



Universidad de Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

Determinación de proteínas biomarcadoras del glaucoma mediante análisis por Dilución Isotópica y Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem

Franco Daniel D'Amico

Julio 2016, Oviedo



Pablo Rodríguez González, Profesor del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo,

CERTIFICA:

Que el presente Trabajo, titulado “Determinación de proteínas biomarcadoras del glaucoma mediante análisis por Dilución Isotópica y Cromatografía de Líquidos acoplada a Espectrometría de Masas en Tándem”,

ha sido realizado por el alumno **Franco Daniel D’Amico** bajo mi 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 autorizo.

Oviedo, a 13 de Julio de 2016

Fdo: Pablo Rodríguez González

ÍNDICE DE CONTENIDO

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1	EL GLAUCOMA: PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA MUNDIAL	1
1.2	DETECCIÓN PRECOZ: PROTEÍNAS BIOMARCADORAS	3
1.3	PROTEÍNAS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS	4
1.4	ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS	8
1.4.1	IDMS EN ANÁLISIS ELEMENTAL Y MOLECULAR	8
1.4.2	DECONVOLUCIÓN DE PERFILES ISOTÓPICOS (IPD) EN ANÁLISIS ORGÁNICO.....	11
1.5	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL USO DE ISOTOPOS ESTABLES ENRIQUECIDOS	12
1.5.2	CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE PROTEÍNAS	14
2.	OBJETIVOS	20
3.	EXPERIMENTAL	21
3.1	REACTIVOS	21
3.2	INSTRUMENTACIÓN.....	21
3.2.1	CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ULTRA-ALTA RESOLUCIÓN AGILENT TECHNOLOGIES 1290 INFINITY.....	22
3.2.2	ESPECTRÓMETRO DE MASAS TRIPLE CUADRUPOLO (QQQ) AGILENT TECHNOLOGIES 6460.....	22
3.3	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	23
3.3.1	ANÁLISIS POR UHPLC	23
3.3.2	ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA).....	23
3.3.3	ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS.....	23
3.3.4	MEDIDA DE LAS ABUNDANCIAS ISOTÓPICAS DE LOS PÉPTIDOS	26
3.3.5	DETERMINACIÓN DE LA PUREZA ESPECTRAL	26
3.3.6	DETERMINACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO DE LOS PÉPTIDOS MARCADOS.....	27
3.3.7	HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CONJUNTA DE LAS PROTEÍNAS C3, VITRO Y APO	27

3.3.8	CALCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS PÉPTIDOS MEDIANTE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE.....	28
3.3.9	RECUPERACIONES INDIVIDUALES EN DISOLUCIÓN ACUOSA.....	29
4.	RESULTADOS.....	30
4.1	OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA FUENTE DE IONIZACIÓN ..	30
4.2	DETERMINACIÓN DE LA PUREZA ESPECTRAL DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS	33
4.3	DETERMINACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO DE LOS PÉPTIDOS MARCADOS	37
4.4	OPTIMIZACIÓN DE LA MEDIDA DE LA COMPOSICIÓN ISOTÓPICA DE LOS PÉPTIDOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM A RESOLUCIÓN ESTÁNDAR	39
4.4.1	OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA PARA CADA PROTEÍNA BIOMARCADORA.....	40
4.5	OPTIMIZACIÓN DEL ANCHO DE VENTANA PARA MEDIDAS POR SRM A BAJA RESOLUCIÓN.....	42
4.6	ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN DE DISOLUCIONES DE PÉPTIDOS.....	43
5.	CONCLUSIONES	45
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Porcentaje de FMB al que eluyen los seis péptidos según el gradiente empleado para la separación cromatográfica descrito en la sección 3.4.1.1	23
Tabla 2: Secuencia de aminoácidos, masa monoisotópica de iones precursores y producto y la energía de colisión empleada en las transiciones SRM de cada uno de los péptidos estudiados a lo largo del presente Trabajo Fin de Máster.	24
Tabla 3: Parámetros de la fuente y rango de estudios seleccionados para la optimización de los seis péptidos	30
Tabla 4: Valor óptimo de <i>Fragmentor Voltage</i> para los 6 péptidos medidos en FIA y con el modo de adquisición SIM	30
Tabla 5: Valores óptimos de los parámetros de la fuente de ionización ESI <i>Jet Stream</i>	33
Tabla 6: Factores de fraccionamiento de los seis péptidos en modo de adquisición SIM a resolución estándar donde x_M se corresponde con la contribución del pico a m/z 887,5 x_{M-1} a la contribución del pico a m/z 886,5 y x_{M-2} a la contribución del pico a m/z 885,5.	35
Tabla 7: Factores de fraccionamiento en modo de medida SRM a baja resolución	36
Tabla 8: Enriquecimiento isotópico medio de los péptidos en modo de adquisición SIM y SRM a baja resolución. La incertidumbre de los resultados corresponde a dos veces la desviación estándar obtenida de cinco replicas independientes.	38
Tabla 9: Contribución de las distintas transiciones SRM a la composición isotópica del cluster del ion producto a m/z 616,3 para el péptido Vitro1	39
Tabla 10: Tiempo para hidrólisis trípica cuantitativa de las tres proteínas	41
Tabla 11: centros de los clusters moleculares precursores y ancho de ventana de los seis péptidos de abundancia natural utilizados a lo largo de este TFM.	43
Tabla 12: Concentración de los patrones de péptidos enriquecidos isotópicamente empleados para la preparación de mezclas 1:1 con sus análogos de abundancia natural	43
Tabla 13: Recuperaciones obtenidas de los seis péptidos de abundancia natural empleando péptidos enriquecidos isotópicamente como referencia. La incertidumbre de las recuperaciones corresponde con la desviación estándar de tres mezclas independientes.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del globo ocular humano	1
Figura 2: Representación comparativa entre el glaucoma de ángulo abierto (izquierda y el de ángulo cerrado (derecha)	2
Figura 3: Mecanismo esquemático del proceso de formación de iones moleculares con la fuente de ionización electrospray	6
Figura 4: Representación esquemática del concepto de dilución isotópica (ID-MS)	8
Figura 5: IDMS elemental en el que se pretende cuantificar el elemento de abundancia natural a con la adición en la muestra del isótopo enriquecido b	9
Figura 6: Distribución de abundancias isotópicas en una molécula orgánica con un número inferior de 90 átomos de carbono en su estructura.....	10
Figura 7: Estrategias para la cuantificación absoluta de proteínas por IDMS	15
Figura 8: Representación esquemática de la metodología para la cuantificación absoluta de proteínas mediante el empleo de la estrategia AQUA	18
Figura 9: Representación esquemática de la fuente de ionización ESI Jet Stream de Agilent Technologies, en la que se muestran los diferentes parámetros y variables que intervienen en las diferentes etapas de la ionización	22
Figura 10: Representación esquemática del método de adquisición SIM a resolución estándar .24	
Figura 11: Representación esquemática del método de adquisición barrido de iones precursores.	25
Figura 12: Representación esquemática del método de adquisición SRM	25
Figura 13: Representación esquemática del método de adquisición SRM a baja resolución	25
Figura 14: Representación esquemática del cálculo de abundancias experimentales	26
Figura 15: Representación esquemática de la digestión enzimática con tripsina de las proteínas C3, VITRO y APO y la obtención de mezcla de los péptidos naturales y los enriquecidos isotópicamente	27
Figura 16: Respuesta instrumental en función de la magnitud de los parámetros de la fuente ESI Jet Stream.....	31
Figura 17: Distribución isotópica teórica (azul) y experimental (naranja) del péptido Vitro1 para el cluster molecular 887.5 u medido en modo SIM a una concentración de aproximada de 10 ppm	34

Figura 18: Distribución isotópica teórica corregida con factores de fraccionamiento (azul) y experimental (naranja) del péptido Vitro1 para el cluster molecular 887,5 u medido en modo SIM a una concentración de 10 ppm	35
Figura 19: Distribución isotópica teórica corregida con factores de fraccionamiento (azul) y experimental (naranja) del péptido Vitro 1 para el ion producto a m/z 616,4 y el ion producto a m/z 644,4 medidos en modo SRM a baja resolución a una concentración aproximada de 10 ppm	37
Figura 20: Suma cuadrática de residuales en la determinación del enriquecimiento isotópico del péptido Vitro1 enriquecido en dos átomos de ^{13}C	38
Figura 21: Distribución isotópica teórica (azul) y experimental (naranja) del péptido Vitro1 para los clusters de los iones producto a m/z 616,4 y a m/z 644,4 medidos en modo SRM resolución estándar a una concentración aproximada de 10 ppm.....	40
Figura 22: Relación de fracciones molares de los péptidos de abundancia natural y los enriquecidos isotópicamente en función del tiempo de digestión trípica de las 3 proteínas objeto de cuantificación	41
Figura 23: Anchos de ventana experimentales en función del ancho de ventana del método de adquisición <i>Precursor Ion Scan</i> para el cluster molecular del ion producto de m/z 799,5 del péptido de abundancia natural Apo 2	42
Figura 24: Representación de la concentración esperada (azul) y experimental (naranja) de los péptidos de abundancia natural en el estudio de recuperaciones individuales	44

ABREVIATURAS

<p>AQUA Absolute QUAntification..... 17</p> <p>CID Disociación Inducida por Colisión..... 7</p> <p>CV Voltaje del capilar 33</p> <p>DG Gas de secado (Drying Gas) 34</p> <p>ESI Ionización Electrospray 5</p> <p>ESI Jet Stream Fuente de ionización ESI Jet Stream..... 23</p> <p>FIA Análisis por Inyección en Flujo 24</p> <p>FMA Fase Móvil A 24</p> <p>FMB Fase Móvil B..... 24</p> <p>FV Fragmentor Voltage..... 31</p> <p>FWHM Anchura a la semialtura (Full Width at Half Maximum) 44</p> <p>GIEE Grupo de Investigación de Isótopos Estables Enriquecidos de la Universidad de Oviedo 21</p> <p>GPAA Glaucoma Primario de Ángulo Abierto..... 3</p> <p>GPEX Glaucoma secundario de ángulo abierto Pseudoexfoliativo..... 3</p> <p>HPLC Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución 8</p> <p>ICAT Isotope-Code Affinity Tag..... 14</p>	<p>IDMS Análisis por Dilución Isotópica y Espectrometría de Masas 8</p> <p>IPD Isotope Pattern Deconvolution 11</p> <p>iTRAQ isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification 14</p> <p>MOPs Mass Overlapping Peptides..... 19</p> <p>MS Espectrometría de Masas 5</p> <p>MS-MS Espectrometría de masas en tándem..... 21</p> <p>NP Presión del gas de nebulización 33</p> <p>NV Nozzle Voltage 33</p> <p>PIO Presion Intraocular..... 1</p> <p>PSAQ Protein Standard Absolute Quantification .. 16</p> <p>QconCAT 18</p> <p>QqQ Espectrómetro de masas de triple cuadrupolo 22</p> <p>SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico 13</p> <p>SGF Flujo del Sheath Gas 32</p> <p>SGT Temperatura del Sheath Gas 32</p> <p>SI Sistema Internacional de Unidades 16</p> <p>SILAC Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture..... 13</p>
---	---

SIM

(Selected Ion Monitoring) Monitorización

Selectiva de Iones 25

SRM

Selected Reaction Monitoring 7

TOF

Analizador Time-Of-Flight (Tiempo de

vuelo) 7

UHPLC

Cromatografía de Líquidos de Ultra-Alta

Resolución 23



1. INTRODUCCIÓN

1.1 EL GLAUCOMA: PROBLEMA DE SALUD PÚBLICA MUNDIAL

El término *glaucoma* hace referencia a un grupo de enfermedades neurodegenerativas que afectan principalmente al nervio óptico, llevando asociada una progresiva, o incluso repentina, pérdida de visión periférica [1], siendo éstas unas de las principales causas de ceguera en el mundo. Uno de los principales factores de riesgo a la hora de padecer algún tipo de glaucoma es presentar una elevada *presión intraocular* (PIO), presión que ejercen los líquidos intraoculares contra la pared del ojo, tradicionalmente superior a 21 mm Hg [2]. Para comprender el mecanismo por el cual el glaucoma se puede desarrollar, es esencial conocer la dinámica del *humor acuoso*, que es el líquido que se halla en el globo ocular delante del cristalino (Figura 1). La función principal del humor acuoso es proporcionar nutrientes y oxígeno a los tejidos a los que no llega el riego sanguíneo, jugando un papel determinante en el establecimiento del nivel de la PIO [3].

