



UNIVERSITAT DE BARCELONA

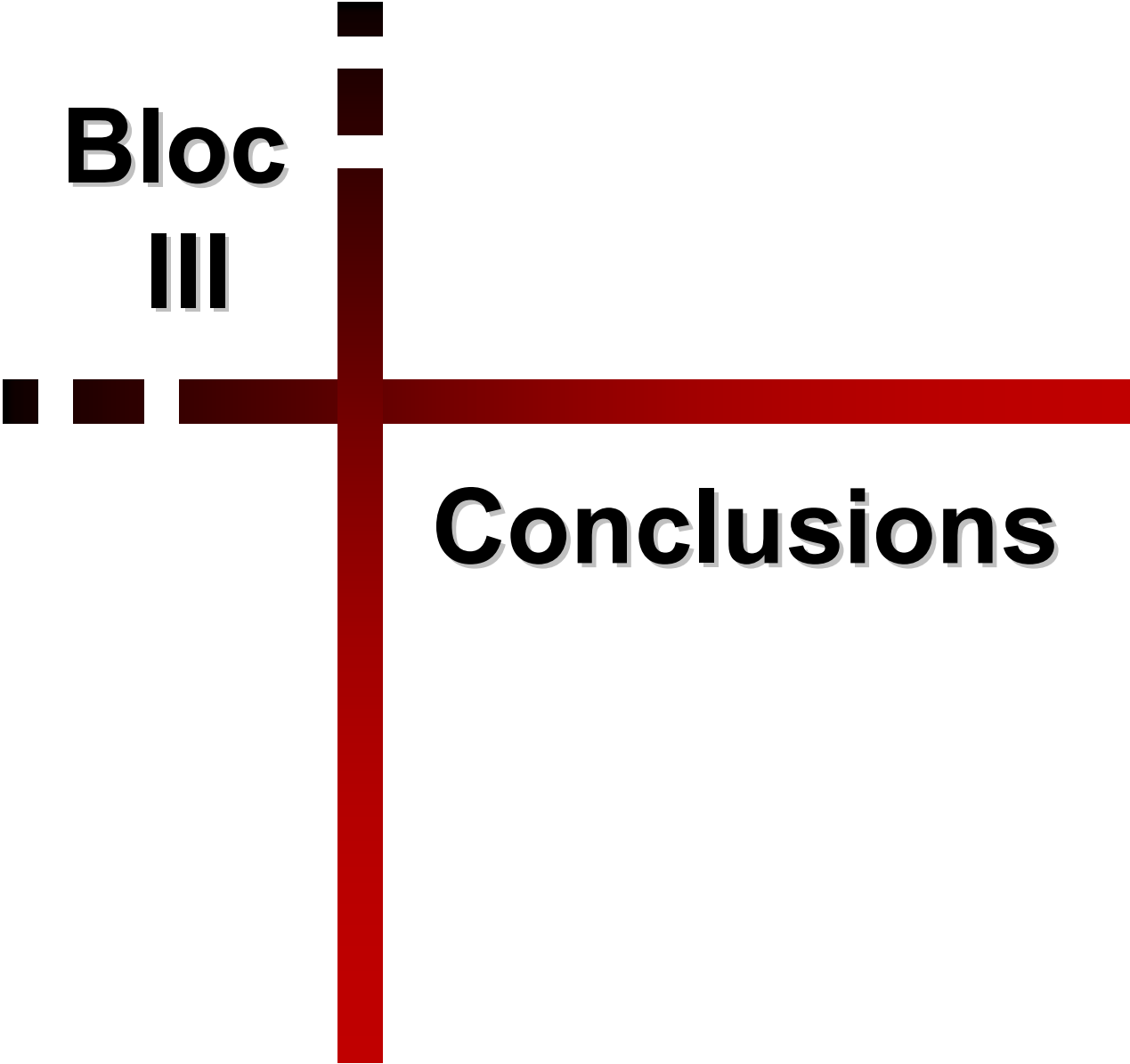


**Nous desenvolupaments,
aplicacions bioanalítiques i
validació de mètodes de
resolució multivariant**

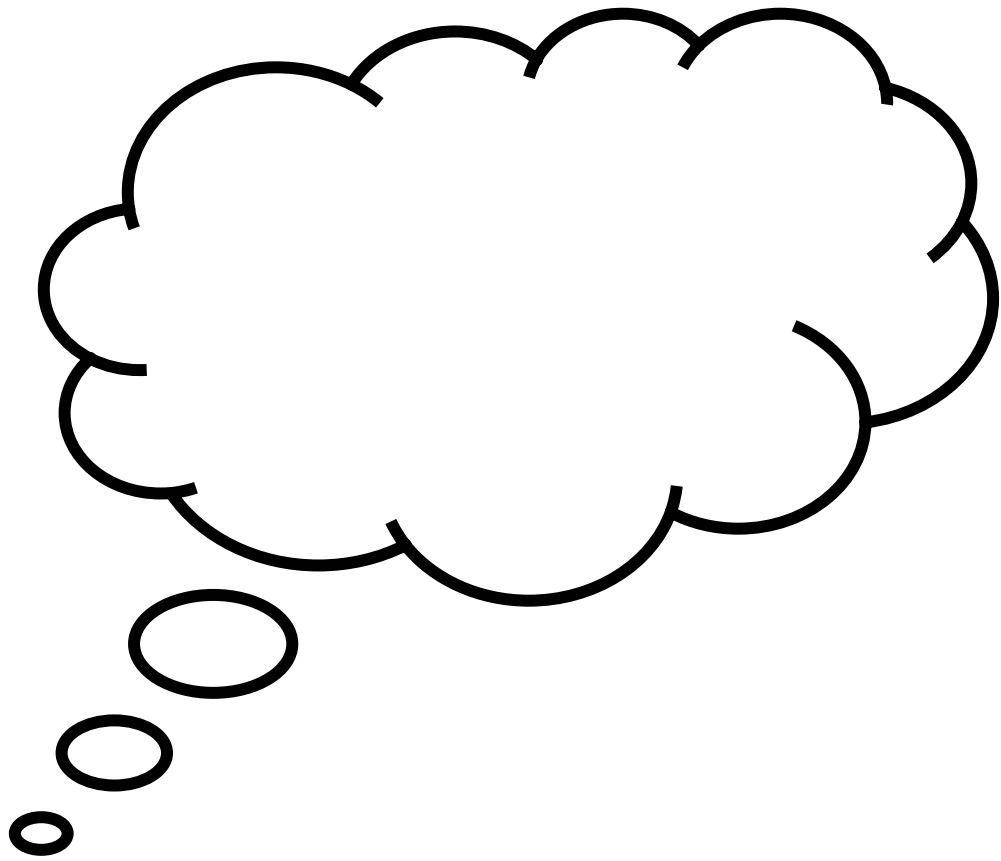
Joaquim Jaumot Soler

**Tesi Doctoral
20 de juny de 2006**

**Bloc
III**



Conclusions



Capítol 6

Conclusions



A partir dels resultats presentats en la memòria d'aquesta Tesi Doctoral es poden extreure les següents conclusions:

- L'aplicació dels mètodes de resolució multivariant, tant de modelització rígida com de modelització flexible, ha permès extreure informació química valuosa a partir de dades de diferent natura com, per exemple, de dades procedents de processos evolutius o de dades procedents d'experiments de micromatrius d'ADN. Mentre que els mètodes de modelització rígida únicament s'han pogut aplicar a casos on es podia postular un model químic (lleis d'equilibri o mecanismes cinètics), els mètodes de modelització flexible s'han pogut aplicar a qualsevol tipus de dades sense necessitat de postular prèviament cap tipus de model. Entre aquests mètodes de modelització flexible s'ha de destacar el mètode de Resolució Multivariant de Corbes mitjançant Mínims Quadrats Alternats (*Multivariate Curve Resolution by Alternating Least Squares*) que és el que s'ha fet servir majoritàriament en aquesta memòria.
