



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE ANGIOTENSINA II POR DILUCIÓN ISOTÓPICA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM

Diego O. Pastene Maldonado

Enero 2016, Oviedo



ADRIANA GONZÁLEZ GAGO, Investigadora post-doctoral del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

PABLO RODRÍGUEZ GONZÁLEZ, Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo, titulado “**Cuantificación absoluta de Angiotensina II por dilución isotópica y espectrometría de masas en tándem**” ha sido realizado por el alumno **DIEGO O. PASTENE MALDONADO** bajo su dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2015-16, y cuya presentación autorizan.

Oviedo, 21 de Enero de 2016

Fdo: Adriana González Gago

Fdo: Pablo Rodríguez González





Indice

Abreviaturas.....	1
INTRODUCCIÓN	2
1. Angiotensina II en el desarrollo de la hipertensión	2
1.1. La hipertensión como factor de riesgo	2
1.2. Control fisiológico de la presión arterial.....	3
1.3. Tratamiento farmacológico de la hipertensión.....	4
1.4. Angiotensina II y sistema renina-angiotensina (RAS).....	5
2. Análisis de angiotensina II por Espectrometría de Masas.....	6
2.1. Espectrometría de Masas frente a técnicas empleadas en rutina.....	6
2.2. Acoplamiento de Cromatografía Líquida a Espectrometría de Masas (LC-MS).....	8
2.3. Espectrometría de Masas en tándem (MS/MS).....	10
2.4. Cuantificación en equipos LC-MS/MS.....	12
3. Cuantificación absoluta de péptidos empleando Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas (IDMS)	13
3.1. Concepto de Dilución Isotópica.....	14
3.2. Cuantificación por IDMS molecular.....	16
3.3. Estrategias de marcaje en IDMS molecular	19
4. Síntesis de trazadores para cuantificación por IDMS.....	19
4.1. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)	20
OBJETIVOS	21
EXPERIMENTAL	22
1. Materiales y reactivos	22
1.1. Reactivos	22
1.2. Materiales	22
2. Instrumentación.....	23
2.1. Software de cálculo en Excel.....	23
2.2. Sintetizador de péptidos en fase sólida <i>LibertyBlue</i>	23
2.3. HPLC-MS/MS Agilent 6460.....	25
2.4. Otros instrumentos	27
3. Procedimientos	27
3.1. Síntesis automatizada de péptidos en fase sólida (SPPS) asistida por microondas....	27
3.2. Análisis por HPLC-MS/MS.....	29



3.3. Procedimiento matemático	30
3.4. Preparación de muestra real.....	32
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
1. Confirmación de péptidos sintetizados.....	33
2. Determinación de fragmentos de medida para IDMS	36
3. Caracterización de patrones	37
3.1. Determinación experimental de la composición isotópica de péptidos sintetizados	37
3.2. Cálculo de pureza del trazador por IDMS inversa	41
4. Cuantificación en muestras acuosas fortificadas	42
4.1. Cuantificación por Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas.....	42
4.2. Características analíticas del método	43
5. Cuantificación en líquido amniótico fortificado.....	44
CONCLUSIONES	46
Agradecimientos	47
BIBLIOGRAFÍA	47



Abreviaturas

$^{13}\text{C}_1$ -Val – Valina enriquecida en un isótopo de ^{13}C
ANG-II – Angiotensina II
Arg - Arginina
Asp – Aspartato
CID – Disociación inducida por colisión
DIC – N,N'-diisopropilcarbodiimida
DMF – N,N-dimetilformamida
ECA – Enzima convertidora de Angiotensina
ESI – Ionización por electrospray
Fmoc[aa] – Aminoácido funcionalizado con 9-fluorometiloxicarbonilo
His – Histidina
HOBt – N-hidroxibenzotriazol
HPLC – Cromatografía Líquida de Alta Resolución
IDMS – Análisis por Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas
Ile – Isoleucina
IPD – Deconvolución de Perfiles Isotópicos
LC – Cromatografía Líquida
MS – Espectrometría de Masas
MS/MS – Espectrometría de Masas en tándem
NMP – N-metilpirrolidona
Oxima – Etil 2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato
Phe – Fenilalanina
Pro – Prolina
PI – Barrido de iones producto en tándem MS
QqQ – Espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo
RAS – Sistema renina-angiotensina
SCAN –Barrido de iones (modo)
SIM – Monitorización de iones selectivos (modo)
SPPS – Síntesis de péptidos en fase sólida
SRM – Monitorización de reacciones selectivas (modo)
TFA – Ácido trifluoroacético
TIC – “Total ion chromatogram”
TIS – Triisopropilsilano
Tyr – Tirosina
UHPLC – Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución
Val – Valina



Introducción

1. Angiotensina II en el desarrollo de la hipertensión

1.1. La hipertensión como factor de riesgo

En 2013, la organización mundial de la salud publicó un informe alertando del grave incremento en la prevalencia de hipertensión sobre la población mundial, caracterizándola de “asesina silenciosa” por su escasa sintomatología en estados tempranos, y por ser un factor de riesgo determinante en algunas de las principales causas de mortalidad como son el infarto de miocardio y los accidentes de tipo cerebro-vascular.¹



Fig. 1 – Mortalidad registrada en 2008 por accidentes cerebrovasculares en el mundo, de los cuales, el 51% tienen como causa directa la hipertensión.¹

De manera general, se habla de un diagnóstico de hipertensión cuando se supera un umbral normotensivo superior a 140/90 mm de Hg (sístole/diástole ventricular) en reposo. Estos valores son consensuados y pueden variar ya que dependen de la procedencia del individuo, edad y género, entre otros.^{2,3}

Todos los casos de hipertensión se diagnostican bajo el mismo criterio: presión arterial por encima del umbral.⁴ Sin embargo, las causas fisiopatológicas que las generan no son idénticas. Muchos de los procesos hipertensivos diagnosticados en primera instancia son identificados como *hipertensión secundaria*, ya que se presupone que derivan de otra afección principal. Sin embargo, existe un grupo considerable de casos de hipertensión que no posee una causa específica aparente (denominada *hipertensión esencial o idiopática*), que representa hasta un 90% de casos clínicos tratados en hospitales y centros de salud.⁵



El punto clave para disminuir y controlar la prevalencia de la hipertensión consiste en llevar hábitos de vida saludables, junto con la prescripción de fármacos orientados a controlar los procesos que producen el incremento de la presión arterial de manera persistente.⁶ El diagnóstico correcto de cada subtipo de hipertensión constituye una herramienta imprescindible para un tratamiento eficaz.⁷ Además es muy importante profundizar en el estudio de los procesos fisiológicos que causan el desarrollo de la hipertensión, con el fin de tratarla convenientemente y disminuir su prevalencia.

1.2. Control fisiológico de la presión arterial

La prescripción de anti-hipertensivos permite controlar el desarrollo de la hipertensión actuando sobre distintos procesos fisiológicos. Para entender la estrategia farmacológica utilizada, se debe comprender cómo trabajan estos durante la homeostasis del organismo. A pesar de su complejidad, es posible identificar dos mecanismos fisiológicos principales.

1.2.1. Resistencia vascular

La resistencia vascular hace referencia a la fuerza opuesta que debe superar el corazón para impulsar la sangre a través del aparato circulatorio. A mayor resistencia, la contracción del corazón aumenta, elevando la presión sobre las arterias.

La resistencia depende principalmente de la estructura tisular de los vasos, la cantidad, y el diámetro de los mismos.⁸ El mecanismo fisiológico más inmediato, y por ello el más importante en el control de la presión arterial, es la regulación del diámetro vascular. En situaciones donde se necesita disminuir la presión, la resistencia vascular se reduce aumentando el diámetro de los vasos, lo que se conoce como *vasodilatación*. En este proceso participa el sistema nervioso central, y algunos moduladores neuroendocrinos tales como péptidos u hormonas.⁹ Alguno de los fármacos prescritos mimetizan el efecto de estos moduladores o suprimen su actividad.

1.2.2. Nivel de agua en plasma

El contenido hídrico del plasma se regula principalmente a través de la función del sistema excretor. En casos donde se necesite reducir rápidamente la presión arterial, se procede a trasvasar agua desde el plasma a la orina para su eliminación, proceso denominado *diuresis*.

Parte de este trasvase se produce de manera continua a través de la libre filtración del plasma, debiéndose a procesos exclusivamente físicos, independientes de la necesidad de agua en los tejidos del cuerpo. Posteriormente se produce un reajuste del contenido hídrico por reabsorción o eliminación del agua filtrada, empleando mecanismos osmóticos controlados hormonalmente.¹⁰



Por esta razón, muchos fármacos diseñados para disminuir la presión arterial tienen como fundamento favorecer la eliminación de agua ya sea bloqueando su recaptación hormonal o utilizando sustancias con efecto diurético.

Ambos procesos fisiológicos son las dianas más efectivas en el tratamiento de la hipertensión al ser *mecanismos sistémicos*. Por ello, la gran mayoría de fármacos se han diseñado con el propósito de intervenir a distintos niveles de estos procesos.

1.3. Tratamiento farmacológico de la hipertensión

1.3.1. Diuréticos

El agente anti-hipertensivo más recurrente para iniciar un tratamiento es la prescripción de diuréticos que disminuyen el contenido hídrico del plasma favoreciendo la eliminación de agua en la orina limitando su recaptación o promoviendo activamente su eliminación. Esto tiene como efecto la disminución de la presión ejercida por la sangre sobre las paredes vasculares.¹¹

1.3.2. Calcio-antagonistas

Estos fármacos favorecen la vasodilatación y disminuyen la resistencia vascular. Están diseñados para bloquear canales de calcio dependientes del voltaje, presentes en el músculo liso de los vasos sanguíneos, evitando así su contracción. Son altamente efectivos, pero poseen numerosos efectos secundarios ya que los procesos regulados por calcio se extienden por todo el organismo. Por ello se emplean casi exclusivamente para tratar la hipertensión persistente.¹²

1.3.3. β -bloqueantes

Los β -bloqueantes son fármacos ampliamente utilizados en el tratamiento de la hipertensión y se prescriben normalmente en terapia combinada junto con los diuréticos. Su uso reduce la actividad del sistema nervioso simpático que conlleva una reducción en la contracción del músculo liso vascular, la fuerza de contracción del corazón, y la supresión de la acción de algunos vasoconstrictores como la noradrenalina.¹³

1.3.4. RAS-inhibidores

En hipertensión persistente o de causa primaria, la prescripción farmacológica más común es la inhibición del sistema renina-angiotensina (RAS). Estos fármacos actúan interrumpiendo la formación o actividad de angiotensina II, el efector final del sistema. La alta eficacia de estos fármacos se debe a que angiotensina II se ha identificado como el principal agente hipertensivo del organismo, siendo mediador tanto de procesos nerviosos como hormonales relacionados con la presión arterial. En muchos casos de hipertensión, este sistema se encuentra sobre-estimulado o bien la respuesta fisiológica a angiotensina II incrementada.¹⁴



A pesar de que el descubrimiento del RAS se produjo hace más de un siglo,¹⁵ y su finalidad en el organismo se creía comprendida en su totalidad, en los últimos veinte años se han descubierto nuevos intermediarios de la ruta clásica, así como nuevas funciones de angiotensina II.

1.4. Angiotensina II y sistema renina-angiotensina (RAS)

La angiotensina II es un péptido de 8 aminoácidos con secuencia Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe, que se genera en muchos tejidos, principalmente en el epitelio de los alveolos pulmonares. Este péptido se identificó como un potente vasoconstrictor en sus inicios. Hoy en día se sabe que también coordina indirectamente la respuesta hipertensiva tanto a nivel de organismo como de tejido.¹⁶ Además, se le atribuye un papel determinante en el desarrollo del tejido renal, así como en otros órganos durante la gestación.¹⁷

El mecanismo enzimático que la genera se conoce con el nombre de *sistema renina-angiotensina* (RAS). Se trata de una ruta que implica sucesivos cortes enzimáticos de una proteína de elevado peso molecular liberada por el hígado denominada *angiotensinógeno*. La descripción de la ruta general clásica y su actividad se resumen en la Fig. 2.

En condiciones normales, ante un estímulo hipotensivo, las glándulas suprarrenales responden liberando el enzima *renina*. Este complejo enzimático corta el angiotensinógeno circulante generando un péptido de 10 aminoácidos llamado *angiotensina I* (secuencia: Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu), sin actividad fisiológica conocida. Este último seguirá circulando por la sangre hasta el epitelio alveolar. En los pulmones, el *enzima convertidor de angiotensina* (ECA) corta dos residuos del extremo carboxilo terminal de angiotensina I, dando origen a *angiotensina II*.

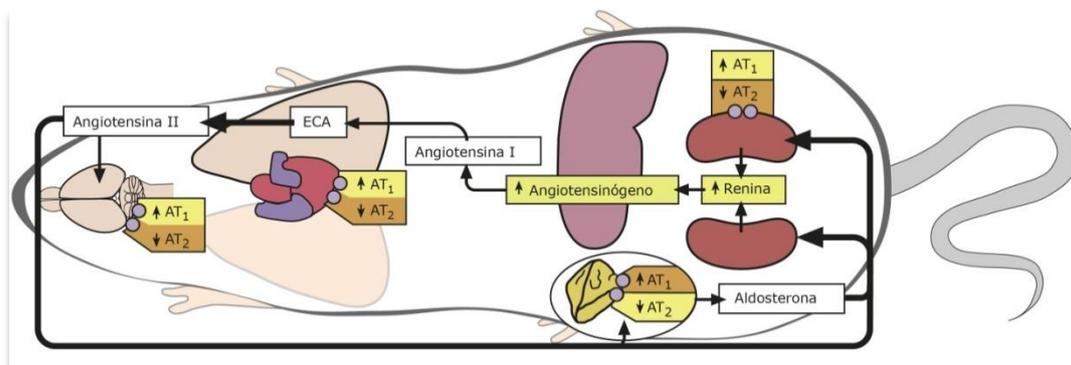


Fig. 2 – Esquema de la actividad RAS en rata. Angiotensina II actúa en múltiples órganos del cuerpo, donde existen receptores de tipo AT. Se resaltan los principales tejidos diana, extrapolables al ser humano (adaptado de referencia ⁴⁴).



A través de los receptores AT₁ la angiotensina II actúa en múltiples tejidos del organismo. Eleva la presión arterial a través del aumento de la resistencia vascular (*vasoconstricción*), y la recaptación de agua en el sistema excretor. Además posee otro receptor, AT₂, que tiene un ligero efecto vasodilatador, y cierta actividad en el crecimiento celular. Son posiblemente estos últimos los que participan durante el desarrollo fetal y la gestación.¹⁸

Sin embargo, a pesar de la importancia que se le atribuye a este péptido como desencadenante de la hipertensión, y diana de los principales agentes farmacológicos, no existen muchas metodologías que permitan determinar la cantidad de angiotensina II efectiva durante el aumento de la presión arterial. Estas podrían ser de utilidad para descartar otras causas de hipertensión secundaria como es el caso de *aldosteronismo primario*, cuya etiología no implica una sobre-estimulación del eje RAS.¹⁹

Además, se han identificado numerosos casos de teratogénesis en fetos durante la gestación atribuibles al uso de fármacos de tipo RAS-inhibidores, prescritos para controlar el desarrollo de hipertensión durante el embarazo.^{17,20-22}

Por estas razones resulta necesario desarrollar nuevas metodologías de cuantificación fiables, sensibles, sencillas, exactas y precisas para cuantificar angiotensina II de manera rutinaria.

2. Análisis de angiotensina II por Espectrometría de Masas

2.1. Espectrometría de Masas frente a técnicas empleadas en rutina

En ciencias de la vida existe una gran preferencia por técnicas de análisis basadas en afinidad antígeno-anticuerpo, altamente consolidadas como es el caso de los inmunoensayos. Esto se debe a que poseen gran sensibilidad y menor tiempo de análisis en comparación con otras técnicas analíticas como la Espectrometría de Masas.

Además, desde finales del siglo XX ha habido una verdadera revolución en este tipo de análisis gracias a la miniaturización, automatización y reducción en sus costes de producción lo que ha permitido aumentar su accesibilidad. Cabe resaltar también que el uso de anticuerpos u otras moléculas de alta afinidad permiten disminuir significativamente la manipulación y el tiempo necesario para llevar a cabo la preparación de la muestra.

Sin embargo la validación de métodos de análisis basados en inmunoensayos es complicada, ya que poseen un elevado número de falsos positivos por la presencia de interferentes, que no es aceptable en situaciones donde se necesita alta fiabilidad de los resultados, como es el caso de la cuantificación absoluta de proteínas.



A pesar de las ventajas detalladas anteriormente, en la bibliografía aun no existen descritas metodologías de cuantificación de angiotensina II por métodos de afinidad inmunológica. Por el contrario en la actualidad se pueden encontrar diferentes publicaciones en las que se cuantifica la angiotensina II mediante Espectrometría de Masas.²³⁻²⁷

La ausencia de inmunoensayos en la cuantificación de angiotensina II se debe a una característica esencial y revolucionaria del sistema renina-angiotensina: su compleja ruta metabólica, y el descubrimiento de nuevos intermediarios “tipo angiotensina” con actividad hipertensante (como angiotensina II) e hipotensante (Fig. 3). Estos últimos, en particular, se oponen al papel exclusivo de RAS en el desarrollo de la hipertensión.

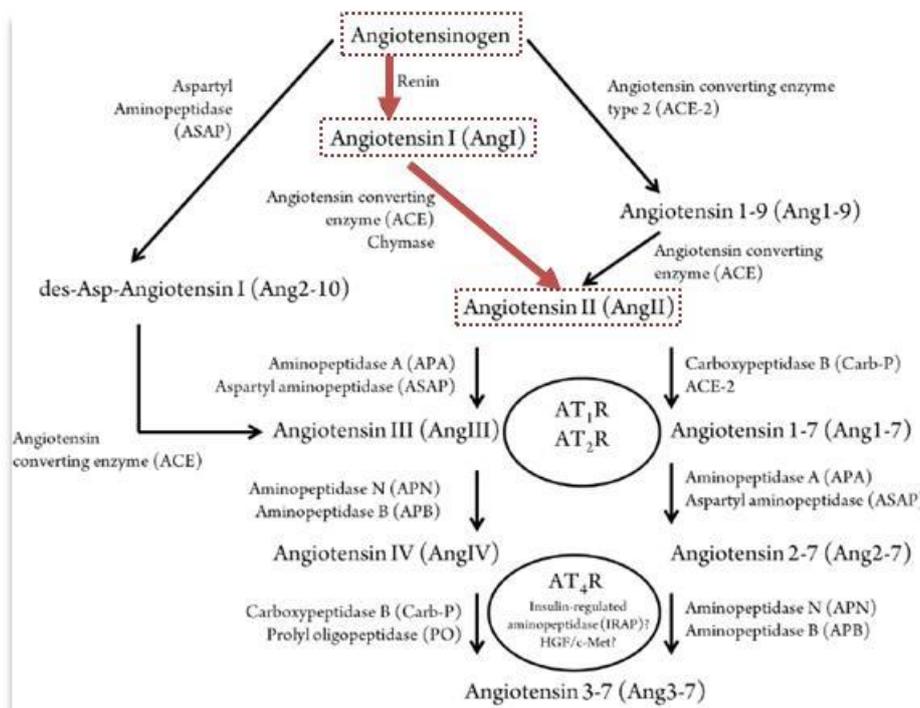


Fig. 3 – Nueva ruta bioquímica del eje RAS. Además de angiotensina II, existen múltiples intermediarios efectoros con actividad similar en los receptores AT(1-2). Se resalta la ruta original descrita.⁴⁵

Las diferencias estructurales entre estos péptidos “tipo angiotensina” de angiotensina II se encuentran principalmente en sus aminoácidos terminales, que son distintos por el corte de muchos otros enzimas además de la ECA antes mencionada.²⁸

En estudios realizados para evaluar la especificidad de inmunoensayos se ha encontrado que estos son incapaces de discriminar péptidos “tipo angiotensina” de angiotensina II, mientras que sí es posible mediante técnicas de Espectrometría de Masas.²⁹ Este hecho en primera instancia invita a explorar nuevas alternativas analíticas, con el fin de expandir el conocimiento sobre la ruta bioquímica de RAS además de evidenciar la necesidad de incorporar nuevas técnicas en ciencias de la vida.