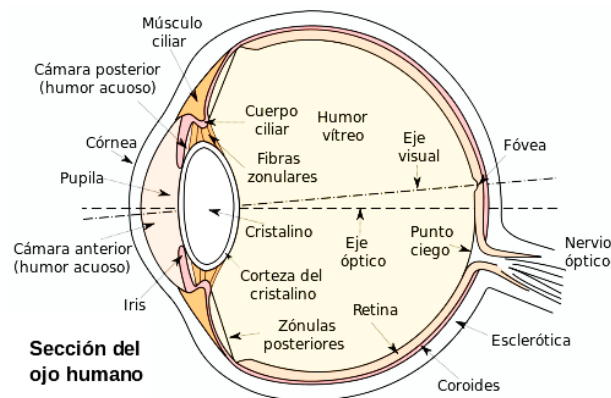


Figura 1: Esquema del globo ocular humano [4]

El humor acuoso se genera en el cuerpo ciliar, siendo éste un proceso biológico sujeto a ritmos circadianos en el que la formación y secreción de este líquido se realiza de manera continua hacia la cámara posterior (entre el iris y el cristalino), principalmente mediante tres procesos: secreción activa (contra gradiente electroquímico e independiente de la presión), ultrafiltración (movimiento dependiente del gradiente de presión) y difusión simple (movimiento pasivo de iones a través de la membrana), siendo la secreción activa el proceso que contribuye en mayor medida a la formación del humor acuoso. Una vez secretado, el humor acuoso circula a través de la pupila hacia la cámara anterior y es drenado principalmente por dos mecanismos: trabecular (a través del sistema malla trabecular-canal de Schlemm), que es dependiente de la presión y es el mecanismo por el que se drena prácticamente la totalidad del líquido; y el mecanismo uveoescleral, denominación que recibe cualquier drenaje extratrabecular, y es independiente de la presión [5].

Los procesos de formación y drenaje del humor acuoso descritos hasta el momento son generalmente determinantes sobre el nivel de la PIO, dado que un desequilibrio en estos

mecanismos, generalmente la disminución de la capacidad de drenaje, lleva a un aumento de la PIO. Así, esta última depende de factores como el nivel de presión venosa episcleral, la velocidad de producción del humor acuoso por el cuerpo ciliar y la resistencia al drenaje del humor acuoso a través del sistema malla trabecular-canal de Schlemm [6].

Generalmente, los pacientes que presentan glaucoma y experimentan una elevada PIO lo hacen debido a una disminución de la facilidad de drenaje del humor acuoso. Esta alteración en el balance formación-drenaje, lleva a una acumulación del líquido y, por tanto, a un aumento de la presión de éste en el ojo, produciendo daños en el nervio óptico. Aun así, si bien es cierto que la PIO es el principal factor de riesgo y es el que mejor se puede tratar clínicamente, no existe actualmente un valor establecido para toda la población a partir del cual se considere que es elevada, dado que se han encontrado casos con pacientes sin daño en el nervio óptico con PIOs de aproximadamente 30 mm Hg y otros que padecen algún tipo de glaucoma con presiones que no superan los 18 mm Hg. Esto se debe a que existen otros factores, generalmente genéticos, que crean susceptibilidad a la lesión de los axones del nervio óptico [6].

Con independencia de la presencia de una elevada PIO, el glaucoma se ha clasificado tradicionalmente como de ángulo abierto o cerrado o de tipo primario o secundario [7]. En este sentido, se considera que el glaucoma es de ángulo abierto cuando el ángulo entre la córnea y el iris, *ángulo iridocorneal*, es amplio (resistencia al drenaje sin que exista obstrucción anatómica), mientras que en el tipo secundario este ángulo es reducido o se encuentra cerrado (resistencia al drenaje debido a la existencia de obstrucción anatómica). Una representación esquemática de ambos tipos de glaucoma se muestra en la Figura 2, donde se compara el glaucoma de ángulo abierto, en el que la facilidad de drenaje se encuentra mermada a pesar de que el ángulo iridocorneal no está anatómicamente obstruido; y el de ángulo cerrado en el que existe una obstrucción anatómica que impide o reduce la capacidad de drenaje [8].

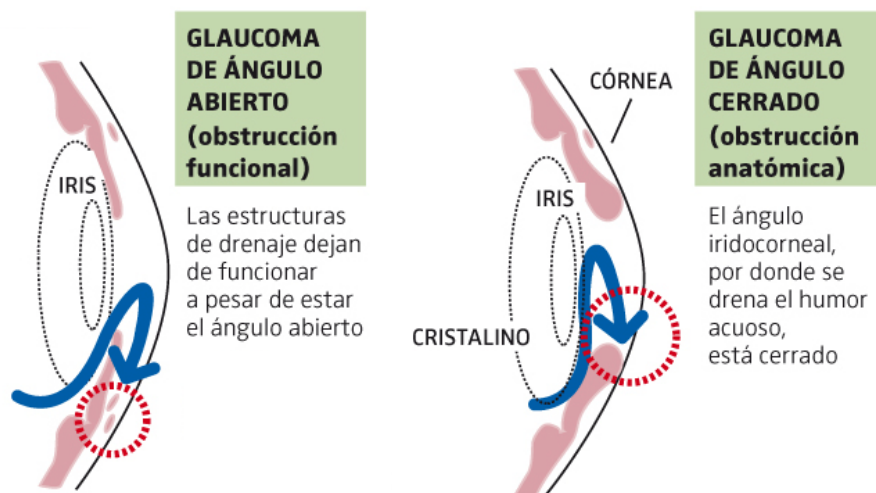


Figura 2: Representación comparativa entre el glaucoma de ángulo abierto (izquierda) y el de ángulo cerrado (derecha) [8]

En cuanto al otro criterio de clasificación, el glaucoma se considera primario si no se asocia a enfermedades oculares o sistémicas conocidas que provoquen resistencia al drenaje; y de tipo secundario, cuando se asocia a trastornos oculares o sistémicos que afecten a la facilidad de drenaje del humor acuoso [9].

El glaucoma primario de ángulo abierto (GPAA) y el glaucoma secundario de ángulo abierto pseudoexfoliativo (GPEX) son los dos tipos de glaucoma más prevalentes en los países desarrollados. Se ha descrito que una elevada PIO es el principal factor de riesgo y progreso del GPAA [10], mientras que en el caso del GPEX, la causa más probable es la presencia del síndrome de pseudoexfoliación [11]. Este síndrome está asociado con la edad y con un importante componente genético que se manifiesta en la excesiva producción y progresivo depósito de material extracelular en diferentes tejidos y estructuras oculares como el ángulo iridocorneal, dificultando de esta manera el drenaje del humor acuoso.

Se calcula que en 2020 cerca de 80 millones de personas en el mundo padecerán algún tipo de glaucoma [12] y que, en algunas regiones del mundo como Asturias, la prevalencia de pacientes con GPEX puede alcanzar el 30 % [13]. Se trata por tanto de un importante problema de salud pública a nivel mundial, situándose, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), como la tercera causa de discapacidad visual en el mundo, por detrás de las cataratas y errores de refracción, como la miopía o el astigmatismo [14].

Estas alarmantes cifras de la incidencia mundial han propiciado el desarrollo de nuevos tratamientos para los diferentes tipos de glaucoma [15], pero sobre todo se ha hondado en el desarrollo de metodologías de detección precoz de esta enfermedad [16], dado que hasta el momento no es posible detectarla hasta que la pérdida de visión es evidente y la medida de la PIO no es un criterio suficiente para su diagnóstico. Aunque se trata de una enfermedad irreversible, es decir, no es posible recuperar la visión perdida, sí es posible frenar su incidencia con un tratamiento adecuado (colirios, pastillas, tratamiento láser o cirugía, entre otros). Se estima que el 50% de los pacientes con glaucoma desconocen que padecen la enfermedad e incluso que el 50% de los pacientes que reciben algún tipo de tratamiento del glaucoma no la padecen [17]. Por este motivo, la detección precoz permitiría frenar la enfermedad desde una etapa temprana o incluso que no llegue desarrollarse, mejorando de manera significativa la calidad de vida de los potenciales pacientes.

1.2 DETECCIÓN PRECOZ: PROTEÍNAS BIOMARCADORAS

Dada la gran importancia del diagnóstico, prevención y seguimiento de enfermedades, la identificación y determinación de biomarcadores ha sido y es uno de los mayores desafíos de la química y bioquímica moderna en los últimos años [18]. Aunque históricamente los biomarcadores se asociaban con medidas de tipo fisiológico, actualmente el término se centra fundamentalmente en biomarcadores de tipo molecular [19]. Estos biomarcadores moleculares

pueden tomar diferentes formas como el ADN, proteínas, péptidos, metabolitos, entre otros, por lo que se han desarrollado diferentes estrategias para su descubrimiento y determinación.

Antes de abordar las diferentes estrategias, es necesario indicar las ventajas que presentan las proteínas biomarcadoras frente a otro tipo de biomarcadores como, por ejemplo, los de tipo genómico (ADN). La secuenciación del genoma humano, además de constituir un hito histórico, supuso una auténtica revolución en la identificación de las causas genéticas de muchas enfermedades. Sin embargo, la información obtenida de ese largo y complicado estudio es a día de hoy insuficiente. El número de proteínas que el organismo sintetiza es mucho mayor que el número de genes presentes en el genoma. La síntesis de las proteínas y sus posibles modificaciones pueden verse alteradas por factores externos o internos al propio organismo. Es precisamente este conjunto dinámico de proteínas (proteoma), frente a la invariabilidad del genoma, el que define el funcionamiento del organismo y, por tanto, de los mecanismos biológicos que pueden dar lugar al desarrollo futuro de determinadas enfermedades [20].

El proteoma es altamente dinámico. Esto quiere decir que el tipo de proteínas expresadas, su abundancia, su estado de modificación y su localización, dependen del estado fisiológico de una célula o tejido. Por tanto, el estudio del proteoma permite conocer el estado celular o del medio que rodea a la célula. De esta manera, el descubrimiento de una proteína biomarcadora consiste en la búsqueda de proteínas que presenten alguna característica diferenciadora entre el proteoma de un paciente que padezca la enfermedad que se pretende estudiar y el de una persona que no la padezca.

La determinación de un biomarcador debe ser rápida, procurando que el método empleado proporcione la máxima especificidad y sensibilidad con una instrumentación que sea accesible a los laboratorios clínicos y que, al mismo tiempo, permita analizar un gran número de muestras a un coste razonable. En este sentido, la Espectrometría de Masas (MS) es actualmente la técnica de referencia empleada en los estudios proteómicos [21]–[23] gracias en gran medida a aspectos relacionados con su elevada sensibilidad, alto rendimiento, y a la elevada exactitud y precisión de los resultados obtenidos.

1.3 PROTEÍNAS Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El método tradicional para la caracterización de péptidos y proteínas ha sido la degradación de Edman [24]. Este procedimiento consiste en la eliminación progresiva de un residuo N-terminal de una cadena peptídica, manteniendo intactos los restantes enlaces peptídicos y detectando los residuos liberados por espectroscopia visible-ultravioleta. Este mecanismo de secuenciación supuso un importante avance científico en la época, pero actualmente su uso ha disminuido notablemente debido a los retos cada vez más exigentes en el ámbito de la proteómica y la evolución de la instrumentación científica, especialmente en el campo de la espectrometría de masas. Además, este método requiere un elevado tiempo de análisis, una significativa cantidad

inicial de muestra altamente purificada y es válido únicamente para proteínas con extremos N-terminales libres. Por tanto, este método no es adecuado cuando existe una modificación (p.e. acetilación) de los extremos N-terminales libres, lo cual es una limitación importante teniendo en cuenta que el 80% de las proteínas celulares presentan algún tipo de modificación.

1.3.1. FUENTE DE IONIZACIÓN DE ELECTROSPRAY EN PROTEÓMICA

La caracterización y determinación de proteínas mediante espectrometría de masas ha sido posible gracias a la progresiva y significativa mejora de la instrumentación. Hoy en día, gran parte de los estudios proteómicos se llevan a cabo preferentemente con esta técnica a pesar de la dificultad de analizar moléculas de elevada masa molecular como péptidos o proteínas cargadas en fase gaseosa. La espectrometría de masas ha estado por tanto restringida durante mucho tiempo a moléculas pequeñas y termoestables debido a la falta de eficientes fuentes de ionización que permitiesen una ionización suave y una transferencia de los iones a la fase gaseosa sin excesiva fragmentación de las moléculas. A mediados de los años 80 se produce una revolución en este campo, gracias al desarrollo de dos nuevas técnicas de ionización para la formación de iones moleculares de biomoléculas intactas: electrospray (ESI) [25] e ionización/desorción por láser asistida por una matriz (MALDI) [26]. Ambas fuentes de ionización solventaron los problemas derivados de la elevada masa molecular y poca volatilidad de las proteínas, haciéndolas accesibles a su estudio por espectrometría de masas y cambiando, por tanto, drásticamente la manera en la que hasta entonces se llevaban a cabo los estudios proteómicos.

En la ionización tipo ESI (Figura 3), el analito que se pretende ionizar está disuelto en un disolvente polar y más volátil y se introduce en la fuente con una jeringa o bien mediante el acoplamiento de una técnica de separación previa como la cromatografía líquida o la electroforesis capilar. Para lograr la ionización del analito, entre los extremos del capilar de la fuente se establece una diferencia de potencial de unos pocos kilovoltios, generalmente entre 3 kV y 4 kV, de tal manera que el spray generado de la nebulización está compuesto por una serie de gotas que contienen a las moléculas de analito en su interior. Estas gotas se encuentran cargadas en su superficie bien de forma positiva o negativa en función del potencial aplicado en el capilar. Las gotas, a medida que van siendo conducidas hacia el analizador, se evaporan generalmente con una corriente caliente de gas inerte, de tal manera que se produce un incremento en la densidad de carga en la superficie de la gota. Cuando la atracción de las moléculas cargadas al potencial de la fuente es mayor que la tensión superficial de la gota se produce la denominada explosión de Coulomb que tiene como resultado la liberación de los iones moleculares en fase gaseosa.