- S'ha desenvolupat una interfície gràfica pel mètode MCR-ALS en MATLAB® que ha permès facilitar la selecció de variables i de restriccions de forma molt més intuïtiva. Així, s'ha aconseguit que un algoritme d'optimització com l'utilitzat en MCR-ALS (amb moltes opcions especialment en l'anàlisi simultània de diferents matrius de dades utilitzant diferents restriccions), es pugui fer servir sense necessitat d'un elevat coneixement tant de l'entorn de treball MATLAB® com de la utilització del propi programa MCR-ALS.
- S'ha dut a terme una avaluació de la qualitat dels resultats obtinguts mitjançant el mètode MCR-ALS. Així, s'ha estudiat l'efecte de les restriccions i de l'anàlisi simultània de diferents matrius en les ambigüitats rotacionals i d'intensitat inherents als mètodes basats en l'anàlisi de factors, i en la propagació del soroll experimental en les solucions obtingudes pel mètode MCR-ALS. S'ha determinat que:
 - L'estratègia d'augmentació de matrius aconsegueix pràcticament eliminar els efectes de les ambigüitats rotacionals en les solucions obtingudes pel mètode MCR-ALS. En el cas de treballar amb una única matriu de dades, els resultats obtinguts pel mètode MCR-ALS poden trobar-se considerablement afectats per aquesta ambigüitat depenent de l'estructura

de les dades i de les restriccions aplicades. En el cas de l'estudi de la propagació de l'error experimental s'observa que l'estratègia d'augmentació de matrius permet disminuir l'efecte que té el soroll experimental sobre els resultats obtinguts per aquest mètode.