La Espectrometría de Masas es hoy por hoy una herramienta trascendental en el estudio de biomoléculas en sistemas complejos. Esto se debe en gran parte a su capacidad de acoplamiento en línea tanto a técnicas de separación de alta resolución (tipo cromatografía), como la incorporación de distintos analizadores de masa en un mismo equipo.

La Espectrometría de Masas ha sido clave en el desarrollo de la proteómica cualitativa y cuantitativa,³⁰ ya que es una de las herramientas más eficaces para determinar de manera independiente, precisa y específica moléculas en matrices complejas como biomoléculas en fluidos corporales de los sistemas vivos.

2.2. Acoplamiento de Cromatografía Líquida a Espectrometría de Masas (LC-MS)

El aislamiento de compuestos inmersos en matrices complejas es un requerimiento previo esencial para su análisis por Espectrometría de Masas. Esto es a menudo un trabajo complejo y tedioso que aumenta los tiempos de análisis y el número de pasos intermedios, un problema que también conlleva la aparición de errores aleatorios y el incremento de la incertidumbre analítica.

La incorporación de un sistema cromatográfico acoplado en línea con un espectrómetro de masas solventa en gran medida este inconveniente, permitiendo la detección de diferentes compuestos presentes en una misma muestra tras su separación cromatográfica.

De las técnicas cromatográficas existentes, la Cromatografía de Gases posee mayor resolución y mejor transferencia de los analitos desde la columna al espectrómetro de masas.

Sin embargo, los péptidos y las proteínas son biomoléculas que poseen en general un elevado peso molecular y una baja volatilidad, por lo que resultan poco adecuados para su separación mediante Cromatografía de Gases. Este tipo de moléculas pueden descomponerse en sus aminoácidos constituyentes mediante digestiones en medio ácido y transformar los aminoácidos en sustancias volátiles a través de procesos de derivatización. Sin embargo esta estrategia es muy poco específica e incrementa notablemente los tiempos de análisis y la manipulación de la muestra. Por ello, la Cromatografía de Gases no suele ser la técnica de separación más utilizada para el análisis de péptidos y proteínas.

La Cromatografía Líquida (LC), por el contrario, no precisa de este tratamiento adicional gracias al desarrollo de fuentes de ionización con capacidad de generar iones en fase gaseosa a partir de una muestra líquida o sólida. Sumado a esto, hoy en día el desarrollo de sistemas de Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución (UHPLC), permite mejorar la separación alcanzada con la LC convencional y acortar el tiempo de análisis.



Fuentes de ionización a presión atmosférica - electrospray

La efectividad de los sistemas LC-MS no sería posible sin un sistema que modifique el estado de los iones desde su fase líquida a una gaseosa. Esto se consigue implementando fuentes que trabajan a presión atmosférica, que son capaces de generar una breve interfase líquido-gas. De las existentes, destaca la fuente de ionización por electrospray (ESI) debido a su excelente acoplamiento a la Cromatografía de Líquidos.³¹⁻³³ El proceso de ionización en la fuente de electrospray se muestra en la Fig. 4.

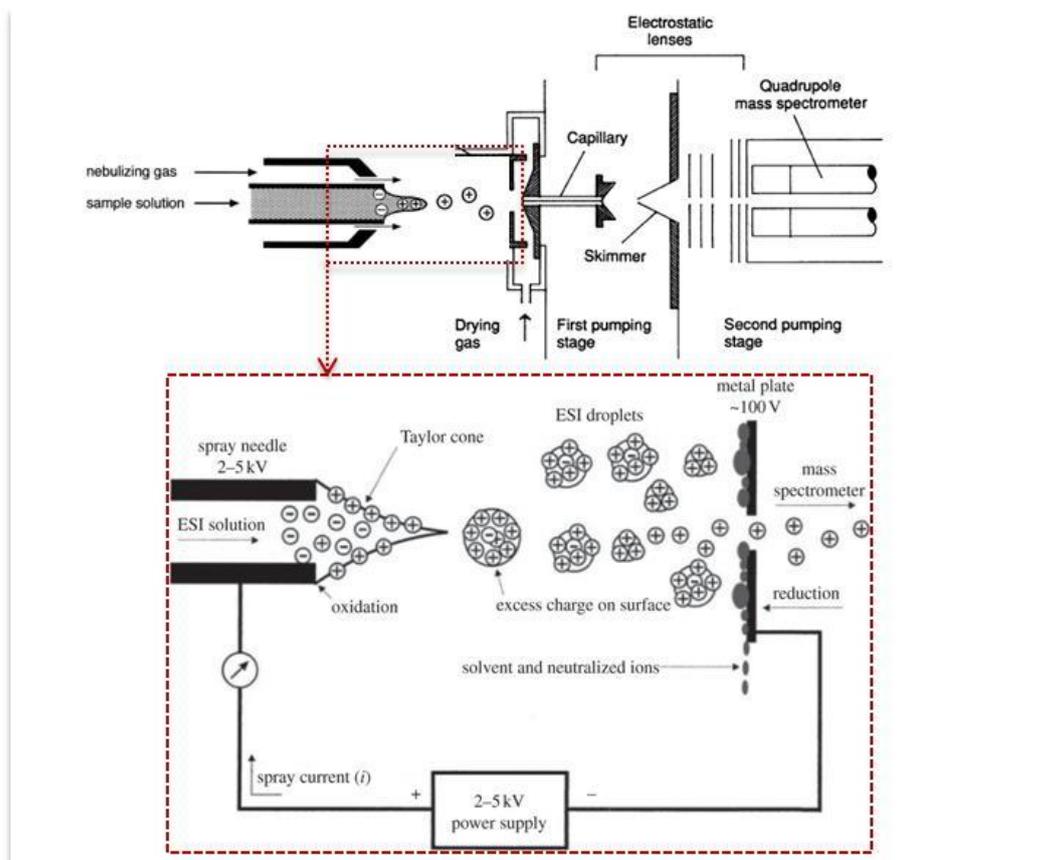


Fig. 4 – Proceso de ionización por fuente ESI. Se amplía la zona donde se produce la ionización a presión atmosférica.^{34,46}

La ionización ocurre por la aplicación de un potencial negativo en la punta del capilar de inserción, que fomenta la asociación entre cationes libres (adicionados previamente a la muestra) y los analitos. La alta presión ejercida por el sistema cromatográfico fuerza la expansión adiabática del líquido, dispersándolo en pequeñas gotas de iones electropositivos (*electrospray*). Mediante un flujo de N₂ introducido en el sistema, el disolvente se evapora, concentrando las cargas positivas en cada gota. Cuando el volumen de estas disminuye, las fuerzas de repulsión provocan una expulsión de los iones contenidos (conocida como explosión de Coulomb), formando gotas electropositivas cada vez más pequeñas hasta



convertirse en iones en fase gaseosa, que son finalmente dirigidos por una diferencia de potencial y de presión hacia la entrada del analizador.³⁴

Esta forma de ionización depende de parámetros como la composición del disolvente, las fases móviles empleadas, y el campo eléctrico utilizado, además de la naturaleza del analito. Los analitos de elevado peso molecular, que posean varios puntos básicos en su estructura como los péptidos, tendrán la posibilidad de tener múltiples estados de ionización

De los tipos de Cromatografía Líquida existentes, la de fase reversa es la más adecuada para este tipo de estudios, debido a que los péptidos y las proteínas poseen residuos con interacciones hidrófobas que permiten su interacción con una fase estacionaria de la misma naturaleza. Además, el uso de disolventes orgánicos como fases móviles contribuye a agilizar la evaporación del disolvente, que favorece la repulsión de cargas y el proceso del electrospray.

2.3. Espectrometría de Masas en tándem (MS/MS)

La Espectrometría de Masas también permite la combinación de más de un analizador de masas en serie, lo que se conoce como Espectrometría de Masas en tándem (MS/MS).

Un analizador de masas permite discriminar iones en función de su relación m/z (masa/carga) mediante la aplicación de campos magnéticos y eléctricos. De los analizadores existentes, el de tipo cuadrupolo es uno de los más utilizados por su simplicidad, bajo coste, alta velocidad de barrido y un amplio rango lineal. La Fig. 5 detalla la estructura de este tipo de analizadores.

Un cuadrupolo consta de cuatro barras conductoras conectadas dos a dos que conforman dos planos perpendiculares (positivo y negativo), sobre los que actúa un voltaje compuesto por una corriente continua y una alterna o de radiofrecuencias. Cada ion en su interior seguirá una trayectoria oscilante particular dependiendo de su relación m/z para un mismo voltaje. Solo aquellos iones que describan una trayectoria estable podrán llegar al detector mientras que el resto serán desviados fuera del cuadrupolo. De la misma manera, es posible variar el voltaje para que secuencialmente se detecten todos los iones generados en la fuente y distinguir diferencias de aproximadamente una unidad de masa.

Así, en el cuadrupolo se puede llevar a cabo un barrido de voltajes (*modo barrido o SCAN*), o fijar voltajes específicos para detectar solo los iones de interés, actuando como filtro (también llamado *modo SIM, Selected ion monitoring*). Esto es extremadamente útil para cuantificar iones, ya que la señal adquirida en el modo SIM será más sensible, debido a que el tiempo invertido en la medida se utiliza sólo en la relación m/z especificada. Sin embargo, la baja resolución de masa que proporciona el cuadrupolo no permite resolver el problema de las interferencias espectrales. Esto se solventa en gran medida utilizando la Espectrometría de Masas en tándem.



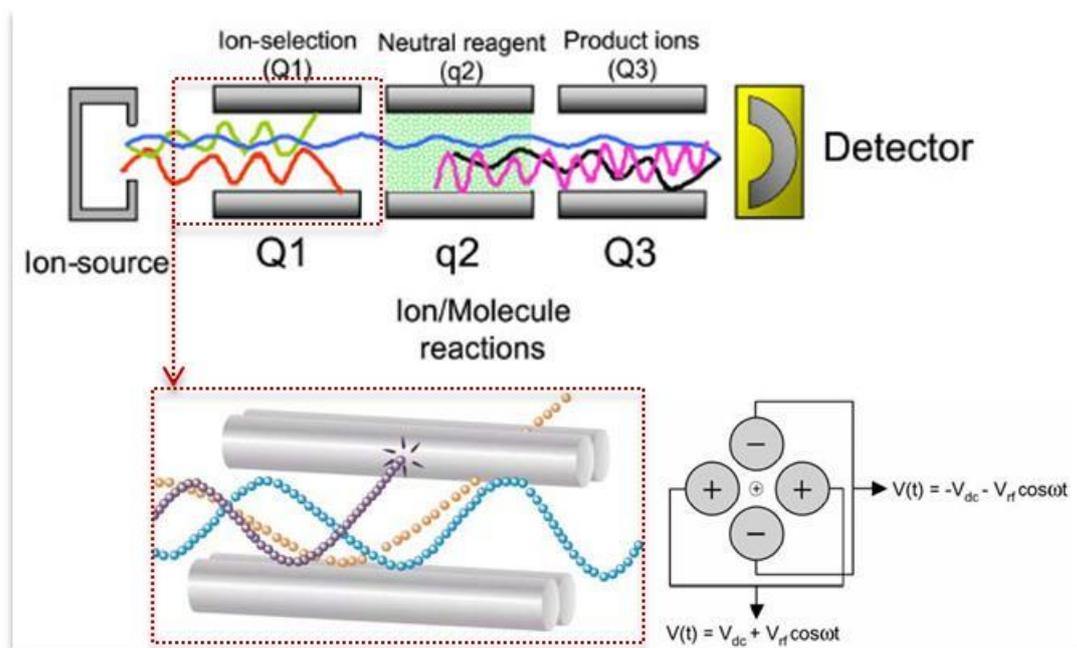


Fig. 5 – Esquema de un espectrómetro de masas en tándem tipo triple cuadrupolo (QqQ). Se amplía el primer analizador, donde se observa en corte transversal los ejes de voltaje positivo y negativo.⁴⁷⁻⁴⁹

Los sistemas MS/MS constan de una fuente de ionización, un detector, y al menos dos analizadores de masas. Uno de los más utilizados tanto para propósitos cualitativos como cuantitativos es el de *triple cuadrupolo* (QqQ) esquematizado en la Fig. 5.

Este tipo de instrumentos consta de dos analizadores de masas, entre los que se sitúa una celda de colisión de tipo cuadrupolo, hexapolo u octapolo. La celda de colisión se presuriza con un gas inerte como N₂ o Ar. Los iones formados en la fuente y seleccionados en el primer cuadrupolo colisionan con las moléculas de gas inerte para formar iones producto mediante disociación inducida por colisión (CID). Finalmente los iones producto son analizados en el segundo analizador de masas.

El espectrómetro de masas de triple cuadrupolo permite mejorar la selectividad y la sensibilidad del análisis en ciertos modos de trabajo, así como obtener información estructural de un ion en particular. Existen cuatro modos de trabajo que dependen exclusivamente de la función barrido o SIM de los dos analizadores de masas (Fig. 6).

Modo barrido de iones producto (PI)

Consiste en seleccionar un ion precursor en el primer analizador, fragmentarlo en la celda de colisión y hacer un barrido en el segundo analizador para detectar todos los iones producto generados tras el proceso CID. Este modo permite extraer información estructural de los precursores para su identificación.



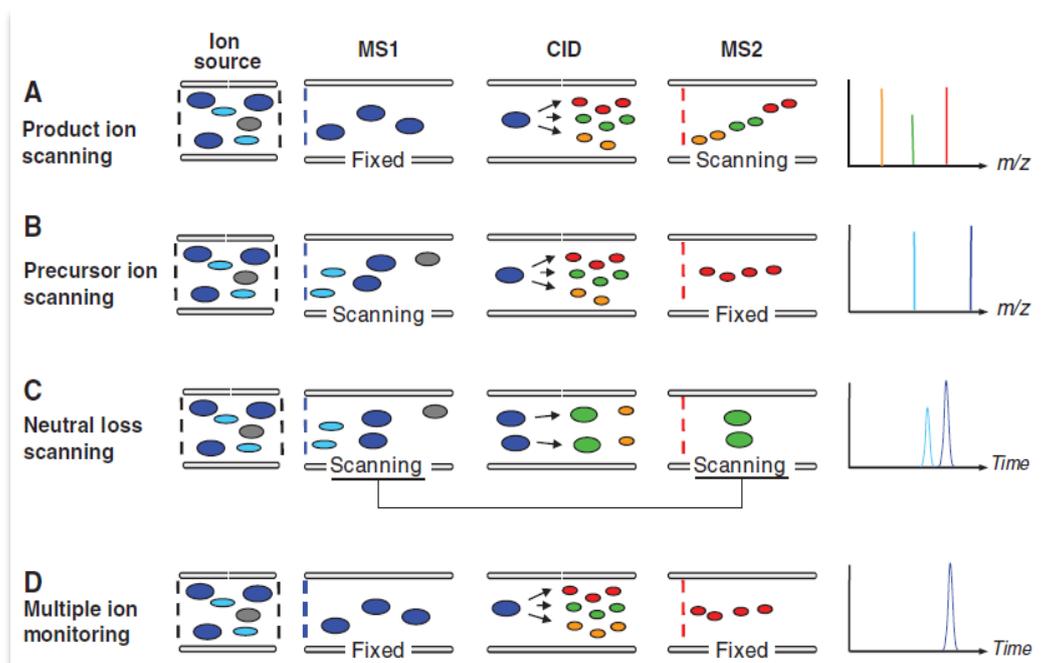


Fig. 6 – Modos de trabajo en Espectrometría MS/MS.⁵⁰

Modo barrido de iones precursores

Este modo invierte la función de los analizadores, actuando el primer analizador en modo barrido y el segundo analizador en modo SIM. Se utiliza para evaluar la presencia de un ion producto en particular de un conjunto de precursores.

Modo pérdidas neutras

En este modo de trabajo se sincronizan los dos analizadores de masas en función barrido para que solo aquellos iones que pierdan un grupo particular en CID lleguen al detector. Ello permite identificar precursores con grupos específicos no ionizables, como modificaciones post-traduccionales.

Modo monitorización de reacciones selectivas (SRM)

En este modo ambos analizadores actúan como filtros, permitiendo solo la detección de un ion producto a partir de un único precursor. Este modo de trabajo proporciona gran selectividad, e incrementa la relación señal/ruido, por lo que es muy útil para la cuantificación de analitos presentes en muestras complejas, ya que minimiza la señal de fondo del equipo respecto al ion de interés gracias a la función de filtro que realizan ambos cuadrupolos.

2.4. Cuantificación en equipos LC-MS/MS

La cuantificación de analitos mediante Espectrometría de Masas en tándem requiere, como en todos los instrumentos de medida, una calibración metodológica que relacione cantidades de analito con la señal obtenida por el equipo.



Sin embargo, la eficiencia de ionización de los analitos a determinar, especialmente en la fuente de electrospray, depende en gran medida de la composición de la muestra (efectos de matriz) lo que afecta a la exactitud y precisión de las medidas. Estas variaciones necesitan ser corregidas durante el proceso de medida mediante una estandarización.

Existen diferentes metodologías de cuantificación basadas en el uso de patrones internos, que consisten en comparar la señal relativa entre analito y un patrón interno añadido a la muestra. Esta metodología permite corregir algunos efectos de matriz y deriva de la señal instrumental, además de pérdidas parciales que puedan ocurrir durante la preparación de la muestra.

La adición de un patrón interno para el calibrado aporta fiabilidad a los resultados cada vez que se desee cuantificar un analito, siendo esencial en todo análisis mediante LC-MS recurrir a este procedimiento.

