

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 763 342**

51 Int. Cl.:

**G01N 33/53** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2016 PCT/DK2016/050138**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.12.2016 WO16188530**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2016 E 16727297 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2019 EP 3298405**

54 Título: **Biomarcadores para la predicción del desarrollo de hipoxemia debido a lesiones pulmonares agudas**

30 Prioridad:

**22.05.2015 EP 15168879**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

**28.05.2020**

73 Titular/es:

**REGION NORDJYLLAND, AALBORG SYGEHUS (50.0%)**

**Niels Bohrs Vej 30  
9220 Aalborg Ø, DK y  
AALBORG UNIVERSITET (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MALTESEN, RALUCA GEORGIANA;  
RASMUSSEN, BODIL STEEN;  
WIMMER, REINHARD;  
PEDERSEN, SHONA;  
KRISTENSEN, SØREN RISOM y  
HANIFA, MUNSOOR ALI**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

**ES 2 763 342 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

**DESCRIPCIÓN**

Biomarcadores para la predicción del desarrollo de hipoxemia debido a lesiones pulmonares agudas

**Campo técnico de la invención**

5 La presente invención se refiere a biomarcadores para la detección temprana de una hipoxemia causada por daño pulmonar agudo. En particular, la presente invención se refiere a biomarcadores para la detección temprana de pacientes en riesgo de hipoxemia que se han sometido a cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de un bypass cardiopulmonar (CPB).

**Antecedentes de la invención**

10 Los daños pulmonares agudos se diagnostican hoy en día por el grado de hipoxemia, poniendo en peligro dicha afección a la vida y afectando a más de un millón de personas en todo el mundo cada año. Esta afección puede desarrollarse en la semana siguiente después de sufrir eventos fisiopatológicos como, p. ej., neumonías, inhalación de agentes tóxicos, aspiración de contenidos gástricos, sepsis, CPB, cirugía mayor, transfusión de sangre y traumatismos graves, entre otros. Independientemente del factor desencadenante inicial, el resultado es un intercambio anormal de gases causado por una inflamación excesiva y una coagulación alterada. La inflamación de  
15 las células endoteliales, la extensión de las uniones celulares, la acumulación de edemas, la aparición de membranas alveolares desnudas, el aumento de la pinocitosis y el colapso alveolar son ciertas características de esta disfunción.

20 Actualmente, ninguna intervención terapéutica ha demostrado todavía ser útil para impedir la progresión de la enfermedad y no existe ninguna prueba diagnóstica definitiva. Por lo tanto, el diagnóstico se basa en la actualidad en cuatro criterios: la aparición aguda de los síntomas, una hipoxemia arterial, infiltrados pulmonares bilaterales en las radiografías torácicas y ausencia de hipertensión en la arteria izquierda. La hipoxemia arterial aparece relativamente tarde y, por lo tanto, es un mal predictor para el diagnóstico precoz. Por lo tanto, la identificación previa de pacientes con riesgo de desarrollar daños pulmonares agudos durante el curso de su enfermedad permitiría desarrollar opciones terapéuticas particularmente dirigidas a dicha enfermedad.

25 Se han realizado esfuerzos sustanciales para comprender la daño pulmonar agudo y múltiples mecanismos parecen estar involucrados. En general, la investigación se centra en comprender el delicado equilibrio entre las respuestas inmunológicas protectoras y las perjudiciales.

30 Bojko et al. (Journal of Pharmaceutical Analysis, vol. 4, no. 1, 1 de febrero de 2014 (2014-02-01), páginas 6-13) describe perfiles metabólicos de muestras de plasma de pacientes sometidos a cirugía cardíaca con el uso de CPB. Bojko et al. no se refiere a los casos de hipoxemia o lesiones pulmonares agudas.

35 Serkova et al. ((2011), American Journal of respiratory and Critical Care Medicine, vol. 184, no. 6, páginas 647-655) y Stringer et al. (American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology, vol. 300, no. 1, 1 de octubre de 2010 (2010-10-01), páginas 4-11) se refieren a la metabolómica usada para el descubrimiento de biomarcadores en enfermedades críticas, como en pacientes con ALI inducida por sepsis. Ambos documentos describen un sistema que comprende un analizador y un procesador para realizar el análisis metabólico.

40 Shah et al. (Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, vol. 143, no. 4, (2011-09-15), páginas 873-878) describe perfiles metabólicos de dicarboxilacilcarnitinas de cadena corta, metabolitos relacionados con cetonas y acilcarnitinas de cadena corta que están asociadas con un resultado adverso después de un injerto de revascularización coronaria (CABG). Los resultados adversos engloban a la supervivencia libre de eventos, los infartos de miocardio, las intervenciones coronarias percutáneas o alguna repetición de CABG. Sin embargo, no se realiza ningún muestreo durante la cirugía o poco después de ésta.

45 Agostoni et al., (European Respiratory Journal, vol. 37, no. 4, 22 de julio de 2010 (2010-07-22), páginas 841-847) describe que el tensor activo proteína B y RAGE aumentan en el plasma durante las derivaciones cardiopulmonares. Se registran durante la cirugía y durante los 2 días siguientes parámetros hemodinámicos y de intercambio de gases.

50 Engels et al. (International Journal of Artificial Organs, vol. 37, no. 9, (2014-09-01), páginas 679-687) describe el uso de Elastasa, CC16 y el tensor activo proteína D como biomarcadores para controlar la función pulmonar en pacientes después de una BCP. Se tomaron muestras de sangre antes de la operación, al cierre de la herida, 2 y 18 horas después de la llegada a la unidad de cuidados intensivos. También se midieron PaO<sub>2</sub>/FiO<sub>2</sub> y el gradiente de Aa-O<sub>2</sub>. No se realizó ninguna medición de los metabolitos.

Engels et al. (Journal of Cardiothoracic Surgery, vol. 8, no. 1, 9 de enero de 2013 (2013-01-09), página 4) describe que se pueden usar SPD y CC16 como biomarcadores en cirugía cardíaca. También se mide la disfunción pulmonar, pero no los metabolitos.

Engels et al. (Disease Markers, vol. 18, no. 3, 1 de enero de 2015 (01-01-2015), páginas 203-210) es una revisión de biomarcadores (péptidos, no metabolitos) para lesiones pulmonares en cirugía cardiotorácica.

5 Por lo tanto, sería ventajoso un mejor método para identificar a pacientes con riesgo de desarrollar daños pulmonares agudos hipoxémicos y, en particular, sería beneficioso para los médicos y la atención al paciente en general desarrollar un método más eficiente y/o fiable para identificar a pacientes con cierto riesgo de desarrollar hipoxemias.

### Compendio de la invención

10 La disfunción pulmonar sigue siendo la complicación más común de la cirugía cardíaca. La presente invención se refiere a un conjunto de biomarcadores que pueden usarse para predecir a los pacientes que desarrollarán hipoxemia en un futuro después de haber sufrido una cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de bypass cardiopulmonar (CPB). Se plantea la hipótesis de que las primeras etapas del daño pulmonar agudo postoperatorio pueden detectarse con metabolitos. En este sentido, se ha investigado si los cambios de metabolitos en la sangre recolectada de la arteria pulmonar (AP) y la aurícula izquierda (LA) en el primer día postoperatorio podrían funcionar como biomarcadores en el desarrollo de hipoxemia. Sorprendentemente, se identificaron potentes biomarcadores predictivos de daño pulmonar agudo postoperatoria dos días antes del diagnóstico clínico.

15 Por lo tanto, un objeto de la presente invención se refiere a la identificación de biomarcadores predictivos para el desarrollo de la hipoxemia.

Por lo tanto, un aspecto de la invención se refiere a un método para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia, comprendiendo el método

20 - proporcionar una muestra biológica (dicha muestra es previamente provista) de un sujeto, que ha sido sometido a cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de un bypass cardiopulmonar (CPB), en el que de dicho sujeto se ha proporcionado dicha muestra entre el inicio de la cirugía (definido como el tiempo de incisión en la piel) y 72 horas después del desenganche del circuito de CPB;

25 - determinar el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en carnitina, citrato, isobutirilglicina, O-N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y ácido isobutírico;

y/o

- determinar la proporción entre niveles de biomarcadores de al menos una relación seleccionada de citrato/fenilalanina, PUFA/fenilalanina, alanina/fenilalanina, citrato/N-óxido de trimetilamina (TMAO), carnitina/TMAO, ácido isobutírico/fenilalanina y/o isobutirilglicina/arginina;

30 - comparar dichos niveles de uno o más biomarcadores o relaciones con uno o más niveles de referencia (metabólicos);

35 - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de uno o más biomarcadores está por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho uno o más niveles son iguales o inferiores respecto a uno o más niveles de referencia;

y/o

40 - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicha una o más relaciones entre los niveles de biomarcadores están por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho nivel de uno o más las relaciones entre niveles de biomarcadores son iguales o inferiores a uno o más niveles de referencia.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia, comprendiendo el método:

45 - proporcionar una muestra biológica, tal como suero, plasma o sangre completa (se ha proporcionado dicha muestra) de un sujeto, habiendo sido, dicho sujeto, sometido a cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de un bypass cardiopulmonar (CPB), en el que dicho sujeto ha proporcionado dicha muestra entre el tiempo de desenganche del CPB (0 horas) (o el inicio de la cirugía (definido como el tiempo de la incisión en la piel)) y 20 horas después del desenganche del circuito de CPB;

- determinar el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en trigonelina; hipoxantina; dopamina; dihidroxifenilalanina (dopa); e inosina;

50 - comparar dichos niveles de uno o más biomarcadores con uno o más niveles de referencia (metabólicos);

- determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de al menos uno de los metabolitos trigonelina, hipoxantina, dopamina e inosina están por debajo de uno o más niveles de referencia, y/o determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho nivel de dihidroxifenilalanina (Dopa) está por encima de uno o más niveles de referencia;

5 o

- determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de al menos uno de los metabolitos trigonelina, hipoxantina, dopamina e inosina son superiores o iguales a uno o más niveles de referencia, y/o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho nivel de dihidroxifenilalanina (Dopa) es inferior o igual a uno o más niveles de referencia;

10 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un método para evaluar la eficacia del tratamiento para prevenir la hipoxemia, comprendiendo el método:

- completar el método de acuerdo con el primer (y/o segundo) aspecto de la invención;

15 - para un sujeto considerado en riesgo de desarrollar hipoxemia, evaluando si un protocolo de tratamiento para la prevención de la hipoxemia da como resultado que dicho sujeto no desarrolle hipoxemia en la siguiente semana desde el desenganche del circuito de CPB.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un sistema dispuesto para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia; comprendiendo el sistema:

- un analizador, tal como un espectrómetro de RMN o un espectrómetro de masas, estando dispuesto:

20 - a recibir una muestra biológica de un sujeto, habiendo sometido dicho sujeto a una cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de un bypass cardiopulmonar (CPB), en el que dicho sujeto ha proporcionado dicha muestra entre el inicio de la cirugía (definida como incisión en la piel) y 72 horas después del desenganche del circuito CPB; y

- a determinar el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en carnitina, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y eicosapentanoico, ácido isobutírico y citrato;

y/o

25 - determinar la proporción entre los niveles de biomarcadores de al menos una proporción seleccionada del grupo de relaciones seleccionadas de citrato/fenilalanina, PUFA/fenilalanina, alanina/fenilalanina, citrato/TMAO, carnitina/TMAO, ácido isobutírico/fenilalanina e isobutirilglicina/arginina;

- un procesador dispuesto a:

- comparar dichos niveles de uno o más biomarcadores o relaciones con uno o más niveles de referencia; y

30 - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de uno o más biomarcadores está por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho uno o más niveles son iguales o inferiores a uno o más niveles de referencia;

y/o

35 - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dichas una o más relaciones entre los niveles de biomarcadores están por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho nivel de una o más relaciones entre niveles de biomarcadores son iguales o inferiores al uno o más niveles de referencia.

40 Debe entenderse que dicho sistema puede combinarse con un analizador existente, p. ej. un espectrómetro de RMN o un espectrómetro de masas, y una computadora, p. ej. una computadora general provista de un software particular dispuesto para realizar al menos parte de uno de los métodos mencionados anteriormente de la presente invención.

Breve descripción de las figuras

Figura 1

45 La Figura 1 muestra huellas metabólicas en suero: Perfiles espectrales de resonancia magnética nuclear (<sup>1</sup>H RMN) Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) de 600 MHz unidimensionales representativos de un paciente que no presenta signos de disfunción pulmonar ni hipoxemia (presión parcial de oxígeno en sangre arterial, PaO<sub>2</sub> = 10,7 kPa u 80,3 mmHg) (negro) y un paciente diagnosticado con daño pulmonar agudo definido por hipoxemia (PaO<sub>2</sub> = 4,9 kPa o 36,8 mmHg) (gris) 72 horas después del desenganche del bypass cardiopulmonar (CPB). La diferencia de espectro (no afectada - hipoxemia) describe fluctuaciones de metabolitos entre pacientes. Se observan niveles más altos de

señales de lipoproteínas, ácidos grasos y niveles más bajos de algunos metabolitos más pequeños en el paciente hipoxémico en comparación con el paciente no afectado.

Figura 2

5 La figura 2 muestra la curva de características operativas del receptor (ROC) de biomarcadores de progresión inicial en daño pulmonar agudo después de una cirugía cardíaca. Los niveles de biomarcadores (ya sea concentraciones de metabolitos individuales o relaciones entre dos metabolitos) se midieron la primera mañana después del desenganche de CPB.

figura 3

10 La Figura 3 muestra las diferencias en los niveles de metabolitos entre los grupos de pacientes expresados como "números de cambios". Los números de cambios metabólicos se calcularon como el cambio porcentual medio entre pacientes leves frente a pacientes no afectados (rectángulos) y pacientes graves frente a pacientes no afectados (rectángulos negros)  $((A-U)/U) * 100$ , donde A = afectado (leve o grave) y U = no afectado). Se descubrió que los metabolitos marcados con un asterisco variaban significativamente entre los grupos mediante el uso de ANOVA unidireccional o su prueba análoga no paramétrica de Kruskal-Wallis (\* 0,09 > p > 0,01, \*\*  $10^{-2}$  > p >  $10^{-3}$ , \*\*\*  $10^{-4}$  > p >  $10^{-5}$ , \*\*\*\* p <  $10^{-5}$ ).

Figura 4

La Figura 4 muestra la distribución de las concentraciones de metabolitos en los grupos de pacientes no afectados (U), afectados levemente (M) y severamente (S) por hipoxemia, medidos en la primera mañana después del desenganche del CPB.

20 Figura 5

La Figura 5 muestra la distribución de las relaciones metabólicas más significativas encontradas diferenciando los tres grupos de pacientes (no afectados (U), levemente (M) y severamente (S)).

Figura 6

25 Proceso de trabajo del método informático descrito en la invención. El cuadro de la izquierda representa las técnicas de procesamiento estándar aplicadas para los estudios de RMN y metabonómica que están integrados en paquetes conectados al sistema RMN. El cuadro de la derecha representa el flujo de trabajo actual y contiene una secuencia de comandos/prueba que realiza: 1) el preprocesamiento automático de los datos espectrales (transformación generalizada de registros, normalización, escalado), 2) la eliminación de características de regiones espectrales que no se correlacionan con los valores de PaO<sub>2</sub> utilizados en el diagnóstico durante tres días después de la operación, 30 3) análisis de datos estadísticos multivariados con el uso de la técnica de aprendizaje automático de regresión PLS para predecir los valores de oxigenación (PaO<sub>2</sub> o PaO<sub>2</sub>/Fi O<sub>2</sub> en kPa), 4) calibración y validación de los resultados de la regresión PLS, 5) visualización de los resultados, incluidos los detalles pronosticados de un paciente basado en los modelos utilizados como referencias, 6) análisis de datos estadísticos multivariados con el uso de la técnica de aprendizaje automático PLS-DA para detectar enfermedades, evaluar el diagnóstico (hipoxemia o nada) y 35 determinar el riesgo de ARDS, 7) calibración y validación de los resultados de PLS-DA, 8) visualización de los resultados, incluidos los detalles pronosticados de un paciente según los modelos utilizados como referencia. Debido a que la secuencia de comandos/programa contiene 500 espectros como referencias en muestras de suero recolectadas en diferentes momentos (después de la toracotomía (incisión en la piel) pero antes del acoplamiento al CPB, justo después del desenganche del CPB (0 horas, 2 horas, 4 horas y 8 horas después de la CPB)), también 40 puede ser aplicable para controlar el efecto de diferentes tratamientos e intervenciones terapéuticas y para determinar si la condición de un paciente está en erupción o remisión después de que se haya iniciado un tratamiento.

Figura 7

45 Ejemplo representativo de regiones de interés encontradas que se correlacionan con el grado de hipoxemia determinado tres días después de la operación por la prueba clínica estándar. Las regiones numeradas corresponden a 1) Histidina, 2) Fenilalanina, 3) PUFA, 4) Carnitina, 5) TMAO, 6) Citrato, 7) N-AcGlc y 8) Alanina.

Figura 8

La Figura 8 muestra la concentración relativa de metabolitos representados como gráficos de histograma con la media y la desviación estándar indicada por los intervalos de confianza del 95%.

50 A) trigonelina; B) hipoxantina; C) dopamina; D) Dihidroxfenilalanina (Dopa); y E) inosina. '-CPB' = después de esternotomía pero antes de CPB; '+ CPB' = después del desenganche de CPB (0 horas); '2 h' = 2 horas después del desenganche del CPB; '4 h' = 4 horas después del desenganche del CPB; '8 h' = 8 horas después del desenganche del CPB; '20 h' = 20 horas después del desenganche de CPB. "Ninguno" = pacientes que no presentan hipoxemia

(no afectados; "Leve" = pacientes afectados levemente por hipoxemia y "Severo" = pacientes afectados severamente por hipoxemia.

La presente invención se describirá a continuación con más detalle en las siguientes secciones.