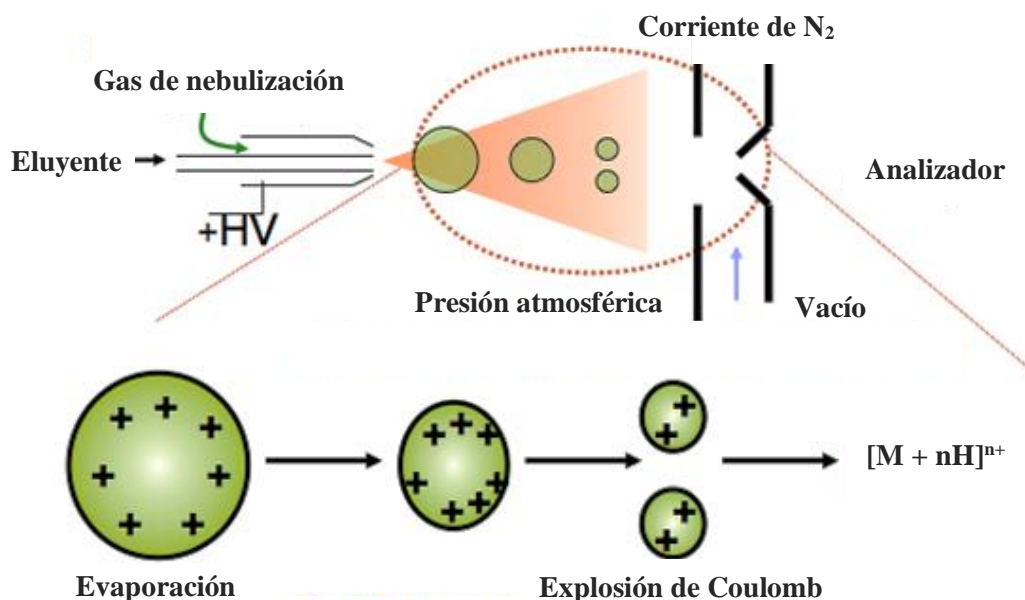


Figura 3: Mecanismo esquemático del proceso de formación de iones moleculares con la fuente de ionización electrospray [27]

La fuente de ionización ESI está considerada como una fuente “débil” en cuanto a la escasa fragmentación que genera en las moléculas ionizadas. Aun así, modificando la diferencia de potencial aplicada en el capilar es posible inducir fragmentación de las moléculas (ISD: *In-Source Dissociation*) [28], que suele ser poco significativa [29]. De esta manera, en la mayoría de los casos, sólo se observa, o lo hace de manera predominante, la forma protonada del catión molecular (ion de la molécula que no ha experimentado fragmentación) $[M+H]^+$ o el anión molecular desprotonado $[M-H]^-$. Teniendo en cuenta las consideraciones anteriores, esta ionización a presión atmosférica se produce por pérdida o ganancia de protones o por adición de otros iones como sodio (Na^+), potasio (K^+), cloruro (Cl^-) o amonio (NH_4^+) presentes en la disolución, dando lugar en estos últimos casos a los que se conocen como iones aducto, como por ejemplo el aducto de amonio $[M+NH_4]^+$ [30], y que se encuentran a un valor de m/z superior al del ion molecular.

Cuando se mide en modo positivo, es decir, cuando se miden los iones $[M+H]^+$ se añade un ácido (generalmente, ácido fórmico) a la disolución que se inyecta en la fuente. El ácido va a favorecer la protonación de las moléculas en los puntos básicos de las mismas [31]. Generalmente, las proteínas poseen varios puntos básicos en su estructura (p.e. grupos amino) por lo que es posible que se encuentren protonadas en más de un punto y en conjunto presenten carga múltiple $[M+nH]^{n+}$. Por esta razón, el espectro de masas obtenido para proteínas/péptidos presenta intensidades a valores m/z correspondientes no solo al ion molecular, sino también a los iones con carga múltiple. Esta característica inherente a la fuente electrospray permite el análisis de proteínas de elevada masa molecular que a priori serían incompatibles con un análisis por espectrometría de masas con la instrumentación disponible hasta la fecha. Sin embargo, al poseer carga múltiple y en espectrometría de masas medirse la relación masa/carga (m/z), esta última

adquiere un valor adecuado en el rango de m/z tolerado por los analizadores de masas más utilizados, como el cuadrupolo o el Time-Of-Flight (TOF).

Además de las comentadas características de esta fuente de ionización, cabe señalar su elevada sensibilidad y su fácil acoplamiento a prácticamente cualquier tipo de Cromatografía Líquida (LC) [32] o electroforesis [33], posibilitando la separación de mezclas complejas de proteínas o péptidos para su posterior análisis por espectrometría de masas.

1.3.2. ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM EN PROTEÓMICA

La aparición y mejora de los equipos de espectrometría de masas en tándem fue especialmente importante para la caracterización y determinación de proteínas mediante espectrometría de masas. Los espectrómetros de masas en tándem poseen generalmente dos analizadores de masa en serie y una celda de colisión situada entre ambos para romper los iones precursores en iones producto mediante procesos de Disociación inducida por Colisión (CID). De esta manera, se pueden eliminar interferencias espectrales y mejorar la relación señal/ruido frente a los instrumentos con un único analizador. Las configuraciones típicas de instrumentos en tándem son: triple cuadrupolo (QqQ) o combinaciones cuadrupolo-TOF (QqTOF), donde la letra q hace referencia a la celda de colisión en la que generar fragmentación.

Cuando los fines del análisis son tipo cuantitativo, los instrumentos en tándem se configuran de tal manera que en el primer analizador sólo deja pasar a la celda de colisión aquel ion que tenga una relación m/z determinada (ion precursor). Este ion se fragmenta en la celda de colisión y se mide uno o varios de los iones productos en el tercer cuadrupolo o analizador TOF. Este procedimiento recibe el nombre de SRM, siglas en inglés de Selected Reaction Monitoring.

Estos espectrómetros permitieron la consolidación de las dos principales estrategias de identificación de proteínas empleadas en la actualidad: “bottom-up” y “top-down”. La diferencia principal entre estos dos modos reside en determinar la proteína intacta (“top-down”) o los péptidos generados de la misma tras una digestión enzimática generalmente con tripsina (“bottom-up”).

La identificación de proteínas por espectrometría de masas está ampliamente consolidada hoy en día. Sin embargo, los métodos analíticos cuantitativos desarrollados hasta la fecha están lejos de lograr la cuantificación de todas las proteínas contenidas en una muestra real. Esto se debe no sólo a la dificultad que entraña la extracción y separación de las mismas, sino también al amplio rango de concentraciones en las que se encuentran (más de 10 órdenes de magnitud). En este sentido, la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (HPLC) acoplada a espectrometría de masas es una de las herramientas actuales más eficaces y prometedoras. Dentro de las estrategias con espectrometría de masas, el empleo de isótopos estables (^{13}C , ^{15}N , ^2H , entre otros) para cuantificar proteínas, de forma relativa o absoluta, mediante análisis por dilución isotópica ha

ganado mucho peso en los últimos años y existen estrategias de análisis comerciales, como AQUA o QconCAT, que son ampliamente utilizadas a día de hoy.

1.4 ANÁLISIS POR DILUCIÓN ISOTÓPICA Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El análisis por dilución isotópica y espectrometría de masas (IDMS) se basa en la modificación intencionada de la composición isotópica de un elemento o compuesto orgánico por la adición en la muestra que se pretende analizar de una forma enriquecida isotópicamente de dicho elemento o compuesto, que generalmente recibe el nombre de trazador isotópico.

La base conceptual de IDMS se puede explicar recurriendo a un sencillo problema según el cual se pretende cuantificar el número de bolas negras contenidas en una determinada caja. Un posible procedimiento consistiría en contarlas una a una, un proceso válido pero tedioso y que podría requerir mucho tiempo si el contenido de bolas negras fuese muy elevado. Sin embargo, existe una alternativa que aplica el concepto de dilución, ya empleada en otros campos, que consistiría en añadir un número conocido y exacto de bolas de color azul. Para la resolución de este problema, es necesario primeramente asumir que tanto las bolas azules como negras tienen la misma forma y tamaño, diferenciándose únicamente en el color. Si las bolas azules y negras se mezclan lo suficiente como para obtener una mezcla homogénea, la relación entre el número de bolas azules y negras en cualquier alícuota que se tome de la mezcla será la misma independiente del tamaño de la alícuota y de cualquier pérdida de bolas que haya podido ocurrir tras la mezcla. Por tanto, conocida la relación de bolas en la mezcla y el número de bolas azules introducidas, es posible conocer el número de bolas negras, tal y como se muestra en la Figura 4.

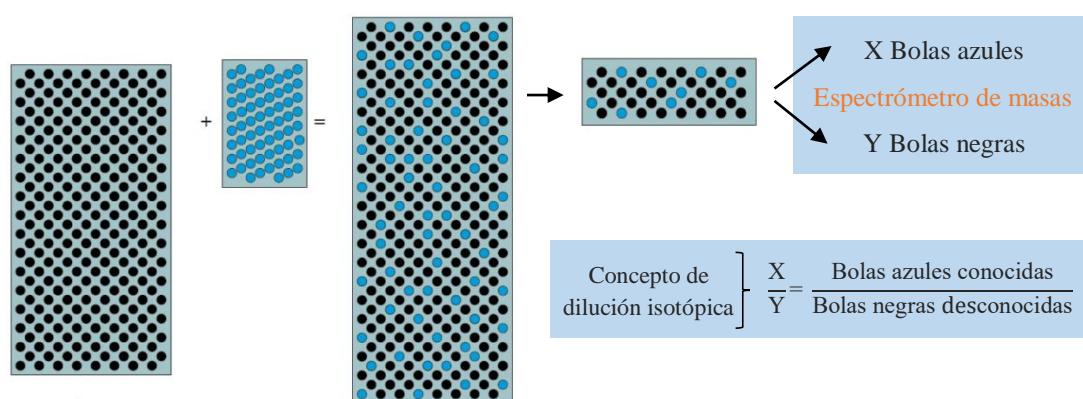


Figura 4: Representación esquemática del concepto de dilución isotópica (ID-MS)

Mediante este ejemplo se ilustra el potencial analítico de IDMS ya que permite la cuantificación exacta y precisa de elementos y compuestos orgánicos empleando para ello isótopos estables (^{13}C , ^{15}N , ^2H , entre otros) y midiendo relaciones isotópicas mediante espectrometría de masas.

1.4.1 IDMS EN ANÁLISIS ELEMENTAL Y MOLECULAR

IDMS en análisis elemental se basa en la modificación intencionada de la abundancia isotópica de un elemento por la adición en la mezcla de una cantidad conocida de un isótopo enriquecido

del propio elemento. Este procedimiento se esquematiza en la Figura 5, donde el isótopo a se corresponde con el elemento de abundancia natural, mientras que el isótopo b se corresponde con el trazador isotópico, con el resultado final de que la composición isotópica de la muestra se ve claramente alterada.

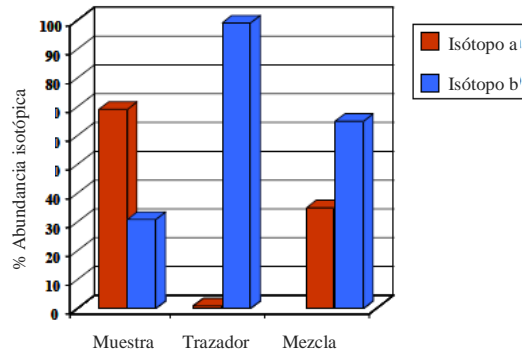


Figura 5: IDMS elemental en el que se pretende cuantificar el elemento de abundancia natural a con la adición en la muestra del isótopo enriquecido b

De esta manera, aplicando el concepto de IDMS ya comentado anteriormente, conocido el número de moles del trazador isotópico que ha sido introducido (N_t) y medida la correspondiente relación de abundancias isotópicas (R_m) es posible conocer el número de moles del elemento de abundancia natural (N_s), sin necesidad de realizar un calibrado metodológico previo. Para ello, si N_s se corresponde con el número de moles de analito en la muestra, el número total de moles del elemento en la mezcla (N_m) viene dado por la Ecuación (1):

$$N_m = N_s + N_t \quad (1)$$

Dado que se conocen las abundancias isotópicas de los isótopos a y b tanto en la muestra (A_S^a y A_S^b) como en el trazador (A_t^a y A_t^b), la Ecuación (1) se puede reescribir en forma de balance de masa para cada isótopo:

$$N_m A_m^a = N_s A_S^a + N_t A_t^a \quad (2)$$

$$N_m A_m^b = N_s A_S^b + N_t A_t^b \quad (3)$$

Si la Ecuación (2) se divide entre la Ecuación (3) se obtiene la relación de abundancias isotópicas entre los isótopos a y b en la mezcla (R_m), expresada de la siguiente manera:

$$R_m = \frac{N_s A_S^a + N_t A_t^a}{N_s A_S^b + N_t A_t^b} \quad (4)$$

Si la Ecuación (4) se reagrupa, se obtiene que el número de moles del elemento en la muestra (N_s) viene dado por:

$$N_s = N_t \frac{R_m A_t^b - A_t^a}{A_S^a - R_m A_S^b} \quad (5)$$

Como se puede observar en la Ecuación (5), el único parámetro que es necesario determinar experimentalmente por espectrometría de masas es R_m , cuyo valor se puede conocer con alta exactitud y precisión. Adicionalmente, no existe ningún parámetro que dependa de la sensibilidad instrumental del espectrómetro de masas, por lo que cualquier desviación en la señal no va a afectar a la relación isotópica medida.