3. Cuantificación absoluta de péptidos empleando Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas (IDMS)

Una de las estrategias de cuantificación más interesantes debido a su gran exactitud y precisión, aunque menos extendidas en rutina, es la cuantificación mediante *Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas (IDMS)*.

Esta metodología se considera un método analítico primario por su directa trazabilidad al sistema internacional de unidades, además su uso minimiza la incertidumbre analítica comparada con otras técnicas analíticas. Sin embargo, su uso no ha sido del todo extendido debido al elevado coste de los espectrómetros de masas, así como de los reactivos marcados isotópicamente necesarios para llevar a cabo este tipo de análisis. Por ello, su principal aplicación en el análisis de rutina ha consistido principalmente en la validación de otros métodos analíticos considerados más asequibles y en la certificación de materiales de referencia.

A pesar de este hecho, resulta de gran interés para el desarrollo de nuevos métodos analíticos que proporcionen resultados fiables, sobre todo a la hora de cuantificar potenciales biomarcadores de interés diagnóstico presentes en distintos tipos de muestra a niveles de concentración muy bajos. Sumado a esto, se han desarrollado metodologías de cuantificación a través de la Dilución Isotópica que no requieren el uso de rectas de calibrado, basadas exclusivamente en la medida de una única muestra.



3.1. Concepto de Dilución Isotópica

La Dilución Isotópica consiste en la adición a una muestra de un análogo enriquecido isotópicamente (trazador isotrópico) al analito de interés, que presentará idealmente idénticas propiedades físico químicas. El resultado final de esta adición provocará un cambio en las abundancias isotópicas originales del analito en la muestra, que solo es posible detectar por técnicas de Espectrometría de Masas (Fig. 7).

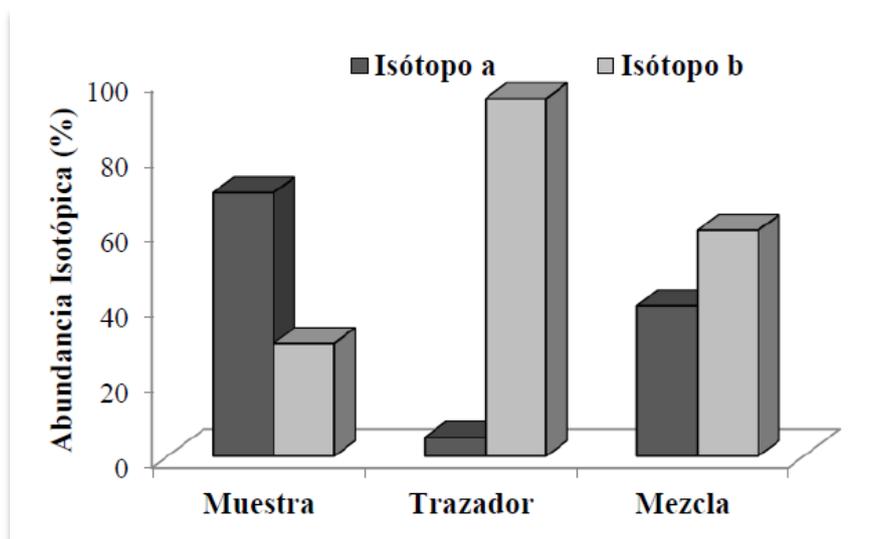


Fig. 7 – Ejemplo de Dilución Isotópica. El trazador posee una composición isotópica enriquecida en el isótopo *b*, diferente a la de la del analito en muestra. Tras la adición del trazador, el perfil isotópico de la mezcla cambia, siendo una combinación lineal de ambos perfiles independientes.³⁵

Con esta metodología es posible determinar la cantidad de analito presente en una muestra, conocida la cantidad de trazador añadida previamente y la cantidad de muestra empleada en el análisis.

Para poder llevar a cabo la determinación fiable de los analitos mediante IDMS deben tenerse en cuenta ciertos aspectos:

- > El *comportamiento de trazador y analito* deben ser idénticos durante todo el proceso analítico.
- > El *trazador debe estar perfectamente caracterizado tanto en concentración como en enriquecimiento isotópico*.
- > Se debe alcanzar un equilibrio isotópico completo entre la muestra y el trazador.

La mezcla entre la muestra y el trazador debe realizarse al comienzo del proceso de preparación de muestra, ya que esto permitirá corregir pérdidas de la muestra que pudieran ocurrir durante las distintas etapas de preparación.



Además, una vez establecido el equilibrio isotópico entre la muestra y el trazador, potenciales efectos de matriz y la variabilidad en la medida debida a la deriva de la señal instrumental o fluctuaciones en la eficacia de la ionización pueden ser corregidas.³⁵

IDMS elemental en el estudio de péptidos

El análisis por IDMS puede llevarse a cabo para determinar tanto elementos como moléculas. Para la cuantificación de péptidos se han utilizado estrategias de IDMS elemental (utilizando equipos de ionización elemental como ICP-MS) a través del marcaje isotópico de heteroátomos presentes en su estructura, como azufre.³⁶ Esto es más conveniente que la cuantificación con patrones internos ya que una vez desarrollado el método, el cálculo de la concentración de un analito se puede obtener a través de la ecuación general de la Dilución Isotópica (**Ecuación 1**) sin necesidad de recurrir a un calibrado metodológico

$$C_s = C_t * \frac{m_t}{m_s} * \frac{W_s}{W_t} * \frac{A_t^b}{A_s^a} * \left(\frac{R_m - R_s}{1 - R_m * R_s} \right) \quad \text{(Ecuación 1)}$$

, siendo s: muestra, t: trazador, m: mezcla; C_n: concentración; W_n: peso atómico; A_nⁱ: abundancia del isótopo i; m: peso experimental; R_n: relación de abundancias isotópicas entre a y b. Mientras que a y b, corresponden a los isótopos de referencia en la muestra y trazador respectivamente.

Sin embargo, no todos los péptidos presentan aminoácidos con azufre en su estructura (como el caso de angiotensina II). Además esta estrategia requiere controlar las posibles fuentes externas de azufre ajenas al péptido deseado o la presencia de interferentes, muy comunes en la medida de relaciones isotópicas de azufre por ICP-MS.³⁵

IDMS molecular en el estudio de péptidos

Las estrategias de IDMS molecular clásicas utilizadas en muchos estudios se basan en realidad en el uso de trazadores isotópicos como patrones internos.

Los análogos isotópicamente marcados de los analitos se consideran los mejores patrones internos disponibles, ya que teóricamente presentan idénticas propiedades fisicoquímicas.

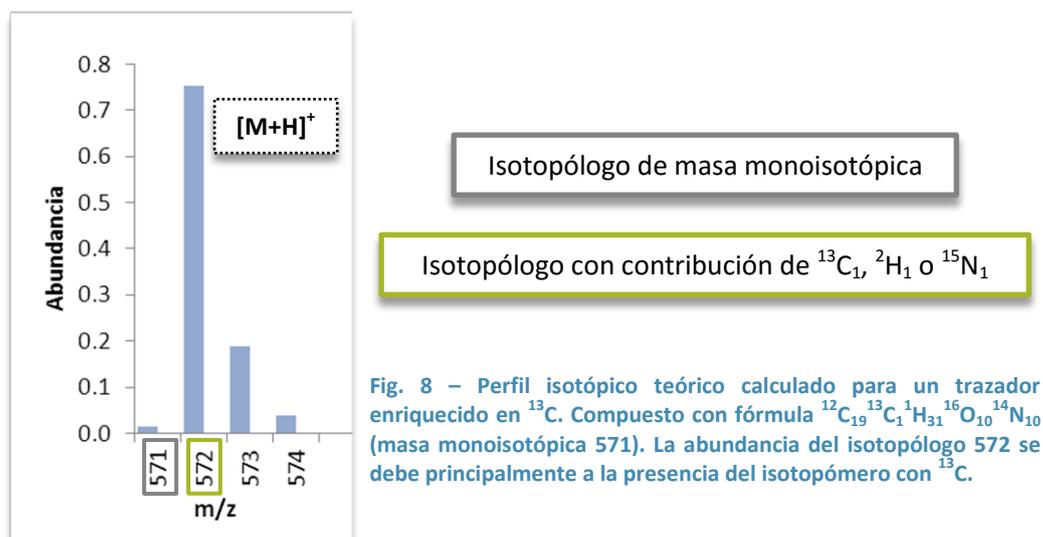
En los métodos clásicos de IDMS molecular se preparan patrones de calibrado con cantidades crecientes del analito (con abundancias isotópicas naturales), y se añade una cantidad constante del trazador tanto a la muestra como a los patrones de calibración. Representando la relación de señales obtenidas para el analito y el trazador frente a su relación de moles se obtiene una recta de calibrado que permite obtener la concentración de analito en la muestra.³⁵



La estrategia de marcaje consiste en sustituir uno o varios elementos del compuesto por isótopos estables de los mismos, pudiendo ser heteroátomos (como ^{34}S) o ^2H , ^{13}C , ^{15}N o ^{18}O .

La cuantificación sin embargo no es directa como en el caso de la dilución isotópica elemental sino que se realiza una aproximación empírica basada en la construcción de un calibrado metodológico.

Una de las razones para utilizar esta estrategia en lugar de la **ecuación 1** es que es necesario conocer la composición isotópica del analito y el trazador, ya que cada m/z observada (o *isotopólogo*) de un espectro molecular de baja resolución corresponde principalmente a la combinación de abundancias isotópicas de todos los elementos en la molécula (Fig. 8).³⁵



3.2. Cuantificación por IDMS molecular

3.2.1. Empleo de trazador como patrón interno

La señal analítica dependerá de la cantidad de moles presentes en la muestra. Tras la adición del trazador, tendremos una cantidad de moles iguales a:

$$N_m = N_s + N_t \quad (\text{Ecuación 2.1})$$

La modificación de las abundancias naturales en alguno de los elementos del trazador, implica modificar las abundancias de los isotopólogos que conforman su espectro de masas (Fig. 8). Si la modificación ocurre únicamente en uno de sus átomos, la abundancia de los isotopólogos a y b en la mezcla viene determinada por:

$$N_m A_m^a = N_s A_s^a + N_t A_t^a \quad (\text{Ecuación 2.2})$$

$$N_m A_m^b = N_s A_s^b + N_t A_t^b \quad (\text{Ecuación 2.3})$$

Donde el trazador presentará mayor abundancia de b y el analito mayor abundancia de a .



Ambas ecuaciones (2.2 y 2.3) pueden dividirse para obtener una relación constante entre las abundancias isotópicas en la mezcla y eliminando de la ecuación la cantidad total de moles:

$$\frac{N_m A_m^a}{N_m A_m^b} = R_m = \frac{N_s A_s^a + N_t A_t^a}{N_s A_s^b + N_t A_t^b} \quad (\text{Ecuación 2.4})$$

Esta relación es constante en todo momento si a y b se comportan de manera idéntica durante todo el análisis. Si se divide esta ecuación por N_t , que también es constante, se obtiene:

$$R_m = \frac{\frac{N_s}{N_t} A_s^a + A_t^a}{\frac{N_s}{N_t} A_s^b + A_t^b} \quad (\text{Ecuación 2.5})$$

Si se emplea una cantidad suficiente de átomos marcados en la molécula, se evitará el solapamiento espectral del compuesto natural y análogo marcado. De esta forma, la contribución del trazador en la abundancia de a es 0, y la contribución del analito en la abundancia de b también será 0, quedando una relación de tipo lineal:

$$R_m = \frac{N_s}{N_t} * \frac{A_s^a}{A_t^b} \quad (\text{Ecuación 2.6})$$

Marcaje múltiple

Si se observa la **ecuación 2.6**, se puede apreciar que evitando el solapamiento espectral se obtiene una recta con pendiente equivalente a la relación de abundancias, y con única incógnita N_s , ya que R_m es una medida experimental. Esto tiene como ventaja asegurar que no hay contribución del analito en b y del trazador en a . Sin embargo, el uso de múltiples átomos marcados isotópicamente en una molécula puede contribuir a la aparición de *efectos isotópicos* (diferencias en las propiedades físicoquímicas entre el analito y el trazador).

Marcaje mínimo

El empleo de un marcaje isotópico mínimo no presenta este último problema. Sin embargo, como se aprecia en la **ecuación 2.5** la contribución de ambos compuestos en las abundancias de a y b dan como resultado una relación más compleja (tipo polinómica) que dificulta el tratamiento de los datos.

3.2.2. Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD)

En términos prácticos, la cuantificación empleando IDMS molecular como calibrado con patrón interno no ofrece grandes cambios respecto al uso de un calibrado con patrón interno convencional. Sin embargo, aun siendo el mejor método de patrón interno existente, su



principal uso en rutina clínica está restringido a validar métodos más directos y asequibles. Esto se debe a la necesidad de aumentar la cantidad de reactivos, el coste de los mismos, y el consumo de tiempo empleado para un análisis. Inconvenientes que pueden ser solventados mediante la cuantificación por Deconvolución de Perfiles Isotópicos o IPD.

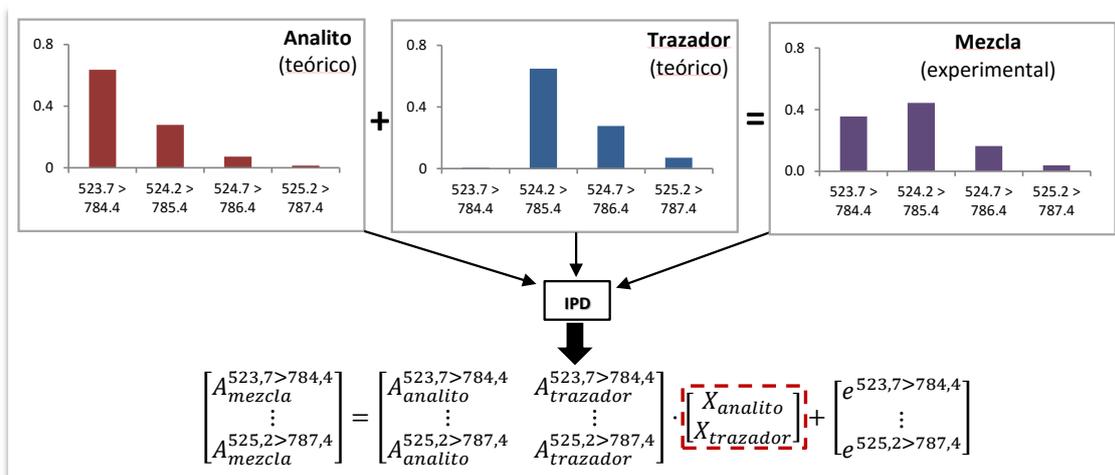


Fig. 9 – Cálculo de fracciones molares de analito y trazador (X_n) por Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD). La matriz resultado corresponde a las abundancias obtenidas de manera experimental por Espectrometría de Masas, y corresponden a la contribución porcentual de las abundancias independientes de trazador y analito. Debido a que la solución se obtiene por ajuste de mínimos cuadrados, también se calcula una matriz de error.

La Deconvolución de Perfiles Isotópicos (IPD) permite separar matemáticamente la contribución del analito y el trazador, cuyas señales se encuentran solapadas experimentalmente. Este procedimiento considera que las abundancias isotópicas medidas en la mezcla son una combinación lineal de las abundancias teóricas del compuesto natural y su análogo marcado. A través de una regresión lineal múltiple es posible obtener las fracciones molares del analito y trazador en la mezcla. La Fig. 9 resume este procedimiento.

La relación entre las fracciones molares del analito y el trazador será igual a la relación de moles, pudiendo expresarse mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{X_s}{X_t} = \frac{N_s}{N_t} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

, donde X_s y X_t son las fracciones molares del analito y el trazador respectivamente; y N_s , N_t simbolizan la cantidad de moles de analito y trazador.

Por tanto, conociendo las abundancias teóricas de analito y trazador, y realizando una medida experimental de las abundancias en la mezcla, es posible determinar sus fracciones molares por IPD, y aplicarlas a la **ecuación 3** para determinar la cantidad inicial de analito en la muestra.



Con esta estrategia, la cuantificación es inmediata y evita llevar a cabo un calibrado con patrones internos. Además, evita la aparición de efectos isotópicos ya que a mayor solapamiento (menor diferencia de masa entre analito y trazador), menor posibilidad de diferencias fisicoquímicas entre ellos.³⁵

3.3. Estrategias de marcaje en IDMS molecular

El enriquecimiento del trazador puede realizarse a través de distintos elementos que formen parte de la molécula y se puede marcar en uno o más átomos de uno o varios elementos. Carbono, hidrógeno, oxígeno y nitrógeno se utilizan típicamente como marca isotópica ya que son elementos que poseen más de dos isótopos estables, y por tanto, sus abundancias pueden alterarse.

Sin embargo, no todos los tipos de marcaje son adecuados ya que los elementos que forman parte de la molécula pueden presentar diferencias en cuanto a estabilidad de enlace (como por ejemplo H). Además, la posición del marcaje es crucial ya que en muchos procesos de ionización molecular los analitos se fragmentan pudiendo perder la marca, haciendo indistinguibles las señales procedentes del analito y del trazador. Por ello, debe buscarse una estrategia de marcaje que permita la conservación de la marca en la fuente de ionización que se pretenda utilizar para llevar a cabo las medidas.

De los elementos antes comentados, el empleo de ^2H es el más utilizado ya que es económico y su incorporación al trazador es menos problemática.³⁵ Sin embargo, se ha observado que múltiples marcas de ^2H pueden dar lugar a efectos isotópicos, observándose comportamiento distinto entre el trazador y al analito.

En estudios comparativos, se ha visto que un marcaje múltiple con ^{13}C no presenta efectos isotópicos tan acusados. Además, el marcaje con carbono es más estable ya que posee mayor número de enlaces. Sumado a esto, hoy en día es posible conseguir distintos aminoácidos enriquecidos en ^{13}C que pueden ser fácilmente incorporados en la posición deseada de una determinada secuencia peptídica.

4. Síntesis de trazadores para cuantificación por IDMS

Un aspecto interesante de abordar es la síntesis de trazadores propios para su aplicación.

A pesar de que la síntesis química es tanto laboriosa como compleja, para el caso de péptidos y proteínas las nuevas tecnologías permiten hoy en día llevar a cabo esta tarea de manera automatizada. Algo que facilita sustancialmente el trabajo a personas poco familiarizadas con la síntesis orgánica.



Existen dos métodos principales para obtener estos compuestos: la síntesis biológica mediante inserción de genes en seres microbiológicos, o la síntesis química en fase sólida. Ambas estrategias poseen ventajas en determinados campos. Sin embargo, la síntesis en fase sólida asegura un mayor grado de control en cuanto a pureza y efectividad, además de la capacidad de situar una marca isotópica en un sitio específico.