Descripción detallada de la invención

5 Definiciones

Antes de discutir la presente invención con detalle, primero se definirán los siguientes términos y convenciones:

Hipoxemia

10 La hipoxemia es una condición peligrosa, en la que el contenido de oxígeno en la sangre arterial cae por debajo de los niveles normales. Una disminución en el suministro de oxígeno afecta a los pulmones, el cerebro, el hígado y otros órganos, y cuya afección más grave puede provocar insuficiencia orgánica e incluso la muerte. Los casos de hipoxemia más graves se observan en pacientes que padecen un síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), que tiene una tasa de mortalidad del 20-40%. En el presente contexto, la hipoxemia se define como la relación entre la presión parcial de oxígeno arterial ( $PaO_2$ ) y la fracción de oxígeno inspirado ( $FiO_2$ ). Se considera que los  
15 pacientes que presentan valores de  $PaO_2/FiO_2$  por debajo de 40 kPa (300 mmHg) tienen un daño pulmonar agudo. Cuanto más bajo es el valor, más grave es la condición.

Lesión aguda pulmonar

20 El daño pulmonar agudo (ALI) es una enfermedad heterogénea, que se define por la aparición aguda de insuficiencia respiratoria hipoxémica, con infiltrados pulmonares en la radiografía de tórax debido a un edema pulmonar no cardiogénico. Los valores de  $PaO_2/FiO_2$  en pacientes con ALI están por debajo de 40 kPa (300 mmHg); donde  $PaO_2$  es la presión parcial de oxígeno en la sangre arterial, y  $FiO_2$  es la fracción de  $O_2$  inspirado.

Bypass cardiopulmonar (CPB)

El bypass cardiopulmonar (CPB) es una técnica que asume temporalmente la función del corazón y los pulmones durante la cirugía cardíaca, manteniendo la circulación de la sangre y el intercambio de gases. El CPB en sí mismo a menudo se denomina máquina corazón-pulmón o "la bomba".

25 Nivel de referencia

En el contexto de la presente invención, la expresión "nivel de referencia" se refiere a un estándar en relación con una cantidad, con la que se pueden comparar otros valores o características.

30 En una realización de la presente invención, es posible determinar un nivel de referencia investigando la abundancia de uno o más de los biomarcadores de acuerdo con la invención en muestras (de sangre) de sujetos que no desarrollaron hipoxemia bajo la misma condición quirúrgica. Al aplicar diferentes medios estadísticos, como el análisis multivariado, se pueden calcular uno o más niveles de referencia.

En base a estos resultados, se puede obtener un límite que muestre la relación entre los niveles detectados y los pacientes en riesgo. De este modo, el límite puede usarse para determinar la cantidad de uno o más biomarcadores, lo que corresponde, por ejemplo, a un mayor riesgo de desarrollar hipoxemia.

35 Evaluación de riesgos

Los presentes inventores han desarrollado con éxito un nuevo método para predecir el riesgo de desarrollar hipoxemia para un paciente con varios días de anticipación. Los resultados presentados en los ejemplos muestran que los biomarcadores descritos (solos o en combinación) parecen ser marcadores eficientes para determinar si un paciente tiene un mayor riesgo de desarrollar hipoxemia postoperatoria.

40 Para determinar si un paciente tiene un mayor riesgo de desarrollar hipoxemia debido a complicaciones pulmonares relacionadas, como un daño pulmonar agudo, se debe establecer un límite. Este límite puede ser establecido por el laboratorio, el médico o caso por caso para cada paciente.

El nivel de corte podría establecerse utilizando varios métodos, que incluyen:

45 pruebas estadísticas multivariadas (como análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA), bosque aleatorio, máquina de vectores de soporte, etc.), percentiles, media más o menos desviación estándar; valor medio; número de cambios.

El análisis discriminante multivariante y otras evaluaciones de riesgos se pueden realizar en los paquetes estadísticos informáticos gratuitos o disponibles en el mercado (SAS, SPSS, Matlab, R, etc.) u otros paquetes de software estadístico o software de detección conocidos por los expertos en la materia.

Como es obvio para cualquier experto en la técnica, en cualquiera de las realizaciones discutidas anteriormente, cambiar el nivel de corte de riesgo podría cambiar los resultados del análisis discriminante para cada paciente.

5 La estadística permite evaluar la importancia de cada nivel de metabolito. Las pruebas estadísticas comúnmente utilizadas aplicadas a un conjunto de datos incluyen pruebas t, pruebas f o incluso pruebas más avanzadas y métodos de comparación de datos. El uso de tal prueba o método permite determinar si dos o más muestras son significativamente diferentes o no.

La importancia puede determinarse mediante la metodología estadística estándar conocida por los expertos en la materia.

El nivel de referencia elegido puede cambiarse dependiendo del mamífero/sujeto para el cual se aplica la prueba.

10 Preferiblemente, el sujeto de acuerdo con la invención es un sujeto humano.

El nivel de referencia elegido puede cambiarse si se desea para dar una especificidad o sensibilidad diferente como se conoce en la técnica. La sensibilidad y la especificidad son variables estadísticas ampliamente utilizadas para describir y cuantificar cómo de bueno y confiable es un biomarcador o una prueba diagnóstica. La sensibilidad evalúa cómo de bueno es un biomarcador o una prueba diagnóstica para detectar una enfermedad, mientras que la especificidad estima la probabilidad de que un individuo (es decir, un control, un paciente sin enfermedad) pueda identificarse correctamente como no enfermo.

20 Se utilizan varios términos junto con la descripción de sensibilidad y especificidad; verdaderos positivos (TP), verdaderos negativos (TN), falsos negativos (FN) y falsos positivos (FP). Si se demuestra que una enfermedad está presente en un paciente enfermo, el resultado de la prueba diagnóstica se considera TP. Si una enfermedad no está presente en un individuo (es decir, control, paciente sin enfermedad), y la prueba de diagnóstico confirma la ausencia de enfermedad, el resultado de la prueba es TN. Si la prueba de diagnóstico indica la presencia de enfermedad en un individuo sin dicha enfermedad, el resultado de la prueba es FP. Finalmente, si la prueba de diagnóstico indica que no hay presencia de enfermedad en un paciente con enfermedad, el resultado de la prueba es FN.

25 Sensibilidad

Sensibilidad =  $TP/(TP + FN)$  = número de evaluaciones positivas verdaderas/número de todas las muestras de pacientes con enfermedad.

30 Como se usa en este documento, la sensibilidad se refiere a las medidas de la proporción de positivos reales que se identifican correctamente como tales, en analogía con una prueba de diagnóstico, es decir, el porcentaje de personas que tienen PaO<sub>2</sub> por debajo de lo normal que se identifican como PaO<sub>2</sub> por debajo de lo normal.

Especificidad

Especificidad =  $TN/(TN + FP)$  = número de evaluaciones negativas verdaderas/número de todas las muestras de los controles.

35 Como se usa en este documento, la especificidad se refiere a las medidas de la proporción de negativos que se identifican correctamente, es decir, el porcentaje de mamíferos o personas que tienen PaO<sub>2</sub> en un nivel normal y que se identifican como que tienen PaO<sub>2</sub> en un nivel normal. La relación entre sensibilidad y especificidad puede evaluarse mediante la curva ROC. Esta representación gráfica ayuda a decidir el modelo óptimo mediante la determinación del mejor umbral o límite para una prueba de diagnóstico o un candidato a biomarcador.

40 Como entenderán generalmente los expertos en la materia, los métodos de detección son procesos de toma de decisiones y, por lo tanto, la especificidad y sensibilidad elegidas dependen de lo que se considera el resultado óptimo por una institución/personal clínico determinado.

Sería obvio para toda persona experta en la técnica que puede ser ventajoso seleccionar una mayor sensibilidad a expensas de una menor especificidad en la mayoría de los casos, para identificar tantos pacientes con enfermedad como sea posible.

45 En una realización preferida, la invención se refiere a un método con una alta especificidad, tal como al menos 70%, tal como al menos 80%, tal como al menos 90%, tal como al menos 95%, tal como 100%.

En otra realización preferida, la invención se refiere a un método con una alta sensibilidad, tal como al menos 80%, tal como al menos 90%, tal como 100%.

50 Otra parte de la invención se refiere a un método en el que la relación entre al menos dos marcadores se usa para predecir si un sujeto está o no en riesgo de desarrollar hipoxemia.

Método para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia.

Como se describió anteriormente, los presentes inventores han identificado un nuevo conjunto de biomarcadores, que pueden usarse para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia para un sujeto que se ha sometido a cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de bypass cardiopulmonar (CPB). Por lo tanto, el primer aspecto de la invención se refiere a un método para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia, comprendiendo el método:

5 - proporcionar una muestra biológica (dicha muestra ha sido proporcionada) de un sujeto, habiendo dicho sujeto sido sometido a cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de un bypass cardiopulmonar (CPB), en el que dicha muestra ha sido proporcionada por dicho sujeto entre el inicio de la cirugía (definida como incisión en la piel) y 72 horas después del desenganche del circuito de CPB;

10 - determinar el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en carnitina, citrato, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y ácido isobutírico;

y/o

15 - determinar la relación entre niveles de marcadores de al menos una relación seleccionada del grupo de relaciones seleccionadas de citrato/fenilalanina, PUFA/fenilalanina, alanina/fenilalanina, citrato/N-óxido de trimetilamina (TMAO), carnitina/TMAO, ácido isobutírico/fenilalanina, e isobutirilglicina/arginina;

- comparar dichos niveles de uno o más biomarcadores o relaciones con uno o más niveles de referencia;

20 - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de uno o más biomarcadores está por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho uno o más niveles son iguales o inferiores a uno o más niveles de referencia;

y/o

25 - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dichas una o más relaciones entre los niveles de biomarcadores están por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho nivel de una o más relaciones entre niveles de biomarcadores son iguales o inferiores a uno o más niveles de referencia.

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un método para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia, comprendiendo el método:

30 - proporcionar una muestra biológica, tal como suero, plasma o sangre completa (se ha proporcionado dicha muestra) de un sujeto, habiéndose sometido dicho sujeto a cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de un bypass cardiopulmonar (CPB), en el que dicho sujeto ha proporcionado dicha muestra entre el tiempo de desenganche del CPB (0 horas) (o el inicio de la cirugía (definido como el tiempo de la incisión en la piel)) y 20 horas después del desenganche del circuito de CPB;

- determinar el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en trigonelina; hipoxantina; dopamina; dihidroxifenilalanina (Dopa); e inosina;

35 - comparar dichos niveles de uno o más biomarcadores con uno o más niveles de referencia (metabólicos);

- determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de al menos uno de los metabolitos trigonelina, hipoxantina, dopamina e inosina están por debajo de uno o más niveles de referencia, y/o determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho nivel de dihidroxifenilalanina (Dopa) está por encima de uno o más niveles de referencia;

40 o

determinar que dicho sujeto no tiene riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de al menos uno de los metabolitos trigonelina, hipoxantina, dopamina e inosina son superiores o iguales a uno o más niveles de referencia, y/o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho nivel de dihidroxifenilalanina (Dopa) es inferior o igual a uno o más niveles de referencia.

45 Para dicho segundo aspecto, los niveles de los biomarcadores se determinan preferiblemente en las siguientes 20 horas posteriores a la separación del circuito CPB, más preferiblemente en las siguientes 4 horas, y aún más preferiblemente en los siguientes minutos después de la separación/desenganche del circuito CPB, como en los siguientes 10 minutos, como en los siguientes 5 minutos o como en los siguientes 2 minutos.

50 Debido a que la hipoxemia normalmente se desarrolla en los 3-7 días posteriores a una exposición inicial como la BCP, es deseable una predicción inicial de la afección. Para lograr una predicción inicial, puede ser ventajoso obtener/proporcionar (o haber proporcionado) la muestra (de sangre) en varios momentos poco después de la

- 5 cirugía, dentro de un intervalo de 2 días después de la operación. Por lo tanto, en una realización, dicha muestra se proporciona (o se ha proporcionado) de dicho sujeto en las siguientes 48 horas posteriores a la separación del circuito CPB, como en las siguientes 30 horas, como en las siguientes 20 horas, como en las siguientes 16 horas, como en las siguientes 10 horas, como en las siguientes 8 horas, como en las siguientes 5 horas, como en las siguientes 4 horas, como en las siguientes 2 horas, como en la siguiente hora, o justo después del desenganche del circuito CPB. En otra realización, dicha muestra se proporciona (o se ha proporcionado) de dicho sujeto (por ejemplo, 2 horas o 90 minutos, o 60 minutos) antes de la separación del circuito CPB hasta 2 horas después de la separación del circuito CPB.
- 10 En el ejemplo 2, las muestras se obtuvieron la primera mañana (16 horas) después del desenganche del CPB. En el ejemplo 5, se obtuvieron muestras en diferentes momentos después de la separación del CPB ( $t = 0$  hasta  $t = 8$  horas).
- 15 En el ejemplo 6 se muestra que las muestras se obtuvieron en diferentes momentos después de la esternotomía pero antes del CPB y después del desenganche del CPB ( $t = -\text{CPB}$ ,  $t = +\text{CPB}$  (0 horas) hasta  $t = 20$  horas). Todos los ejemplos proporcionan fuertes valores predictivos en relación con el riesgo de desarrollar hipoxemia.
- 20 Por supuesto, debe entenderse que los niveles en la relación indicada también podrían revertirse matemáticamente, lo que daría como resultado que el riesgo indicado sería lo contrario. Se considera que esto también forma parte de la presente invención.
- Se puede predecir que la hipoxemia prevista ocurrirá en diferentes períodos de tiempo. Por lo tanto, en otra realización, se predice que la hipoxemia se produce en la siguiente semana desde el inicio de la cirugía cardíaca, tal como en las siguientes 72 horas, tal como en las siguientes 60 horas, o tal como en las siguientes 48 horas, preferiblemente en las siguientes 72 horas.
- 25 En una realización, dicho sujeto ha proporcionado dicha muestra después de la esternotomía pero antes del desenganche del circuito de CPB hasta 2 horas después del desenganche del circuito de CPB.
- 30 Cuando se obtiene la muestra, el sujeto normalmente tendrá niveles normales de oxígeno ( $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 > 40$  kPa ( $> 300$  mmHg)) y, por lo tanto, no sufrirá hipoxemia. Por lo tanto, en una realización adicional, dicho sujeto tiene niveles normales de oxigenación de la sangre en el momento en que se obtuvo la muestra, tal como tener un  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  igual o superior a 40 kPa (300 mmHg). Para aumentar el valor predictivo del método, el método de la invención determina preferiblemente más de un biomarcador. Por lo tanto, en una realización, se determinan los niveles de al menos dos biomarcadores. En otra realización, se determinan los niveles de al menos tres biomarcadores, como al menos cuatro biomarcadores, como al menos cinco biomarcadores, como al menos seis biomarcadores.
- En otra realización, se determinan al menos las relaciones entre citrato/fenilalanina, PUFA/fenilalanina y alanina/fenilalanina.
- 35 En otra realización, se determinan al menos los niveles de carnitina y citrato. En otra realización más, se determinan al menos los niveles de carnitina y citrato, y la relación citrato/U (metabolito no identificado que ocurre a 5,10-5,08 ppm en nuestro espectro de RMN). En otra realización más, se determinan al menos los niveles de carnitina, citrato, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y ácido isobutírico.
- 40 El tipo de material de muestra puede variar. Por lo tanto, en una realización, la muestra es una muestra de sangre, tal como sangre completa, suero y/o plasma. La muestra de sangre puede haber sido provista desde diferentes lugares del sujeto. En una realización, la muestra de sangre se ha obtenido de la aurícula izquierda (LA), la arteria pulmonar (PA), sangre venosa y/o sangre arterial.
- La determinación de la presencia y los niveles de estos metabolitos en una muestra se puede realizar por muchos métodos diferentes. Por lo tanto, en una realización, dicho nivel de biomarcadores se determina mediante un método seleccionado del grupo que consiste en espectrometría de masas (GC-MS, LC-MS), HPLC, Raman, NIR y espectroscopía de RMN. La persona experta puede identificar otros métodos, que pueden usarse.
- 45 La gravedad de la hipoxemia puede variar. En una realización, dicho sujeto se determina que está en riesgo de tener una hipoxemia leve. En el presente contexto, los pacientes con hipoxemia leve tienen un  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  en el intervalo entre 40-26,6 kPa (300-200 mmHg).
- En otra realización, se determina que dicho sujeto se encuentra en riesgo de tener hipoxemia severa. En el presente contexto, la hipoxemia severa se define como pacientes que tienen una  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 26,6$  kPa (200 mmHg).
- 50 El tipo de cirugía cardíaca a corazón abierto puede variar. Por lo tanto, en una realización, dicha cirugía a corazón abierto se selecciona del grupo que consiste en injerto de derivación de arteria coronaria y cirugía valvular.
- Los niveles de referencia pueden determinarse de diferentes maneras. En una realización, dichos uno o más niveles de referencia se determinan a partir de los niveles de dichos biomarcadores en muestras de sangre de sujetos que

se sometieron a cirugía a corazón abierto con el uso de CPB, que no desarrollaron hipoxemia después de la operación como se diagnostica mediante pruebas de diagnóstico estándar al menos 3 días después de la operación.

5 El valor predictivo del método puede incrementarse aún más al incluir biomarcadores adicionales en el ensayo. La Tabla 4 enumera algunos de los biomarcadores identificados que también tienen un valor predictivo, aunque con un poder predictivo más bajo. Por lo tanto, en una realización, dicho método comprende además determinar el nivel de al menos un marcador seleccionado del grupo listado en la Tabla 4.

En ese caso, la determinación según el método de la invención sería:

10 - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dichos uno o más niveles de biomarcadores están por debajo/por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dichos uno o más niveles de los biomarcadores son iguales, están por encima/por debajo de uno o más niveles de referencia.

De la tabla 4, los expertos podrán adaptar el método en consecuencia.

Inicio del tratamiento basado en la predicción.