La Ecuación (5) es aplicable al análisis elemental, donde la relación entre los dos isótopos de referencia es fácilmente medible por espectrometría de masas. Sin embargo, la aplicación directa de la Ecuación (5) para el análisis orgánico es más complicada. No se trabaja con masas isotópicas ya que, a excepción de las masas monoisotópicas, en una misma masa coexisten varios isotopólogos (Figura 6) [34].

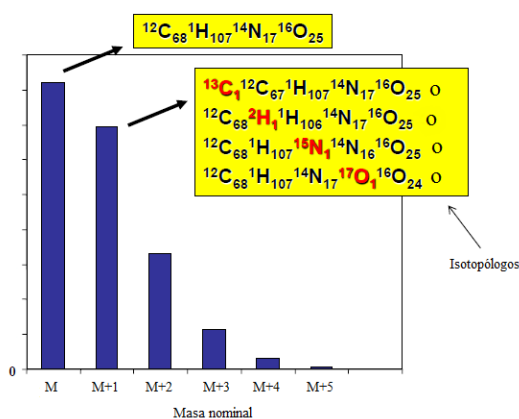


Figura 6: Distribución de abundancias isotópicas en una molécula orgánica con un número inferior de 90 átomos de carbono en su estructura

A mediados de los años 70, los espectrómetros de masas disponibles no proporcionaban medidas fiables de la composición isotópica de las moléculas. Por esta razón se desarrolló un procedimiento experimental haciendo uso de un calibrado metodológico que permita obtener la correlación entre la relación isotópica y la relación de moles de compuesto de abundancia natural y enriquecido. Para ello se divide la Ecuación (4) entre el número de moles de trazador (N_t):

$$R_m = \frac{\frac{N_s}{N_t} A_s^a + A_t^a}{\frac{N_s}{N_t} A_s^b + A_t^b} \quad (6)$$

Cuando el trazador isotópico está lo suficientemente enriquecido como para que no haya solapamiento de masas entre los análogos natural y marcado, la Ecuación (6) adquiere una forma lineal. Sin embargo, si el trazador está mínimamente enriquecido, dicha ecuación pierde la linealidad y toma una forma polinómica, complicando los cálculos matemáticos. En este punto hay que resaltar también que el trazador utilizado debe presentar las mismas propiedades fisicoquímicas que el analito a lo largo del proceso, es decir que no existan efectos isotópicos como, por ejemplo, un tiempo de retención diferente a lo largo de una separación cromatográfica. Uno de los requisitos del trazador isotópico, que actúa como patrón interno, es que tenga el mismo

tiempo de retención que el análogo natural, dado que es posible que, debido a las características propias de la fuente ESI, exista variación en la eficiencia de la ionización debido a efectos de supresión de la ionización con motivo de la coelución de otros componentes de la muestra. Los efectos isotópicos dependen de la diferencia de masa relativa entre los isótopos del elemento empleado para realizar el marcaje (^2H y ^1H o ^{13}C y ^{12}C) y del número de átomos marcados de la molécula. Por ejemplo, cuando se emplea deuterio para el marcaje y el trazador se ha marcado en varios átomos suelen presentarse efectos isotópicos que hacen que los tiempos de retención del trazador y el compuesto natural sean diferentes [21]. Por tanto, los efectos de supresión de la ionización pueden ser diferentes para ambos y, como consecuencia de ello, la medida de las abundancias isotópicas y la relación isotópica presentarían una desviación. Por este motivo, aunque el marcaje múltiple proporcione una ecuación lineal de calibración, pueden existir efectos isotópicos, mientras que cuando se utiliza un análogo mínimamente marcado se disminuye la posibilidad de tener efectos isotópicos pero la dependencia entre la relación de intensidades y la relación de moles obedece a un ajuste polinomial, lo cual complica el tratamiento de datos.

1.4.2 DECONVOLUCIÓN DE PERFILES ISOTÓPICOS (IPD) EN ANÁLISIS ORGÁNICO

Existe otro procedimiento de medida que emplea abundancias isotópicas en lugar de relaciones isotópicas y que permite que haya solapamiento espectral entre el analito y el análogo enriquecido isotópicamente. Esto es especialmente importante en el caso del análisis de moléculas orgánicas al permitir un marcaje simple del trazador y evitar posibles efectos isotópicos. Este procedimiento recibe el nombre general de IPD, siglas en inglés de *Isotope Pattern Deconvolution*. Se trata de una herramienta matemática que permite determinar la contribución individual de un determinado perfil isotópico en un perfil isotópico experimental de una mezcla de varios componentes. Mediante esta metodología se asume que el perfil isotópico observado de una mezcla es una combinación lineal de distintos perfiles isotópicos que contribuyen al perfil isotópico de la misma. Por tanto, llevando a cabo una regresión lineal múltiple se pueden obtener las fracciones molares de cada uno de los perfiles isotópicos en la mezcla.

Para la implementación de este procedimiento en el análisis de moléculas orgánicas mediante IDMS es necesario conocer de antemano la composición isotópica del compuesto natural y del trazador isotópico.

Si la medida de la composición isotópica de moléculas se realiza mediante espectrometría de masas en tándem es importante tener en cuenta los efectos derivados de la fragmentación. La composición isotópica real del fragmento molecular de n isotopólogos no se puede determinar únicamente con n transiciones (m/z de uno o varios iones producto), debido a que varios isotopólogos de la molécula precursora pueden contribuir al mismo isotopólogo de un ion producto. De esta manera, la forma de determinar la distribución isotópica sería empleando n^2

transiciones, un número elevado de transiciones que conllevarían una pérdida de sensibilidad y un elevado tiempo de medida.

1.5 CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE EL USO DE ISOTOPOS ESTABLES ENRIQUECIDOS

Hoy en día, el uso de isótopos estables enriquecidos y la espectrometría de masas para la cuantificación de proteínas está ampliamente extendido [35]. Actualmente, existen métodos con la capacidad de estudiar la dinámica de los proteomas y poder realizar determinaciones relativas de las abundancias de proteínas entre muestras (cuantificación relativa), así como metodologías capaces de determinar la concentración de ciertas proteínas con una gran exactitud y precisión en una muestra real (cuantificación absoluta).

1.5.1 Cuantificación relativa de proteínas

La cuantificación relativa de proteínas tiene como objetivo la caracterización cualitativa y cuantitativa de los cambios en la composición de un proteoma en función del genotipo, estado celular, proceso patológico o metabolismo de fármacos [36]. Existen diferentes estrategias de cuantificación relativa, que se diferencian entre ellas en función del tipo de marcaje empleado, el cual puede ser metabólico, proteolítico o químico.

1.5.1.1 Marcaje metabólico

El marcaje metabólico constituye la etapa más temprana en la que es posible introducir una marca isotópica: durante el crecimiento y división celular [37]. Uno de los dos cultivos celulares que se quiere estudiar se hace crecer en un medio que contiene una abundancia natural de nitrógeno en forma de ion amonio (NH_4^+), mientras que el segundo de ellos se hace crecer en un medio idéntico al anterior, pero en este caso el ion amonio que se emplea está enriquecido en ^{15}N . Tras un tiempo adecuado de crecimiento, los dos cultivos se mezclan y las proteínas sintetizadas son extraídas, separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), digeridas por una proteasa y los péptidos resultantes son analizados por espectrometría de masas en tándem. Las diferencias entre ambos cultivos celulares se miden a partir de la relación entre los péptidos de abundancia isotópica natural y los péptidos enriquecidos en ^{15}N .

Este tipo de marcaje presenta ciertas desventajas derivadas, por ejemplo, del incompleto enriquecimiento en ^{15}N y del coste del marcaje isotópico. Otra desventaja importante es que esta estrategia es muy difícil de implementar en sistemas mamíferos, por lo que está limitado a microorganismos.

Para solventar estas limitaciones, se desarrolló la estrategia SILAC (*Stable Isotope Labelling by Amino acids in Cell culture*), basada en la adición de aminoácidos esenciales marcados en cultivos celulares deficientes en aminoácidos con el objetivo de introducirlos en todas las proteínas cuando son sintetizadas. A diferencia del marcaje metabólico completo con ^{15}N , el número de marcas

incorporadas en SILAC está definido, por lo que se simplifican los cálculos matemáticos. En este método, es necesario asegurar un enriquecimiento del 100% en el cultivo precursor de los aminoácidos marcados para obtener un completo marcaje de las proteínas. Este método funciona adecuadamente para células mamíferas que no sintetizan estos aminoácidos esenciales. La principal ventaja del marcaje metabólico es que la marca se introduce al nivel de células intactas, por lo que todas las fuentes de error derivadas de la preparación de muestra son corregidas, proporcionando el mayor nivel de precisión y exactitud de entre todos los métodos de cuantificación relativa.

1.5.1.2 *Marcaje proteolítico*

El marcaje proteolítico se basa en llevar a cabo la digestión enzimática de la proteína en un medio con agua enriquecida isotópicamente ($H_2^{18}O$). De este modo, la marca isotópica se introduce mediante la adición de dos átomos del isótopo ^{18}O en el extremo carboxilo terminal de cada uno de los péptidos liberados durante la digestión [38]. Si una de las muestras es digerida enzimáticamente en un medio que contiene agua de abundancia natural y la otra lo hace en un medio con agua enriquecida isotópicamente, es posible llevar a cabo un estudio diferencial entre las dos muestras, dado que existirá una diferencia de cuatro unidades de masa entre los péptidos de abundancia natural y los enriquecidos isotópicamente. Sin embargo, este mínimo marcaje (2 átomos de ^{18}O) puede dar lugar a solapamiento espectral entre los análogos naturales y marcados, sobre todo en el caso de péptido de elevada masa molecular. Otra de las desventajas es que, a diferencia del marcaje metabólico, la marca enzimática es introducida durante la proteólisis, por lo que tras la mezcla de ambas muestras solamente se corregirán errores derivados de etapas posteriores del análisis. Además, existen reacciones de intercambio isotópico entre los átomos de ^{16}O y ^{18}O durante la digestión enzimática, lo que puede llevar a una medida errónea de la relación de intensidades entre los picos mayoritarios de los péptidos de abundancia natural y los enriquecidos.

1.5.1.3 *Marcaje químico*

El marcaje químico es la estrategia de marcaje más empleada en la cuantificación relativa de proteínas. Dependiendo de la marca empleada, se han desarrollado diferentes métodos, siendo ICAT e iTRAQ los dos métodos más utilizados.

En la estrategia ICAT (*Isotope-Code Affinity Tag*) [39] la marca isotópica es añadida antes de la digestión enzimática y emplea una cisteína unida a un grupo reactivo, que contiene ocho átomos de deuterio (D_8), y un grupo de afinidad (biotina) para la purificación de los péptidos derivatizados por la unión de la cisteína. Dos muestras que presentan dos estados celulares diferentes son tratadas con los dos reactivos ICAT para, posteriormente ser mezcladas y digeridas, de tal manera que los péptidos derivatizados que resultan de dicha digestión son aislados por cromatografía de afinidad gracias a la molécula de biotina enlazada que presentan. Una ventaja de este método es

que la cisteína es un aminoácido poco frecuente en las proteínas, por lo que se reduce la complejidad de la mezcla de péptidos. Sin embargo, esto es también una desventaja, dado que el método no es adecuado para la cuantificación de proteínas que no contengan cisteína.

Otra importante desventaja de este método es la presencia de efectos isotópicos como consecuencia del marcaje con átomos de deuterio, lo que da lugar a picos cromatográficos con diferentes formas por HPLC. Además, la ligera hidrofobicidad de la biotina hace que todos los péptidos eluyan en un período de tiempo relativamente corto lo que da lugar un complejo espectro de masas MS/MS.

Para solventar los problemas derivados de los efectos isotópicos como consecuencia del marcaje con átomos de deuterio, se desarrolló una nueva versión de la estrategia ICAT denominada cICAT [40] que remplazaba la marca de ocho deuterios por un compuesto con nueve ^{13}C , de manera que se eliminaban los efectos isotópicos y permitía la eliminación de la molécula de biotina tras la purificación por afinidad, logrando que los péptidos de interés eluyeran en una ventana de tiempo más amplia en separaciones cromatográficas por fase reversa.