4.1. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)

Al contrario que en la síntesis biológica, la síntesis en fase sólida construye la secuencia de aminoácidos desde el extremo carboxilo al amino terminal. El proceso químico consiste en utilizar un soporte sólido insoluble en el medio de reacción, denominado *resina*, sobre la que está anclado el último aminoácido del péptido por su extremo carboxilo, quedando libre el extremo amino. Debido a que los aminoácidos poseen grupos reactivos, su comercialización para síntesis se realiza en forma protegida. Ello implica que todos los grupos reactivos (como el extremo amino terminal) se encuentran bloqueados para evitar las reacciones competitivas, promoviendo exclusivamente la adición entre el extremo amino del péptido en crecimiento y el extremo carboxilo del aminoácido en disolución. Esta estrategia además maximiza la vida útil de los reactivos.

Síntesis asistida por microondas

El uso de microondas en SPPS fue descrito por primera vez en 1992 utilizando un microondas doméstico convencional, donde se demostró que las microondas aceleran considerablemente el proceso de síntesis. Refinamientos en los equipos permitieron producir campos de microondas más reproducibles, estables y uniformes, haciendo de esta tecnología un complemento obligatorio en los sintetizadores de hoy en día. La razón de esta mejora se debe principalmente a tres características: (i) incrementos en la probabilidad de interacción en las dos etapas de activación (carbodiimida-extremo carboxilo, y posterior reacción con el extremo amino), (ii) aumento de la vibración molecular, impidiendo la agregación de la cadena creciente; y (iii) un mejor control de la temperatura por radiación infrarroja, promoviendo las dos características anteriores. La síntesis de péptidos enriquecidos para su uso como trazadores (en IDMS), permite ahorrar costes sustanciales; ya que los costes de los aminoácidos es inferior al de péptidos con una marca específica. Además, amplía el uso de los reactivos para otros fines paralelos, y permite flexibilidad en la ubicación de la marca isotópica del péptido. Debido que la síntesis se basa en un proceso secuencial en el que se van llevando a cabo etapas consecutivas de desprotección, adición de los reactivos necesarios y lavado se han desarrollado instrumentos que permiten automatizar la síntesis de péptidos.



Objetivos

En el presente Trabajo de fin de Máster se plantea cuantificar de manera absoluta el péptido angiotensina II mediante Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas en tándem acoplada a Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Para ello se desarrollará un método analítico en el que se utilizará como trazador angiotensina II mínimamente marcada y la metodología IPD antes descrita.

Este objetivo fundamental se abordará a través de los siguientes objetivos parciales:

- I. En primer lugar se sintetizará angiotensina II enriquecida (trazador isotópico) utilizando un aminoácido marcado en un ^{13}C . La síntesis se llevará a cabo por un proceso de síntesis en fase sólida automatizado y asistido por microondas.
- II. A continuación se llevará a cabo la caracterización del péptido marcado tanto en pureza como en enriquecimiento isotópico para su posterior uso como trazador en la determinación de angiotensina II.
- III. Finalmente se desarrollará y validará un método para la determinación de angiotensina II en una muestra acuosa y se intentará aplicar la metodología desarrollada para la cuantificación del péptido en una muestra de líquido amniótico de ratas de laboratorio.



Experimental

1. Materiales y reactivos

1.1. Reactivos

Para la síntesis de péptidos en fase sólida se empleó una resina Wang precargada con Phe-Fmoc (funcionalización: 0.67 mmol/g). También los aminoácidos-Fmoc de abundancia natural: Asp (>99%), Ile (>98%), Pro (>99%), Tyr (98%) y Val (98%) de la casa comercial Aldrich (Steinheim, Alemania); Arg e His (Novabiochem®, >99%) de Merck (Darmstadt, Alemania). El aminoácido enriquecido Val(¹³C₁)-Fmoc (enriquecimiento y pureza >99%) de Cambridge Isotope Laboratories (Andover, MA, EEUU) se utilizó en la síntesis del péptido enriquecido.

Para el proceso de síntesis también se utilizó: Etil-2-ciano-2-(hidroxiimino)acetato (oxyma, >97%), N-hidroxibenzotriazol (HOBT, >97%), N,N'-diisopropilcarbodiimida (DIC, >99%), triisopropilsilano (TIS, >99%), piperazina (>99%) etanol (>99%), N-metilpirrolidona (NMP, >99%), ácido trifluoroacético (TFA, >99%), diclorometano (>99%) y dietiléter (>99%), de la casa comercial Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EEUU), N,N-dimetilformamida (DMF, >99%) de BDH Prolabo® (Leuven, Holanda) y agua ultra pura (Millipore Co., Bedford, EEUU).

Para la preparación de fases móviles se emplearon: acetonitrilo (>99%) de Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, Francia) y ácido fórmico (>98%) de Sigma-Aldrich.

Por último, se utilizó un patrón comercial de angiotensina II humana (>93%) adquirido a Sigma-Aldrich.

1.2. Materiales

Se utilizaron viales para autoinyector de vidrio con inserto (300 µL) para la medida de las muestras mediante el sistema HPLC-QqQ. Tubos de centrifuga de fondo cónico (50 mL, VWR), tubos de vidrio de 7mL (Sigma) y placas de filtrado con poro de tipo 4 (Pobel) se emplearon en el proceso de síntesis y preparación de patrones analíticos. También se emplearon en la preparación de la muestra tubos de microcentrifuga de fondo cónico de 1.5 mL (Eppendorf).



2. Instrumentación

2.1. Software de cálculo en Excel

Las abundancias teóricas de los distintos isotopólogos que conforman un espectro molecular de masas fueron calculadas empleando una hoja de cálculo programada con lenguaje Visual Basic, preparada por el profesor José Ignacio García Alonso, y basada en el método de Kubinyi³⁷ que emplea las abundancias naturales de los elementos, y aplica un algoritmo de multiplicaciones matriciales basado en la distribución binomial de la probabilidad de aparición de cada isótopo. Dicho software se encuentra disponible como material suplementario en la cita señalada.³⁸

2.2. Sintetizador de péptidos en fase sólida

La Fig. 10 esquematiza el equipo *LibertyBlue* (CEM corporation, Matthews, NC, EEUU) empleado a lo largo de este Trabajo de Fin de Máster en la síntesis automatizada de péptidos en fase sólida asistida por microondas. Sobre la celda de reacción se añade una suspensión que contiene la resina con el primer aminoácido precargado. Posteriormente se sitúan las disoluciones de los distintos aminoácidos que forman parte de la angiotensina II en las posiciones correspondientes del sintetizador.



Fig. 10 – Sintetizador de péptidos *LibertyBlue*. El sistema se compone de dos partes: dispensador de reactivos (diferentes posiciones para colocar los aminoácidos, celda de reacción y desagüe) y generador de microondas (rodeando la celda de reacción).

Como se muestra en la Fig. 10 el sistema tiene varias filas de tubos. En las primeras dos filas se introducen aminoácidos naturales, mientras que en la tercera se colocan aminoácidos enriquecidos.



El disolvente orgánico de la reacción (en este caso DMF) se sitúa en la parte inferior del equipo, y servirá como reactivo de lavado. Los desechos de cada etapa de reacción se filtran atravesando una placa porosa que se encuentra en la parte inferior de la celda de reacción e impide el paso de la resina. Debido a que el péptido se encuentra anclado sobre la resina, la secuencia peptídica no será eliminada tras cada etapa de lavado. El sistema utiliza un gas inerte (nitrógeno) para bombear los reactivos hasta la cámara de reacción, y crear una atmósfera de inerte para las reacciones. Una fibra óptica (protegida por una vaina) controla los cambios de temperatura en la síntesis al activarse el generador de microondas, ubicado en la zona inferior del equipo, rodeando la celda de reacción. Todo el proceso se controla por un sistema informatizado, que realiza automáticamente el cálculo de reactivos para la cantidad de péptido deseada (entre 0.05 y 5 mM), y puede ser modificada por el usuario.

Existen dos grandes estrategias de síntesis dependiendo del grupo conjugado al amino terminal: Boc (t-butoxicarbonilo, lábil en medio ácido) y Fmoc (9-fluorometiloxicarbonilo, lábil en medio básico). En función del método de síntesis, la resina cambiará, ya que el grupo de enlace al aminoácido debe permanecer estable ante los reactivos utilizados hasta el final del proceso. Para este trabajo se emplearon aminoácidos Fmoc y resina tipo Wang. Para comenzar la reacción de síntesis es necesario llevar a cabo una primera etapa en la que se procede a la *desprotección* del grupo amino del primer aminoácido anclado a la resina. A continuación se añade el penúltimo aminoácido de la secuencia peptídica cuyo grupo amino terminal se encuentra protegido, de modo que su grupo carboxilo se unirá únicamente al grupo amino terminal, ahora desprotegido, del aminoácido anclado a la resina.

Con el fin de favorecer la formación del enlace amida entre grupo amino y carboxilo del siguiente aminoácido, se emplean grupos activantes como *carbodiimida*, un compuesto homobifuncional que tiene extremos nitrogenados ligeramente básicos que reaccionan con los extremos carboxilo de los aminoácidos, generando un producto intermedio más reactivo que favorece la formación del enlace peptídico.³⁹ Posteriormente, se realiza un ciclo de lavado para eliminar el exceso del penúltimo aminoácido y evitar así otras reacciones indeseadas. El empleo de la resina para la síntesis de la cadena peptídica minimiza la pérdida de producto entre cada lavado. Repitiendo secuencialmente las etapas de desprotección y adición del siguiente aminoácido se obtiene finalmente el péptido de interés anclado a la resina. Finalmente, el péptido se libera de la resina y de los grupos protectores restantes mediante un tratamiento en condiciones ácidas fuertes. El siguiente paso consiste en la precipitación, secado y liofilización del péptido obtenido inicialmente en disolución.



Automatización de la síntesis peptídica

La Fig. 11 esquematiza un resumen del proceso iterativo programado en el equipo. El péptido creciente estará inicialmente con su grupo amino protegido, que solo quedará libre en presencia del reactivo de desprotección (piperazina). Posteriormente, se adiciona el aminoácido específico para continuar con la secuencia. Este nuevo aminoácido se activa a través de una reacción con un reactivo de tipo carbodiimida para dar lugar a un intermedio reactivo de O-acilisourea, con múltiples posibilidades de reacción, pero con preferencia por los grupos amino presentes. Este ataca al grupo amino previamente desprotegido del péptido, generando el enlace peptídico deseado. Con el fin de favorecer la reacción con el grupo amino se recurre a los reactivos Oxyma y HOBt, empleados como aditivos cuya función es generar intermedios en reacciones secundarias indeseadas que se reconducen hacia la formación del enlace peptídico.

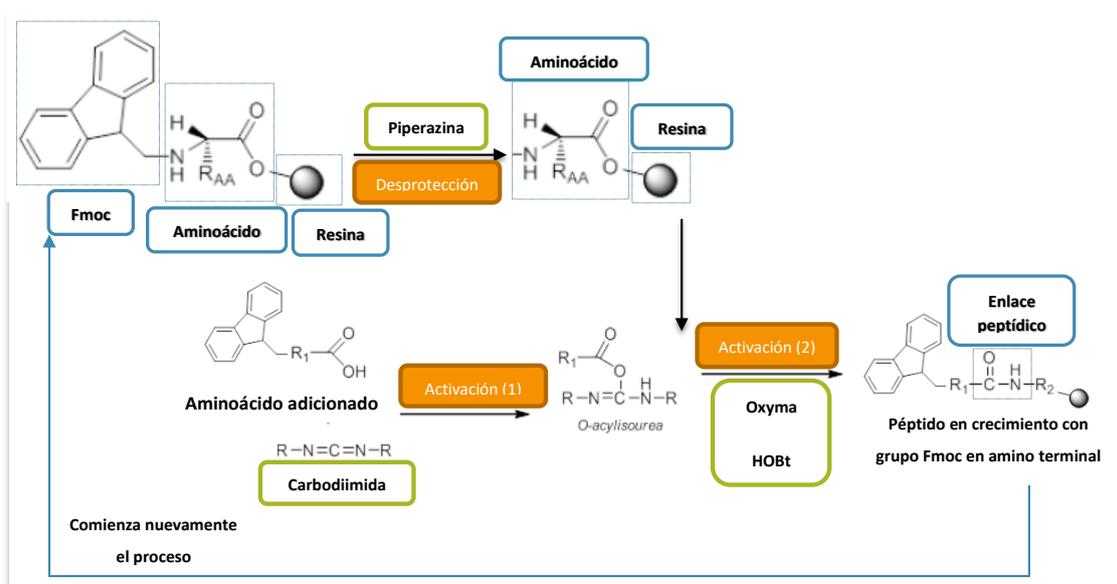


Fig. 11 – Esquema del proceso de elongación en la síntesis peptídica por el método de las carbodiimidas y aminoácidos con protección Fmoc. Después del paso de desprotección, se añade el siguiente aminoácido y carbodiimida. Su interacción crea un intermediario que reaccionará con el grupo amino del péptido unido a la resina. Después de una segunda activación, se forma el enlace peptídico y se repite el proceso.

2.3.Sistema HPLC-MS/MS

Todo el procedimiento analítico se realizó utilizando un equipo de Cromatografía Líquida HPLC Agilent modelo 1290, con autoinyector termostatzado, disponibilidad para cuatro fases móviles, desgasificador, y bomba binaria de empuje (Fig. 12). La separación de especies se llevó a cabo empleando una columna UHPLC de fase reversa modelo Peptide XB-C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μ m, Aeris, Phenomenex).



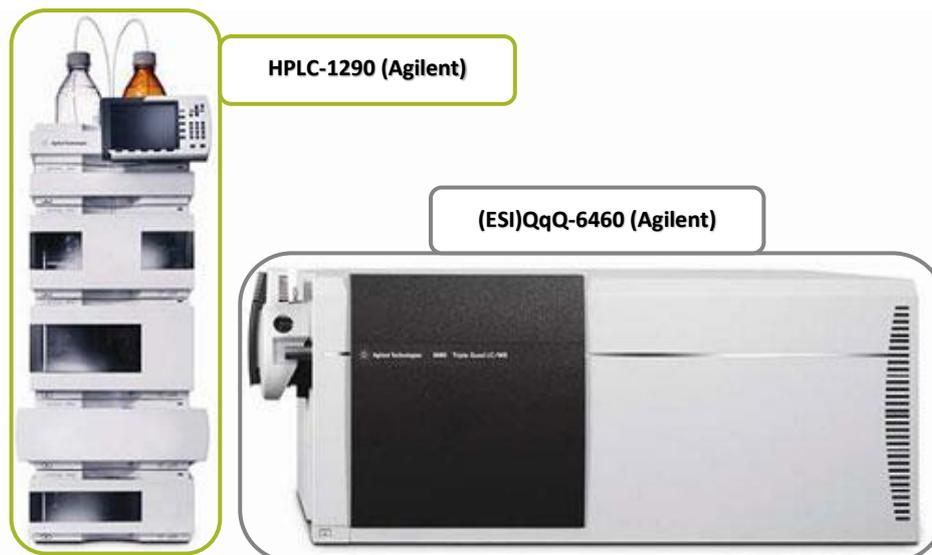


Fig. 12 – Modelo de Espectrómetro de Masas tándem y sistema cromatográfico Agilent empleado.

El sistema se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas, modelo Agilent 6460 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EEUU) con analizador de triple cuadrupolo (QqQ), fuente de ionización a presión atmosférica ESI tipo jet-stream (empleado en modo positivo) y detección mediante un dinodo de alta energía con electroamplificación.

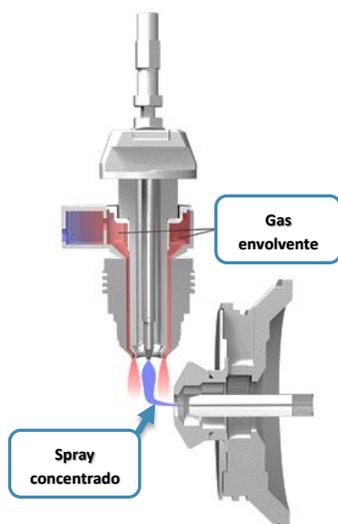


Fig. 13 – Fuente de ionización del equipo con el sistema “jet-stream”. Se observa cómo se concentra el spray para ser dirigido posteriormente al analizador.

El sistema jet-stream de la fuente de ionización de electrospray difiere de los modelos convencionales en un flujo de gas adicional, que envuelve y arrastra los iones que salen desde el capilar del electrospray hacia la entrada del primer cuadrupolo (Fig. 13). Esto permite una disposición ortogonal del acoplamiento, lo que potencia que sólo los iones positivos sean transferidos al analizador, y la suciedad en la entrada del espectrómetro de masas disminuya. Además, este sistema mejora la transferencia iónica (focaliza el spray), aumentando la sensibilidad del equipo.



2.4. Otros instrumentos

Las disoluciones de trabajo se prepararon gravimétricamente mediante una balanza analítica, modelo MS205DU (Mettler Toledo, Zürich, Suiza).

Para la separación del péptido sintetizado tras su precipitación se recurrió a una centrífuga modelo Centro-8-BL (J.P. Selecta, España) y para filtrar el péptido anclado o no la la resina se utilizó una bomba de vacío de diafragma modelo ME2 (Vacuubrand, Wertheim, Alemania). La posterior liofilización de péptidos se realizó con un equipo Heto powerDry LL3000 (Thermo Scientific, Republica Checa). También se empleó un equipo de agitación constante Fisher Bioblock modelo KL2 (Fisher Scientific, USA) para preparar la suspensión y acondicionar la resina antes de comenzar la síntesis.

Para el pretratamiento de líquido amniótico se utilizó una microcentrífuga Eppendorf, modelo 5415 D (Eppendorf, Hamburgo, Alemania).

3. Procedimientos

3.1. Síntesis automatizada de péptidos en fase sólida (SPPS) asistida por microondas

3.1.1. Síntesis de angiotensina II natural

Se procedió a la síntesis de angiotensina II natural utilizando el equipo Libertyblue® (descrito previamente) y DMF como medio de reacción. Mediante el software del equipo se obtuvo de manera orientativa los pesos necesarios de cada aminoácido-Fmoc (incluyendo el volumen de DMF para su disolución) y los distintos reactivos para la síntesis de 0.05mM de la secuencia [DRVYIHPF]. Posteriormente estos valores fueron recalculados ligeramente en exceso (con la misma concentración) para asegurar la disponibilidad de aminoácido durante el proceso. La Fig. 14 resume estos valores.

La resina anclada al primer aminoácido debe someterse a un proceso de acondicionamiento previo denominado “swelling”. Para ello se preparó una suspensión de la resina en DMF y se dejó en agitación orbital constante durante 30 minutos. Posteriormente se prepararon por pesada las disoluciones de trabajo según se indica en la figura 14 y se colocaron en las posiciones correspondientes en el equipo según la Fig. 10. Finalmente se inició la secuencia de síntesis, dando comienzo al proceso indicado en la Fig. 11.