15 Si un sujeto se considera que está en riesgo de desarrollar hipoxemia, puede ser ventajoso iniciar un tratamiento preventivo para evitar que ocurra la hipoxemia. Por lo tanto en otra realización de la invención el método comprende además, para un sujeto considerado en riesgo de desarrollar hipoxemia inicial,

- proporcionar a dicho sujeto un protocolo de tratamiento inicial para la prevención de la hipoxemia, tal como un tratamiento antioxidante, tratamiento antiinflamatorio, administración de glucosa, tratamiento con insulina, suplementación con oxígeno, soporte respiratorio y/o tratamiento con líquidos;

20 y/o

- poner a dicho sujeto bajo observación para observar el desarrollo de hipoxemia.

Método para evaluar la eficacia del tratamiento para prevenir la hipoxemia.

25 Al identificar los biomarcadores que permiten la predicción inicial de la hipoxemia en un sujeto, también es posible probar/evaluar posibles protocolos de tratamiento que pueden prevenir el desarrollo de la hipoxemia. Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a un método para evaluar la eficacia del tratamiento para prevenir la hipoxemia, comprendiendo el método:

- completar el método de acuerdo con el primer aspecto de la invención; y

30 - para un sujeto considerado en riesgo de desarrollar hipoxemia, evaluar si un protocolo de tratamiento para la prevención de la hipoxemia da como resultado que dicho sujeto no desarrolle hipoxemia al cabo de una semana después del desenganche del circuito de CPB.

35 En ciertas realizaciones, después del Ejemplo 5 siguiente, el método comprende aplicar espectroscopía RMN en dicha muestra biológica, p. ej. 1D RMN, para llegar a un espectro resultante que cubra un rango espectral representativo de dichos biomarcadores, y aplicar un algoritmo informático en respuesta, para determinar un resultado indicativo de que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia. Especialmente, dicha muestra biológica, tal como una muestra de sangre, la ha proporcionado dicho sujeto entre el inicio de la cirugía (definida como incisión en la piel) y hasta 24 horas después del desenganche del circuito de CPB (preferiblemente hasta 8 horas). Preferiblemente, la muestra es una muestra de suero.

40 Más específicamente, dicho sujeto ha proporcionado dicha muestra biológica entre un tiempo durante la cirugía, tal como desde el desenganche del circuito de CPB hasta 8 horas después del desenganche del circuito de CPB. En el contexto actual, el final de la cirugía se define como el tiempo del cierre de la piel (como por medio de suturas), que a menudo se producirán entre 1 y 2 horas después del desenganche del CPB. Como se muestra en las tablas 5 y 6, se pueden obtener valores predictivos fuertes del riesgo de desarrollar hipoxemia justo después del desenganche del circuito de CPB.

45 El método puede comprender seleccionar del espectro resultante una pluralidad de intervalos espectrales (o regiones), en el que se selecciona una combinación de intervalos espectrales para cubrir al menos rangos espectrales indicativos de al menos uno de: arginina, fenilalanina, PUFA, alanina, TMAO, carnitina, ácido isobutírico, isobutirilglicina y citrato. Especialmente, la combinación de intervalos espectrales se puede seleccionar para cubrir todos en el grupo de: arginina, fenilalanina, PUFA, alanina, TMAO, carnitina, ácido isobutírico, isobutirilglicina y citrato. Estos compuestos son parte de las proporciones consideradas las más relevantes según la presente invención. En una realización adicional, la combinación de rangos espectrales se selecciona para cubrir al menos rangos espectrales indicativos de al menos uno de: carnitina, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y eicosapentanoico, ácido isobutírico y citrato. En otra realización adicional, la combinación de rangos

espectrales se puede seleccionar para cubrir todo: carnitina, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y eicosapentanoico, ácido isobutírico y citrato.

5 La combinación de rangos espectrales puede seleccionarse para cubrir al menos rangos espectrales indicativos de al menos 14 metabolitos, tales como 14-19 metabolitos. El método puede comprender realizar un análisis estadístico informático de dicha combinación de intervalos espectrales, tal como un análisis estadístico informático que implica aplicar un algoritmo de aprendizaje automático. El método puede comprender presentar una salida visual indicativa de que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, p. ej. una presentación de datos que permita a un clínico determinar si dicho sujeto está o no en riesgo de desarrollar hipoxemia.

10 Siguiendo el Ejemplo 5, un aspecto de la invención puede definirse como un método para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia, comprendiendo el método:

- proporcionar una muestra biológica de un sujeto, habiendo sido sometido dicho sujeto a una cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de bypass cardiopulmonar (CPB), en la que dicho sujeto ha proporcionado dicha muestra entre el inicio de la cirugía (definida como incisión en la piel) y 72 horas después del desenganche del circuito CPB;

15 - aplicar espectroscopía de RMN en dicha muestra biológica, tal como realizar un análisis de 1D CPMG RMN para llegar al espectro resultante representativo del nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en carnitina, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y eicosapentanoico, ácido isobutírico y citrato;

y/o

20 - dicho espectro resultante es representativo de la relación entre niveles de biomarcadores de al menos una relación seleccionada del grupo de relaciones seleccionadas de citrato/fenilalanina, PUFA/fenilalanina, alanina/fenilalanina, citrato/TMAO, carnitina/TMAO, ácido isobutírico/fenilalanina e isobutirilglicina/arginina;

y

25 - aplicar un algoritmo informático en dicho espectro resultante que implica una comparación con los datos de referencia, para determinar si dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia y/o para determinar si dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia.

Además, siguiendo el Ejemplo 5, un aspecto de la invención puede definirse como un producto informático que tiene instrucciones que, cuando se ejecutan en un procesador, hacen que el procesador:

30 - reciba datos que representan un espectro resultante de un espectroscopio de RMN representativo del nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en carnitina, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y eicosapentanoico, ácido isobutírico y citrato;

y/o

- dicho espectro resultante es representativo de la relación entre niveles de biomarcadores de al menos una relación seleccionada del grupo de relaciones seleccionadas de citrato/fenilalanina, PUFA/fenilalanina, alanina/fenilalanina, citrato/TMAO, carnitina/TMAO, ácido isobutírico/fenilalanina e isobutirilglicina/arginina;

35 y

- aplicar un algoritmo de procesamiento en dicho espectro resultante que implique una comparación con los datos de referencia, para determinar si dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia y/o para determinar si dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia.

40 Dicho producto informático puede estar diseñado para ejecutarse en una computadora portátil, un servidor, parcial o totalmente integrado con un software particularizado para un espectrómetro de RMN, etc. El espectro resultante determinado por el espectrómetro de RMN puede transferirse por cable o ser inalámbrico con respecto a un dispositivo de procesamiento separado dispuesto para ejecutar el producto del programa informático. Especialmente, el producto informático puede estar presente en un medio legible por ordenador.

Otros aspectos de la invención.

45 Se piensa que el método según la invención también puede encontrar un uso en otras afecciones médicas que sean desencadenantes de daños pulmonares agudos. Estas condiciones están relacionadas con la condición médica actual (cirugía a corazón abierto con el uso de CPB), al relacionarse también con un daño pulmonar agudo como se describió anteriormente.

50 Estas condiciones pueden ser sepsis, neumonía, trauma severo, inhalación de agentes tóxicos, aspiración de contenido gástrico, cirugía mayor y transfusiones.

Por lo tanto, en un aspecto adicional, la invención se refiere a un método para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia, comprendiendo el método:

- proporcionar una muestra biológica de un sujeto considerado en riesgo de desarrollar hipoxemia;
  - 5 - determinar el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en carnitina, citrato, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y ácido isobutírico;
  - y/o
  - determinar la relación entre niveles de marcadores de al menos una relación seleccionada del grupo de relaciones seleccionadas de citrato/fenilalanina, PUFA/fenilalanina, alanina/fenilalanina, citrato/TMAO, carnitina/TMAO, ácido isobutírico/fenilalanina e isobutirilglicina/arginina;
  - 10 - comparar dichos niveles de uno o más biomarcadores o relaciones con uno o más niveles de referencia;
  - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de uno o más biomarcadores está por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho uno o más niveles son iguales o inferiores a uno o más niveles de referencia;
  - 15 y/o
  - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dichas una o más relaciones entre los niveles de biomarcadores están por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho nivel de una o más relaciones entre niveles de biomarcadores son iguales o inferiores a uno o más niveles de referencia.
  - 20 En una realización específica, dicho sujeto experimenta sepsis, neumonía, trauma severo como cirugía cardíaca, aórtica, torácica y espinal, lesión cerebral traumática, trasplante de pulmón, traumas múltiples y transfusiones, o ha inhalado agentes tóxicos o contenidos gástricos aspirados.
- Debe observarse que las realizaciones y características descritas en el contexto de alguno de los aspectos de la presente invención también se aplican a los otros aspectos de la invención.
- 25 La invención se describirá a continuación con más detalle en los siguientes ejemplos no limitantes.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1

Métodos empleados para identificar biomarcadores, que son biomarcadores tempranos para el desarrollo de la hipoxemia.

#### 30 Grupo de pacientes y resultados clínicos

Se obtuvieron muestras de suero de cuarenta y siete (n = 47) pacientes sometidos a injerto de revascularización coronaria (CABG). Tres días después de la operación, 15 pacientes no mostraron signos de hipoxemia; mientras que 32 desarrollaron hipoxemia con PaO<sub>2</sub> por debajo de los valores normales.

#### Preparación de las muestras

- 35 Para evitar sesgos preanalíticos debido a la recolección de muestras, todas las muestras de sangre fueron recolectadas y preparadas por la misma persona. Se obtuvieron muestras de sangre tanto de la aurícula izquierda (LA) como de la arteria pulmonar (PA) exactamente 16 h después del desenganche del circuito CPB. Para obtener muestras de suero, se dejó que la sangre se coagulara a temperatura ambiente durante 30 minutos y, posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Las alícuotas de suero LA y PA se almacenaron
- 40 inmediatamente a -80°C hasta que se analizaron.

#### Preparación de muestras para RMN

- 45 Antes de las mediciones RMN, las muestras se descongelaron durante 2 horas a 4°C, se agitaron en vórtex y se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C y 14000 rpm para eliminar las células y otros materiales precipitados. Se mezclaron alícuotas de 400 µl de sobrenadante con 200 µl de tampón fosfato 0,2 M (pH 7,4, lectura del medidor sin corregir) en <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99% <sup>2</sup>H) para minimizar las variaciones en el pH y reducir la viscosidad del suero. Durante todo el procedimiento, las muestras se mantuvieron en hielo. La mezcla se pipeteó en un tubo de RMN de 5 mm y se realizó un análisis de RMN.

#### Mediciones de RMN

- Los espectros se adquirieron en un espectrómetro de RMN Bruker DRX-600 (Bruker BioSpin, Alemania y Suiza) equipado con una sonda TXI (hidrógeno, carbono, nitrógeno) (Bruker BioSpin, Suiza) que funcionaba a 600,13 MHz para  $^1\text{H}$ . Los experimentos se adquirieron a una temperatura constante de 310,1 K (37°C). Para el análisis, se usó un experimento Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) editado con atenuación T2. Este experimento atenúa las señales amplias de las proteínas y lipoproteínas que caen lentamente. Se recogieron 128 desintegraciones por inducción libre (FID) con 32768 puntos de datos complejos en un ancho espectral de 11,97 ppm y un tiempo de adquisición de 2,28 s. Se aplicó un retraso de atenuación de 2 s entre cada FID durante el cual se aplicó una irradiación de onda continua débil ( $\gamma\text{Bi}/2\pi = 26,6$  Hz) a la frecuencia del agua (presaturación). El retraso total de atenuación del spin-eco fue de 67,4 ms y consistió en elementos ( $\tau$ - $\pi$ - $\tau$ ), donde  $\tau$  es un retraso de 0,4 ms y  $\pi$  es un pulso de 180° de 22 $\mu$ s de longitud. El procesamiento espectral se realizó en TopSpin versión 2.1 (Bruker BioSpin, Alemania). Antes de la transformación de Fourier, la multiplicación exponencial correspondiente a un ensanchamiento de la línea de 0,3 Hz se aplicó a los FID, que se rellenaron a cero por un factor de 2 para duplicar el número de puntos. Los espectros se corrigieron manualmente con respecto a la fase y a la línea de base, y la señal de metilo de lactato se usó como referencia del desplazamiento químico a 1,33 ppm.
- Para la identificación del metabolito, se adquirieron tres tipos de experimentos bidimensionales (2D). Se adquirieron experimentos  $^1\text{H}$ -RMN con resolución J 2D, con pre-saturación de agua durante un retraso de relajación de 2 segundos, con 8 FID para cada uno de los 80 incrementos. El ancho espectral se ajustó a 11,6 ppm y 54,7 Hz en dirección F2 y F1, respectivamente. Antes de la transformación 2D-Fourier, ambas dimensiones se multiplicaron por una función de campana sinusoidal no desplazada y el número de puntos se duplicó con relleno de cero. Además, los espectros fueron inclinados 45° y se hicieron simétricos a lo largo del eje F1. Después del procesamiento, las proyecciones de horizonte de los espectros 2D resueltos en J se corrigieron y calibraron manualmente en la línea de base utilizando el centro de la señal de metilo del lactato. Se realizaron espectros 2D homonucleares  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ -TOCSY (espectroscopía de correlación total) y  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HSQC (espectros de coherencia cuántica heteronuclear) con la presaturación en muestras representativas, con diferentes números de FID, incrementos, anchos espectrales y tiempos de mezcla para enfocarse en diferentes regiones espectrales. La información obtenida de estos espectros se utilizó para encontrar metabolitos coincidentes en la Base de datos del metaboloma humano. Se realizaron otras asignaciones de metabolitos utilizando AMIX (v. 3.9.10, Bruker BioSpin), bases de datos BRUKER bbiorefcodes (2.7.0-2.7.3) y bibliografía.

#### Quantificación de los datos RMN

- Se realizó utilizando la herramienta de integración múltiple AMIX. Los picos de interés se integraron utilizando la opción de análisis de forma en línea con un factor de ruido fijo de 3,5 y un umbral de forma de línea de 0,01. Los picos se integraron utilizando la suma de todos los puntos de la región como modo de integración, y se normalizaron a la región del metabolito de glucosa (3,52 ppm (H-5 de  $\beta$ -glucosa) y 5,24 ppm (H-1 de  $\alpha$ -glucosa)). Se usó una distribución de equilibrio 36:64 entre  $\alpha$ - y  $\beta$ -glucosa para los cálculos. Para calcular la concentración de un metabolito dado, se utilizó la siguiente fórmula:

$$C_X [mM] = \frac{I_X}{N_X} \cdot C_{Glucosa} \cdot 0.64 \frac{N_{\beta-Glucosa}}{I_{\beta-Glucosa}}$$

- donde  $C_X$  es la concentración de metabolito en mM,  $I_X$  es la integral del pico del metabolito  $^1\text{H}$ ,  $N_X$  es el número de protones que contribuyen al pico del metabolito  $^1\text{H}$ ,  $C_{Glucosa}$  es la concentración de glucosa determinada químicamente,  $0,64N_{\beta-Glucosa}$  es la cantidad de protones que contribuyen a la señal de  $\beta$ -glucosa (a 3,52 ppm) utilizada como referencia multiplicada por 0,64 (la fracción molar de  $\beta$ -glucosa), e  $I_{\beta-Glucosa}$  es la integral de la señal de  $\beta$ -glucosa a 3,52 ppm.

#### Procesamiento previo de los datos RMN

- Los espectros de CPMG se convirtieron en una matriz n-por-m (n = 94 muestras LA y PA de 47 pacientes, m = 8700 cubetas iguales de 0,001 ppm de ancho) en AMIX (paquete de software Analysis of Mixtures, versión 3.9.10, Bruker BioSpin, Alemania) usando la región entre  $\delta$  9 a 0 ppm, y excluyendo la región de señal de agua entre 4,80-4,5 ppm. El procesamiento adicional y el modelado multivariado se llevaron a cabo en MATLAB R2011b<sup>56</sup> junto con PLS-Toolbox 6.5 (Eigenvector Research, Wenatchee, WA). Los datos agrupados fueron iCoshifted<sup>57</sup>, normalizado a la concentración de lactato medida 16 h después de la cirugía, transformado en logaritmo y autoescalado.

#### Modelado multivariante

- Se emplearon varios enfoques de modelado matemático y estadístico para relacionar los datos de RMN procesados previamente con los fenotipos de las enfermedades. El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) se aplicó para evaluar las posibilidades de diagnóstico de RMN y descubrir biomarcadores. Se identificaron y cuantificaron las variables más importantes obtenidas por el método.

#### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó el software Statistical Package and Services Solutions (SPSS) v22.0. Se calcularon estadísticas descriptivas para cada grupo y los datos cuantitativos se resumieron utilizando la media, la mediana y la desviación estándar.

5 Se aplicó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk seguida de métodos paramétricos o no paramétricos. Al comparar las diferencias de metabolitos entre pacientes no afectados e hipoxémicos ( $\text{PaO}_2 < 8,4\text{kPa}$ ,  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 40$  kPa ( $< 300$  mmHg)), se utilizó una prueba t independiente o la prueba U de Mann-Whitney. Al comparar las diferencias entre los tres grupos (no afectados, leves, severos), ya sea análisis de varianza unidireccional (ANOVA) con Tukey HSD o se aplicaron pruebas post-hoc de comparación múltiple Dunnett T3 (dependiendo de la homogeneidad de la varianza), o la prueba de Kruskal-Wallis con la prueba post-hoc de Dunn. Al comparar los datos  
10 entre la aurícula izquierda y la arteria pulmonar, se utilizó una prueba t pareada o la prueba de suma de rangos con signo de Wilcoxon análogo no paramétrico. La significancia se estableció en  $p < 0,05$ .

Para visualizar los cambios globales entre los grupos, se calcularon las medias o medianas (dependiendo de la distribución de datos) de cada metabolito en el grupo correspondiente. Por tanto, los números de cambios del metabolito se calcularon como la relación entre pacientes leves y no afectados y pacientes graves y no afectados  
15 con la fórmula:

$$FC_{\frac{M(o S)}{U}} [\%] = \frac{M(o S) - U}{U} \cdot 100$$

donde FC = número de cambios en porcentaje, M = leve, U = no afectado, S = grave.