Actualmente, la estrategia más ampliamente utilizada es la denominada como iTRAQ (*isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*) [41] que se basa en que los análogos naturales y marcados tengan la misma masa total, de manera que, cuando se emplea espectrometría de masas en tándem, solo es necesario seleccionar una determinada relación m/z en el primer analizador. Los fragmentos isobáricos facilitan la identificación, mientras que la concentración de los péptidos se obtiene por la intensidad relativa de los iones indicadores obtenidos por espectrometría de masas en tándem.

1.5.2 CUANTIFICACIÓN ABSOLUTA DE PROTEÍNAS

A diferencia de la cuantificación relativa de proteínas descrita en el subpartado anterior, la cuantificación absoluta de proteínas tiene como objetivo determinar la concentración real de proteínas o péptidos en una muestra. Esto es especialmente relevante en la búsqueda y la determinación de proteínas biomarcadoras de enfermedades.

Se pueden distinguir principalmente 3 estrategias generales para la cuantificación absoluta de proteínas por IDMS, diferenciándose entre ellas por el tipo de trazador isotópico empleado: aminoácidos, proteínas o péptidos. Estas estrategias se muestran de forma esquemática en la siguiente Figura 7.

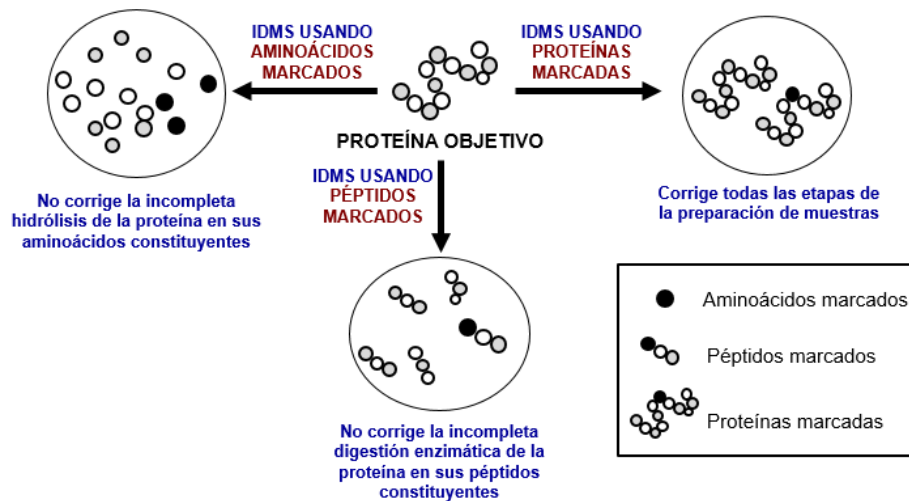


Figura 7: Estrategias para la cuantificación absoluta de proteínas por IDMS

La primera de las estrategias consiste en emplear aminoácidos marcados isotópicamente [42] y requiere que la hidrólisis de la proteína en sus aminoácidos constituyentes sea completa, dado que si no se cometería un error por defecto en la cuantificación. Algo similar ocurre cuando lo que se emplean para la cuantificación son péptidos marcados isotópicamente [43], requiriéndose que la digestión enzimática de la proteína objetivo sea cuantitativa. La última de las tres grandes estrategias de cuantificación absoluta de proteínas consiste precisamente en el uso de proteínas enriquecidas isotópicamente [44], y es sólo en este caso cuando todo el proceso de preparación de muestra es corregido, dado que la marca isotópica ya está presente desde el inicio del tratamiento experimental.

1.5.2.1 Cuantificación con aminoácidos marcados isotópicamente

El principal requisito de esta estrategia absoluta de cuantificación es que la etapa de hidrólisis de la proteína en sus aminoácidos constituyentes sea completa, al fin de evitar errores en la determinación. Esta hidrólisis suele ser de tipo ácido, aunque también se han desarrollado procedimientos que hacen uso de una hidrólisis en medio básico o de tipo enzimático.

La principal ventaja de este procedimiento por medio de aminoácidos enriquecidos isotópicamente es que estos últimos se encuentran en el mercado con certificados de análisis o de pureza, que permite que los resultados de la cuantificación sean directamente trazables al Sistema Internacional de Unidades (SI). Sin embargo, la principal desventaja de esta estrategia reside en el hecho de que todas las proteínas contienen los mismos aminoácidos, por lo que este procedimiento queda restringido a aquellos casos en los que las muestras contienen exclusivamente la proteína objetivo, o bien al análisis de patrones de proteínas.

1.5.2.2 Cuantificación con proteínas marcadas isotópicamente

El segundo procedimiento de cuantificación absoluta de proteínas se basa precisamente en el uso de proteínas enriquecidas isotópicamente como trazador isotópico, recibiendo la denominación general de PSAQ (*Protein Standard Absolute Quantification*) [45]. La principal ventaja de este procedimiento, a diferencia de aquellos que emplean aminoácidos o péptidos enriquecidos isotópicamente, es que en este caso las proteínas marcadas se mezclan con las proteínas de la muestra al comienzo del proceso de preparación de muestra, por lo que todos los errores cometidos durante el análisis son corregidos. Otra de las grandes ventajas, principalmente frente al empleo de péptidos marcados isotópicamente, es que el procedimiento PSAQ permite cuantificar la proteína utilizando todos sus péptidos proteotípicos (exclusivos) ya que están disponibles para su análisis tras la digestión enzimática (generalmente, trípica). Esto permite evitar posibles problemas derivados de interferencias espectrales o supresión de la ionización en la fuente ESI. Además, dado que los análogos naturales y marcados presentan el mismo comportamiento químico, esta estrategia de cuantificación es adecuada para casi cualquier tipo de método de fraccionamiento de muestra como electroforesis SDS-PAGE, captura hidrofóbica o inmunocaptura.

Una de las principales desventajas de este procedimiento de cuantificación es sin duda la dificultad de la caracterización en concentración de las proteínas, que tiene que ser llevado a cabo por análisis de sus aminoácidos constituyentes para que su pureza sea trazable al SI. La estrategia utilizada para dicha caracterización consiste primeramente en la certificación en concentración de los patrones de proteínas de abundancia natural a partir de sus aminoácidos liberados en su hidrólisis. Conocida la concentración de las proteínas de abundancia natural, los patrones de proteínas marcadas son caracterizados por IDMS inversa utilizando el mismo procedimiento. De esta manera, la concentración de la proteína en la muestra real puede ser cuantificada con trazabilidad al SI una vez conocida la concentración de las proteínas enriquecidas isotópicamente. Sin embargo, la mayor limitación de esta estrategia es el coste y dificultad de la síntesis y purificación de proteínas isotópicamente enriquecidas, que es mucho más complicado que en los procedimientos que hacen uso de patrones de aminoácidos o péptidos enriquecidos isotópicamente. Además, la estabilidad de los patrones de proteínas tanto naturales como marcadas isotópicamente es muy limitada.

1.5.2.3 Cuantificación con péptidos marcados isotópicamente

La tercera de las tres estrategias de cuantificación absoluta de proteínas se basa en la cuantificación de péptidos proteotípicos de las proteínas mediante el empleo de péptidos enriquecidos isotópicamente. Estos péptidos proteotípicos son liberados tras la hidrólisis enzimática (generalmente, trípica) de la proteína objetivo. Precisamente, uno de los principales requisitos asociados a este procedimiento de análisis es la necesidad de que dicha digestión

enzimática sea cuantitativa, es decir, que los péptidos proteotípicos de la proteína objeto de determinación sean liberados de forma completa para obtener una cuantificación exacta. Los péptidos enriquecidos isotópicamente empleados para la cuantificación son añadidos antes o después de la etapa de digestión. Si los péptidos marcados se añaden antes de la digestión, los péptidos enriquecidos isotópicamente deben ser estables y no sufrir modificaciones durante todo el proceso de hidrólisis enzimática.

Esta estrategia presenta principalmente dos limitaciones: la necesidad de que la digestión trípica sea cuantitativa y la necesidad de conocer de antemano la concentración y enriquecimiento isotópico de los péptidos. Al igual que sucede con la estrategia PSAQ, uno de los principales inconvenientes a la hora de trabajar con este tipo de estrategias es la dificultad que entraña el establecimiento de la pureza de los patrones de péptidos. Al igual que ocurre en la estrategia PSAQ, los patrones de péptidos de abundancia natural deben ser certificados en concentración a partir de la concentración de los aminoácidos liberados en su hidrólisis mediante un análisis de aminoácidos. Caracterizados los péptidos de abundancia natural, los patrones de péptidos marcados isotópicamente son caracterizados en enriquecimiento isotópico y en concentración por IDMS inversa. Una vez conocida la concentración del trazador isotópico, la concentración de la proteína puede ser determinada por IDMS normal a partir de la concentración de los péptidos trípicos marcados isotópicamente.

Actualmente, existen dos estrategias de análisis que son ampliamente utilizadas para la cuantificación absoluta de proteínas por medio de la utilización de péptidos enriquecidos isotópicamente: AQUA y QconCAT. El primero de estos procedimientos (AQUA: *Absolute QUAntification*) [46] hace uso de péptidos marcados isotópicamente sintetizados químicamente (Figura 8). Para la determinación de la concentración, AQUA mide la relación de intensidades entre los picos de los análogos naturales y marcados. Esta relación se iguala a la relación de moles de péptidos de abundancia natural y péptidos enriquecidos isotópicamente para determinar la concentración de la proteína objetivo. Sin embargo, este procedimiento puede producir errores ya que la relación de señales no tiene por qué ser igual a la relación de moles si no se conoce el enriquecimiento isotópico de los péptidos marcados ni la abundancia isotópica relativa de los diferentes isotopólogos involucrados. Por este motivo, una estrategia habitual es realizar un calibrado metodológico (preferentemente en presencia de matriz) con el cual obtener la correlación entre el ratio de intensidades y la relación de moles de los péptidos de abundancia natural y enriquecidos. Para evitar el solapamiento espectral entre el péptido de abundancia natural y el marcado isotópicamente, los péptidos enriquecidos utilizados suelen presentar marca múltiple, lo que puede dar lugar a la ocurrencia de efectos isotópicos.

Por otro lado, la estrategia QconCAT [47] es más completa que AQUA en cuanto a la posibilidad que ofrece de cuantificar múltiples proteínas en un solo experimento. Este procedimiento hace uso del diseño de genes *de novo* para la síntesis de proteínas sintéticas que incluyen una

concatenación de péptidos proteotípicos, permitiendo que tras la correspondiente digestión trípica, se obtengan múltiples péptido proteotípicos enriquecidos isotópicamente de una o varias proteínas, proporcionando una cuantificación más robusta. Los péptidos concatenados obtenidos de las proteínas sintéticas son añadidos a la muestra previamente a la etapa de digestión enzimática, por lo que son liberados durante la misma y mezclados por tanto con sus análogos de abundancia natural, midiéndose la mezcla resultante por espectrometría de masa en tándem. Las limitaciones de este procedimiento son principalmente derivadas de la trazabilidad al SI de la concentración de los patrones QconCAT, requiriéndose una caracterización de los mismos por análisis IDMS por medio de sus aminoácidos constituyentes.