Reagent Calculator Report

Resin

Scale: 0.05 Resin substitution: 0.600 Mass required: 0.083

Activators

Activator	Formula Weight	Density	Concentration (M)	Total Volume (mL)	Activator Mass (g)	Activator Volume (mL)
DIC	126.2	0.81	0.5	10	0.631	0.8
Oxyma	142.1	1	1	6	0.853	0.9
HOBt	135.2	1	0.1	100	1.352	1.4

Amino Acids

Derivative	Volume (mL)	Concentration (M)	Mass (g)
Fmoc-Arg(Pbf)-OH	5	0.2	0.649
Fmoc-Asp(OtBu)-OH	3	0.2	0.247
Fmoc-His(Trt)-OH	3	0.2	0.372
Fmoc-Ile-OH	3	0.2	0.212
Fmoc-Pro-OH	3	0.2	0.202
Fmoc-Tyr(tBu)-OH	3	0.2	0.276
Fmoc-Val-OH	3	0.2	0.204

Fig. 14 – Cálculo de reactivos del software Liberty blue para síntesis de péptidos. Los volúmenes corresponden a valores aumentados respecto a los calculados por el programa. Valores idénticos para angiotensina II natural y marcada.

<i>Disolución de desprotección (100mL)</i>	
Piperazina (10%P/V)	10 g
Etanol	10 mL
NMP	90 mL
HOBt	1.352 g
<i>Disolución resina (10 mL)</i>	
WANG-Phe-Fmoc	0.083 g
DMF	10 mL
<i>Disolución activadora-DIC (10 mL)</i>	
DIC	0.8 mL
DMF	9.2 mL
<i>Disolución activadora-Oxyma (6 mL)</i>	
Oxyma	0.9 mL
DMF	5.1 mL
<i>Disolución de separación (10 mL)</i>	
TFA	9.5 mL
TIS	0.25 mL
Agua-milliQ	0.2 mL

Purificación y almacenamiento

El péptido anclado a la resina obtenido como resultado de la síntesis fue filtrado en una placa filtrante conectada a una bomba de vacío y posteriormente lavado con DMF y diclorometano (por triplicado). A continuación el sólido retenido en la placa filtrante precipitado se trató con una disolución ácida (TFA (9.5 mL), TIS (0.25 mL) y agua milliQ (0.25 mL)) durante 3 horas para romper el enlace entre la resina Wang y el péptido.

La disolución resultante fue filtrada sobre una placa porosa conectada a una bomba de vacío y se recuperó la fracción líquida. La resina retenida sobre la placa filtrante se lavo con TFA para arrastrar todo el péptido. Finalmente se añadió dietileter frío (-20°C) para precipitar el péptido. La mezcla fue trasvasada a viales y centrifugada a 500 rpm durante 5 minutos. El precipitado obtenido (correspondiente al péptido) fue recuperado, lavado con dietileter, y centrifugado. Este procedimiento se repitió dos veces.

Finalmente, el precipitado se secó bajo corriente de N₂ y se liofilizó para su almacenamiento en frío (-20°C).

3.1.2. Síntesis de trazador

Para la síntesis del trazador, se llevó a cabo el procedimiento descrito en el punto 3.1.1, sustituyendo el aminoácido valina natural por valina enriquecida en ¹³C₁ (¹³C₁-Val).



3.2. Análisis por HPLC-MS/MS

3.2.1. Confirmación de péptidos sintetizados

Se prepararon disoluciones concentradas (1500 µg/g) de los péptidos sintetizados y un patrón comercial de angiotensina II en una mezcla de agua ultrapura y acetonitrilo (1:1). Posteriormente se realizaron diluciones intermedias en agua ultrapura y una dilución final en la fase móvil (agua ultrapura + 0.1% ácido fórmico).

Se prepararon disoluciones de 10 µg/g para su medida por HPLC-MS/MS en modo SCAN y modo PI del ion más abundante. La separación cromatográfica se llevó a cabo con la columna de fase reversa previamente mencionada. Las fases móviles utilizadas fueron 0.1% ácido fórmico en agua ultrapura (A), y 0.1% ácido fórmico en acetonitrilo (B).

El gradiente cromatográfico empleado se refleja en la Tabla 1 (flujo constante de 0.3 mL/min; volúmenes inyectados: 2 µL de péptidos sintéticos y 8 µL de patrón de angiotensina II), mientras que la Tabla 3 refleja las condiciones de la fuente de ionización.

Tabla 1 – Gradiente HPLC de confirmación.

Periodo (minutos)	Gradiente (fase B)
0 a 3	2%
3 a 7	2-12%
7 a 8	12-13%
8 a 12	13-50%
12 a 17	50-80%
17 a 18	80-2%
18 a 21	2%

Tabla 2 – Gradiente HPLC de caracterización y cuantificación.

Periodo (minutos)	Gradiente (fase B)
0 a 1	2%
1 a 10	2-80%
10 a 15	80%
15 a 18	80-2%

3.2.2. Caracterización de péptidos

El gradiente HPLC fue modificado en este punto respecto al reflejado en la Tabla 2 con el fin de disminuir el tiempo de análisis. Se utilizó un flujo de 0.3 mL/min con la columna y fases antes mencionadas. El volumen inyectado fue de 2 µL para patrones y hasta 20 µL para muestra real. Las medidas se llevaron a cabo en modo SIM para detectar los isotopólogos que conforman el perfil isotópico del ion molecular en un rango de [1044.5-1053.5] para un patrón comercial de angiotensina II y [1045.5-1054.5] para el trazador sintetizado. Las condiciones de la fuente de ionización se reflejan en la Tabla 3.



Tabla 3 – Condiciones de trabajo iniciales (confirmación) y optimizadas (caracterización y cuantificación) de la fuente de ionización de electrospray.

Condiciones	Confirmación	Caracterización y cuantificación
Gas de colisión	Nitrógeno	Nitrógeno
Voltaje de colisión	20 eV	16 eV (a_6^+) y 20 eV (b_6^+)
Fragmentor	135 V	70 V
Sheath gas flow	11 L/min	11 L/min
Sheath gas T°	300°C	300°C
Nebulizer pressure	45 psi	25 psi
Capillary voltage	3500 V	3500 V
Nozzler voltage	0 V	500 V
Drying gas T°	300°C	350°C
Drying gas flow	5 L/min	5 L/min

3.2.3. Cuantificación

La cuantificación se realizó con las condiciones UHPLC y de ionización descritas en el apartado anterior. El espectrómetro se utilizó en modo SRM (resolución unidad) para las transiciones de dos fragmentos diferentes:

- **Fragmento $[M+2H]^{+2} \rightarrow a_6^+$** (CID, 20 eV): 523.7 \rightarrow 756.4; 524.2 \rightarrow 757.4; 524.7 \rightarrow 758.4 y 525.7 \rightarrow 759.4.
- **Fragmento $[M+2H]^{+2} \rightarrow b_6^+$** (CID, 16 eV): 523.7 \rightarrow 784.4; 524.2 \rightarrow 785.4; 524.7 \rightarrow 786.4 y 525.7 \rightarrow 787.4.

3.3. Procedimiento matemático

3.3.1. Deconvolución de Perfiles Isotópicos

La metodología de la Deconvolución de Perfiles Isotópicos se utiliza para determinar de manera independiente las fracciones molares (X_i) de los distintos compuestos presentes en una mezcla, cuyas abundancias (A_i) combinadas conforman el espectro experimental observado para la mezcla por Espectrometría de Masas:

$$X_i = \frac{N_i}{N_{total}}$$

(Ecuación 4.1)

$$A_{mezcla}^j = A_{analito}^j \cdot X_{analito} + A_{trazador}^j \cdot X_{trazador}$$

(Ecuación 4.2)

donde N_i representa el número de moles, y A^j corresponde a la abundancia j de los n isotopólogos que conforman un espectro de masas de un fragmento molecular.



Para ello se utiliza un sistema de ecuaciones lineales en el que las abundancias isotópicas observadas de manera experimental para cada uno de los isotopólogos en la mezcla se expresa como una combinación lineal de las abundancias isotópicas teóricas de cada compuesto (analito y trazador). La resolución de dicho sistema por regresión lineal múltiple tiene como resultado una matriz de fracciones molares, que indican la contribución de cada sustancia al perfil isotópico experimental.

$$\begin{bmatrix} A_{mezcla}^1 \\ A_{mezcla}^2 \\ A_{mezcla}^3 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{analito}^1 & A_{trazador}^1 \\ A_{analito}^2 & A_{trazador}^2 \\ A_{analito}^3 & A_{trazador}^3 \end{bmatrix} \cdot \begin{bmatrix} X_{analito} \\ X_{trazador} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e^1 \\ e^2 \\ e^3 \end{bmatrix} \quad \text{(Ecuación 4.3)}$$

Se calcula también una matriz de error ya que el ajuste lineal se encuentra por aproximación de mínimos cuadrados. Esta metodología se ha aplicado a lo largo del presente trabajo de Fin de Máster para calcular el enriquecimiento isotópico de un trazador para identificar la posible contribución del frente o la cola de un isotopólogo en otros isotopólogos contiguos y para determinar la concentración de un analito en una muestra.^{38,40}

Una vez halladas las fracciones molares se puede utilizar la siguiente ecuación para calcular directamente la concentración de analito en la muestra, sin la necesidad de una calibración metodológica previa:

$$N_{analito} = N_{trazador} \cdot \frac{X_{analito}}{X_{trazador}} \quad C_{analito} = C_{trazador} \cdot \frac{X_{analito}}{X_{trazador}} \cdot \frac{PM_{analito}}{PM_{trazador}} \cdot \frac{g_{trazador}}{g_{analito}}$$

(Ecuación 4.4)

(Ecuación 4.5)

donde C_i corresponde a la concentración y PM_i al peso molecular (calculado a partir de los pesos atómicos de IUPAC⁴¹). La mezcla entre la muestra y el trazador se preparó por pesada para conseguir la máxima exactitud y precisión en los resultados y minimizar la incertidumbre asociada.

La función ESTIMACION.LINEAL de excel se empleó a lo largo de este Trabajo de Fin de Máster para determinar las fracciones molares a partir de abundancias teóricas y experimentales. Estas últimas se obtuvieron integrando la señal de cada isotopólogo de manera independiente, realizadas en modo SIM (caracterización) o SRM (cuantificación).

Esta metodología fue empleada también para determinar la concentración del trazador sintético (*IDMS inversa*), a partir de la pureza de un patrón comercial.



3.3.2. Estudio de las fuentes de incertidumbre mediante el método de Kragten

Se estudió la contribución de cada fuente de incertidumbre a la incertidumbre total de la determinación por la metodología IDMS utilizando el método de Kragten,⁴² una aproximación a la ecuación general del cálculo de incertidumbre utilizando la suma de residuales. La Fig. 15 destaca el procedimiento aplicado a hoja de cálculo en Excel.

	u(a)	u(b)	u(c)	u(d)	y_{SD}	r_{ab}
a	a+u(a)	a	a	a		
b	b	b+u(b)	b	b		
c	c	c	c+u(c)	c		
d	d	d	d	d+u(d)		
y(a,b,c,d)	y _a (a+u(a),b,c,d)	y _b (a,b+u(b),c,d)	y _c (a,b,c+u(c),d)	y _d (a,b,c,d+u(d))	y _{SD} (a,b,c,d)	
	Y-Y _a	Y-Y _b	Y-Y _c	Y-Y _d	Y-Y _{SD}	
u_y	(Y-Y _a) ²	(Y-Y _b) ²	(Y-Y _c) ²	(Y-Y _d) ²	(Y-Y _{SD}) ²	2·r _{ab} ·(Y-Y _a)·(Y-Y _b)

Fig. 15 – Método de Kragten para el cálculo de incertidumbre en hoja de cálculo. La primera columna representa las fuentes de incertidumbre consideradas. $y(a,b,c,d)$ representa la función dependiente. $u(x)$ señala las incertidumbres de cada variable. r_{ab} representa la covarianza de las variables a y b . La incertidumbre final (círculo verde) se calcula sumando la última fila de la hoja de cálculo.

3.4. Preparación de muestra real

3.4.1. Almacenamiento

2.1 mL de líquido amniótico procedente de dos ratas Wistar (estado de preñez de 19 días) fue inmediatamente separado de su porción celular mediante centrifugado (1200 rpm, 10 minutos, 20°C). Posteriormente el sobrenadante fue alicuotado en porciones de 200 µL en viales eppendorf de 1 mL y almacenado en el congelador a -20°C.

3.4.2. Fortificación y extracción de angiotensina II

Los viales fueron descongelados a temperatura ambiente y las muestras (200 µL) se fortificaron a distintos niveles de concentración de angiotensina II. Inmediatamente después se añadieron 50 µL del trazador caracterizado en concentración y abundancia isotópica.

Posteriormente se precipitaron proteínas de alto peso molecular con acetonitrilo en proporción de volumen 1:1 y centrifugado (4000 G, 5 minutos).

A continuación se decantó el sobrenadante en tubos eppendorf y se llevó a sequedad en un concentrador de vacío a 37°C.

Finalmente, el precipitado se reconstituyó en 120 µL de fase móvil A (agua ultrapura + 0.1% ácido fórmico) y analizado por HPLC-MS/MS.



Resultados y discusión

1. Confirmación de péptidos sintetizados

En la Fig. 16 se muestra el cromatograma y el espectro de masas obtenido a 11.315 minutos (modo SCAN) para un patrón comercial de angiotensina II. Se observa que la intensidad del ion doblemente cargado (m/z 523.9) es mayor que la del ion molecular (m/z 1046.5). Este comportamiento coincide con el descrito en otros estudios en los que se emplea la ionización ESI para el estudio de angiotensina II.²³

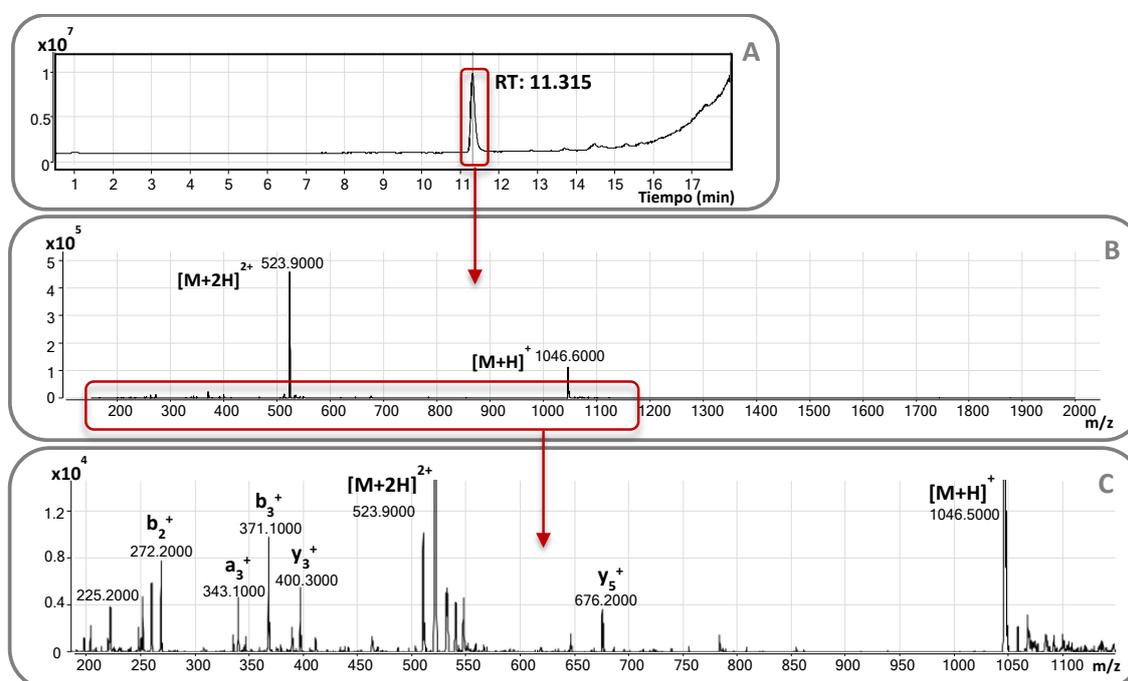


Fig. 16 – (A) Cromatograma LC-MS de un patrón comercial de angiotensina II donde se muestran la suma de intensidades de todos los iones (TIC). (B y C) Espectro de masas en modo SCAN de angiotensina II obtenido a tiempo de retención 11.315. Se señalan en la imagen los fragmentos identificados en la fuente y los iones moleculares $[M+H]^+$ y $[M+2H]^{2+}$.

Otros fragmentos observados en el espectro de masas coinciden con las relaciones m/z teóricas identificadas con el programa MS-Homology (UCSF-ProteinProspector[®]) de los fragmentos y_5^+ y b_3^+ (entre otros). Se puede afirmar que esta fragmentación se produce en la fuente de ionización y no proviene de la descomposición del péptido o de productos de una síntesis incompleta debido a la existencia de un único pico en el cromatograma realizado en modo SCAN.



El péptido natural sintetizado por el proceso automatizado (Fig. 17) proporcionó resultados similares. Posteriormente se comparó el espectro de masas obtenido en modo barrido de iones producto para el ion precursor $[M+2]^{2+}$ de ambos péptidos (Fig. 19), lo que permitió confirmar la identidad de angiotensina II obtenida sintéticamente.

Una vez confirmado el éxito en la síntesis automatizada de la secuencia [DRVYIHPF], se procedió a sintetizar el trazador de angiotensina II utilizando el procedimiento previamente descrito, y sustituyendo el residuo de Val por $^{13}\text{C}_1\text{-Val}$. Los resultados que se muestran en la Fig. 18 confirman que el péptido enriquecido fue sintetizado con éxito, ya que se identifica un desplazamiento de los iones $[M+H]^+$ y $[M+2H]^{2+}$ en una, y media unidad de masa respectivamente.

La identificación de los fragmentos generados en la fuente se mantuvo constante para algunos fragmentos como b_2^+ (fragmento [DR]) mientras que otros se desplazan en una unidad (b_3^+ : fragmento [DRV]). La Fig. 19 compara los barridos de iones producto obtenidos para los tres péptidos (comercial, natural sintético y enriquecido sintético) y confirma el enriquecimiento en el residuo de Val de la tercera posición de la secuencia [DRVYIHPF].