Debido a que la relación entre dos concentraciones de metabolitos puede llevar más información que los dos metabolitos solos, el software libre ROCET (ROC Curve Explorer & Tester)<sup>27</sup> disponible de forma gratuita se usó  
20 para calcular todos los pares posibles de combinaciones de metabolitos que podrían estar relacionadas con resultados posteriores. Las proporciones de metabolitos que exhiben significación estadística ( $p < 0,05$ ) se utilizaron adicionalmente como candidatos a biomarcadores.

La asociación entre metabolitos y valores de  $\text{PaO}_2$  obtenidos 3 días después de la operación fueron evaluados por el análisis de correlación de Pearson. Se establecieron curvas ROC para determinar el valor pronóstico de cada biomarcador en el diagnóstico futuro. Se proporciona el área bajo la curva (AUC) y los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95%.  
25

#### Ejemplo 2

La detección del metaboloma describe signos tempranos de enfermedad:

30 Los fenotipos sistémicos y pulmonares se monitorizaron mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)  $^1\text{H}$ . Un espectro RMN de suero unidimensional (1D) típico se caracteriza por resonancias amplias de lípidos y glucoproteínas, y las resonancias estrechas por provenir de glucosa, lactato y citrato, etc. Dos espectros de dos muestras recolectadas en el primer día postoperatorio (exactamente 16 h después del desenganche de CPB), uno de un paciente que no mostraba signos de hipoxemia ( $\text{PaO}_2 = 10,7$  kPa o 80,2 mmHg), y otro de otro paciente que desarrolló hipoxemia ( $\text{PaO}_2 = 4,9$  kPa o 36,7 mmHg), describen diferencias en varias señales, de las cuales los  
35 lípidos son los más significativos (Figura 1).

Dado que el metaboloma refleja los cambios ambientales, se planteó la hipótesis de que la enfermedad podía reflejarse en los niveles metabólicos el primer día después de la operación. Por lo tanto, se seleccionaron posibles asociaciones entre el metaboloma y los valores hipoxémicos ( $\text{PaO}_2$ ) utilizados en el diagnóstico. Se dividieron a los 32 pacientes diagnosticados con daño pulmonar agudo en pacientes que desarrollaban hipoxemia leve y grave para proporcionar una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes.  
40

Posteriormente, las diferencias entre los tres grupos (hipoxemia no afectada, leve y grave) se evaluaron mediante análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA). Los modelos mostraron  $> 95\%$  de precisión, lo que indicaba un notable rendimiento de la prueba de detección de los inventores.

#### Ejemplo 3

45 Las huellas metabólicas encontradas en la prueba de detección se investigaron más a fondo. Se analizaron 64 metabolitos diferentes, de los cuales uno no pudo ser identificado (U (5,10-5,08 ppm)). Ciertas perturbaciones en los niveles de los metabolitos implicados en el funcionamiento celular normal (aminoácidos, carbohidratos, cetonas), señalización celular (1,2-diacilglicerol), inflamación (ácido araquidónico y eicosapentanoico), componentes de la membrana celular y tensioactivos alveolares (ácidos grasos, colesterolos, fosfolípidos) fueron cruciales en el desarrollo de las lesiones. La carnitina, el ácido araquidónico y eicosapentanoico, la glicoproteína, el citrato y la fenilalanina, entre otros, mostraron los cambios más altos, lo que indicaba que representaban una función clave en los resultados posteriores. La mayoría de los metabolitos mostraban tendencias consistentes de daño pulmonar  
50

agudo de leve a grave (Figura 4), lo que indicaba la correlación implicada en el grado de disfunción pulmonar posterior y su posible función como biomarcadores predictivos.

La lista de los biomarcadores más relevantes se enumera en las tablas a continuación.

5 Tabla 4: Metabolitos más significativos encontrados correlacionados con la presión parcial de O<sub>2</sub> (PaO<sub>2</sub>) medidos el día del diagnóstico (72 h después del desenganche del CPB).

Correlación de Pearson (metabolitos vs. PaO <sub>2</sub> (72h))			
Metabolitos		Correlación	Sig. (2 colas)
1	Citrato/U (5,10-5,08 ppm)	-0,645**	1,77E-06
2	Isobutirilglicina/Fenilalanina	-0,609**	8,86E-06
3	Isobutirilglicina/Arginina	-0,602**	1,20E-05
4	Citrato/Fenilalanina	-0,572**	4,02E-05
5	PUFA/Fenilalanina	-0,562**	5,83E-05
6	Alanina/Fenilalanina	-0,556**	7,37E-05
7	Isobutirato/Fenilalanina	-0,546**	1,03E-04
8	PUFA/Arginina	-0,546**	1,06E-04
9	Ácido araquidónico (Ara) y eicosapentanoico (Epa)	-0,509**	3,62E-04
10	Isobutirilglicina	-0,455**	1,70E-03
11	Citrato/TMAO	-0,452**	1,85E-03
12	Carnitina	-0,421**	4,00E-03
13	Citrato	-0,388**	8,50E-03
14	Carnitina/TMAO	-0,383**	9,37E-03
15	NAC-Glc	-0,330*	2,69E-02
16	Fenilalanina	0,317*	3,38E-02
17	Alanina	-0,293	5,10E-02

10 Abreviaturas: Sig. = nivel de significancia; U = metabolito desconocido, TMAO: trimetilamina-N-óxido, 1,2-DAG = 1,2-diacilgluceroil, GPE = glicerofosfoetanolamina, GPC = glicerofosfocolina, 3-HBA = ácido 3-hidroxi-butírico, VLDL = lipoproteínas de muy baja densidad, LDL = lipoproteínas de baja densidad, HDL = lipoproteínas de alta densidad, DAGPL = diacilglicerolfosfolípido, UFA = ácidos grasos libres, FA libres, ácidos grasos libres, NACGal = N-acetil-galactosa amina, NAC-Glc = N-acetil-glucosamina, Lyso-PC = lisofosfatidilcolina. En el presente contexto, "PUFA" se refiere a ácidos grasos poliinsaturados ("PUFA"). Los PUFA se clasifican de acuerdo con el número y la posición de los dobles enlaces en los ácidos grasos de acuerdo con una nomenclatura aceptada que es común para los expertos en la materia. Ácidos grasos poliinsaturados omega-3/6 (con ≥ 3 enlaces dobles); p. ej. ácido eicosopentanoico [EPA, 20:5 (n-3)], ácido docosahexaenoico [DHA, 22:6 (n-3)], linoleico (18:2, n-6), ácido gamma-linolénico (18:3, n-6), ácido alfa-linolénico (18:3, n-3) y estearidónico (18:4, n-3).

15 Tabla 2A: Los metabolitos más significativos encontrados en la predicción de resultados posteriores mediante la aplicación de la prueba t; Pacientes con Hipoxemia vs. Pacientes no Afectados.

Metabolitos		Pacientes con Hipoxemia vs. no Afectados		
		AUC	95% C.I. AUC	Sig.
1	Carnitina	0,90	0,79-0,979	6,96E-07
2	Citrato/TMAO	0,89	0,749-0,993	3,59E-06

3	Citrato	0,88	0,764-0,961	2,43E-05
4	Carnitina/TMAO	0,86	0,714-0,971	5,21E-05
5	NAcGlc	0,86	0,748-0,951	2,14E-04
6	Citrato/Fenilalanina	0,85	0,722-0,942	1,31E-04
7	Citrato/U (5,10-5,08 ppm)	0,85	0,705-0,948	2,60E-05
8	Isobutirato/Fenilalanina	0,84	0,676-0,935	5,64E-04
9	Ácido araquidónico y eicosapentanoico	0,82	0,688-0,953	5,95E-05
10	Ácido isobutírico	0,79	0,63-0,899	2,31E-03
11	Alanina/Fenilalanina	0,78	0,633-0,908	2,94E-03
12	Isobutirilglicina/Arginina	0,78	0,635-0,911	1,32E-03
13	Isobutirilglicina/Fenilalanina	0,77	0,622-0,917	2,52E-03
14	PUFA/Fenilalanina	0,76	0,601-0,882	4,83E-03
15	PUFA/Arginina	0,76	0,594-0,894	2,87E-03
16	Isobutirilglicina	0,75	0,603-0,879	3,65E-03

Tabla 2B: Metabolitos encontrados significativos en la predicción de resultados posteriores mediante la aplicación de la prueba t; Pacientes Graves vs. no Afectados.

Metabolitos	Pacientes Graves vs. no Afectados		
	AUC	95% C.I. AUC	Sig.
Citrato/Fenilalanina	1,00	1,00-1,00	1,06E-06
Citrato/U (5,10-5,08 ppm)	1,00	1,00-1,00	2,71E-05
Isobutirato/Fenilalanina	0,98	0,912-1,00	5,88E-05
PUFA/Fenilalanina	0,98	0,905-1,00	2,14E-05
PUFA/Arginina	0,97	0,881-1,00	3,85E-05
Alanina/Fenilalanina	0,97	0,865-1,00	1,45E-05
Isobutirilglicina/Arginina	0,95	0,857-1,00	7,73E-05
Isobutirilglicina/Fenilalanina	0,94	0,833-1,00	5,44E-05
Ácido araquidónico y eicosapentanoico	0,93	0,802-1,00	5,46E-04
Citrato	0,93	0,782-1,00	6,45E-04
Carnitina	0,90	0,762-1,00	8,75E-04
Citrato/TMAO	0,92	0,77-1,00	8,20E-05
Carnitina/TMAO	0,88	0,714-1,00	1,59E-03
NAcGlc	0,88	0,714-1,00	1,70E-02

5 Abreviaturas: AUC = área bajo la curva, C.I. = nivel de confianza, U = metabolito desconocido, TMAO = trimetilamina-N-óxido, NAcGlc = N-acetil-glucosamina

Conclusiones

Se ha identificado un conjunto de biomarcadores diferentes que tienen valores predictivos para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia en pacientes sometidos a cirugía a corazón abierto con el uso de CPB.

Ejemplo 4

Los marcadores iniciales predicen el riesgo de hipoxemia

5 Se encontró que varios metabolitos séricos medidos 16 h después de la operación se correlacionan significativamente con PaO<sub>2</sub> medido 72 h después del desenganche de CPB (Figura 4/Tablas 1-2). Además, varios metabolitos mostraron un fuerte poder predictivo para la hipoxemia leve y severa con un área alta bajo las curvas (AUC > 0,8, p < 0,0001) (tablas 2A y 2B). Este es el primer estudio que presenta biomarcadores predictivos de daño pulmonar agudo postoperatorio 56 h antes del diagnóstico de hipoxemia.

10 Tabla 3: Metabolitos considerados más relevantes (marcador único o relaciones).

Metabolitos	La regulación consideró la indicación del riesgo de desarrollar hipoxemia
Carnitina	Niveles más altos en hipoxemia
Citrato/TMAO	Mayor relación en hipoxemia
Citrato	Niveles más altos en hipoxemia
Carnitina/TMAO	Mayor proporción en hipoxemia
O-NAc-Glc	Niveles más altos en hipoxemia
Citrato/Fenilalanina	Mayor relación en hipoxemia
Ácido isobutírico/Fenilalanina	Mayor relación en hipoxemia
Ácido araquidónico (Ara, 20: 4 ω-6) y ácido eicosapentanoico (Epa, 20: 5 ω-3)	Niveles más altos en hipoxemia
Ácido isobutírico	Niveles más altos en hipoxemia
Alanina/Fenilalanina	Mayor relación en hipoxemia
Isobutirilglicina/Arginina	Mayor relación en hipoxemia
Isobutirilglicina/Fenilalanina	Mayor relación en hipoxemia
PUFA/Fenilalanina	Mayor relación en hipoxemia
PUFA/Arginina	Mayor relación en hipoxemia
Isobutirilglicina	Niveles más altos en hipoxemia

15 Por lo tanto, los marcadores predictivos presentados en la Tabla 3 se consideraron los metabolitos identificados más relevantes. En la tabla se indica que los niveles más altos se consideran una indicación del riesgo de desarrollar hipoxemia para los biomarcadores indicados. Del mismo modo, las relaciones más altas entre los biomarcadores indicados se consideran una indicación del riesgo de desarrollar hipoxemia para las relaciones de biomarcadores indicados.

20 La Tabla 4 contiene una lista de biomarcadores también determinados como significativamente diferentes en pacientes con riesgo de desarrollar hipoxemia, aunque con valores predictivos más bajos. Uno o más de estos biomarcadores también pueden incluirse en un método de acuerdo con la invención para aumentar aún más el valor predictivo. Los expertos pueden adaptar el método en consecuencia en relación con los valores de referencia.

Tabla 4: Metabolitos considerados relevantes (marcador único).

Metabolitos	
Ácido fosfoglicérico (PGA)	Niveles más bajos en hipoxemia
N-acetil-galactosamina (NAcGal)	Niveles más altos en hipoxemia

ES 2 763 342 T3

Glicina	Niveles más altos en hipoxemia
Trimetilamina-N-óxido (TMAO)	Niveles más bajos en hipoxemia
Dimetil amina (DMA)	Niveles más altos en hipoxemia
Piruvato	Niveles más altos en hipoxemia
Alanina	Niveles más altos en hipoxemia
Acetato	Niveles más altos en hipoxemia
Lisina	Niveles más altos en hipoxemia
Leucina, isoleucina, valina	Niveles más altos en hipoxemia
Ácido malónico	Niveles más altos en hipoxemia
Ácido 3-hidroxiбутírico (3-HBA)	Niveles más altos en hipoxemia
Acetoacetato	Niveles más altos en hipoxemia
Formiato	Niveles más altos en hipoxemia
Etanol	Niveles más altos en hipoxemia
Isobutirato	Niveles más altos en hipoxemia
2-cetobutirato	Niveles más altos en hipoxemia
Carnitina	Niveles más altos en hipoxemia
Ácidos grasos insaturados (UFA)	Niveles más altos en hipoxemia
Ácidos grasos libres (FFA) + adipato	Niveles más altos en hipoxemia
Ácido araquidónico (Ara, 20:4 $\omega$ -6) y ácido eicosapentanoico (Epa, 20:5 $\omega$ -3)	Niveles más altos en hipoxemia
PUFA (ácido lipoico y metabolitos relacionados)	Niveles más altos en hipoxemia
Colesterol libre	Niveles más altos en hipoxemia
Colesterol est.	Niveles más altos en hipoxemia
Lipoproteínas (VLDL, LDL, HDL)	Niveles más altos en hipoxemia
Glicerofosfolina (GPC)	Niveles más altos en hipoxemia
Lisofosfolina (Lyso-PC)	Niveles más altos en hipoxemia
Colina	Niveles más altos en hipoxemia
Heparina	Niveles más bajos en hipoxemia
Esfingomielina	Niveles más altos en hipoxemia
Glicerol	Niveles más bajos en hipoxemia
1,2-Diacilglicerol (DAG)	Niveles más altos en hipoxemia
Diacilglicerofosfolípido (DAGPL)	Niveles más altos en hipoxemia
Triacilglicerol (TAG)	Niveles más altos en hipoxemia
Plasmenilo	Niveles más altos en hipoxemia
Fosfoetanolamina (PE)	Niveles más altos en hipoxemia
Glicerofosfoetanolamina (GPE)	Niveles más altos en hipoxemia

Glutamato	Niveles más altos en hipoxemia
Glutamina	Niveles más bajos en hipoxemia
Prolina	Niveles más altos en hipoxemia
Creatina	Niveles más bajos en hipoxemia
Fenilalanina	Niveles más bajos en hipoxemia
Tirosina	Niveles más bajos en hipoxemia
Dopa	Niveles más bajos en hipoxemia
Dopamina	Niveles más bajos en hipoxemia
Histidina	Niveles más bajos en hipoxemia
1-Metilhistidina	Niveles más altos en hipoxemia
3-Metilhistidina	Niveles más bajos en hipoxemia
Urocanato	Niveles más bajos en hipoxemia
Plasmalógeno	Niveles más bajos en hipoxemia
Xantosina	Niveles más bajos en hipoxemia
Hipoxantina	Niveles más bajos en hipoxemia
Arginina	Niveles más bajos de en hipoxemia
Citrulina	Niveles más bajos en hipoxemia
U (5,10-5,08 ppm)	Niveles más bajos en hipoxemia
Fosfoenolpiruvato (PEP)	Niveles más altos en hipoxemia

5 En una realización de la invención, los métodos de la invención incluyen además determinar el nivel de uno o más de los biomarcadores enumerados en la Tabla 4. Como se puede ver en la columna derecha, para algunos de los marcadores, los niveles más bajos son indicativos del desarrollo de hipoxemia. Por lo tanto, para estos marcadores específicos, el método incluirá en su lugar:

- determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de uno o más biomarcadores está por debajo de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dichos uno o más niveles son iguales o superiores a uno o más niveles de referencia.

10 Un ejemplo de dicho biomarcador es el ácido fosfoglicérico (PGA) que figura en la tabla 4 anterior.

Ejemplo 5

Indicación inicial del riesgo de desarrollar hipoxemia mediante RMN

Cohorte de pacientes y diagnóstico

15 Los pacientes citados para cirugía de bypass coronario electivo (CABG) con uso de bypass cardiopulmonar (CPB) se incluyeron consecutivamente en el estudio después de obtener el consentimiento informado (n = 50).

El diagnóstico clínico se basó en la relación entre la presión parcial de oxígeno y la fracción de oxígeno inspirado ( $PaO_2/FiO_2$ ) calculada a partir del  $PaO_2$  medido en muestras de sangre arterial recolectadas de la arteria radial 72 horas después del desenganche del CPB y para estandarizar las mediciones, se tomaron muestras de sangre arterial mientras los pacientes respiraban aire atmosférico durante al menos 10 minutos.

20 Recolección de muestras

Se recogió sangre después de que se abrió el tórax pero antes de que los pacientes se unieran al circuito de CPB, justo después de que se quitara la CPB (0 horas), 2 horas, 4 horas y 8 horas después del desenganche de la CPB.