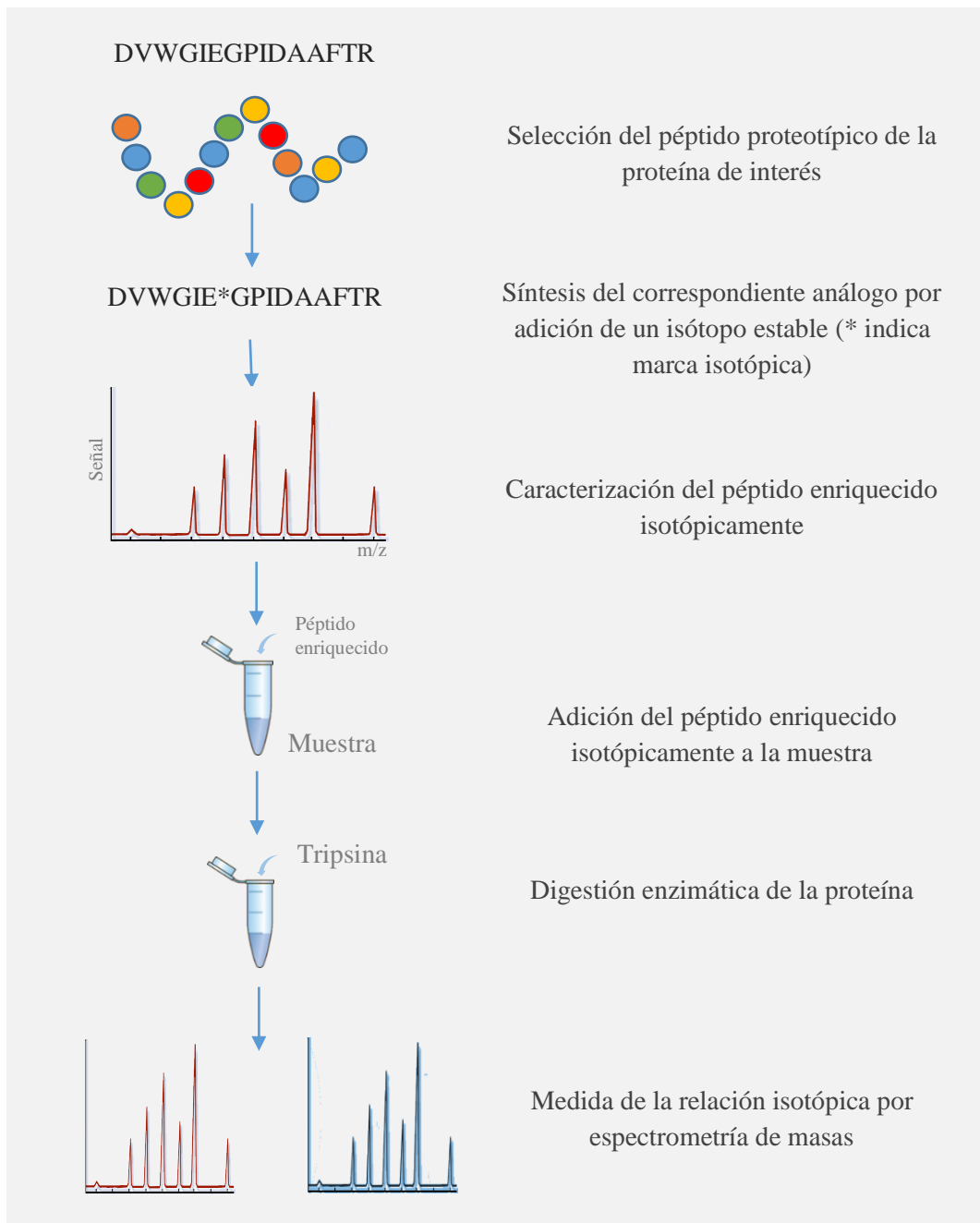


Figura 8: Representación esquemática de la metodología para la cuantificación absoluta de proteínas mediante el empleo de la estrategia AQUA

Recientemente, en el año 2015 se ha desarrollado en nuestro laboratorio un método IDMS en el que se miden abundancias isotópicas de los péptidos de abundancia natural y péptidos mínimamente marcados. Esta estrategia hace uso del solapamiento espectral entre el analito y los análogos enriquecidos denominados MOPs (Mass Overlapping Peptides) [48]. A diferencia de los métodos AQUA y QconCAT en la que se miden relación de intensidades, esta estrategia permite el cálculo de las fracciones molares del péptido natural y el enriquecido a partir de la medida de la composición isotópica de la muestra. De este modo, la relación de fracciones molares se iguala a la relación de moles sin cometer ningún error derivado del enriquecimiento isotópico de los péptidos ni de la abundancia relativa de los isotopólogos involucrados en la medida. Esta estrategia de análisis IDMS utilizando MOPs reúne una serie de ventajas respecto a los dos métodos comentado hasta el momento. Tanto AQUA como QconCAT necesitan que no exista solapamiento espectral entre los análogos de abundancia natural y los enriquecidos isotópicamente, por lo que se recurre al marcaje múltiple de estos últimos, generalmente con ^{13}C o ^{15}N . El empleo de péptidos enriquecidos isotópicamente con múltiples marcas puede conducir a la aparición de efectos isotópicos que provoquen una medida errónea de la relación de intensidades. Además, respecto a esta relación de intensidades y como se comentó para la estrategia AQUA, caben señalar los significativos errores que se pueden cometer si se emplean relaciones isotópicas a partir de intensidades.

La ventaja fundamental de la estrategia basada en MOPs es que al trabajar con fracciones molares en lugar de intensidades de isotopólogos, las determinaciones obtenidas poseen una mayor exactitud y precisión. Además, el hecho de no necesitar un calibrado metodológico para evaluar la dependencia entre relación de intensidades y relación de moles disminuye considerablemente el tiempo de análisis, convirtiéndola en una estrategia más atractiva para laboratorios de rutina. Otra ventaja de la estrategia de cuantificación absoluta de proteínas empleando MOPs es el hecho de que utilizando péptidos marcados mínimamente se reduce la probabilidad de que existan efectos isotópicos que puedan conducir a medidas erróneas. Además, mediante la reducción de la resolución del primer analizador de masas en un espectrómetro de masas en tándem se puede permitir el paso de todo el cluster molecular de iones precursores tanto del péptido natural como el enriquecido isotópicamente, lo que permite mejorar la sensibilidad y, por tanto, obtener mejores límites de detección.

2. OBJETIVOS

Desde el Instituto Oftalmológico Fernández-Vega, IOFV, se ha iniciado un estudio de la genómica del GPPA y GPEX con el objetivo de desarrollar una metodología para la detección precoz de la enfermedad con la finalidad de proporcionar tratamientos que permitan mejorar la calidad de vida de los potenciales pacientes.

Entre el IOFV y el Grupo de Investigación de Isótopos Estables Enriquecidos (GIEE) de la Universidad de Oviedo se ha establecido un acuerdo de colaboración a partir del cual se han fijado una serie de líneas de investigación. El Trabajo Fin de Máster (TFM) que en esta Memoria se expone tiene como objetivo general continuar con el desarrollo de una metodología analítica para la determinación de proteínas biomarcadoras del glaucoma, ya seleccionadas por el IOFV, por análisis por dilución isotópica (IDMS) utilizando MOPs y cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (MS-MS). A partir de las potenciales proteínas biomarcadoras seleccionadas por el IOFV, previamente al inicio del presente TFM, el GIEE ha desarrollado los estudios encaminados a la selección de dos péptidos proteotípicos por proteína. Por tanto, para la consecución de este objetivo general, se han establecido dentro del presente TFM los siguientes objetivos parciales:

- Optimización de la fuente ESI del espectrómetro de masas acoplado al equipo UHPLC con el fin de lograr la máxima sensibilidad para los seis péptidos objetos de determinación.
- Determinación de la pureza espectral para los seis péptidos debido a la falta de resolución de los espectrómetros cuadrupolo.
- Caracterización en enriquecimiento isotópico de los seis péptidos marcados para la correcta asignación de abundancias.
- Evaluación de la hidrólisis enzimática de las tres proteínas en función del tiempo para determinar en qué punto de la misma se logra la completa liberación de los péptidos.
- Evaluación de la recuperación cuantitativa individual de los seis péptidos en disolución acuosa.

3. EXPERIMENTAL

3.1 REACTIVOS

Urea (>99.5%), acetato de amonio (>99%), 2,3-dihidroxi-butano-1,4-ditiol (>99%, DTT), iodoacetamida (98%, IAA), tripsina porcina (20 µg/ampolla, grado proteómico), ácido trifluoroacético (>99%, TFA), ácido fórmico (>98%, FA) y amoníaco (>99%, NH₃) se adquirieron a Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, EEUU). El Acetonitrilo empleado fue de calidad HPLC y se adquirió a Fisher Scientific (Madrid, España). El Agua ultra-pura empleada se obtuvo de un sistema Milli-Q (Millipore Company, Bedford, EEUU). La Proteína C3 (Complemento 3 humano) (≥95%) se adquirió a Merck Millipore (Darmstadt, Alemania). La Vitronectina (≥ 95%, Vitro) y Apolipoproteína A-IV de plasma humano (≥ 85%, Apo) se adquirieron a Sigma-Aldrich. Los péptidos de abundancia natural (Vitro 1: AVRPGYPK; Vitro 2: DVWGIEGPIDAAFTR; C3 1: VVLVAVDK; C3 2: IWDVVEK; Apo 1: LLPHANEVSQK; Apo 2: LAPLAEDVR) y los péptidos marcados isotópicamente (¹³C₂-Vitro 1: AVRP*GYPK; ¹³C₂-Vitro 2: DVWGIE*GPIDAAFTR; ¹³C₁-C3 1: VVL*VAVDK; ¹³C₁-C3 2: IWD*VVEK; ¹³C₁-Apo 1: LAPLAED*VR; ¹³C₁-Apo 2: LAPLAED*VR) fueron sintetizados previamente en el laboratorio del GIEE.

3.2 INSTRUMENTACIÓN

Una balanza analítica modelo MS205DU (Mettler Toledo, Zürich, Suiza) se empleó en la preparación gravimétrica de todas las disoluciones. Un termoagitador Termomixer Compact 5350 (Eppendorf, Hamburgo, Alemania) se empleó en la termostización y agitación durante las etapas de desnaturalización y digestión enzimática de las proteínas. Un evaporador miVac DNA-23050-B00 (Genevac LTD, Reino Unido) se empleó en la evaporación de las muestras durante las etapas de desnaturalización y digestión enzimática de las proteínas. El liofilizador Heto powerDry LL3000 (Thermo Scientific, Bremen, Alemania) se utilizó para eliminar la humedad de los patrones sólidos de los péptidos empleados en la etapa de determinación de la concentración de los péptidos de abundancia natural. Todas las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en un cromatógrafo de líquidos de Agilent Technologies (Santa Clara, California, EEUU) modelo 1290 Infinity, acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) de Agilent Technologies modelo 6460 con fuente de ionización electrospray ESI-*Jet Stream*.

3.2.1 CROMATÓGRAFO DE LÍQUIDOS DE ULTRA-ALTA RESOLUCIÓN AGILENT TECHNOLOGIES 1290 INFINITY

Todas las operaciones experimentales en las que se realiza una separación cromatográfica líquida o bien un análisis por inyección en flujo (FIA) fueron llevadas a cabo con el cromatógrafo de líquidos de ultra-alta resolución modelo 1290 Infinity de Agilent Technologies. Este equipo ofrece la posibilidad de emplear cuatro fases móviles diferentes; consta de bombas de empuje binarias con la posibilidad de emplear velocidades de flujo de 0,05 ml/min a 5 ml/min; trabaja con un rango de presiones de hasta 1200 bar (>17400 psi), permitiendo la aplicación de cromatografía de líquidos de ultra-alta resolución (UHPLC); dispone de desgasificador y válvula de purga automática; y consta de autoinyector automático con volumen de retardo y arrastre de contaminante reducidos.

3.2.2 ESPECTRÓMETRO DE MASAS TRIPLE CUADRUPOLO (QqQ) AGILENT TECHNOLOGIES 6460

El cromatógrafo de líquidos descrito en el subapartado anterior se acopla al espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (QqQ) modelo 6460 de Agilent Technologies. Este espectrómetro consta de fuente de ionización ESI-*Jet Stream*. En la Figura 9 se muestra una representación esquemática de la fuente de ionización ESI *Jet Stream* de Agilent Technologies. Esta fuente, a diferencia de las fuentes de ionización ESI tradicionales, consta de un sistema auxiliar (*sheath gas*) de ionización y focalización del flujo de iones generado. Este gas circula de manera cilíndrica entorno al extremo de salida del capilar de nebulización, generando una zona de confinamiento por gradiente térmico que permite aumentar la densidad de gotas, incrementando por tanto la eficiencia de la ionización. Además, este gas tiene también una función focalizadora del flujo de iones, que, junto a la disposición ortogonal de la entrada al analizador de masas, permite aumentar el número de iones que alcanzan el analizador, incrementándose la sensibilidad y reduciéndose el ruido derivado de la entrada de moléculas neutras.

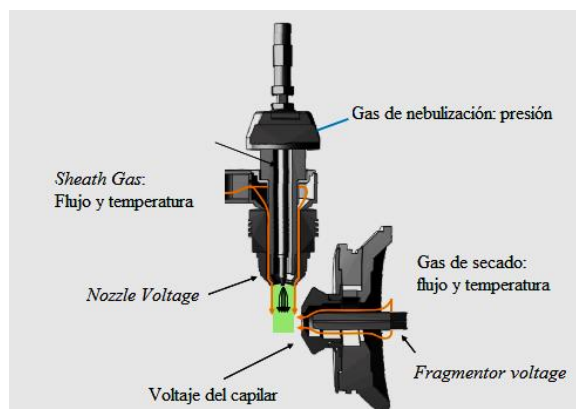


Figura 9: Representación esquemática de la fuente de ionización ESI *Jet Stream* de Agilent Technologies, en la que se muestran los diferentes parámetros y variables que intervienen en las diferentes etapas de la ionización [49]

3.3 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.3.1 ANÁLISIS POR UHPLC

3.3.1.1 Gradiente empleado para el análisis de la disolución mezcla de péptidos

La separación de mezclas de péptidos se llevó a cabo por UHPLC con una columna Peptide XB-C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm, Aeris, Phenomenex). Las fases móviles empleadas fueron Agua Milli-Q con ácido fórmico al 0,1% (v/v) (Fase móvil A, FMA) y acetonitrilo con ácido fórmico al 0,1% (v/v) (Fase móvil B, FMB). El gradiente empleado se configuró de tal manera que se mantiene a 2% de FMB durante 3 minutos, de 2 a 12% de FMB hasta 7 minutos, de 12 a 13 % FMB hasta 9 minutos, de 13 a 50% de FMB hasta 13 minutos, de 50 a 80 % FMB hasta 17 minutos y se vuelve a las condiciones de 2% FMB hasta los 18 minutos. El flujo empleado fue de 0,3 mL/min.