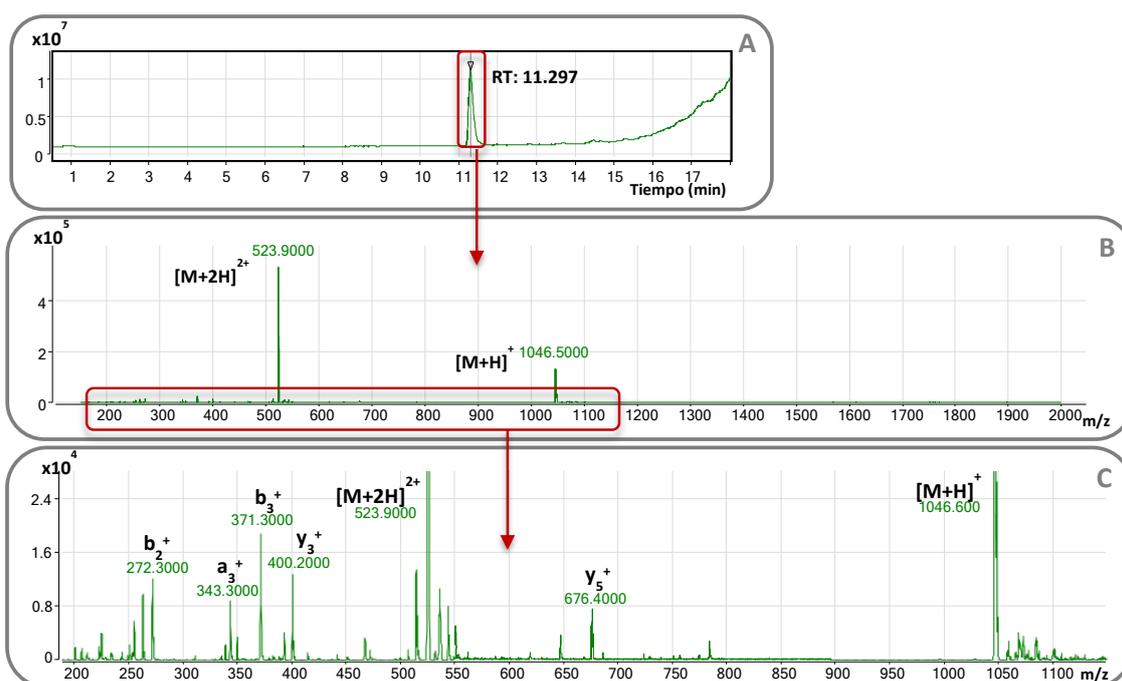


Fig. 17 – (A) Cromatograma LC-MS (TIC) y (B y C) espectro de masas en modo SCAN del primer péptido sintetizado. El péptido presenta tiempo de retención y fragmentos idénticos a los observados en la Fig. 16.

Además, como se puede observar en las figuras Fig. 16, Fig. 17 y Fig. 18 no se observan cambios significativos en el tiempo de retención del cromatograma. Esto indica que el comportamiento químico de trazador y angiotensina II es idéntico a pesar del enriquecimiento, y por tanto su uso resulta adecuado para llevar a cabo la cuantificación mediante IDMS.



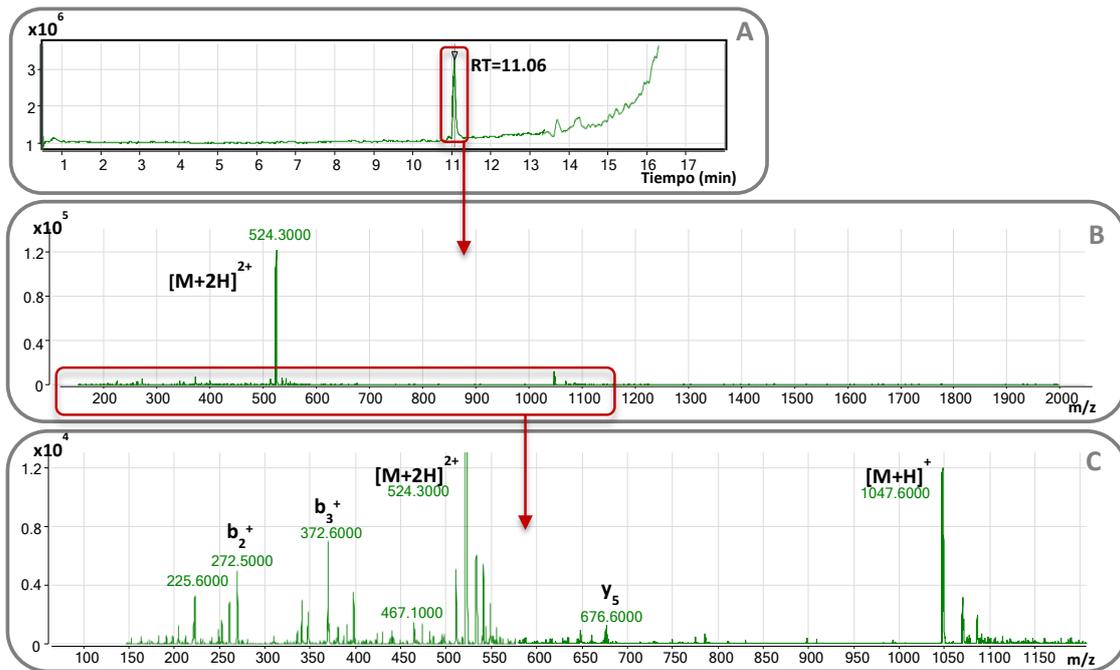


Fig. 18 – (A) Cromatograma LC-MS (TIC) y (B y C) espectro de masas en modo SCAN del del péptido enriquecido en $^{13}C_1$ -Val. Tiempo de retención idéntico a angiotensina II, y fragmentos en fuente (con residuos de Val) desplazados en una unidad adicional debido al enriquecimiento del aminoácido. Otros fragmentos sin embargo no se ven desplazados, como el caso de b_2 .

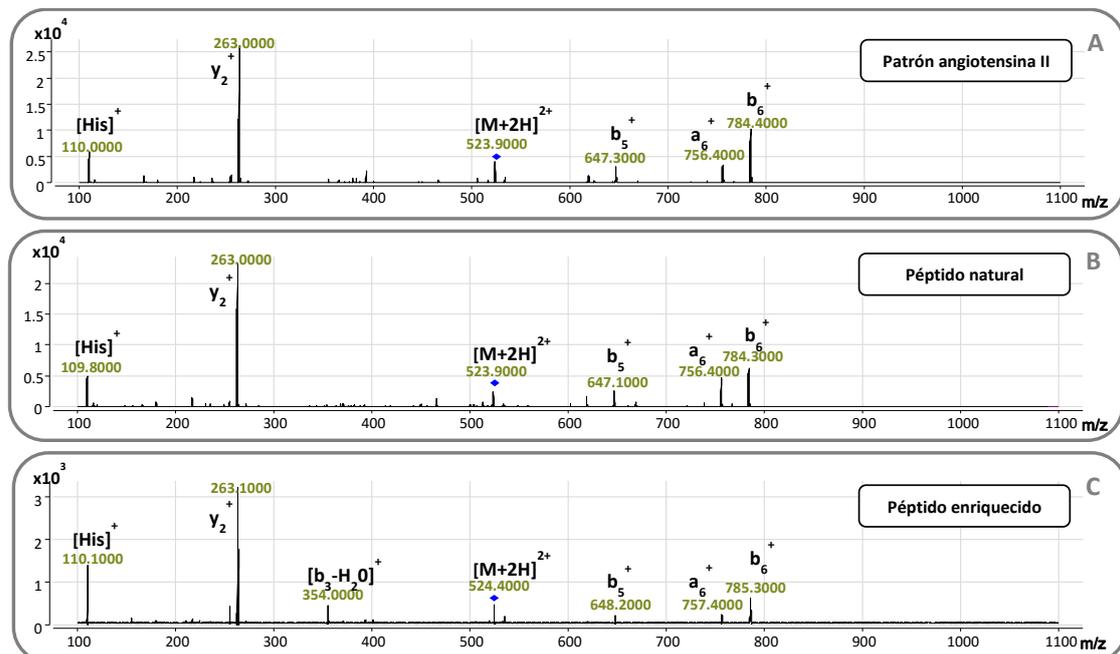


Fig. 19 – Comparación de espectros MS/MS (modo barrido de iones producto) de angiotensina II (A) y los péptidos sintetizados (B y C). Se observa un desplazamiento en el ion precursor $[M+2H]^{2+}$ del péptido enriquecido correspondiente al enriquecimiento en un isótopo de ^{13}C , y en los fragmentos b_5 , a_6 , y b_6 . El fragmento y_2 sin embargo permanece constante ya que no presenta Val en su estructura.



2. Determinación de fragmentos de medida para IDMS

Con el fin de aumentar la selectividad y la sensibilidad de las determinaciones, la cuantificación de las muestras se realizó empleando el modo SRM del equipo. Esta estrategia discrimina las posibles interferencias que aún puedan existir después de la separación cromatográfica, seleccionando un ion precursor característico del analito o el trazador y unos fragmentos producto exclusivos del mismo.

El precursor seleccionado fue $[M+2H]^{2+}$ (m/z 523.7), ya que tanto para angiotensina II como para el trazador presenta mayor señal que el ion $[M+H]^+$ (m/z 1046.5). En la Fig. 19 se aprecian los fragmentos identificados de $[M+2H]^{2+}$.

La selección de los fragmentos de medida se realizó en función del criterio de obtener la mayor señal posible para asegurar una buena precisión de los resultados.

Se seleccionaron inicialmente tres posibles fragmentos producto para una energía de colisión de celda de 20 eV (modo barrido de iones producto): 523.7 \rightarrow 647.1 (fragmento b_5^+ , secuencia [DRVYI]-CO₂H), 523.7 \rightarrow 756.4 (fragmento a_6^+ , secuencia [DRVYIH]-H), y 523.7 \rightarrow 784.4 (fragmento b_6^+ , secuencia [DRVYIH]-CO₂H).

Optimización condiciones de medida SRM

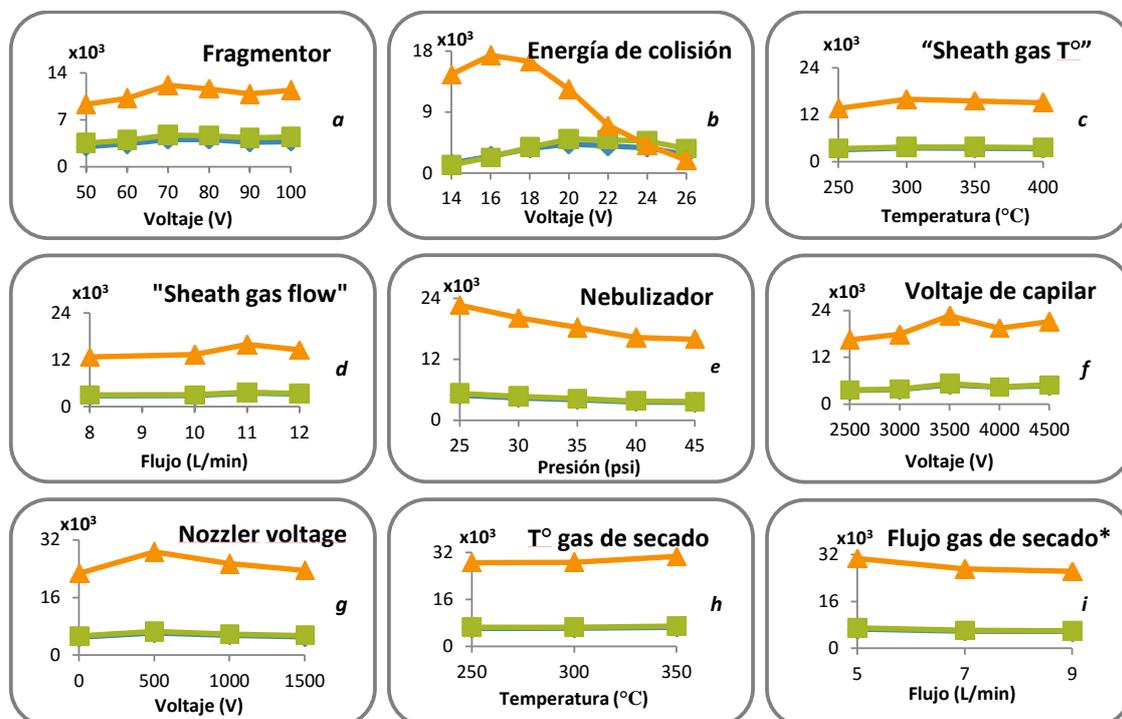
Para aumentar la intensidad de señal de los fragmentos señalados, se realizó una optimización de los parámetros que intervienen en la ionización en la fuente de electrospray: temperatura y flujo del gas de enfundado (sheath gas), presión del nebulizador, voltaje del capilar, “nozzler” voltaje, temperatura y flujo del gas de evaporado (drying gas). Además también se optimizaron otros parámetros relativos a la fragmentación del analito dentro del espectrómetro de masas como voltaje de aceleración de los iones en la fuente (fragmentor voltage) y la energía de colisión.

Esto se realizó midiendo una disolución patrón de angiotensina II de 10 μ g/g en modo SRM (5 μ L inyectados). En la Fig. 20 se aprecian los valores óptimos de cada parámetro, dentro de los rangos de prueba recomendados por el fabricante.⁴³ Estos valores óptimos han sido reflejados previamente en el apartado de procedimientos (condiciones de caracterización y cuantificación, Tabla 3, página 30). Debido al comportamiento similar entre los fragmentos $[M+2H]^{2+} \rightarrow a_5^+$ y $[M+2H]^{2+} \rightarrow a_6^+$ se optó por utilizar el de mayor señal junto con el fragmento $[M+2H]^{2+} \rightarrow b_6^+$ para futuras cuantificaciones.

Para llevar a cabo la optimización, los patrones se inyectaron directamente en la fuente de ionización prescindiendo de la separación cromatográfica, y simulando las condiciones de fase móvil para las que se espera la elución de angiotensina II (25% fase B).



Se observa que los parámetros más importantes en la amplificación de la señal pertenecen a la optimización de la energía de colisión, la presión del nebulizador, y el “nozzler voltage”. La optimización final triplica la sensibilidad inicial del fragmento b_6^+ , que en términos prácticos permitirá disminuir considerablemente el límite de cuantificación de algunas transiciones. Aunque no es tan acusado, en los fragmentos restantes también se aprecia un aumento considerable.



3. Caracterización de patrones

3.1. Determinación experimental de la composición isotópica de péptidos sintetizados

3.1.1. Angiotensina II

En este punto, se modificó el gradiente cromatográfico para disminuir el tiempo de medida en pasos posteriores (Caracterización de péptidos, página 29).

Los perfiles isotópicos experimentales de los fragmentos moleculares pueden diferir ligeramente de los calculados teóricamente debido al principalmente al solapamiento de la señal de isotopólogos contiguos (también denominados *efectos de cola*) que ocurre en los analizadores de baja resolución.³⁸



En la Fig. 21 se observa el perfil teórico y experimental (n=5) de un patrón comercial de angiotensina II. Se aprecia cierta contribución de abundancia en las relaciones 1044.5 y 1045.5, inferiores al isotopólogo monoisotópico (1046.5). Esto se atribuye al efecto de cola antes mencionado de isotopólogos más abundantes (como la propia masa monoisotópica).

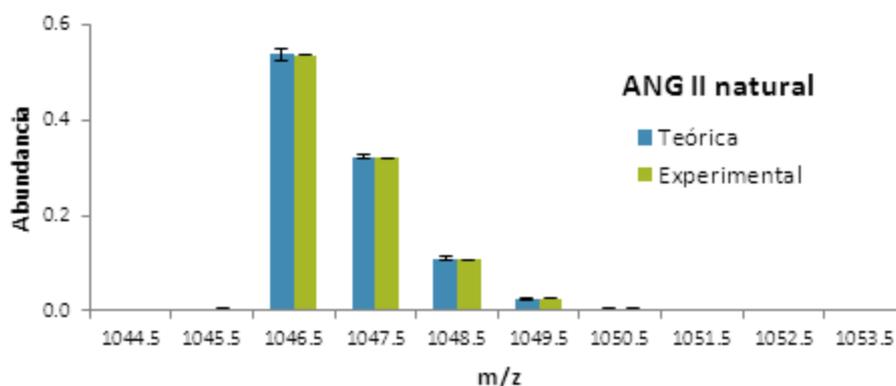


Fig. 21 – Perfiles isotópicos teórico y experimental de angiotensina II. No se esperan isotopólogos a masas inferiores a la masa monoisotópica. Sin embargo, experimentalmente se observa cierta contribución en estos.

El estudio de la contribución a los isotopólogos [M-1] y [M-2] en el patrón comercial es un paso previo ineludible para calcular con exactitud el grado de enriquecimiento del trazador sintetizado. Se determinó la contribución de [M-1] y [M-2] al perfil isotópico de angiotensina II por cálculo de fracciones molares a través de la metodología IPD como se observa en la Fig. 22. Donde la *matriz X* corresponde a las abundancias teóricas de una molécula de angiotensina ionizada ($C_{50}H_{72}O_{12}N_{13}$, $[M+H]^+$) y posibles casos de pérdida de hidrógeno ($C_{50}H_{71}O_{12}N_{13}$ y $C_{50}H_{70}O_{12}N_{13}$); y la *matriz Y* se compone de las abundancias experimentales detectadas. Se puede observar que la contribución en el espectro final es próxima a un 1%, lo que destaca la importante necesidad de caracterizar estas diferencias en las abundancias de cualquier trazador molecular antes de su empleo en cuantificación por IPD.

3.1.2. Trazador

La Fig. 23 compara los perfiles isotópicos teórico y experimental (n=5) del trazador de angiotensina II. La contribución en este caso al isotopólogo 1046.5 se debe a dos posibles fenómenos: efecto de cola del isotopólogo 1047.5 debido a su abundancia y enriquecimiento inferior al 100% del aminoácido Val- $^{13}C_1$. Debido a que el comportamiento químico entre el patrón y el trazador es idéntico, la fracción molar M-1 calculada anteriormente permite corregir los efectos de baja resolución. Por ello, cualquier contribución detectada en 1046.5 dependerá exclusivamente del enriquecimiento.