## Preparación de las muestras

Las muestras de suero se descongelaron durante 30 minutos a 4°C, se agitaron vorticialmente y, posteriormente, se centrifugaron durante 5 minutos a 12.100 g y 4°C. Un total de 400 µl del sobrenadante claro se mezclaron con 200 µl de tampón fosfato 0,2M (lectura del medidor sin corregir pH 7,4, 99% <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O) en un tubo de RMN de 5 mm.

## 5 Experimentos RMN

A continuación, se registraron los espectros RMN de las muestras en un espectrómetro de RMN Avance-III de 600 MHz (BrukerBioSpin, Rheinstetten, Alemania) equipado con una sonda de TCI de triple resonancia enfriada criogénicamente, usando una temperatura de muestra de 298,1 K (25°C). La adquisición de los espectros se controló utilizando el software TopSpin 3.1 (Bruker Biospin). Se aplicó un filtro T<sub>2</sub> usando la secuencia de pulso Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG)<sup>21</sup> con presaturación de agua para cada medición. Cada espectro CPMG se adquirió como 64k puntos de datos en un ancho espectral de 20 ppm, 256 escaneos, una ganancia del receptor fijo (RG) de 203 y un retraso de relajación (d1) de 4s.

## Procesamiento de los espectros

15 El procesamiento de los espectros se realizó en TopSpin 3.1. Los datos se multiplicaron exponencialmente correspondiendo a una ampliación en línea de 0,3Hz (CPMG), transformada de Fourier, corregido en fase y respecto al inicio, y calibrado para el desplazamiento químico de la señal de metilo de L-alanina a 1,48 ppm. Los espectros se redujeron a regiones de cubetas iguales (0,001 ppm) y la región de agua entre δ 4,65 y δ 4,95 ppm se excluyó en AMIX (software Analysis of MIXtures, v.3.9.10, Bruker BioSpin, Alemania).

## La secuencia de comandos

20 Posteriormente, los datos se exportaron en el entorno de programación Matlab R2011b (The MathWorks, Inc., MA). Se escribió una secuencia de comandos basada en el reconocimiento de patrones complejos que incluía (1) post-procesamiento espectral (transformación logarítmica generalizada (gLog)<sup>22</sup> para mejorar pequeñas señales en el espectro, normalización, escala y centrado), (2) extracción de características seleccionando la regiones espectrales significativas que se correlacionaban con los resultados posteriores, (3) análisis estadístico multivariado basado en los algoritmos de aprendizaje automático de regresión PLS y PLS-DA, (4) validación y (5) visualización de los resultados.

30 Para el procedimiento de extracción de características, la selección de las regiones de interés (ROI) se logró dividiendo los datos en intervalos de 50 cubetas y correlacionando cada intervalo con el PaO<sub>2</sub> medido en el día de diagnóstico. La correlación se realizó mediante el análisis de regresión PLS multivariante. Los intervalos con baja correlación se descartaron mientras que los intervalos significativos se utilizaron adicionalmente en el modelado. La extracción de estas características distintivas de los espectros de suero en cada momento demostró ser la característica clave del éxito de la prueba de diagnóstico asistida por computadora de los inventores. De un total de 10500 cubetas, se eliminaron 7000-9500 cubetas (dependiendo del momento analizado) ya que no mostraban ninguna correlación con los valores diagnósticos de PaO<sub>2</sub>. Incluso el número de características/cubetas restantes fue mayor que el número de muestras (1000-3500 cubetas frente a 100 muestras por modelo); se consideró que los datos no estaban sobreajustados, ya que estas variables correspondían a la información incorporada en los metabolitos 14-19. Estas regiones se seleccionaron constantemente en cada uno de los momentos medidos con pequeñas variaciones. Teniendo en cuenta que para cada modelo se disponía de 90-100 muestras y la información de 14-19 metabolitos, se consideró entonces que los modelos no estaban sobreajustados. Para evaluar la sensibilidad y especificidad de estas regiones seleccionadas, se realizó un modelado multivariado de PLS-DA.

40 Para el propósito de validación, se aplicó la validación cruzada de Venetian-Blinds con 10 divisiones segmentarias. En este caso, se extrajeron 10 muestras consecutivas (5 pacientes por duplicado) y se creó un modelo. A continuación, se predijeron las 10 muestras. Este procedimiento se repitió hasta que todas las muestras se retiraron de una vez. Para evitar una interpretación demasiado optimista y resultados engañosos, solo se hace referencia a los resultados de validación cruzada (CV) del presente modelado; sin embargo, también se proporcionan los resultados estimados (o calibrados). Este procedimiento de validación proporcionó un indicador de cómo podría funcionar el modelo en la predicción de muestras futuras.

50 Se realizó un segundo nivel de validación del modelo mediante el uso de pruebas de permutación. En este caso, se probó la aleatoriedad de los modelos para mostrar que ningún otro modelo funcionaba tan bien o mejor que el modelo de predicción principal. Después de codificar los valores de PaO<sub>2</sub> medidos tres días después de la operación (para el modelado de regresión de PLS) y los marcadores de grupo (hipoxemia versus no afectado; para el modelado de PLS-DA) 500 veces y realizar el modelado multivariado, se compararon los modelos PLS y PLS-DA óptimos 'verdaderos' con los modelos permutados. El rendimiento del modelo "verdadero" se comparó estadísticamente con la distribución de los modelos permutados, y se calculó un valor p mediante la prueba de Wilcoxon. Un valor p <0,001 se consideró significativo, lo que significaba que el poder predictivo del enfoque de los inventores se relacionaba significativamente con PaO<sub>2</sub> y con los resultados del diagnóstico, y que no era una asociación falsa positiva como resultado de la predicción aleatoria.

Resultados

En una realización de la invención, el método se debe aplicar como sigue: cuando un paciente se somete a una cirugía cardíaca, su muestra de sangre se recoge en uno o varios momentos y se extrae su suero. El suero se mezcla con tampón fosfato (véase "Preparación de la muestra" a continuación), y la muestra se procesa en RMN (véase "Experimento RMN" a continuación). Después de esto, el espectro conseguido se procesa previamente (véase "Procesamiento de espectros" a continuación), y los datos se escanean a través de la secuencia de comandos/prueba provista. Y es así que una realización incluye los siguientes pasos:

1. Obtener la muestra de sangre
2. Preparar la muestra
3. Realizar un RMN 1D CPMG
4. Aplicar un procesamiento espectral estandarizado para reducir los artefactos (por ejemplo, supresión de agua, cambios de pH, ruido de fondo) (Figura 1, recuadro relleno)
5. Fragmentar/agrupar los espectros para minimizar aún más los desplazamientos de los máximos
6. Exportar los datos al entorno del Matlab
7. Aplicar la secuencia de comandos/prueba de diagnóstico informatizada (Figura 1, cuadro gris)
8. Leer o interpretar el diagnóstico y/o el efecto del tratamiento.

La secuencia de comandos/prueba (Figura 6, cuadro gris) es un algoritmo de diagnóstico y/o monitoreo informático basado en el aprendizaje automático. La secuencia de comandos/prueba está optimizada para 5 tiempos diferentes, conteniendo cada tiempo 100 espectros procesados en muestras de suero recolectadas antes del acoplamiento a CPB, justo después del desenganche de CPB pero aún durante la cirugía, y 2, 4 y 8 horas después de la operación. Primero, la secuencia de comandos procesa posteriormente los datos (transformación, normalización, escalado, centrado), luego selecciona el ROI clave que se utilizará para el diagnóstico posterior, aplica el modelado multivariado (PLS o PLSDA) según el interés diagnóstico (PaO<sub>2</sub> o hipoxemia vs. ausencia de hipoxemia), y devuelve un cierto valor (para PLS) o un nivel umbral (para PLSDA) para cada muestra en el análisis. Finalmente, en base a estos valores o umbrales, se proporciona una regresión y un gráfico de valores y se resalta la posición de cada muestra. Según la posición de las muestras en las representaciones, los médicos pueden leer/interpretar el diagnóstico. Si alguno está interesado en monitorear y determinar el efecto de los tratamientos iniciados en los pacientes, la secuencia de comandos/prueba también puede usarse para este propósito. En tal caso, se realiza el mismo procedimiento que se mencionó anteriormente, pero las muestras se recogen después del final de la cirugía (por ejemplo, 2, 4 y/u 8 horas después de la operación). Dependiendo del efecto de los tratamientos iniciados, la posición del paciente en las representaciones eventualmente se desplazará hacia la recuperación (niveles de valores más altos).

Para mostrar el poder predictivo de este enfoque, el modelo de regresión PLS se aplicó en datos espectrales preprocesados con el fin de predecir los valores de PaO<sub>2</sub> de diagnóstico medidos tres días después de la operación. Ya antes de que los pacientes fueran acoplados al CPB, los ROI específicos en los espectros de RMN (Figura 7) mostraban una correlación validada cruzada de 0,70 ( $R^2 = 0,70$ ) con los valores de PaO<sub>2</sub> medidos 3 días después de la operación, con un error cuadrático medio de validación cruzada (RMSECV) de 0,75 kPa (5,62 mmHg) (Tabla 5). Después del desenganche del CPB, los RMN pueden detectar una correlación de 0,91 y un error de predicción de 0,40 kPa (2,62 mmHg) (Tabla 5). Los modelos realizados en muestras recogidas 2 horas, 4 horas y 8 horas después de la operación tienen  $R^2 > 0,93$  y RMSECV  $< 0,36$  kPa (Tabla 5).

Tabla 5: Para el propósito de validación se aplicó la validación cruzada de Venetian-Blinds con 10 segmentos. En este caso se extrajeron 10 muestras consecutivas (5 pacientes por duplicado) y se creó un modelo. A continuación, se predijeron las 10 muestras. Este procedimiento se repitió hasta que todas las muestras se retiraron una vez. Debido a la limitación de no tener muestras completamente nuevas para probar los modelos, los valores logrados en este trabajo son relativos y representan los resultados promedio para eliminar y predecir 10 de las 100 muestras. Ya después de la incisión/toracotomía, el enfoque de los inventores puede predecir los resultados del diagnóstico. La correlación con la validación cruzada entre el metaboloma antes de CPB y el PaO<sub>2</sub> medido en el día 3 es 0,7. Se observa una mayor correlación cuando se mide el metaboloma justo después del desenganche de CPB (0 horas), 2 horas, 4 horas y 8 horas después de la operación.

	R <sup>2</sup>		RMSE (PaO <sub>2</sub> [kPa])		Sesgo de la pendiente	
	Cal	CV	Cal	CV	Cal	CV
Después de la toracotomía, antes de CPB	0,94	0,70	0,332	0,749	0	0,021

0 horas (justo después de CPB)	0,98	0,91	0,146	0,402	-3,5*10 <sup>-15</sup>	0,009
2 horas (post-CPB)	0,99	0,93	0,131	0,362	-2,6*10 <sup>-15</sup>	-0,001
4 horas (post-CPB)	0,99	0,95	0,123	0,302	-2,6*10 <sup>-15</sup>	-0,011
8 horas (post-CPB)	0,99	0,94	0,127	0,340	-1,7*10 <sup>-15</sup>	-0,013

El clasificador binario PLS-DA se realizó para detectar la sensibilidad y especificidad del método de los inventores en el diagnóstico de hipoxemia y en la determinación del riesgo de ARDS mientras los pacientes aún se sometían a la cirugía. Después de la toracotomía, la RMN con aprendizaje automático muestra una sensibilidad CV del 77,8% y una especificidad CV del 84,2% con el fin de diferenciar entre pacientes hipoxémicos y no afectados (Tabla 6). Esperar hasta el desenganche de CPB dio como resultado un aumento significativo en la precisión del método con un 88,2% de sensibilidad CV y un 92,2% de especificidad CV (Tabla 6). Además, la aplicación del modelo en muestras recolectadas 2 horas, 4 horas y 8 horas después de la operación muestra un buen acuerdo con los resultados antes mencionados (Tabla 6), lo que indica el gran valor del enfoque de los inventores tanto en el diagnóstico como en el monitoreo de los tratamientos terapéuticos iniciados.

Tabla 6: El PLSDA aplicado en los ROI seleccionados y los marcadores de diagnóstico (hipoxemia/no hipoxemia) determinan el resultado del diagnóstico cuando los pacientes aún se están sometiendo a la cirugía. Las 8 horas posteriores a la cirugía aún describen buena sensibilidad y especificidad, lo que indica su valor en el diagnóstico y monitoreo de nuevas opciones de tratamiento. Los resultados se muestran para los datos calibrados (Cal) y de validación cruzada (CV) de Venetian-Blinds.

Tiempo	Sensibilidad		Especificidad		Error de clase		RMSE		500x prueba de permutación (valor p)
	Cal	CV	Cal	CV	Cal	CV	Cal	CV	CV
Pre-CPB	0,833	0,778	0,952	0,842	0,107	0,190	0,292	0,392	<0,001
0 h	1,00	0,882	0,984	0,922	0,008	0,098	0,184	0,337	<0,001
2 h	1,00	0,912	0,984	0,938	0,007	0,075	0,179	0,075	<0,001
4 h	0,971	0,882	0,917	0,883	0,056	0,117	0,321	0,405	<0,001
8 h	0,971	0,943	0,967	0,917	0,031	0,070	0,226	0,362	<0,001

Conclusiones

El presente ejemplo proporciona un método para la detección y el diagnóstico precoz de la hipoxemia durante la cirugía cardíaca, lo que permite una ayuda inmediata para los cirujanos en el quirófano. Debido a que el método puede conducir a resultados de diagnóstico en 15-20 minutos, los médicos pueden tomar decisiones críticas y vitales durante la cirugía. Además, debido a que el método puede proporcionar hasta 500 referencias de espectros en suero recolectado en diferentes momentos, también permite a los médicos y enfermeras monitorear el efecto de los tratamientos en el proceso varias horas después de la operación.

Las muestras de pacientes recién diagnosticados también se pueden agregar a la base de datos proporcionada junto con el resultado conocido, lo que conduce a una base de datos en continuo crecimiento y mejora para una predicción más precisa.

Ejemplo 6

Objetivo

Prueba si Inosina; Dopamina; Dihidroxifenilalanina (Dopa); Hipoxantina; y Trigonelina son biomarcadores en pacientes con un mayor riesgo de desarrollar hipoxemia después de haber tenido una cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de bypass cardiopulmonar (CPB).

Materiales y métodos

Grupo de pacientes y resultado clínico

Se obtuvieron muestras de suero de cincuenta (n = 50) pacientes sometidos a injerto de revascularización coronaria (CABG). Tres días después de la operación, 18 pacientes no mostraron signos de hipoxemia; mientras que 32

desarrollaron hipoxemia con PaO<sub>2</sub> por debajo de los valores normales, de los cuales 9 desarrollaron hipoxemia severa.

#### Preparación de muestras

5 Para evitar sesgos preanalíticos debido a la recolección de muestras, todas las muestras de sangre fueron recolectadas y preparadas por la misma persona. Se obtuvieron muestras de sangre tanto de la aurícula izquierda (LA) como de la arteria pulmonar (AP) después de la esternotomía pero antes de la unión al CPB, precisamente después del desenganche del circuito de CPB (0 horas) y 2, 4, 8 y 20 horas después del desenganche del circuito CPB. Para obtener muestras de suero, se dejó que la sangre coagulara a temperatura ambiente durante 30 minutos y, posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. Las alícuotas de suero LA y PA se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta que se analizaron.

#### Preparación de muestras para RMN

15 Antes de las mediciones de RMN, las muestras se descongelaron durante 2 horas a 4°C, se agitaron en vórtex y se centrifugaron durante 5 minutos a 4°C y 14000 rpm para eliminar las células y otros materiales precipitados. Se mezclaron alícuotas de 400 µl de sobrenadante con 200 µl de tampón fosfato 0,2 M (pH 7.4, lectura del medidor sin corregir) en <sup>2</sup>H<sub>2</sub>O (99% <sup>2</sup>H) para minimizar las variaciones en el pH y reducir la viscosidad del suero. Durante todo el proceso, las muestras se mantuvieron en hielo. La mezcla se pipeteó en un tubo de RMN de 5 mm y se realizó un análisis de RMN.

#### Mediciones de RMN

20 Los espectros se adquirieron en un espectrómetro de RMN Bruker DRX-600 (Bruker BioSpin, Alemania y Suiza) equipado con una sonda TXI (hidrógeno, carbono, nitrógeno) (Bruker BioSpin, Suiza) que funcionaba a 600,13 MHz. Los experimentos se adquirieron a una temperatura constante de 310,1 K (37°C). Para el análisis, se usó un experimento Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) editado con relaxation T<sub>2</sub>. Este experimento atenúa las señales amplias de las proteínas y lipoproteínas que caen lentamente. Se recogieron 128 desintegraciones de inducción libre (FID) con 32768 puntos de datos complejos en un ancho espectral de 11,97 ppm y un tiempo de adquisición de 2,28 s. Se aplicó un retraso de relajación de 2s entre cada FID durante el cual se aplicó irradiación de onda continua ( $\gamma\text{Bi}/2\pi = 26,6 \text{ Hz}$ ) a la frecuencia del agua (presaturación). El retraso total de la relajación del spin-eco fue de 67,4 ms y consistió en elementos ( $\tau\text{-}\pi\text{-}\tau$ ), donde  $\tau$  es un retraso de 0,4 ms y  $\pi$  es un pulso de 180° de 22 µs de longitud. El procesamiento espectral se realizó en TopSpin versión 2.1 (Bruker BioSpin, Alemania). Antes de la transformación de Fourier, la multiplicación exponencial correspondiente a un ensanchamiento de la línea de 0,3 Hz se aplicó a los FID, que se rellenaron a cero por un factor de 2 para duplicar el número de puntos. Los espectros se corrigieron manualmente por fase y por línea de base, y la señal de metilo de alanina se usó como referencia del desplazamiento químico a 1,48 ppm.