3.3.1.2 Gradiente empleado en el análisis individual de los péptidos

El análisis cromatográfico de péptidos individuales tanto de abundancia isotópica natural como enriquecidos isotópicamente se llevó a cabo por UHPLC con una columna Peptide XB-C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm, Aeris, Phenomenex). Las fases móviles empleadas son las mismas que en el apartado anterior. El gradiente empleado se configura de tal manera que se mantiene a 2% de FBA durante 1 minuto y se aumenta hasta 80% de FMB a lo largo de 10 minutos volviéndose a las condiciones iniciales a los 14 minutos. El flujo empleado fue de 0,3 mL/min.

3.3.2 ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

El análisis por inyección en flujo (FIA) se empleó en el análisis de péptidos. El análisis se llevó a cabo con un flujo de 0,3 mL/min con una composición de fase móvil similar a la que eluyen de la columna cromatográfica utilizando el gradiente descrito en el apartado anterior (Tabla 1).

Tabla 1: Porcentaje de FMB al que eluyen los seis péptidos según el gradiente empleado para la separación cromatográfica descrito en la sección 3.3.1.1

Péptido	Vitro1	Apo1	C31	Apo2	C32	Vitro2
% FMB	10 %	12 %	19%	23%	31%	44%

3.3.3 ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

En la Tabla 2 se muestran, por orden de elución, la secuencia de aminoácidos, la masa monoisotópica de los iones precursores y producto y la energía de colisión empleada en las transiciones SRM de cada uno de los péptidos en estudio.

Tabla 2: Secuencia de aminoácidos, masa monoisotópica de iones precursores y producto y la energía de colisión empleada en las transiciones SRM de cada uno de los péptidos estudiados a lo largo del presente Trabajo Fin de Máster.

Péptido	m/z M ²⁺	Energía de colisión (eV)	Fragmentos (M ⁺)
Vitro 1	444,3 u	18	AVRPGY-CO (m/z: 616,4 u) AVRPGY (m/z: 644,5 u)
Apo 1	618,6 u	15	ANEVSQK (m/z: 775,4 u) PHANEVSQK (m/z: 1009,5 u)
C3 1	422,0 u	8	VAVDK (m/z: 531,3 u) LVAVDK (m/z: 644,4 u)
Apo 2	492,5 u	15	AEDVR (m/z: 589,2 u) PLAEDVR (m/z: 799,5 u)
C3 2	445,0 u	12	DVVEK (m/z: 589,3 u) WDVVEK (m/z: 775,4 u)
Vitro 2	824,0 u	25	GPIDAAFTR (m/z: 947,5 u) EGPIDAAFTR (m/z: 1076,5 u)

3.3.3.1 Método de adquisición SIM (Selected Ion Monitoring)

Como se observa en Figura 10, en el modo de adquisición SIM, monitorización selectiva de iones, el primer cuadrupolo (Q1) actúa únicamente como guía de iones, la celda de colisión (Q2) no se presuriza con N₂ para evitar la fragmentación y el segundo analizador (Q3) se configura de tal manera que sólo mide una o varias relaciones m/z individualmente.

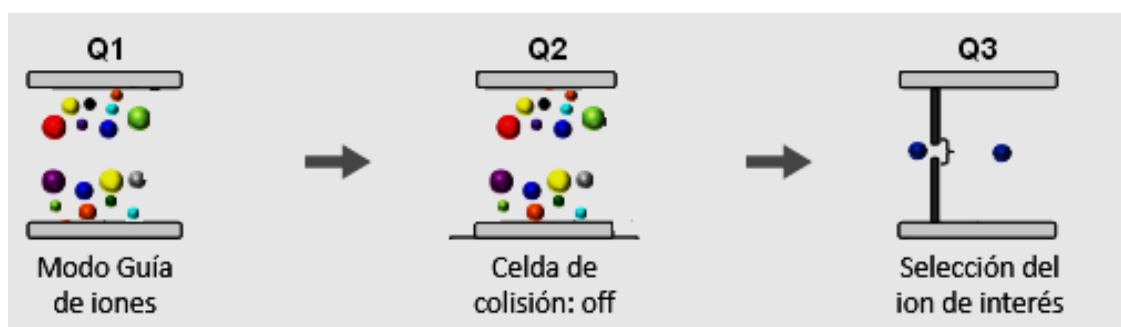


Figura 10: Representación esquemática del método de adquisición SIM a resolución estándar

3.3.3.2 Método de adquisición de barrido de iones precursores (Precursor Ion Scan)

En el barrido de iones precursores, el primer analizador se configura de tal manera que barre en un rango de masas determinado. Los iones precursores se fragmentan en la celda de colisión y el segundo analizador solamente mide una o varias relaciones m/z fijadas al comienzo de la adquisición. El espectro de masas obtenido corresponderá a todos los iones precursores que han fragmentado en la celda dando lugar a los iones producto seleccionados (Figura 11).

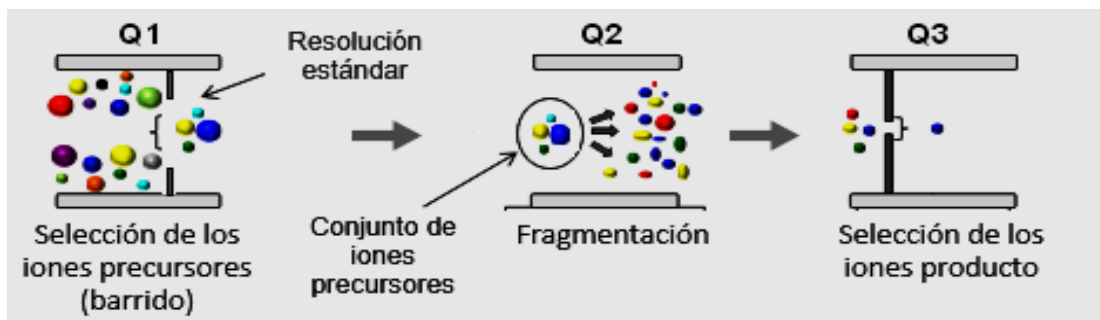


Figura 11: Representación esquemática del método de adquisición barrido de iones precursoros.

3.3.3.3 Método de adquisición SRM (Selected Reaction Monitoring)

En el modo SRM, el primer analizador se configura de tal manera que sólo deja pasar a la celda de colisión aquellos iones con una determinada relación m/z . Los iones seleccionados son fragmentados en la celda de colisión, para cada péptido, y los iones producto generados son analizados en el segundo analizador, configurado éste de tal manera que sólo se mida una o varias relaciones m/z individualmente (Figura 12).

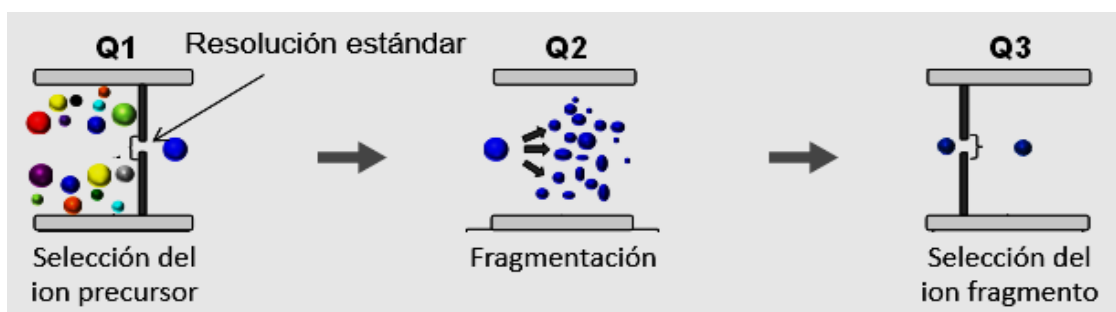


Figura 12: Representación esquemática del método de adquisición SRM

3.3.3.4 Método de adquisición SRM a baja resolución

Como se observa en la Figura 13, se reduce la resolución del primer analizador de tal manera que se transmitan simultáneamente todos los isotopólogos que constituyen el cluster molecular precursor. Todos los iones que constituyen el cluster son fragmentados en la celda de colisión, con la energía de colisión optimizada para cada péptido, y los iones producto generados son analizados en el segundo analizador, configurado de tal manera que mida varias relaciones m/z a resolución estándar.

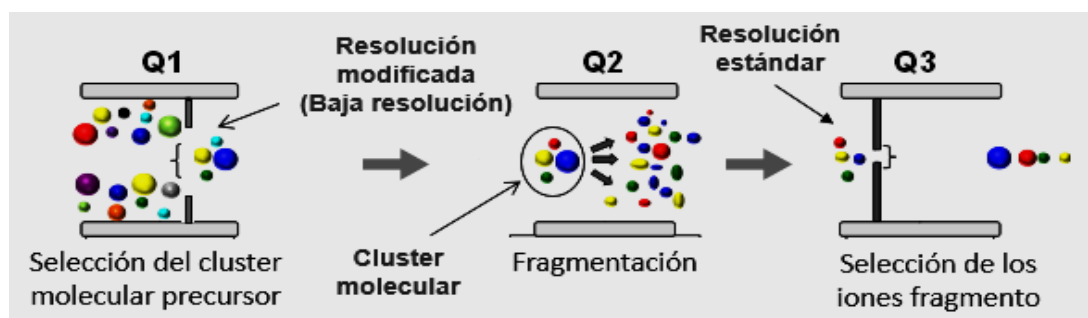


Figura 13: Representación esquemática del método de adquisición SRM a baja resolución

3.3.4 MEDIDA DE LAS ABUNDANCIAS ISOTÓPICAS DE LOS PÉPTIDOS

Todas las distribuciones isotópicas experimentales, A_{exp}^i , son calculadas como el cociente del área de pico medido para cada masa de interés entre la suma total de áreas de todos los picos medidos.

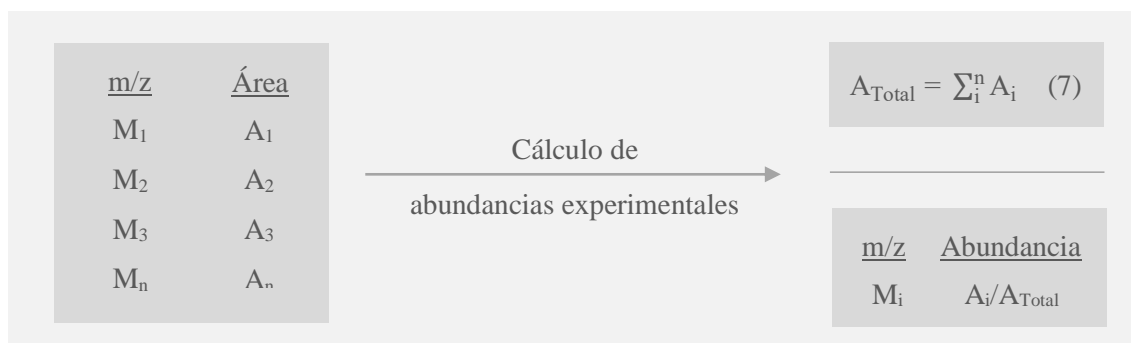


Figura 14: Representación esquemática del cálculo de abundancias experimentales

3.3.5 DETERMINACIÓN DE LA PUREZA ESPECTRAL

La falta de resolución en los espectrómetros de masas de tipo cuadrupolo produce contribuciones de un ion de masa M a las masas inferiores M-1 y M-2. Esta contribución se puede calcular mediante regresión lineal múltiple [49]. La distribución isotópica experimental del péptido de abundancia natural i , A_{exp}^i , a 8 masas consecutivas desde M-2, son comparadas con la distribución isotópica teórica calculada para un cluster determinado (A_{teo}^i) con masa monoisotópica M, M-1 y M-2, utilizando la siguiente ecuación matricial:

$$\begin{bmatrix} A_{exp}^{M-2} \\ A_{exp}^{M-1} \\ A_{exp}^M \\ A_{exp}^{M+1} \\ A_{exp}^{M+2} \\ A_{exp}^{M+3} \\ A_{exp}^{M+4} \\ A_{exp}^{M+5} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} 0 & 0 & A_{teo}^M \\ 0 & A_{teo}^M & A_{teo}^{M+1} \\ A_{teo}^M & A_{teo}^{M+1} & A_{teo}^{M+2} \\ A_{teo}^{M+1} & A_{teo}^{M+2} & A_{teo}^{M+3} \\ A_{teo}^{M+2} & A_{teo}^{M+3} & A_{teo}^{M+4} \\ A_{teo}^{M+3} & A_{teo}^{M+4} & A_{teo}^{M+5} \\ A_{teo}^{M+4} & A_{teo}^{M+5} & A_{teo}^{M+6} \\ A_{teo}^{M+5} & A_{teo}^{M+6} & A_{teo}^{M+7} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_{M-1} \\ x_{M-2} \\ x_M \end{bmatrix} \quad (8)$$

Resolviendo la Ecuación (8) por mínimos cuadrados se obtiene la contribución (x_i), en forma de fracción, de la cola del pico de masa M sobre las señales asociadas a una (x_{M-1}) como a dos (x_{M-2}) unidades de masa inferiores.