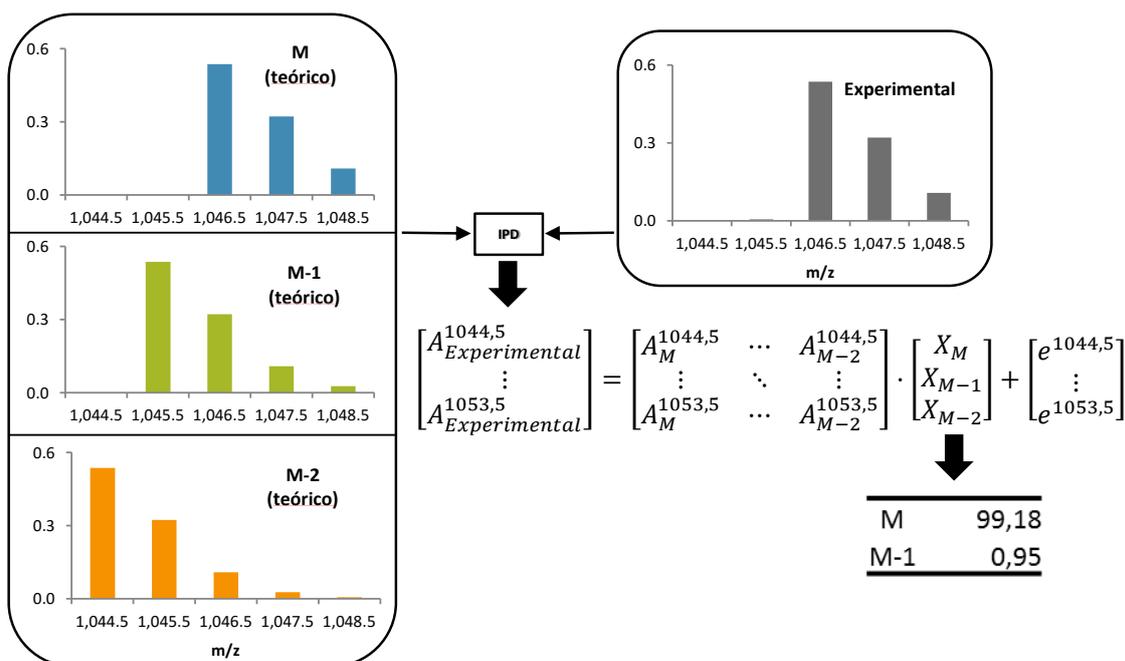


Fig. 22 – Determinación de la fracción molar del isotómero M-1 y M-2 en las abundancias detectadas experimentalmente. Esto permite solucionar errores sistemáticos que pueden afectar en el cálculo preciso del enriquecimiento de un compuesto.

Cálculo de enriquecimiento del trazador

Para determinar el enriquecimiento isotópico del trazador, se utilizó una aproximación por ajuste lineal de mínimos cuadrados (incluido en material suplementario de la publicación³⁸). Esto se realizó aplicando un algoritmo que calcula 100 distribuciones corregidas en [M-1] variando el nivel de enriquecimiento dentro de un rango seleccionado (98-100%), el cual compara por estimación lineal su ajuste a las abundancias experimentales. El ajuste que posea una suma cuadrada de residuales mínima (un mejor ajuste) será aquel que más se asemeje al enriquecimiento real. El cálculo de residuales puede apreciarse en la Fig. 23, de donde se obtuvo que la distribución con mejor ajuste pertenece a la distribución calculada con un 99,12% de enriquecimiento. Este valor es ligeramente inferior al certificado en el aminoácido empleado para la síntesis del trazador (Fmoc-¹³C₁Val), que corresponde a un 99,3%.

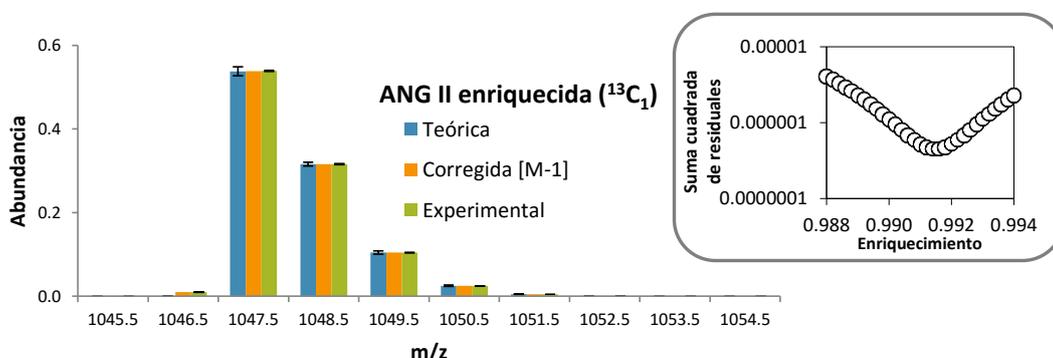


Fig. 23 – Perfiles isotópicos teórico, teórico corregido en M-1, y experimental del trazador de angiotensina II. También se muestra el cálculo de residuales para determinar el mejor ajuste a los valores experimentales, que coinciden con el enriquecimiento aproximado del compuesto.



3.1.3. Fragmentos y transiciones de medida

Se utilizó el programa IsoPatrn[®] (v.2.10) para calcular la distribución de abundancias isotópicas relativas de los fragmentos a_6^+ y b_6^+ de angiotensina II y su trazador (este último se calculó teniendo en cuenta el enriquecimiento previamente señalado). Con ello fue posible obtener las abundancias teóricas de todas las transiciones procedentes del fragmento iónico de medida, y determinar las transiciones de medida ideales para la cuantificación. La Tabla 4 y Tabla 5 ilustran este procedimiento para el fragmento más abundante, también realizado para a_6^+ (no mostrado). Las cuatro primeras transiciones de cada fragmento fueron escogidas debido a su abundancia.

Tabla 4 – Cálculo por IsoPatrn[®] de las abundancias de las transiciones en el fragmento b_6 de angiotensina II (precursor $[M+2H]^{2+}$). Se resaltan las seleccionadas para cuantificación por IPD.

ANG II $\rightarrow b_6^+$	523.77	524.27	524.77	525.27	525.77	526.27	526.77	527.27
784.41	0.53640	0.08693	0.00990	0.00085	0.00006	0.00000	0.00000	0.00000
785.41		0.23558	0.03818	0.00435	0.00037	0.00003	0.00000	0.00000
786.41			0.06048	0.00980	0.00112	0.00010	0.00001	0.00000
787.41				0.01142	0.00185	0.00021	0.00002	0.00000
788.41					0.00174	0.00028	0.00003	0.00000
789.41						0.00022	0.00004	0.00000
790.41							0.00003	0.00000
791.41								0.00000

Tabla 5 – Cálculo por IsoPatrn[®] de las abundancias de las transiciones en el fragmento b_6 del trazador de angiotensina II (precursor $[M+2H]^{2+}$). Se resaltan las seleccionadas para cuantificación por IPD.

TRAZADOR $\rightarrow b_6^+$	524.27	524.77	525.27	525.77	526.27	526.77	527.27	527.77
785.41	0.00477	0.00086	0.00010	0.00001	0.00000	0.00000	0.00000	0.00000
786.41		0.53916	0.08737	0.00995	0.00085	0.00006	0.00000	0.00000
787.41			0.23056	0.03736	0.00426	0.00036	0.00002	0.00000
788.41				0.05816	0.00942	0.00107	0.00009	0.00001
789.41					0.01082	0.00175	0.00020	0.00002
790.41						0.00163	0.00026	0.00003
791.41							0.00021	0.00003
792.41								0.00002

Una comparación entre las abundancias calculadas, y las determinadas de forma experimental por el modo SRM (n=5) (Fig. 24), demuestra que los perfiles isotópicos seleccionados concuerdan satisfactoriamente. Esto indica que ningún ajuste adicional debe ser incluido para corregir el cálculo realizado. Por ello, los valores obtenidos con el programa IsoPatrn[®] de las cuatro transiciones señaladas (de cada fragmento) en ambos péptidos se utilizaron para conformar la *matriz X* en todas las cuantificaciones posteriores empleando la metodología IPD para determinar fracciones molares.



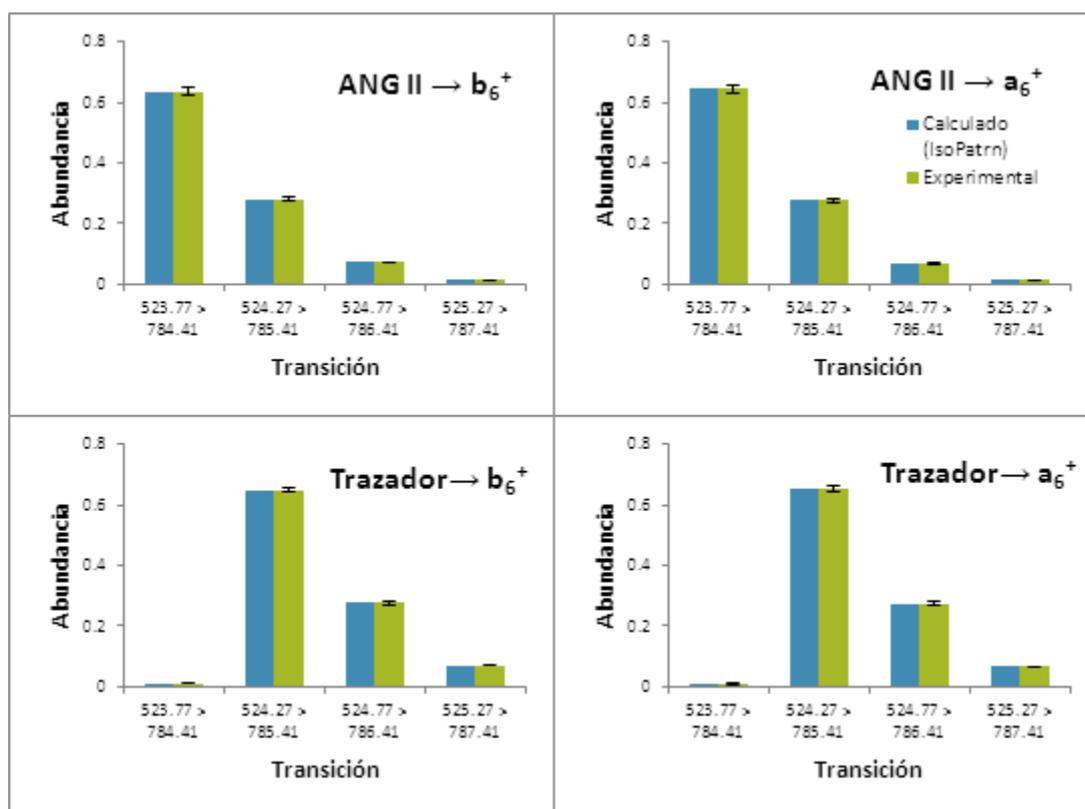


Fig. 24 – Comparación de abundancias entre transiciones calculadas con IsoPatrn[®], y experimentales (n=5) de los fragmentos a₆⁺ y b₆⁺ de angiotensina II y su trazador. Se observa gran concordancia entre estos valores.

3.2. Cálculo de pureza del trazador por IDMS inversa

Uno de los requisitos fundamentales para la cuantificación fiable de angiotensina II es conocer con gran precisión la concentración del trazador añadido. En ello influye tanto el cálculo de las diluciones a partir del sólido, como el grado de pureza certificado. Este último puede determinarse mediante hidrólisis de aminoácidos y cuantificación de los mismos mediante IDMS inversa o utilizando un patrón certificado de angiotensina II para caracterizar el trazador mediante IDMS inversa. Ambos son métodos primarios y pueden otorgar el grado de pureza directamente trazable al sistema internacional.

Para este trabajo se realizó IDMS inversa del trazador, utilizando el patrón comercial de angiotensina II previamente caracterizado, con una pureza indicada por el fabricante del 81%. Sin embargo, es importante señalar que con este valor no es posible realizar trazabilidad al sistema internacional ya que no se trata de un material de referencia certificado metrológicamente.

La determinación se realizó a través de ambos fragmentos (a₆⁺ y b₆⁺) y sus respectivas transiciones seleccionadas de manera independiente. Los resultados obtenidos para distintas mezclas del patrón y el trazador se pueden apreciar en la Tabla 6, donde se indica que el trazador posee un nivel de pureza cercano al 53%.



Tabla 6 – Cálculo de pureza del trazador sintetizado de angiotensina II (n=5). (*) valor utilizado en cálculos posteriores.

Relación trazador-angiotensina II	a_6^+		b_6^+	
	Pureza	SD	Pureza	SD
100:100 (1)	52.23%	0.09%	53.42%	0.20%
100:100 (2)	52.44%	0.08%	52.24%	0.10%
100:100 (3)	52.44%	0.14%	52.26%	0.05%
100:60	52.79%	0.09%	53.31%	0.08%
60:100	53.21%	0.11%	53.08%	0.07%
Promedio (1,2,3)	52.37%		52.64%(*)	
SD	0.12%		0.68%	
SD combinada	0.22%		0.71%	
SD expandida (k=2)	0.43%		1.43%	

4. Cuantificación en muestras acuosas fortificadas

4.1. Cuantificación por Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas

A continuación se desarrolló un método para la cuantificación por IDMS de angiotensina II en muestras de agua ultrapura. Para ello se prepararon mezclas 1:1 de muestra y trazador, a diferentes niveles de concentración entre 10 y 0.1 $\mu\text{g/g}$ (Tabla 7). Se puede apreciar que las recuperaciones son cercanas al 100% para niveles de concentración por encima de 0.5 $\mu\text{g/g}$ en ambos fragmentos. El aumento del volumen de inyección de 2 μL a 20 μL permitió mejorar los límites de detección, como se puede observar en la Tabla 8, donde la recuperación mejora considerablemente para el nivel de concentración de 0.1 $\mu\text{g/g}$.

Tabla 7 – Recuperaciones de mezclas 1:1 de angiotensina II y su trazador caracterizado (n=5).

Añadido	a_6^+			b_6^+		
	Concentración	Recuperación	RSD	Concentración	Recuperación	RSD
10 $\mu\text{g/g}$ (2 μL)	10.30 $\mu\text{g/g}$	103.0%	2.4%	10.02 $\mu\text{g/g}$	100.2%	1.1%
7.5 $\mu\text{g/g}$ (2 μL)	7.66 $\mu\text{g/g}$	101.9%	1.8%	7.63 $\mu\text{g/g}$	101.5%	1.3%
5 $\mu\text{g/g}$ (2 μL)	4.87 $\mu\text{g/g}$	97.3%	2.6%	4.94 $\mu\text{g/g}$	98.7%	1.4%
2.5 $\mu\text{g/g}$ (2 μL)	2.54 $\mu\text{g/g}$	101.8%	6.3%	2.63 $\mu\text{g/g}$	105.1%	2.3%
1 $\mu\text{g/g}$ (2 μL)	0.98 $\mu\text{g/g}$	97.8%	7.0%	1.00 $\mu\text{g/g}$	100.3%	5.3%
0.5 $\mu\text{g/g}$ (2 μL)	0.52 $\mu\text{g/g}$	104.0%	10.2%	0.53 $\mu\text{g/g}$	105.3%	3.6%

 Tabla 8 – Recuperaciones de mezcla 1:1 de angiotensina II y su trazador caracterizado al nivel 0.1 $\mu\text{g/g}$ para distintos volúmenes de muestra (n=5).

Añadido	a_6^+			b_6^+		
	Concentración	Recuperación	RSD	Concentración	Recuperación	RSD
0.1ppm (2 μL)	0.13 $\mu\text{g/g}$	133.1%	27.5%	0.13 $\mu\text{g/g}$	130.5%	18.6%
0.1ppm (10 μL)	0.11 $\mu\text{g/g}$	111.0%	8.5%	0.11 $\mu\text{g/g}$	113.1%	5.8%
0.1ppm (20 μL)	0.11 $\mu\text{g/g}$	105.6%	9.9%	0.11 $\mu\text{g/g}$	114.7%	5.8%



4.2. Características analíticas del método

4.2.1. Límite de cuantificación

La Tabla 9 resume los valores obtenidos en la determinación de angiotensina II en muestras acuosas para niveles de concentración inferiores a 100 ng/g aumentando el volumen de muestra inyectado. La cuantificación mediante el fragmento a_6^+ presenta mayor variabilidad en sus recuperaciones aunque se encuentran exactitudes en el mismo rango.

Se observa que es posible disminuir el límite de cuantificación en un factor de 20 aumentando el volumen de muestra inyectado, alcanzándose valores de gran precisión y exactitud a 25 ng/g para el fragmento b_6^+ .

Esto se mantiene hasta un nivel de concentración de 10 ng/g, donde ya no se puede asegurar que las recuperaciones obtenidas sean fiables ya que presentan escasa exactitud y precisión debido a que la intensidad de la señal es muy baja.

El límite de cuantificación del método se obtuvo multiplicando por 10 la desviación estándar de un blanco cuantificado 5 veces (100 μ L de trazador [0.05 μ g/g] y 100 μ L fase A), obteniéndose 2,4 ng/g a través del fragmento a_6^+ y 2,1 ng/g para b_6^+ . Sin embargo de manera experimental no se puede asegurar una buena precisión por debajo de los 10 ng/g en muestras acuosas fortificadas.

Tabla 9 – Recuperaciones de mezclas 1:1 de angiotensina II y su trazador caracterizado. Aumentando el volumen a 20 μ L es posible alcanzar un buen nivel de cuantificación a 25 ng/g (n=5).

Añadido	a_6^+			b_6^+		
	Concentración	Recuperación	RSD	Concentración	Recuperación	RSD
0.075 μ g/g (20 μ L)	0.08 μ g/g	103.1%	5.0%	0.08 μ g/g	105.9%	2.7%
0.05 μ g/g (20 μ L)	0.05 μ g/g	100.0%	16.4%	0.05 μ g/g	100.2%	8.2%
0.025 μ g/g (20 μ L)	0.03 μ g/g	111.6%	14.3%	0.03 μ g/g	100.5%	9.2%
0.01 μ g/g (20 μ L)	0.01 μ g/g	83.8%	64.3%	0.01 μ g/g	97.2%	24.5%

4.2.2. Contribución de la fuentes de incertidumbre analíticas

El cálculo de concentración por IDMS posee numerosas fuentes de incertidumbre debido al elevado número de parámetros que influyen en la ecuación final, sin que por ello deje de ser una determinación precisa (véase IPD, **ecuación 4.5**, página 31). La Fig. 25 enseña un diagrama de porcentajes, donde se aprecia la contribución independiente de cada parámetro a la incertidumbre final de la muestra acuosa fortificada con 1 μ g/g, calculada por el método de Kragten.⁴²



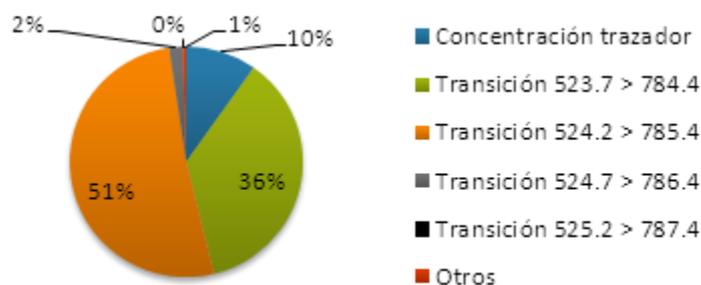


Fig. 25 – Contribución de incertidumbre final de la concentración calculada de una muestra acuosa fortificada al nivel de 1 µg/g con las transiciones del fragmento b_6 . Los “otros” parámetros corresponden a la correlación de las fracciones molares, y los términos de la ecuación 4.5 en la página 31.

La mayor contribución corresponde a las medidas experimentales representadas por la desviación estándar de la abundancia calculada para cada transición ($n=5$). Algo que ocurre en ambos fragmentos (a_6^+ y b_6^+), y proviene de la variabilidad intrínseca que posee el instrumento empleado para llevar a cabo las medidas. Otras fuentes de incertidumbre (como la pureza del patrón de angiotensina II) no pudieron ser incorporadas al cálculo debido a su desconocimiento. Sin embargo, es importante mencionar que esta es habitualmente una de las fuentes de incertidumbre con una mayor contribución a la incertidumbre total de la determinación.