35 Para la identificación del metabolito, se adquirieron tres tipos de experimentos bidimensionales (2D). Los experimentos <sup>1</sup>H-RMN con resolución J 2D, con pre-saturación de agua durante un retraso de relajación de 2 segundos, se adquirieron con 8 FID para cada uno de los 80 incrementos. El ancho espectral se ajustó a 11,6 ppm y 54,7 Hz en dirección F2 y F1, respectivamente. Antes de la transformación 2D-Fourier, ambas dimensiones se multiplicaron por una función de campana sinusoidal no desplazada y el número de puntos se duplicó con relleno de cero. Además, los espectros fueron inclinados 45° y simetrizados a lo largo del eje F1. Después del procesamiento, las proyecciones de horizonte de los espectros 2D resueltos en J se corrigieron y calibraron manualmente en la línea de base utilizando el centro de la señal de metilo del lactato. Se realizaron espectros 2D homonuclear <sup>1</sup>H,<sup>1</sup>H-TOCSY (Espectroscopía de correlación total) y <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C-HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) con presaturación en muestras representativas, con diferentes números de FID, incrementos, anchos espectrales y tiempos de mezcla para enfocarse en diferentes regiones espectrales. La información obtenida de estos espectros se utilizó para encontrar metabolitos coincidentes en la Base de datos del metabolismo humano. Se realizaron otras asignaciones de metabolitos utilizando AMIX (v. 3.9.10, Bruker BioSpin), bases de datos BRUKER bbiorefcode (2.7.0-2.7.3) y bibliografía.

#### Cuantificación de los datos RMN

50 Esto se realizó utilizando la herramienta de integración múltiple AMIX. Los picos de interés se integraron utilizando la opción de análisis de forma de línea con un factor de ruido fijo de 3,5 y un umbral de forma de línea de 0,01. Los picos se integraron usando la suma de todos los puntos en la región como modo de integración, y estas integrales se usaron como concentraciones relativas como unidades arbitrarias (a.u.).

#### Preprocesamiento de datos RMN

55 Los espectros de CPMG se convirtieron en una matriz n-por-m (n = 590 muestras LA y PA de 50 pacientes, m = 8700 cubetas iguales de 0,001 ppm de ancho) en AMIX (paquete de software Analysis of Mixtures, versión 3.9.10, Bruker BioSpin, Alemania) usando la región entre δ 9 a 0 ppm, y excluyendo la región de señal de agua entre 4,80-4,5 ppm. El procesamiento adicional y el modelado multivariado se llevaron a cabo en MATLAB R2011b<sup>56</sup> junto con

PLS-Toolbox 6.5 (Eigenvector Research, Wenatchee, WA). Los datos agrupados fueron iCoshifted<sup>57</sup>, normalizados a la intensidad total, transformado en forma logarítmica y centrados en la media.

Modelado multivariante

5 El análisis discriminante de mínimos cuadrados parciales (PLS-DA) se aplicó para identificar variables importantes en la discriminación de muestras y se identificaron las variables más significativas obtenidas por el método.

Análisis estadístico

10 Para el análisis estadístico se utilizó el software Statistical Package and Services Solutions (SPSS) v23.0. Se utilizó ANOVA de 2 vías con pruebas de comparación múltiple post-Tukey HSD hoc para analizar las diferencias dentro y entre los grupos. Los grupos estaban compuestos por los momentos antes de CPB (-CPB), 0 horas después de CPB (+CPB), 2, 4, 8 y 20 horas después de CPB, y las clases no se vieron afectadas ('ninguna'), levemente afectadas por hipoxemia ('leve') y gravemente afectada por hipoxemia ('severa'). La significación se estableció en  $p < 0,05$ .

Para visualizar los cambios entre los momentos y los grupos, se calcularon las medias y la desviación estándar con los correspondientes intervalos de confianza (IC) del 95% para cada uno de los metabolitos significativos (p. ej. Trigonelina, Hipoxantina, Dopamina, Dihidroxifenilalanina (Dopa) e Inosina).

15 Resultados:

20 La inosina, la dopamina, la dihidroxifenilalanina (Dopa), la hipoxantina y la trigonelina se midieron después de la esternotomía pero antes del CPB, después del desenganche del CPB (0 h), y 2, 4, 8 y 20 h después de la operación se encontraron cambios significativos con el tiempo y el riesgo de desarrollar hipoxemia postoperatoria (Figura 8 A-E/Tabla 7) en una etapa inicial después del desenganche del CPB. Los metabolitos muestran tendencias consistentes de daño pulmonar de ninguno, a leve, y a grave (Figura 8 A-E), lo que indicaba su correlación con el grado de disfunción pulmonar posterior y su posible función como biomarcadores predictivos. La regulación metabólica se muestra en la Figura 8 A-E y se explica en la Tabla 7.

Este es el primer estudio que presenta biomarcadores predictivos de daño pulmonar agudo postoperatorio justo después del desenganche del CPB o 72 h antes de que se diagnosticara la hipoxemia.

25 La lista de los biomarcadores relevantes que se encuentran significativamente diferentes dentro de los grupos se especifica en las tablas siguientes.

30 Tabla 7. Los metabolitos encontraron cambios significativos con el tiempo según el diagnóstico posterior. Los tiempos correspondían con las muestras recolectadas después de la esternotomía pero antes del CPB, justo después del desenganche del CPB (0 h), 2h, 4h, 8h y 20h después del CPB; mientras que los marcadores de clase correspondían con pacientes no afectados ('ninguno'), levemente afectados por hipoxemia ('leve') y gravemente afectados por hipoxemia ('grave')

ANOVA 2 colas	Valor p Tiempo Sig.	Valor p Clase Sig.	La regulación consideró la indicación del riesgo de desarrollar hipoxemia
Trigonelina	1,7E-05	1,8E-05	Niveles más bajos en hipoxemia
Hipoxantina	1,5E-11	2,7E-04	Niveles más bajos en hipoxemia
Inosina	8,6E-25	0,003	Niveles más bajos en hipoxemia
Dopamina	2,6E-87	0,05	Niveles más bajos en hipoxemia
Dihidroxifenilalanina (Dopa)	3,9E-14	2,04E-09	Niveles más altos en hipoxemia

Conclusión

35 Los datos preliminares indican que la inosina; Dopamina; Hipoxantina; y trigonelina están reguladas negativamente, mientras que la Dihidroxifenilalanina (Dopa) está regulada positivamente en pacientes con riesgo de desarrollar hipoxemia después de haber tenido una cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de bypass cardiopulmonar (CPB) en una etapa inicial después de la cirugía final.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

40 Se ha investigado si, cuando el metaboloma en pacientes que progresan a hipoxemia postoperatoria cambia tan repentina y drásticamente, esta complicación podría predecirse al menos 2-3 días antes de los signos clínicos. Los

espectros RMN (Figura 1) y el modelado multivariado relacionaron con precisión perturbaciones en el metaboloma registradas durante y después del desenganche de CPB con valores diagnósticos posteriores. Considerando los desafíos involucrados en la predicción del daño pulmonar agudo debido a la falta de biomarcadores específicos, el método presentado puede permitir la detección inicial de la enfermedad.

5 A partir de muestras de suero recolectadas la primera mañana después de la operación, se identificaron varios metabolitos que variaban entre pacientes (Figuras 3, 4 y 8). De estos, varios marcadores se correlacionaron significativamente con PaO<sub>2</sub> (p<0,05) y mostraron una potencia diagnóstica sobresaliente, con AUC> 0,8 (véanse las tablas anteriores). Estos son marcadores de estado antioxidante y peroxidación (histidina, PUFA); producción de óxido nítrico inducible (iNOS) (arginina); agotamiento de ATP y formación de especies reactivas de oxígeno (ROS) (citrato); inflamación (ácido araquidónico y eicosapentanoico, lesión de la membrana (fosfolípidos) y disfunción mitocondrial (carnitina). El AUC y las tasas de detección del daño pulmonar agudo observadas en este estudio son las primeras de este tipo; ningún otro estudio similar ha mostrado el uso de la metabonomía en la predicción de resultados postoperatorios.

15 Esto sugiere una fosforilación oxidativa deteriorada. La carnitina, que normalmente se encuentra en las mitocondrias y que se requiere para el transporte de FA a través de la membrana para la oxidación β, aumentó significativamente en pacientes con hipoxemia, lo que también puede indicar una fosforilación oxidativa deteriorada y una posible fuga en el torrente sanguíneo. Apoyando esto, la isobutirilglicina, un marcador del deterioro de la oxidación β mitocondrial de FA también se asoció con la gravedad de la hipoxemia. Las alteraciones mitocondriales aumentan el estrés oxidativo, causando la muerte de las células alveolares. Sin embargo, bajo condiciones homeostáticas, varios antioxidantes son capaces de aliviar los efectos dañinos de ROS del sistema, pero una barrera antioxidante insuficiente no puede contrarrestar este daño.

20 Los fosfolípidos unidos a la membrana y los PUFA son susceptibles a la peroxidación que conduce a la formación de hidroperóxidos altamente reactivos. Estos reaccionan con muchas sustancias bioquímicas que tienen enormes impactos en el funcionamiento celular normal, incluida la activación endotelial y la alteración de los fosfolípidos tensioactivos. Los niveles de PUFA y ácido adípico (un subproducto de la peroxidación) se correlacionaron con una disfunción pulmonar posterior, mientras que los niveles de plasmógeno (implicado en la protección contra ROS y la formación de peroxinitrito) disminuyeron, especialmente en el grupo hipoxémico severo.

25 La colina, los fosfolípidos, el 1,2-DAG, el PUFA y el colesterol son esenciales para la integridad estructural y la señalización de la membrana celular. Un aumento en sus niveles refleja una activación del mecanismo de protección y un posible trastorno estructural en pacientes que progresan hacia la enfermedad. Los lípidos son moléculas de señalización altamente interconectadas que regulan los procesos metabólicos, inmunes innatos e inflamatorios, y la alteración en un lípido desencadenará automáticamente una desregulación importante en varias vías de señalización causando profundas respuestas fisiológicas. Los niveles de ácidos araquidónico y eicosapentanoico fueron más altos en pacientes con daño pulmonar agudo, lo que indicó un mayor ambiente inflamatorio. Estos PUFA pueden liberarse por la activación de fosfolipasa A<sub>2</sub>, hidrólisis de glicerofosfolípidos de membrana, que también pueden indicar un desprendimiento de la membrana celular. Se sabe que esta es una de las características del daño pulmonar agudo. Debido a que una de las propiedades de esta enfermedad es la disfunción de los tensioactivos alveolares, el aumento de los niveles de algunos fosfolípidos, en muestras de pacientes hipoxémicos, también puede explicarse en parte por la fuga de tensioactivos, lo que podría indicar un daño en la barrera endotelial-alveolar.

30 Se observaron niveles reducidos de arginina en el grupo que desarrollaba hipoxemia severa. El agotamiento de la arginina en la sangre se ha relacionado previamente con lesiones pulmonares agudas, sepsis y fibrosis quística, y se observó que la suplementación con arginina reduce la inflamación. Esta deficiencia puede haber desencadenado la producción de superóxidos, que interactúan aún más con los peroxinitritos que producen NO, la acumulación de amoníaco y el aumento de la expresión de iNOS, lo que provoca disrupción de la microvasculatura pulmonar y daño tisular.

35 La glucosamina N-acetilada también se correlacionó positivamente con la enfermedad. Este carbohidrato es parte del metabolismo de la pentosa, que se sabe que es más activo bajo estrés, especialmente en condiciones de estrés hipotónico. Este es el primer estudio de este tipo, que analiza los cambios metabólicos en el primer día postoperatorio después de CABG en pacientes con riesgo de desarrollar ALI/ARDS debido al uso de CPB. Como se describió anteriormente, los hallazgos de los inventores sugieren defectos en el sistema respiratorio mitocondrial que afectan la generación de ROS, el deterioro del estado antioxidante, el aumento de la peroxidación y el estrés oxidativo, la alteración de las membranas celulares desprotegidas, la disminución de la producción de tensioactivo, en pacientes con hipoxemia. TCA, arginina y PUFA participan en una amplia gama de reacciones biológicas que producen resultados beneficiosos y perjudiciales, por lo tanto, las intervenciones terapéuticas dirigidas al estudio de sus rutas pueden abrir nuevas estrategias para prevenir el daño pulmonar agudo postoperatorio.

40 Se han identificado características metabólicas de la hipoxemia, que pueden cerrar la brecha entre la patogénesis y la enfermedad en toda regla. Los marcadores como el ácido araquidónico y eicosapentanoico, citrato, carnitina, glicina, fenilalanina, arginina e histidina sirven como nodos centrales en su metabolismo y, por lo tanto, tienen un alto impacto en la predicción de la progresión de la enfermedad. Ningún metabolito solo capturó la complejidad de la

lesión sola, ya que las diferentes rutas mostraron simultáneamente desequilibrios. Por lo tanto, para prevenir la progresión inicial hacia la hipoxemia, la focalización terapéutica en varias rutas sería más efectiva.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para determinar el riesgo de desarrollar hipoxemia, comprendiendo el método:
  - 5 - proporcionar una muestra biológica de un sujeto, habiéndose dicho sujeto sometido a una cirugía cardíaca a corazón abierto con el uso de bypass cardiopulmonar (CPB), en el que dicho sujeto proporcionó dicha muestra entre el inicio de la cirugía y 72 horas después del desenganche del circuito de CPB;
  - determinar el nivel de al menos un biomarcador seleccionado del grupo que consiste en carnitina, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y eicosapentanoico, ácido isobutírico y citrato;
  - y/o
  - 10 - determinar la relación entre los niveles de biomarcadores de al menos una relación seleccionada del grupo de relaciones seleccionadas de citrato/fenilalanina, ácidos grasos poliinsaturados (PUFA)/fenilalanina, alanina/fenilalanina, citrato/trimetilamina-N-óxido (TMAO), carnitina/TMAO, ácido isobutírico/fenilalanina e isobutirilglicina/arginina;
  - comparar dichos niveles de uno o más biomarcadores o relaciones con uno o más niveles de referencia;
  - 15 - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicho nivel de uno o más biomarcadores está por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho uno o más niveles son iguales o inferiores a uno o más niveles de referencia;
  - y/o
  - 20 - determinar que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia si dicha una o más relaciones entre los niveles de biomarcadores están por encima de uno o más niveles de referencia, o determinar que dicho sujeto no se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia, si dicho nivel de una o más relaciones entre niveles de biomarcadores son iguales o inferiores a uno o más niveles de referencia.
- 25 2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto ha proporcionado dicha muestra en las siguientes 48 horas posteriores a la separación del circuito CPB, tal como en las siguientes 30 horas, tal como en las siguientes 20 horas, tal como en las siguientes 16 horas, tal como en las siguientes 10 horas, como dentro de 5 horas, como dentro de 2 horas, como dentro de 1 hora después de la separación del circuito CPB.
- 30 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que dicho sujeto ha proporcionado dicha muestra antes de la separación del circuito de CPB hasta 2 horas después de la separación del circuito de CPB.
4. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determina al menos el nivel de al menos dos biomarcadores y/o al menos una relación entre biomarcadores.
- 35 5. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se determinan al menos los niveles de carnitina y citrato.
6. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la muestra es una muestra de sangre, tal como sangre completa, suero y/o plasma.
- 40 7. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho nivel de biomarcadores se determina mediante un método seleccionado del grupo que consiste en espectrometría de masas (GC-MS, LC-MS), HPLC, Raman, NIR y espectroscopía RMN.
8. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la hipoxemia es una  $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$  por debajo de 40 kPa (300 mmHg).
- 45 9. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha cirugía a corazón abierto se selecciona del grupo que consiste en injerto de derivación de arteria coronaria y cirugía de válvula.
10. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende aplicar espectroscopía RMN en dichas muestras biológicas, tales como realizar una RMN 1D tal como CPMG, para llegar a un espectro resultante que cubra un rango espectral representativo de dichos biomarcadores, y aplicar un algoritmo informático en respuesta, para determinar una salida indicativa de que dicho sujeto se encuentra en riesgo de desarrollar hipoxemia.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho sujeto ha proporcionado dicha muestra biológica entre un tiempo durante la cirugía, tal como desde el desenganche del circuito de CPB, y hasta 8 horas después del desenganche del circuito de CPB.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que se selecciona una combinación de intervalos espectrales para cubrir todo: carnitina, isobutirilglicina, N-acetil-glucosamina, ácido araquidónico y eicosapentanoico, ácido isobutírico y citrato.

5 13. El método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en el que dicho análisis estadístico informático implica la aplicación de un algoritmo de aprendizaje automático.

14. Un método para evaluar la eficacia del tratamiento para prevenir la hipoxemia, comprendiendo el método:

- completar el método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-13;

10 para un sujeto considerado en riesgo de desarrollar hipoxemia, evaluar si un protocolo de tratamiento para la prevención de la hipoxemia da como resultado que dicho sujeto no desarrolle hipoxemia en una semana después del desenganche del circuito de CPB.