- L'aplicació de restriccions durant el procés d'optimització ALS serveix per eliminar tant les ambigüitats rotacionals com les ambigüitats d'intensitat. Les millors restriccions per tal d'eliminar els efectes de les ambigüitats rotacionals són la restricció de selectivitat (tant en els perfils de concentració com en els espectrals) i la restricció de no-negativitat. Per tal d'eliminar l'ambigüitat d'intensitat es fa servir la restricció de sistema tancat o la normalització dels perfils.
- Per tal de determinar la propagació del soroll experimental en les solucions MCR-ALS s'ha realitzat la comparació de diferents mètodes de remostratge. Aquesta comparació ha permès seleccionar el mètode de remostratge per addició de soroll com el més adient per a l'estimació de les incerteses associades al mètode MCR-ALS per efecte del soroll experimental.
- S'ha estudiat l'efecte de la restricció de no-negativitat a l'interior del procés d'optimització d'un algoritme de modelització rígida. S'ha comprovat que l'aplicació d'aquesta restricció permet, en la majoria dels casos, evitar l'ambigüitat en la determinació de les constants de velocitat en el cas de dades corresponents a un estudi cinètic.
- S'ha demostrat l'adequació del mètode MCR-ALS per a l'estudi d'equilibris conformacionals d'oligonucleòtids utilitzant diferents tècniques espectroscòpiques. Així, cal destacar la seva aplicació a:
 - Estudis conformacionals de dimerització d'oligonucleòtids entre les estructures anomenades com *dumbbell* i *bi-loop*. En aquests estudis s'ha observat la influència que tenen els diferents cations i que permeten l'estabilització d'una estructura o una altra. L'aplicació del mètode MCR-ALS ha permès resoldre els perfils de concentració i espectres en

diferents condicions experimentals. A partir dels perfils de concentració resolts s'han determinat paràmetres termodinàmics associats a aquests equilibris.

- Estudis sobre la formació i l'estabilitat d'estructures triples paral·leles i antiparal·leles. En aquest cas, el mètode MCR-ALS ha permès determinar els intervals de pH en els quals existeix l'estructura triple, i si la formació d'aquesta és dependent del pH. D'aquesta forma s'ha determinat que l'estructura triple paral·lela estudiada que es forma mitjançant l'aparellament de bases C⁺*(G·C) presenta dependència amb el pH. En canvi, les estructures triples antiparal·leles estudiades no presenten cap dependència amb el pH, la qual cosa les podrien fer especialment útils en les teràpies antigènica i antisentit.
- Estudis sobre les diferents estructures quàdruples que pot adoptar l'oligonucleòtid d(TAG GGT TAG GGT) en solució, i la competició d'aquestes amb la formació de l'estructura dúplex si la cadena complementària de l'oligonucleòtid es troba també en solució. El mètode MCR-ALS ha permès determinar les estructures quàdruples paral·leles i antiparal·leles que es troben simultàniament en solució i determinar els seus espectres associats. A més, en el cas que es trobi la cadena complementària en solució, el mètode MCR-ALS ha permès determinar que la espècie majoritària és l'estructura dúplex. A partir dels perfils de concentració resolts s'han determinat els paràmetres termodinàmics relacionats amb aquests processos.
- S'ha estudiat l'aplicació del mètode MCR-ALS a dades obtingudes mitjançant espectroscòpies multidimensionals. Així, cal destacar:
 - L'anàlisi de processos seguits mitjançant RMN 2D. A partir d'una sèrie d'espectres RMN 2D mesurats a diferents temps s'han resolt per MCR-ALS els perfils de concentració i els espectres RMN 2D purs associats a cadascuna de les espècies determinades. A més, a partir dels perfils de concentració resolts, s'han determinat els diferents passos del mecanisme i les seves constants de velocitat.

- L'anàlisi de dades de micromatrius d'ADN. L'aplicació del mètode MCR-ALS a aquest tipus de dades ha permès la resolució dels perfils de mostres, a partir dels quals es pot determinar si una mostra d'un determinat teixit presenta un determinat tipus de càncer i, també, la resolució dels perfils gènics associats a cadascun dels perfils de mostres anteriors. D'aquesta forma es pot obtenir una classificació de les mostres per tipus de càncer i es poden seleccionar una sèrie de gens candidats a ser els causants de l'aparició d'aquest càncer.