5. Cuantificación en líquido amniótico fortificado

Finalmente, se llevó a cabo la cuantificación de angiotensina II por IDMS en una muestra de líquido amniótico de rata Wistar. Las recuperaciones se observan en la Tabla 10 para la muestra fortificada a dos niveles de concentración, 1 µg/g y 10 ng/g.

Se puede apreciar que las recuperaciones para ambos fragmentos fueron próximas aunque ligeramente inferiores al 100%. La precisión no pudo ser evaluada para niveles de 1 µg/g debido a que la cantidad de muestra disponible era limitada.

Sin embargo, la muestra de líquido amniótico fortificada a un nivel de 10 ng/g presentó mejores recuperaciones que la estudiada en muestras acuosas para ambos fragmentos, algo inesperado debido a que se esperaba mayor complejidad en la matriz. La Fig. 26 representa la intensidad obtenida en un cromatograma de líquido amniótico fortificado con 10 ng/g y una muestra acuosa de angiotensina II de 50 ng/g. Se observa que la intensidad es similar en ambos casos. Una hipótesis que se baraja para este hecho es el paso de reconstitución realizado en el pretratamiento de líquido amniótico (véase Preparación de muestra real, página 32), que podría haber preconcentrado el analito, mejorando la señal a este nivel.



Aunque debido a las limitaciones de muestra, no pudo confirmarse esta hipótesis con un blanco de muestra.

Relacionado con el pretratamiento diseñado para detección de angiotensina II en líquido amniótico, no se observó supresión de la señal (efecto de matriz) inyectando volúmenes crecientes de muestra en el sistema (Fig. 27) que indica que el pretratamiento diseñado para este propósito es efectivo.

Tabla 10 – Recuperaciones en muestras de líquido amniótico fortificadas con 1 µg/g y 10 µg/g de angiotensina II.

Añadido	a_6^+			b_6^+		
	Concentración	Recuperación	RSD	Concentración	Recuperación	RSD
LA (1 µg/g, 2 µL)	0.95 µg/g	96%	-	0.95 µg/g	95%	-
LA (1 µg/g, 2 µL)	0.95 µg/g	96%	-	0.97 µg/g	97%	-
LA (1 µg/g, 10 µL)	0.95 µg/g	96%	-	0.97 µg/g	98%	-
LA (1 µg/g, 20 µL)	0.97 µg/g	97%	-	0.96 µg/g	96%	-
LA (0.01 µg/g, 20 µL)	0.01 µg/g	105.3%	7.4%	0.01 µg/g	106.1%	9.9%

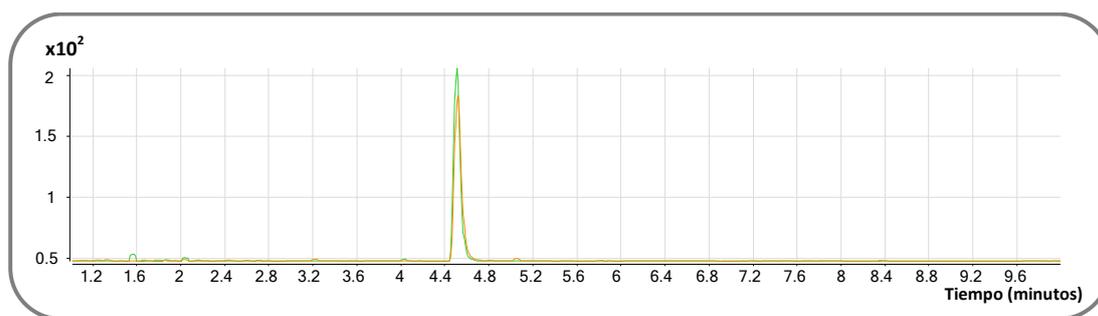


Fig. 26 – Comparación de cromatogramas entre una muestra de líquido amniótico fortificada con 10 µg/g de angiotensina II (verde) y una muestra acuosa de 50 ng/g (naranja). Modo SRM del fragmento b_6^+ .

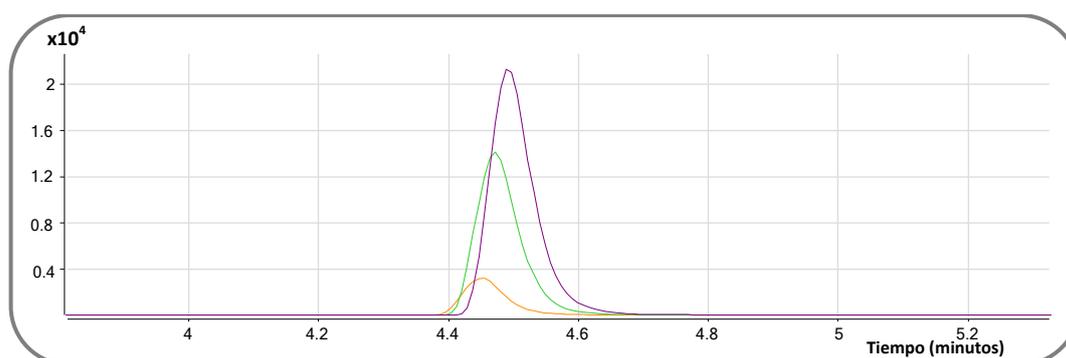


Fig. 27 – Cromatograma de líquido amniótico fortificado con 1 µg/g de angiotensina II (modo MRM, $[M+2H]^{2+} \rightarrow b_6^+$). Inyecciones de muestra de 2 µL (amarillo), 10 µL (verde) y 20 µL (lila).



Conclusiones

En este trabajo de fin de máster se ha estudiado la posibilidad de cuantificar de manera absoluta la concentración de angiotensina II mediante análisis por Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas (IDMS).

Se ha demostrado que la síntesis automatizada de péptidos en fase sólida es una herramienta útil para sintetizar angiotensina II enriquecida en un isótopo de ^{13}C como trazador de su homólogo natural, y que constituye una herramienta simple ya que solo es necesario reemplazar un aminoácido natural de la secuencia por uno enriquecido, algo que también permite el diseño de múltiples trazadores para los distintos péptidos “tipo angiotensina”. Esta última característica podría ser un primer paso para llegar a cuantificar con múltiples trazadores los distintos péptidos “tipo angiotensina” existentes en una muestra real, como se ha planteado que existen en la ruta metabólica de angiotensina II, y no son diferenciables por inmunoensayo.

En cuanto a la cuantificación de angiotensina II por la metodología IDMS desarrollada, se ha demostrado en muestras acuosas que es una herramienta precisa, exacta, sencilla y sensible hasta un nivel de 25 ng/g cuando se utiliza el modo SRM. Esto se confirmó a través de las transiciones de dos fragmentos independientes del mismo péptido (a_6^+ y b_6^+) que presentaron resultados concordantes, lo que da mayor fiabilidad a los resultados presentados. Además destaca su sencillez, ya que una vez realizada la caracterización del trazador (y estudiado el comportamiento de angiotensina II en el sistema HPLC-MS/MS) solo requiere introducir un volumen mínimo de muestra equilibrada con el trazador, corrigiéndose todos los posibles errores del pretratamiento de la muestra y efectos de matriz.

Respecto a las muestras realizadas en líquido amniótico fortificado se obtuvieron recuperaciones cuantitativas a niveles de 10 ng/g que no había sido posible en el análisis de muestras acuosas fortificadas. Estos resultados deberían ser estudiados con más profundidad para evaluar los posibles efectos de matriz del líquido amniótico (aumento de la eficiencia de ionización).

Cabe resaltar que a lo largo del Trabajo de Fin de Máster no fue posible realizar cuantificaciones absolutas directamente trazables al Sistema Internacional de unidades. Esto se debe a que no se dispuso de un material de referencia certificado de angiotensina II necesario para realizar la caracterización de la concentración del trazador isotópico



sintetizado. Esto refleja la importancia de desarrollar procedimientos fiables para certificar estándares de péptidos mediante métodos absolutos que sean directamente trazables al Sistema Internacional de unidades

Otro detalle importante por resolver es el de conseguir una importante disminución del límite de detección del método para cuantificar angiotensina II al nivel de pg/g (concentración esperada del péptido en algunas muestras de plasma²⁷). Para ello se podrían aplicar procedimientos de preconcentración de la muestra más selectivos como la Cromatografía de Inmunofinancia.

Los resultados obtenidos a lo largo de este Trabajo de Fin de Máster animan a seguir desarrollando este método para cuantificar angiotensina II en líquido amniótico (u otros fluidos corporales) dadas sus características e importancia.

Agradecimientos

Me gustaría agradecer en primer lugar al grupo de investigación de José Ignacio García Alonso, con especial mención a mis tutores, por su implicación, paciencia y accesibilidad en todo momento. Ello ha contribuido enormemente a mi formación en esta rama de la ciencia y sus aplicaciones.

A los doctores Juan Argüelles Luis, Carmen Perillán Méndez y Paula Núñez Martínez del área de Fisiología Animal (Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo) por facilitar las muestras de líquido amniótico analizadas, así como su apoyo y dedicación a lo largo de todo este trabajo. Sin ellos, la motivación de estudiar angiotensina II no hubiera sido concebida.

Por último, aunque por ello no menos importante, a los doctores Daniel García García del área de Ecología (Departamento de Biología de Organismos y Sistemas de la Universidad de Oviedo) y Daniel Martínez Rodríguez por motivarme a desarrollar una mente crítica en mis inicios como estudiante de biología, que ha contribuido enormemente en mi formación actual.

Bibliografía

1. World Health Organization. *A global brief on hypertension. WHO publications* (2013).
2. Van Der Giet, M. & Tölle, M. New Hypertension Guidelines: Progression or a Step Backwards in Hypertension? *Curr. Hypertens. Rep.* **17**, 1–7 (2015).
3. Mancia, G. New threshold and target blood pressures in the hypertension guidelines. Which implications for the hypertensive population? *J. Hypertens.* **33**, 702–703 (2015).



4. Mancia, G. *et al.* 2013 ESH/ESC guidelines for the management of arterial hypertension: The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Hypertension (ESH) and of the European Society of Cardiology (ESC). *Eur. Heart J.* **34**, 2159–2219 (2013).
5. Reudelhuber, T. L. Where hypertension happens. *J. Clin. Invest.* **123**, 1934–1936 (2013).
6. Egan, B. M., Li, J., Hutchison, F. N. & Ferdinand, K. C. Hypertension in the United States, 1999 to 2012: progress toward Healthy People 2020 goals. *Circulation* **130**, 1692–9 (2014).
7. Krawczyk, B. & Woźniak, M. in *ICT Innovations 2014 SE - 34* (eds. Bogdanova, A. M. & Gjorgjevikj, D.) **311**, 341–349 (Springer International Publishing, 2015).
8. Pries, A. in *PanVascular Medicine SE - 48* (ed. Lanzer, P.) 1619–1624 (Springer Berlin Heidelberg, 2015). doi:10.1007/978-3-642-37078-6_48
9. de Souza Mecawi, A., Ruginsk, S. G., Elias, L. L. K., Varanda, W. A. & Antunes-Rodrigues, J. Neuroendocrine Regulation of Hydromineral Homeostasis. *Compr. Physiol.* **5**, 1465–1516 (2015).
10. Ivy, J. R. & Bailey, M. a. Pressure natriuresis and the renal control of arterial blood pressure. *J. Physiol.* **592**, 3955–3967 (2014).
11. Sica, D. a. Current concepts of pharmacotherapy in hypertension: thiazide-type diuretics: ongoing considerations on mechanism of action. *J. Clin. Hypertens. (Greenwich)*. **6**, 661–664 (2004).
12. Kanno, Y., Ohno, Y. & Takenaka, T. in *Pathophysiology and Pharmacotherapy of Cardiovascular Disease SE - 37* (eds. Jagadeesh, G., Balakumar, P. & Maung-U, K.) 807–822 (Springer International Publishing, 2015). doi:10.1007/978-3-319-15961-4_37
13. Pedersen, M. E. & Cockcroft, J. R. The vasodilatory beta-blockers. *Curr. Hypertens. Rep.* **9**, 269–277 (2007).
14. Ibrahim, M. M. RAS inhibition in hypertension. *J. Hum. Hypertens.* **20**, 101–8 (2006).
15. Hinck, S. History about the discovery of the Renin-Angiotensin system. *Am. J. Nurs.* **111**, 12–13 (2011).
16. Morales Olivas, F. J. & Estañ Yago, L. Conceptos nuevos sobre el sistema renina angiotensina. *Hipertens. y Riesgo Vasc.* **27**, 211–217 (2010).
17. Alwan, S., Polifka, J. E. & Friedman, J. M. Angiotensin II receptor antagonist treatment during pregnancy. *Birth Defects Res. Part A Clin. Mol. Teratol.* **73**, 123–130 (2005).
18. Unger, T. The role of the renin-angiotensin system in the development of cardiovascular disease. *Am. J. Cardiol.* **89**, 3A–9A; discussion 10A (2002).
19. Piaditis, G., Markou, A., Papanastasiou, L., Androulakis, I. I. & Kaltsas, G. PROGRESS IN ALDOSTERONISM: A review of the prevalence of primary aldosteronism in pre-hypertension and hypertension. *Eur. J. Endocrinol.* **172**, R191–R203 (2015).
20. Saji, H., Yamanaka, M., Hagiwara, a & Ijiri, R. Losartan and fetal toxic effects. *Lancet* **357**, 363 (2001).
21. Bos-Thompson, M. -a. Fetal Toxic Effects of Angiotensin II Receptor Antagonists: Case Report and Follow-Up after Birth. *Ann. Pharmacother.* **39**, 157–161 (2004).
22. Podymow, T. & August, P. Antihypertensive Drugs in Pregnancy. *Semin. Nephrol.* **31**, 70–85 (2011).
23. Li, H. & Yuan, G. Electrospray ionization mass spectral characteristics and fragmentation mechanisms of Angiotensin II and its analogues. *Int. J. Mass Spectrom.* **252**, 54–60 (2006).
24. Tenorio-López, F. A. *et al.* Simultaneous determination of angiotensins II and 1-7 by capillary zone electrophoresis in plasma and urine from hypertensive rats. *Talanta* **80**, 1702–1712 (2010).
25. Wang, C., Lee, C. S., Smith, R. D. & Tang, K. Capillary Isotachopheresis-Nanoelectrospray Ionization-Selected Reaction Monitoring MS via a Novel Sheathless Interface for High Sensitivity Sample Quantification. *Anal Chem* **85**, 7308–15 (2013).



26. Schulz, A., Jankowski, J., Zidek, W. & Jankowski, V. Absolute quantification of endogenous angiotensin II levels in human plasma using ESI-LC-MS/MS. *Clin. Proteomics* **11**, 37 (2014).
27. Olkowicz, M. *et al.* Development of a sensitive, accurate and robust liquid chromatography/mass spectrometric method for profiling of angiotensin peptides in plasma and its application for atherosclerotic mice. *J. Chromatogr. A* **1393**, 37–46 (2015).
28. Dell'Italia, L. J. & Ferrario, C. M. The never-ending story of angiotensin peptides: Beyond angiotensin I and II. *Circ. Res.* **112**, 1086–1087 (2013).
29. Jankowski, V. *et al.* Mass-Spectrometric Identification of a Novel Angiotensin Peptide in Human Plasma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **27**, 297–302 (2006).
30. Aebersold, R. & Goodlett, D. R. Mass spectrometry in proteomics. *Chem. Rev.* **101**, 269–295 (2001).
31. Whitehouse, C. M., Dreyer, R. N., Yamashita, M. & Fenn, J. B. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* **57**, 675–679 (1985).
32. Smith, R. D., Loo, J. a, Edmonds, C. G., Barinaga, C. J. & Udseth, H. R. New developments in biochemical mass spectrometry: electrospray ionization. *Anal. Chem.* **62**, 882–899 (1990).
33. Krueve, A. *et al.* Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part II. *Anal. Chim. Acta* **870**, 8–28 (2015).
34. Bruins, A. P. Mechanistic aspects of electrospray ionization. *J. Chromatogr. A* **794**, 345–357 (1998).
35. García Alonso, J. I. & Rodríguez-González, P. *Isotope Dilution Mass Spectrometry*. (The Royal Society of Chemistry, 2013).
36. Diaz Fernández, S., Sugishama, N., Ruiz Encinar, J. & Sanz-medel, A. Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics. (2012).
37. Kubinyi, H. Calculation of isotope distributions in mass spectrometry. A trivial solution for a non-trivial problem. *Anal. Chim. Acta* **247**, 107–119 (1991).
38. González-Antuña, A., Rodríguez-González, P. & García Alonso, J. I. Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **49**, 681–691 (2014).
39. CEM corporation. *Liberty Blue™ Automated Microwave Peptide Synthesizer Operation Manual Supplement 600327*. (2013).
40. González-Antuña, A. *et al.* Determination of Cystatin C in human serum by isotope dilution mass spectrometry using mass overlapping peptides. *J. Proteomics* **112**, 141–155 (2014).
41. Wieser, M. E. & Coplen, T. B. Atomic weights of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.* **83**, 359–396 (2010).
42. Kragten, J. Tutorial review. Calculating standard deviations and confidence intervals with a universally applicable spreadsheet technique. *Analyst* **119**, 2161–2165 (1994).
43. Presser, D. *Mass Hunter user workshop QQQ*. (2009). at <https://www.agilent.com/cs/library/posters/Public/QQQ_Method_Development_Triple_and_Optimization.pdf>
44. Lerman, L. O., Chade, A. R., Sica, V. & Napoli, C. Animal models of hypertension: An overview. *J. Lab. Clin. Med.* **146**, 160–173 (2005).
45. Ortega, R. S.-A., Saavedra-Alías, J. M. A. de, Liébana-Cañada, A., Sánchez-Muñoz, B. & Ramírez-Expósito, J. M. M.-M. and M. J. Circulating Aminopeptidase Activities in Men and Women with Essential Hypertension. *Current Medicinal Chemistry* **20**, 4935–4945 (2013).
46. Staniforth, M. & Stavros, V. G. Recent advances in experimental techniques to probe fast excited-state dynamics in biological molecules in the gas phase: dynamics in nucleotides, amino acids and beyond. *Proc. Math. Phys. Eng. Sci.* **469**, 20130458 (2013).



47. Lane, C. S. Mass spectrometry-based proteomics in the life sciences. *Cell. Mol. Life Sci.* **62**, 848–869 (2005).
48. Waters. Quadrupole analyzer. at <http://www.waters.com/waters/es_ES/What-Types-of-Instruments-Are-Used%3F/nav.htm?cid=10090937&locale=es_ES>
49. Santos, L. S. What do We Know about Reaction Mechanism? The Electrospray Ionization Mass Spectrometry Approach. *Synthesis (Stuttg.)*. **22**, 1827–1840 (2011).
50. Domon, B. & Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* **312**, 212–217 (2006).