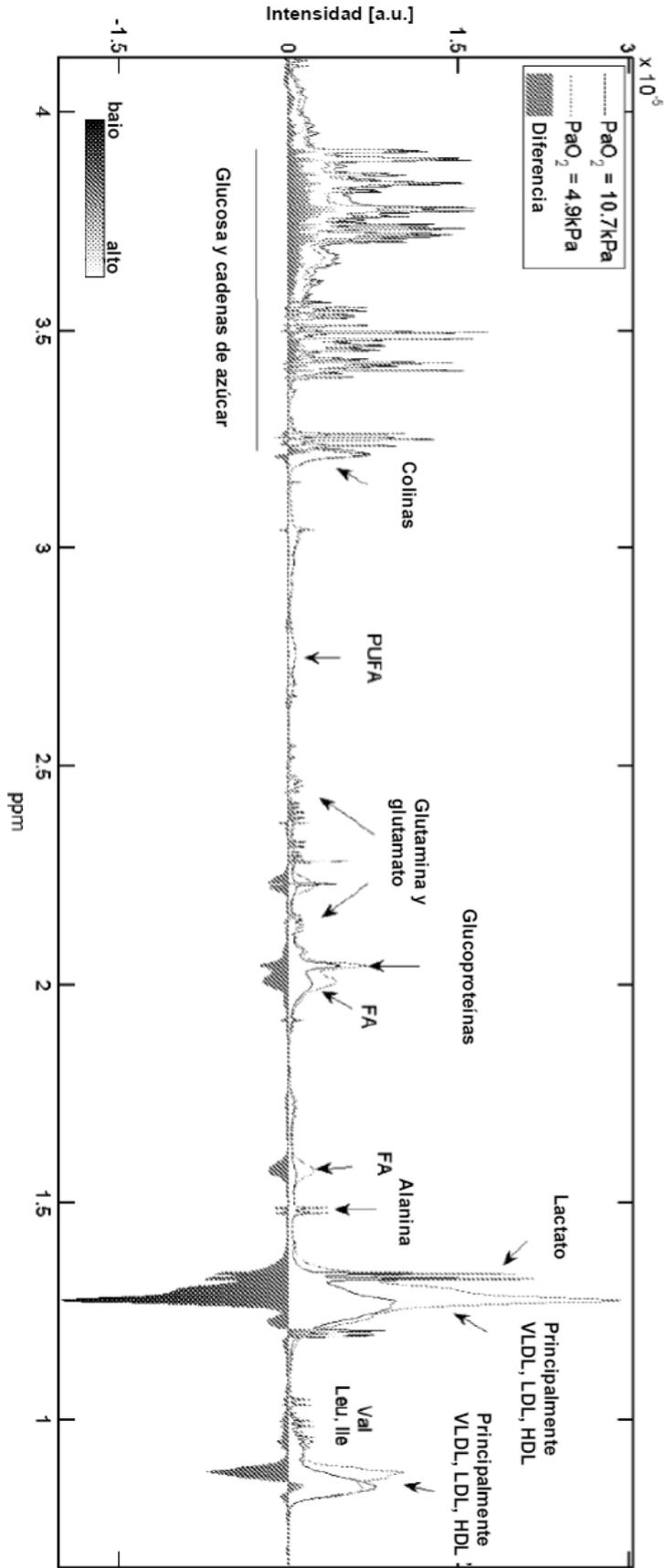


Fig. 1

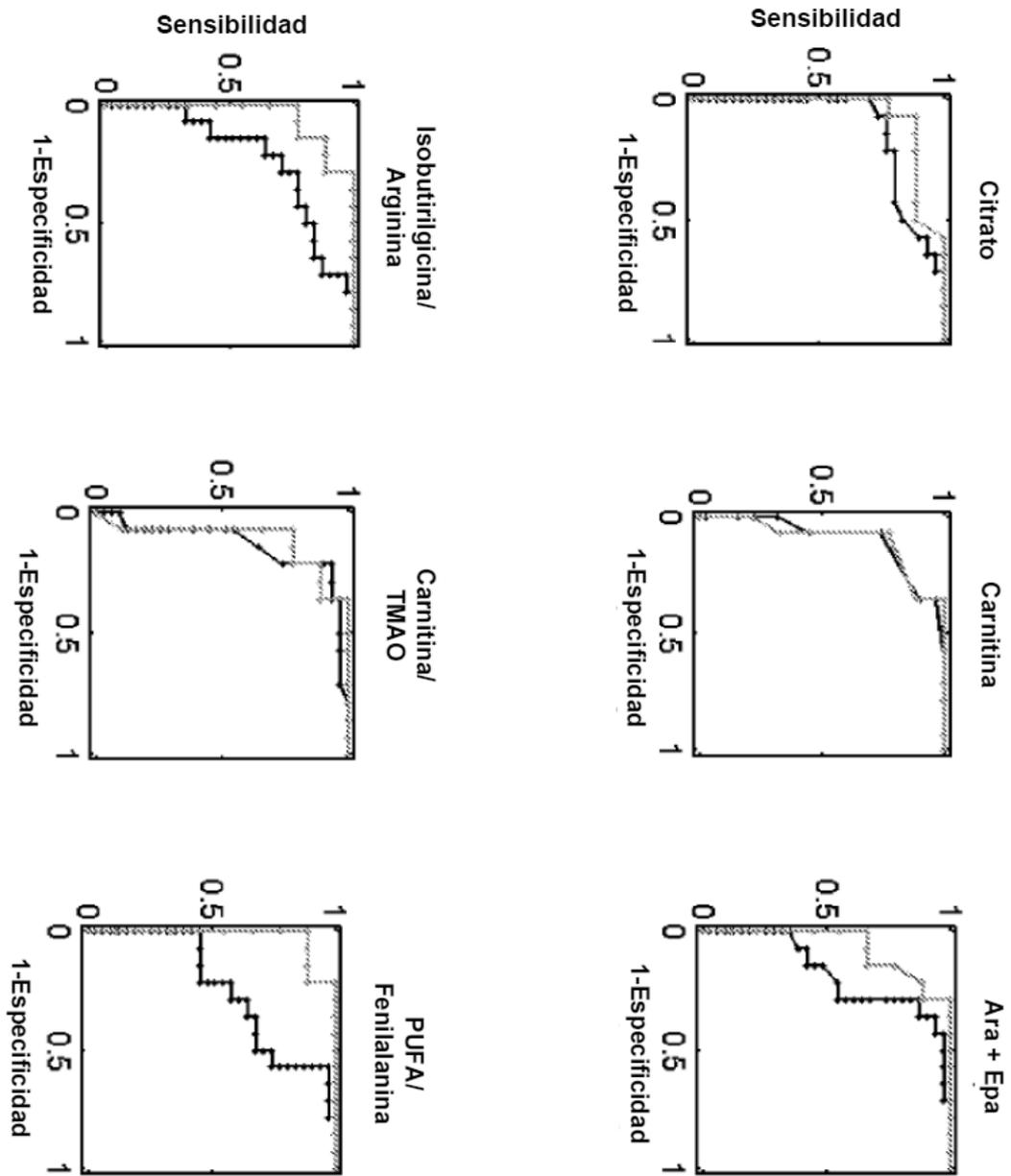


Figura 2, continuación

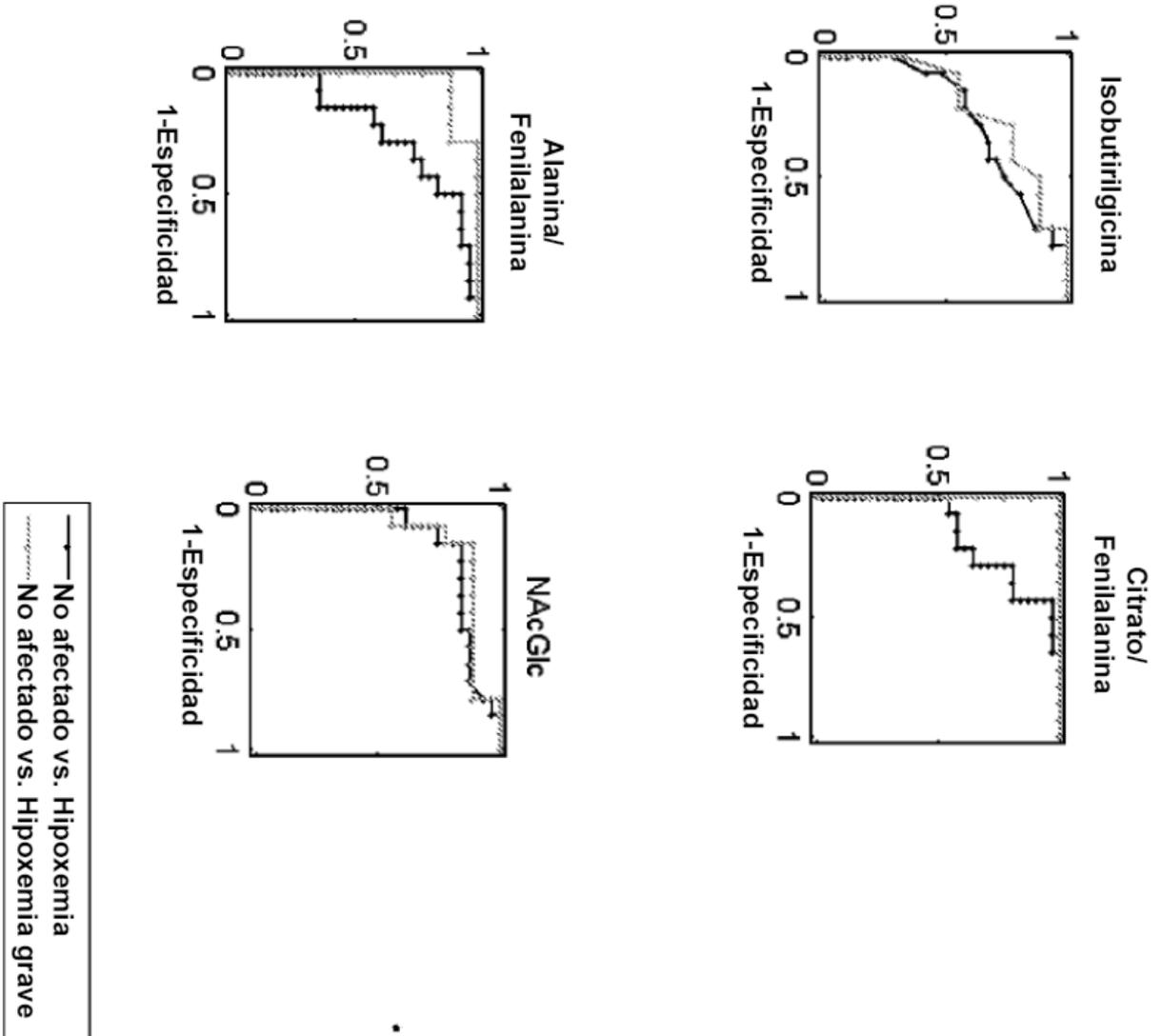


Figura 2, continuación

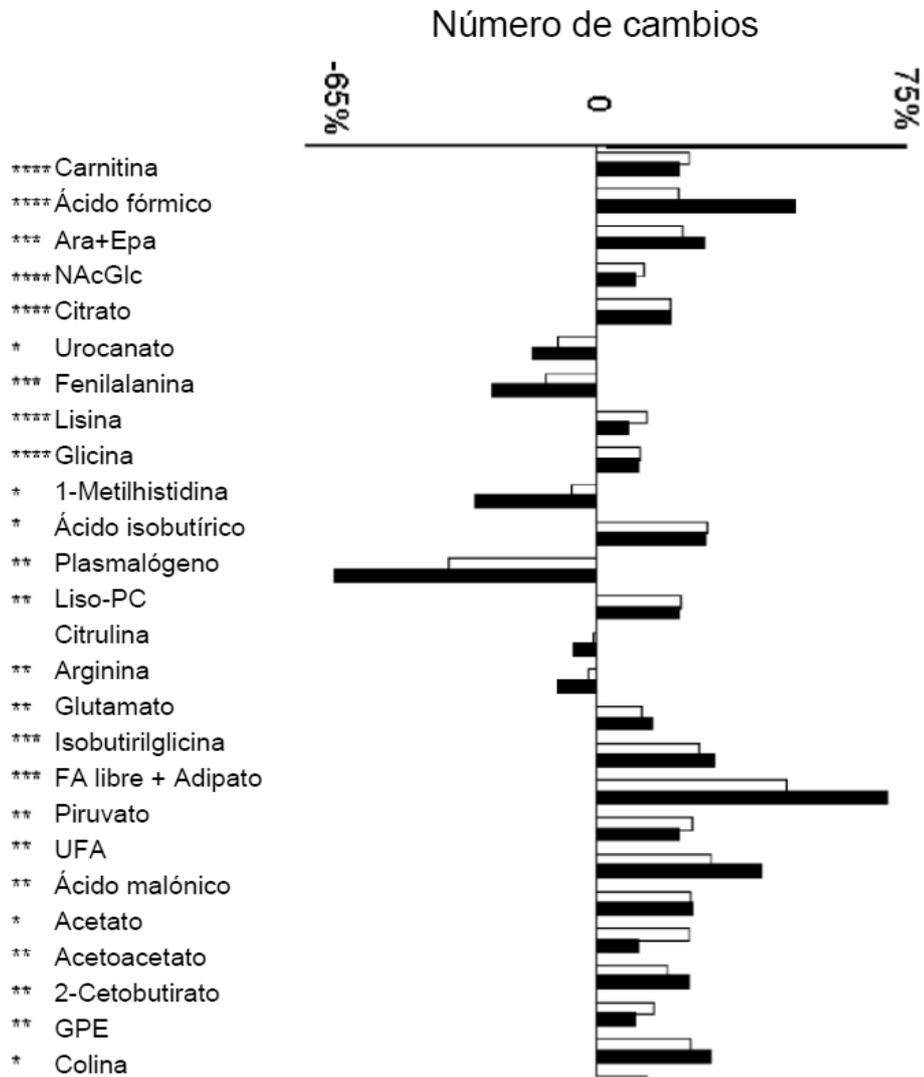


Figura 3, continuación



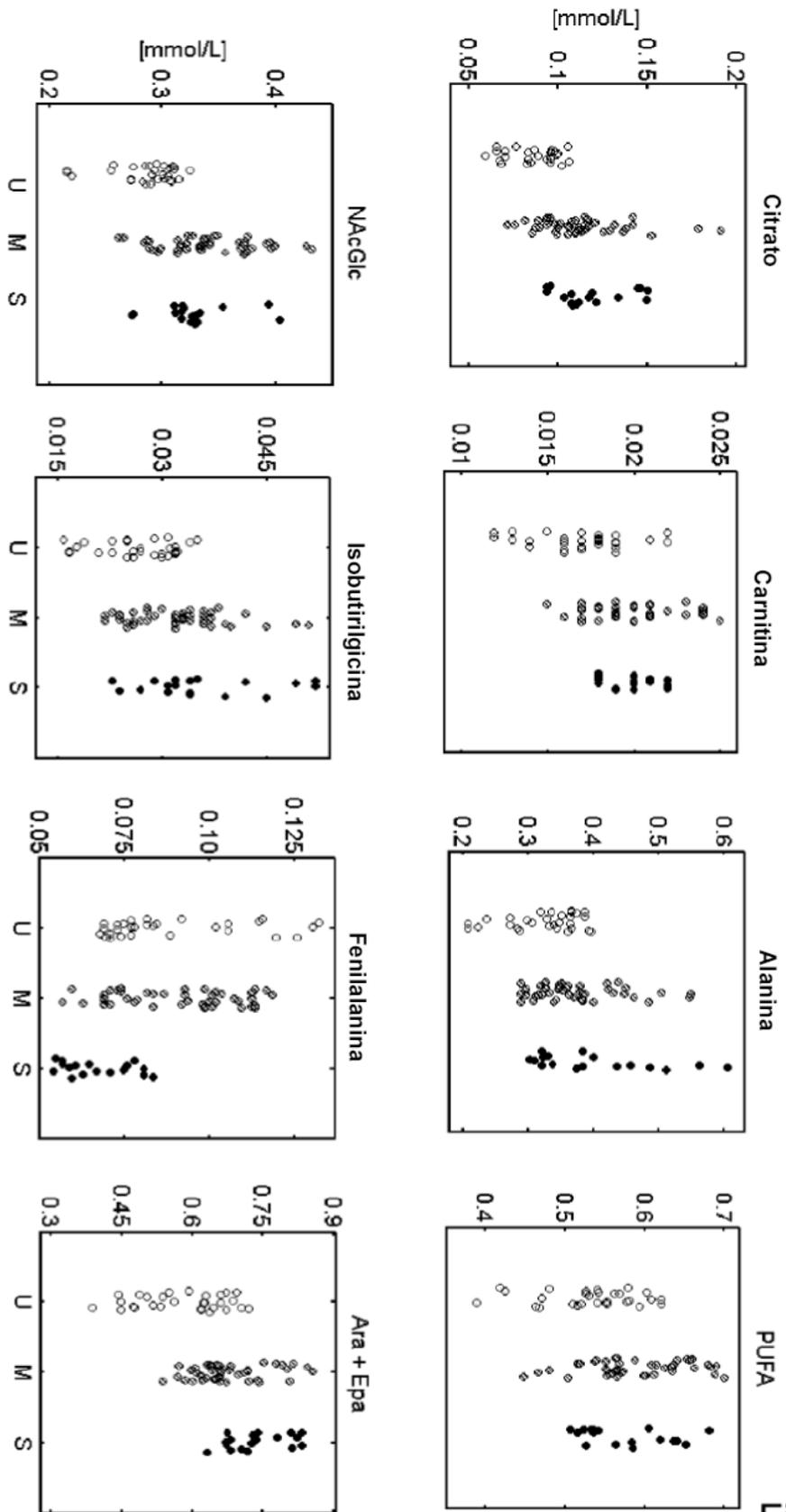


Fig. 4

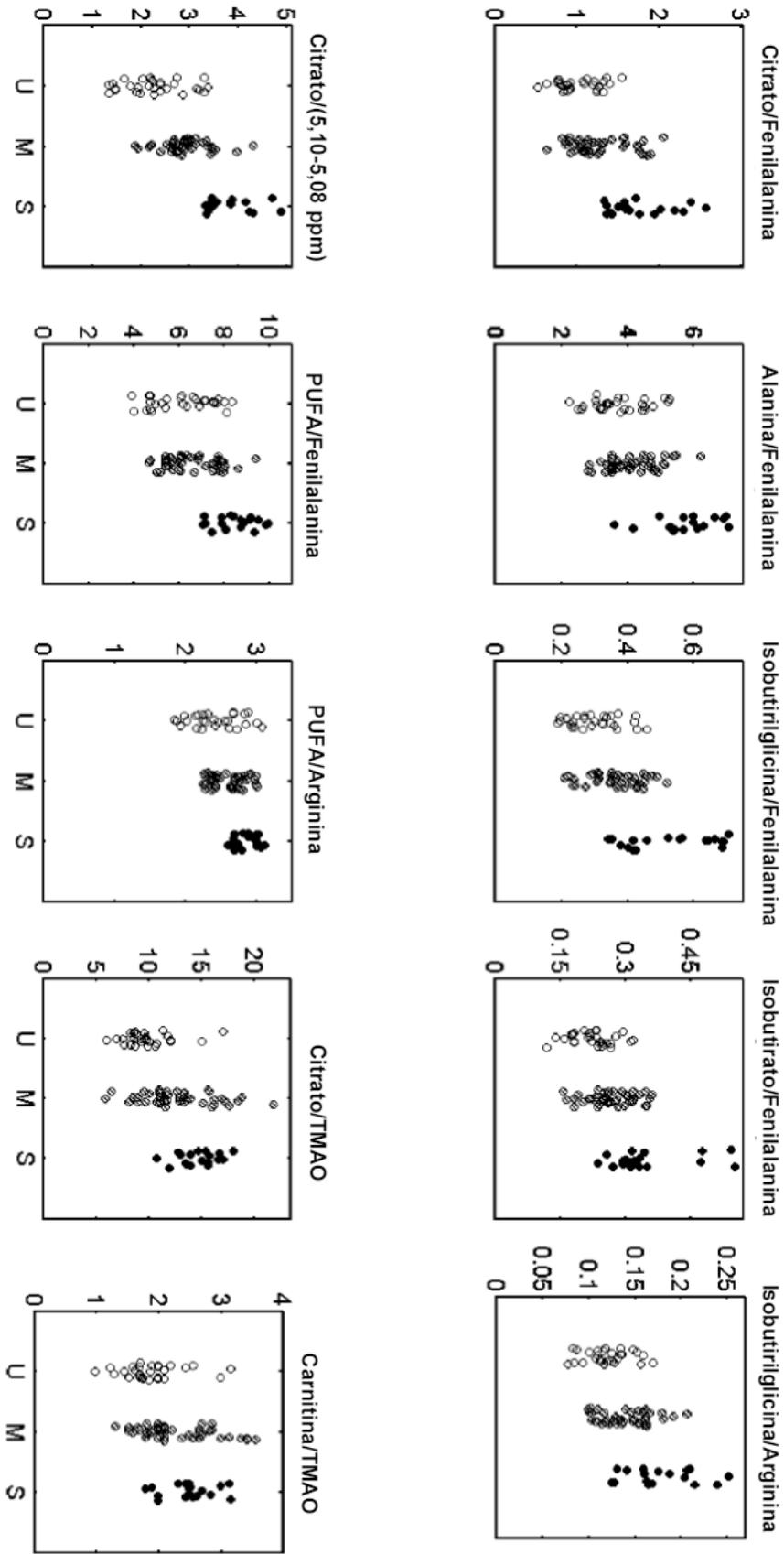


Fig. 5

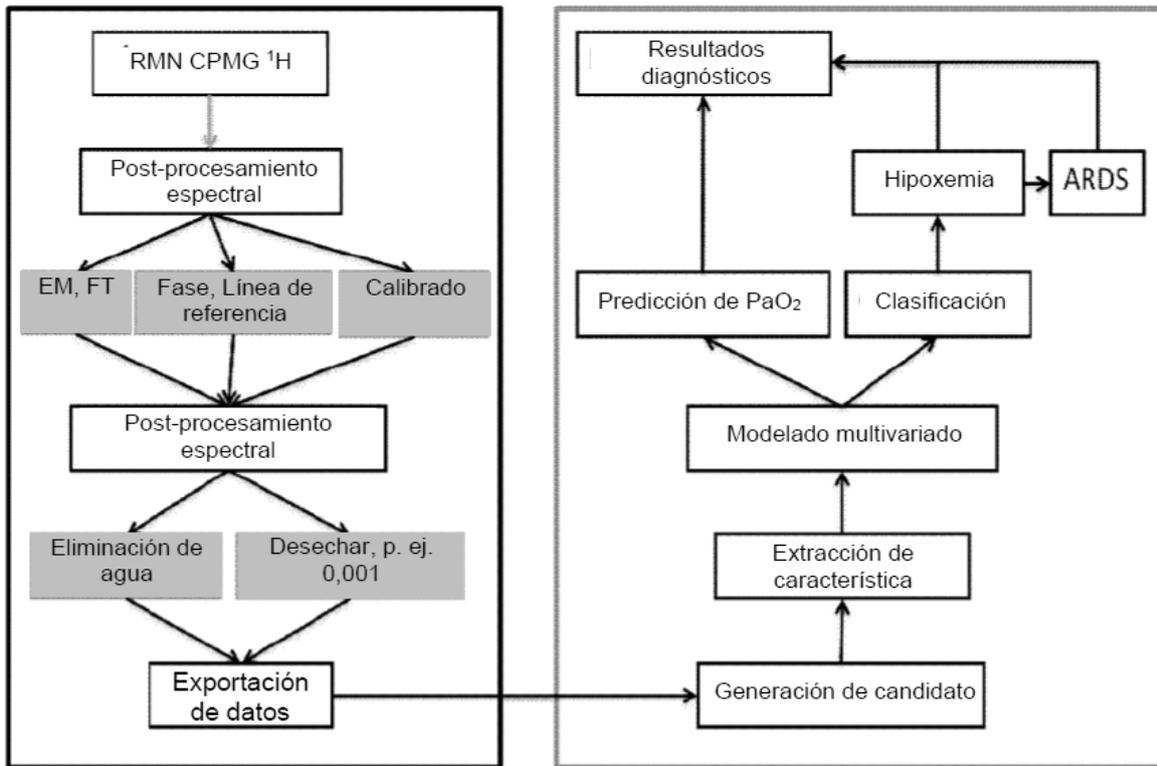


Fig. 6

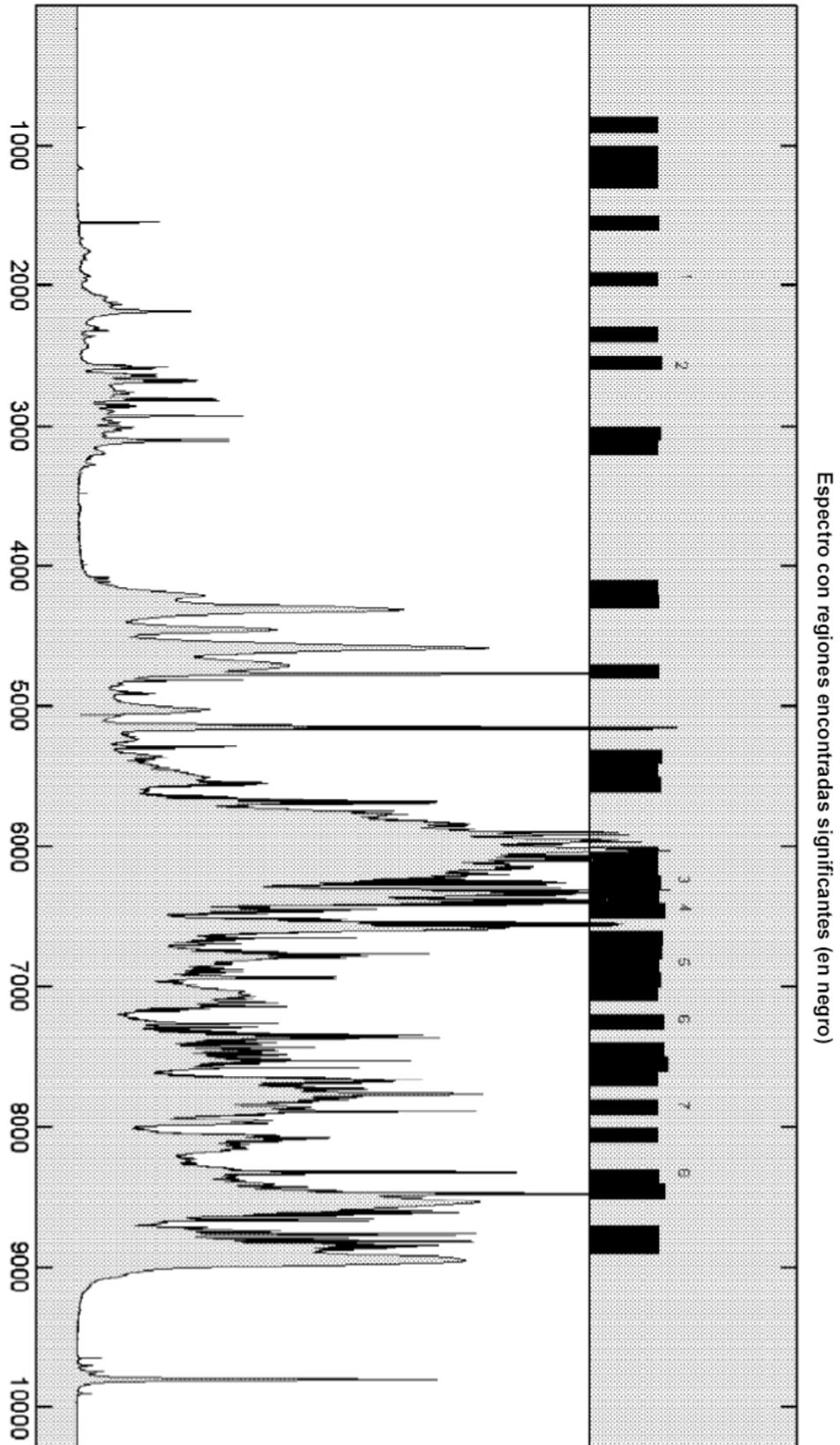


Fig. 7

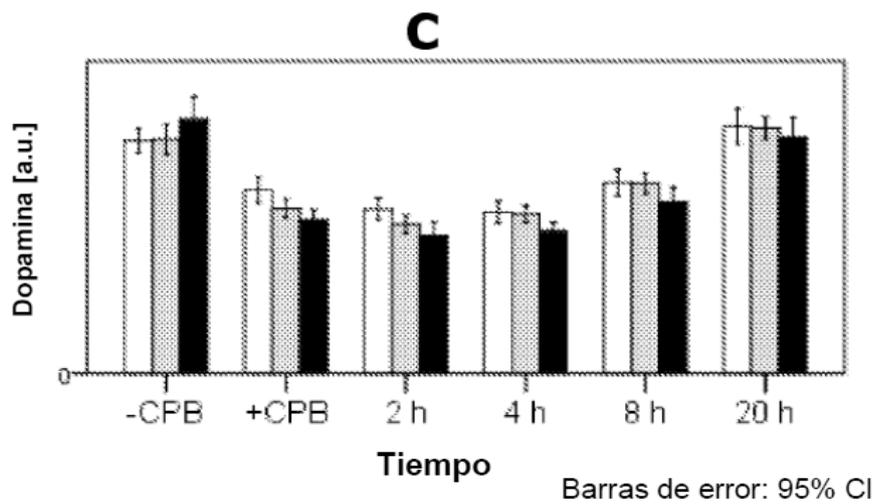
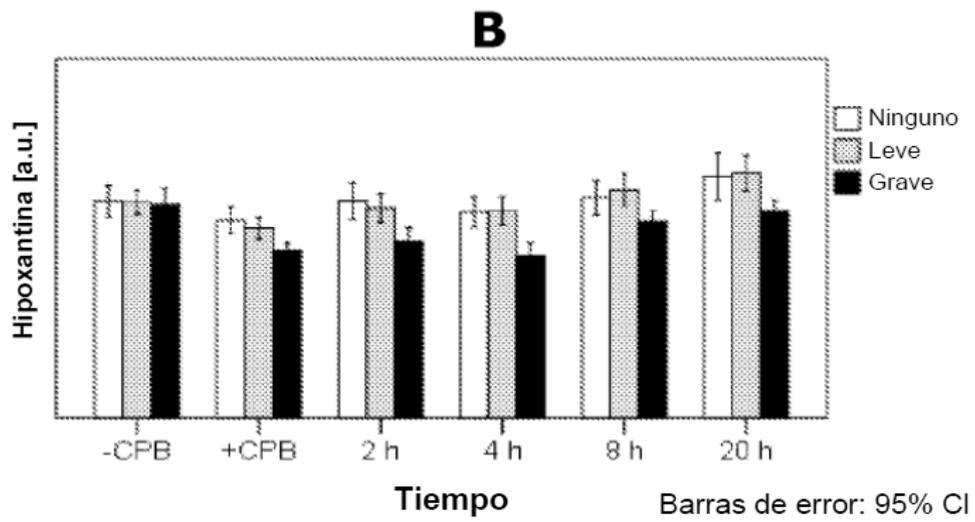
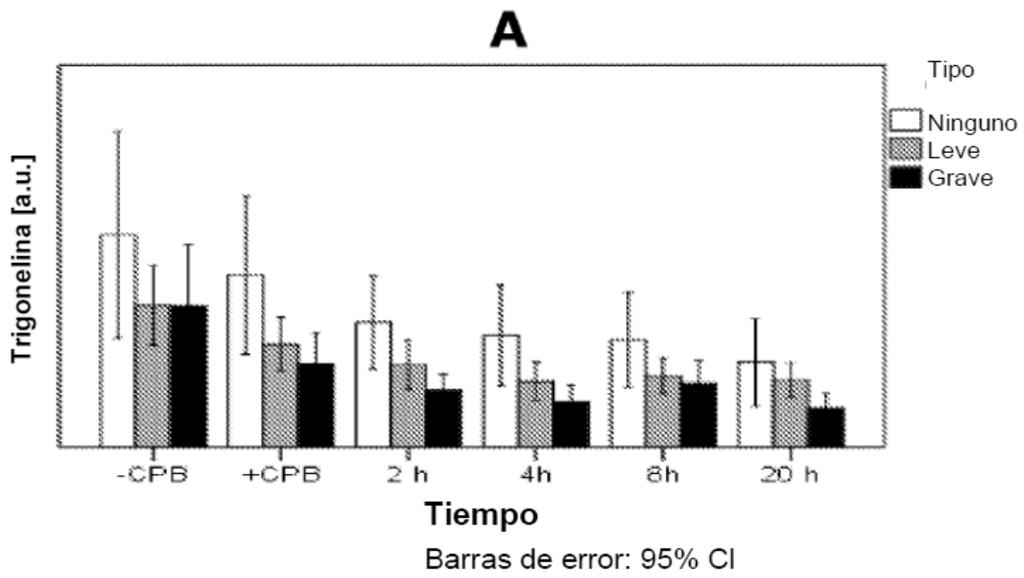


Figura 8, continuación

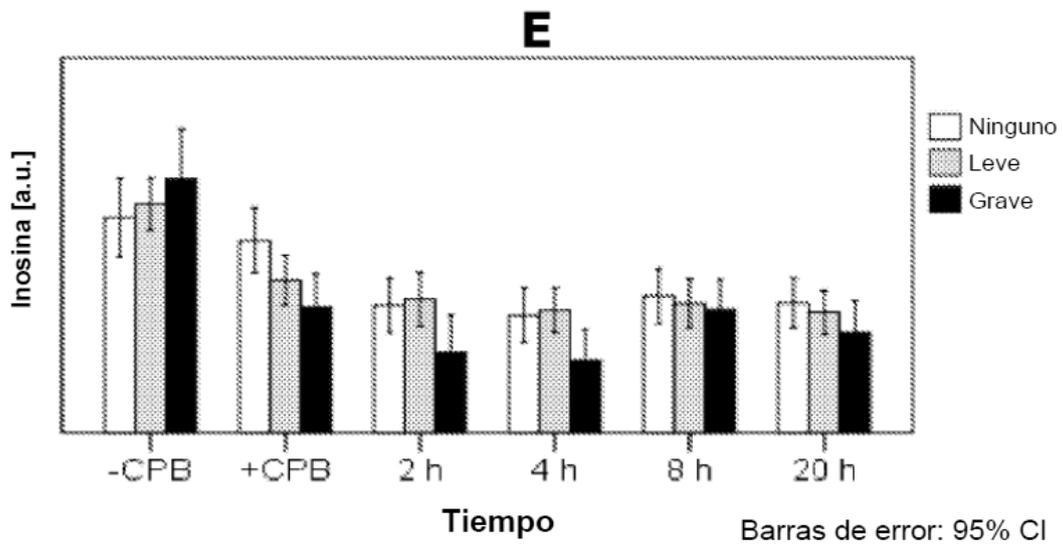
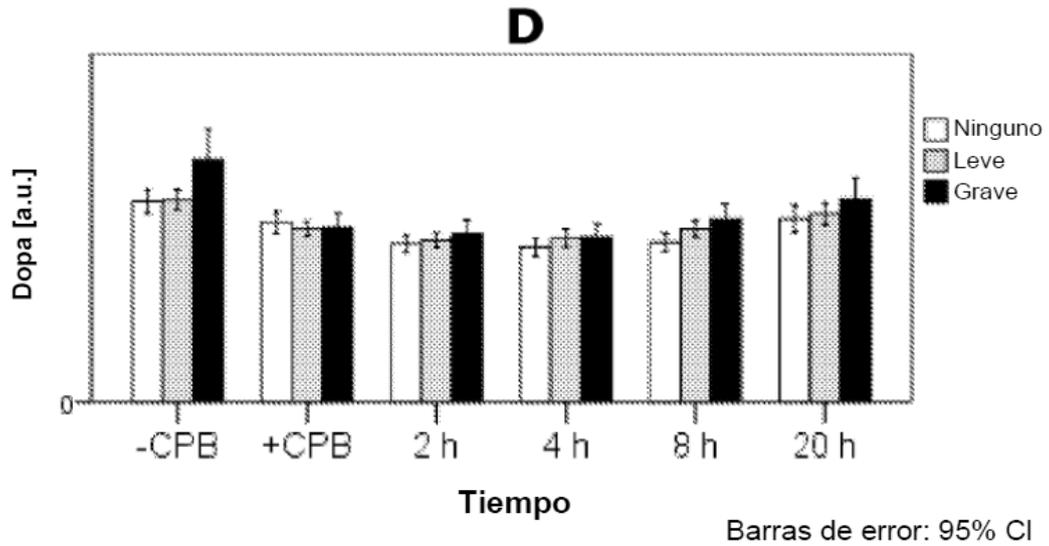


Figura 8, continuación