Conocidas estas contribuciones, se procede a recalcular las abundancias teóricas del clúster molecular utilizando la Ecuación (9) para su comparación con los valores experimentales:

$$\begin{bmatrix} A_{rec}^{M-2} \\ A_{rec}^{M-1} \\ A_{rec}^M \\ A_{rec}^{M+1} \\ A_{rec}^{M+2} \\ A_{rec}^{M+3} \\ A_{rec}^{M+4} \\ A_{rec}^{M+5} \end{bmatrix} = x_M \times \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ A_{teo}^M \\ A_{teo}^{M+1} \\ A_{teo}^{M+2} \\ A_{teo}^{M+3} \\ A_{teo}^{M+4} \\ A_{teo}^{M+5} \end{bmatrix} + x_{M-1} \times \begin{bmatrix} 0 \\ A_{teo}^M \\ A_{teo}^{M+1} \\ A_{teo}^{M+2} \\ A_{teo}^{M+3} \\ A_{teo}^{M+4} \\ A_{teo}^{M+5} \\ A_{teo}^{M+6} \end{bmatrix} + x_{M-2} \times \begin{bmatrix} A_{teo}^M \\ A_{teo}^{M+1} \\ A_{teo}^{M+2} \\ A_{teo}^{M+3} \\ A_{teo}^{M+4} \\ A_{teo}^{M+5} \\ A_{teo}^{M+6} \\ A_{teo}^{M+7} \end{bmatrix} \quad (9)$$

3.3.6 DETERMINACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO DE LOS PÉPTIDOS MARCADOS

Para el cálculo del enriquecimiento isotópico de un péptido marcado se calculan 100 distribuciones isotópicas teóricas entre dos enriquecimientos isotópicos diferentes teniendo en cuenta las contribuciones a M-1 y M-2 calculadas según el subapartado anterior para el mismo péptido de abundancia isotópica natural. La distribución isotópica experimental del péptido enriquecido se compara, por regresión lineal, con las 100 distribuciones teóricas calculadas, siendo el valor óptimo de enriquecimiento aquel que proporciona la menor suma cuadrática de residuales.

3.3.7 HIDRÓLISIS ENZIMÁTICA CONJUNTA DE LAS PROTEÍNAS C3, VITRO Y APO

El procedimiento de digestión enzimática con tripsina (Figura 15) consta principalmente de tres etapas: desnaturalización conjunta de las proteínas APO, VITRO y C3; adición de los péptidos enriquecidos isotópicamente; y obtención de la mezcla de péptidos de abundancia natural y marcados.

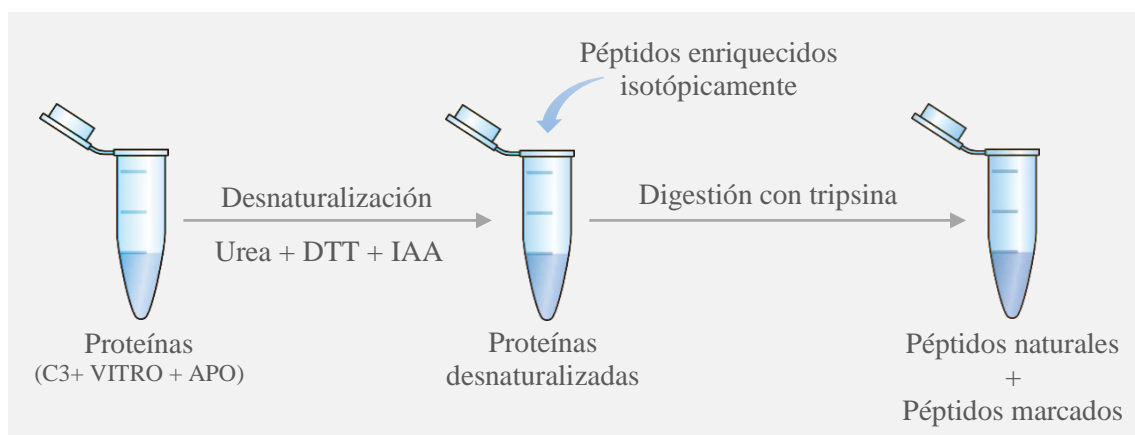


Figura 15: Representación esquemática de la digestión enzimática con tripsina de las proteínas C3, VITRO y APO y la obtención de mezcla de los péptidos naturales y los enriquecidos isotópicamente

Para la desnaturalización conjunta de proteínas, 500 μL de la mezcla de proteínas (100 μL de una disolución de 250 μg péptido/g disolución (ppm) de VITRO, 100 μL de una disolución de 1000 ppm de APO y 300 μL de una disolución de 120 ppm de C3) se llevaron a sequedad en un preconcentrador miVac DNA-23050-B00 (Genevac LTD) a una temperatura de 37 $^{\circ}\text{C}$. La

solución sólida obtenida se redisuelve en 500 μL de *buffer* (100 mM de acetato amónico, pH 8.0) y las proteínas se desnaturalizan añadiendo 0,07 g de urea. La disolución resultante se agitó manualmente durante 30 s y se diluyó añadiendo 200 μL *buffer*. Para la reducción de los puentes disulfuro, se añadieron 20 μL de ditioneitol (DTT) 200 mM y se agitó a 5000 rpm a una temperatura de 37 °C durante 30 minutos en un termoagitador Termomixer Compact 5350 (Eppendorf). Para evitar que los puentes disulfuro se vuelvan a regenerar, se procedió a la alquilación de los enlaces -SH por adición de 23 μL de una disolución de 600 mM de iodoacetamida (IAA), manteniendo la disolución agitada durante 30 min en oscuridad. A fin de eliminar el exceso de IAA, se añadieron 25 μL de una disolución 600 mM de DTT. Para mantener el pH óptimo de la digestión enzimática (pH 8.0), se añadieron 30 μL de NH_3 al 5%, y, para finalizar el proceso de desnaturalización, se disminuyó la concentración de urea por adición de 300 μL de *buffer*.

Antes de iniciar el procedimiento de digestión enzimática, se añadió una cantidad apropiada de los péptidos enriquecidos isotópicamente. La digestión enzimática se llevó a cabo con tripsina porcina con una relación enzima sustrato 1:16 (p/p), a pH 8.0 y 37 °C. Para la optimización del tiempo de digestión se tomaron alícuotas a los 5, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420 y 540 minutos desde la adición de la tripsina. La digestión se paralizó disminuyendo el pH de la mezcla por debajo de 2, añadiendo para ello 30 μL de TFA al 20%. La disolución resultante se llevó a sequedad en un evaporador miVac DNA-23050-B00 (Genevac LTD) a una temperatura de 37 °C y se reconstituyó en 15 μL de una disolución de agua Milli-Q con TFA al 0,1%.

3.3.8 CALCULO DE LA CONCENTRACIÓN DE LOS PÉPTIDOS MEDIANTE REGRESIÓN LINEAL MÚLTIPLE

Conocidos los moles de péptido enriquecido isotópicamente añadidos a la muestra que contiene el analito de abundancia natural, se establece un balance de masas para el número de moles totales del compuesto en la muestra, N_{mix} , según la siguiente ecuación (10):

$$N_{mix} = N_{nat} + N_{erq} \quad (10)$$

donde N_{mix} es la cantidad total de péptido en la mezcla, N_{nat} es la cantidad de péptido de abundancia isotópica natural y N_{erq} es la cantidad de péptido enriquecido isotópicamente añadido a la mezcla.

Se establece un balance similar para cada una de las masas de interés del péptido que se pretende cuantificar teniendo en cuenta las abundancias isotópicas, A.

$$N_{mix} \cdot A_{mix}^i = N_{nat} \cdot A_{nat}^i + N_{erq} \cdot A_{erq}^i \quad (11)$$

Si se divide la ecuación anterior entre la ecuación (10), se obtiene la siguiente expresión:

$$A_m^i = x_S \cdot A_S^i + x_t \cdot A_t^i \quad (12)$$

donde x_S es la fracción molar de péptido en la muestra y x_t es la fracción molar de péptido en el trazador isotópico.

La distribución isotópica medida para un determinado fragmento molecular en la muestra, A_{mez}^i , se puede considerar una combinación lineal de la distribución isotópica teórica del péptido de abundancia natural, A_{nat}^i , y la del péptido enriquecido isotópicamente, A_{erq}^i , ambas corregidas con los factores de fragmentación calculados según subapartado 3.3.5. La contribución de los perfiles isotópicos de cada uno en la mezcla, en forma de fracciones molares, se calcula por regresión lineal múltiple de acuerdo a la siguiente ecuación (13) para 4 masas consecutivas:

$$\begin{bmatrix} A_{mez}^n \\ A_{mez}^{n+1} \\ A_{mez}^{n+2} \\ A_{mez}^{n+3} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A_{nat}^n & A_{erq}^n \\ A_{nat}^{n+1} & A_{erq}^{n+1} \\ A_{nat}^{n+2} & A_{erq}^{n+2} \\ A_{nat}^{n+3} & A_{erq}^{n+3} \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} x_{nat} \\ x_{erq} \end{bmatrix} \quad (13)$$

Conocidos los moles de trazador introducido en la muestra, es posible conocer los moles de péptido de abundancia natural según la siguiente Ecuación (14):

$$\frac{N_{nat}}{N_{erq}} = \frac{x_{nat}}{x_{erq}} \quad (14)$$

3.3.9 RECUPERACIONES INDIVIDUALES EN DISOLUCIÓN ACUOSA

Para la estimación de la recuperación cuantitativa de los seis péptidos, se preparan muestras individuales de los análogos naturales y enriquecidos isotópicamente con una concentración aproximada de 50 ppm disolución para análisis por UHPLC según procedimiento 3.3.1.1 y método de adquisición SRM a baja resolución. La determinación de la concentración de los péptidos de abundancia natural se realiza por IPD tomando a los péptidos enriquecidos isotópicamente como referencia.

La recuperación se calculó a partir de la siguiente Ecuación (15)

$$\% \text{ Recuperación} = \frac{\text{Concentración experimental}}{\text{Concentración teórica}} \cdot 100 \quad (15)$$

4. RESULTADOS

4.1 OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA FUENTE DE IONIZACIÓN

La optimización de los parámetros de la fuente de ionización ESI *Jet Stream* del espectrómetro de masas empleado (subapartado 3.2.2) se llevó a cabo de acuerdo a los criterios establecidos por Agilent Technologies [50]. En la Tabla 3 se muestran las condiciones de ensayo para la optimización de la fuente, llevándose a cabo por análisis FIA-MS (subapartado 3.3.2) con los iones M^{2+} de los péptidos de abundancia natural (Tabla 2) por el método de adquisición SIM (subapartado 3.3.3.1).

Tabla 3: Parámetros de la fuente y rango de estudios seleccionados para la optimización de los seis péptidos

Parámetro de la fuente	Rango de estudio	Intervalo
Fragmentor voltage	100-300 V	50 V
Temperatura del Sheath Gas	200-390 °C	40 °C, 50 °C
Flujo del Sheath Gas	7-12 mL/min	1 mL/min
Presión del gas de nebulización	5-50 psi	10 psi, 15 psi
Presión del capilar	1000-6000 V	1000 V
Nozzle Voltage	0-2000 V	300 V, 500 V
Temperatura del gas de secado	200-350 °C	50 °C
Flujo del gas de secado	5-11 mL/min	2 mL/min

El primero de los parámetros optimizados fue el *fragmentor voltage* (*FV*), voltaje que se aplica después del capilar de entrada al analizador con la finalidad de extraer los iones generados. Este voltaje aplicado puede inducir fragmentación de los iones precursores y, por tanto, que se reduzca la señal instrumental. Este parámetro se optimizó inyectando 5 μ L de una disolución de 10 ppm de los péptidos de abundancia natural para análisis por FIA en modo SIM en rango de ensayo comprendido entre 100 y 300 V.

En la Figura 16 se muestra la respuesta instrumental obtenida para el péptido Vitro 1. Para cuatro de los seis péptidos, un valor de *FV* superior a 150 V genera una significativa reducción de la sensibilidad. Este descenso es especialmente acusado en los péptidos Vitro 1, C3 1, C3 2 y Apo 2, mientras que Apo 1 y Vitro 2 mantienen una sensibilidad constante hasta aproximadamente 200 V. En este punto cabe señalar que este parámetro se debe optimizar para cada uno de los péptidos, recogiendo en la siguiente Tabla 4 los valores óptimos.

Tabla 4: Valor óptimo de *Fragmentor Voltage* para los 6 péptidos medidos en FIA y con el modo de adquisición SIM

Péptido	Vitro 1	Vitro 2	Apo 1	Apo 2	C3 1	C3 2
Fragmentor voltage	150 V	100 V	150 V	100 V	100 V	100 V

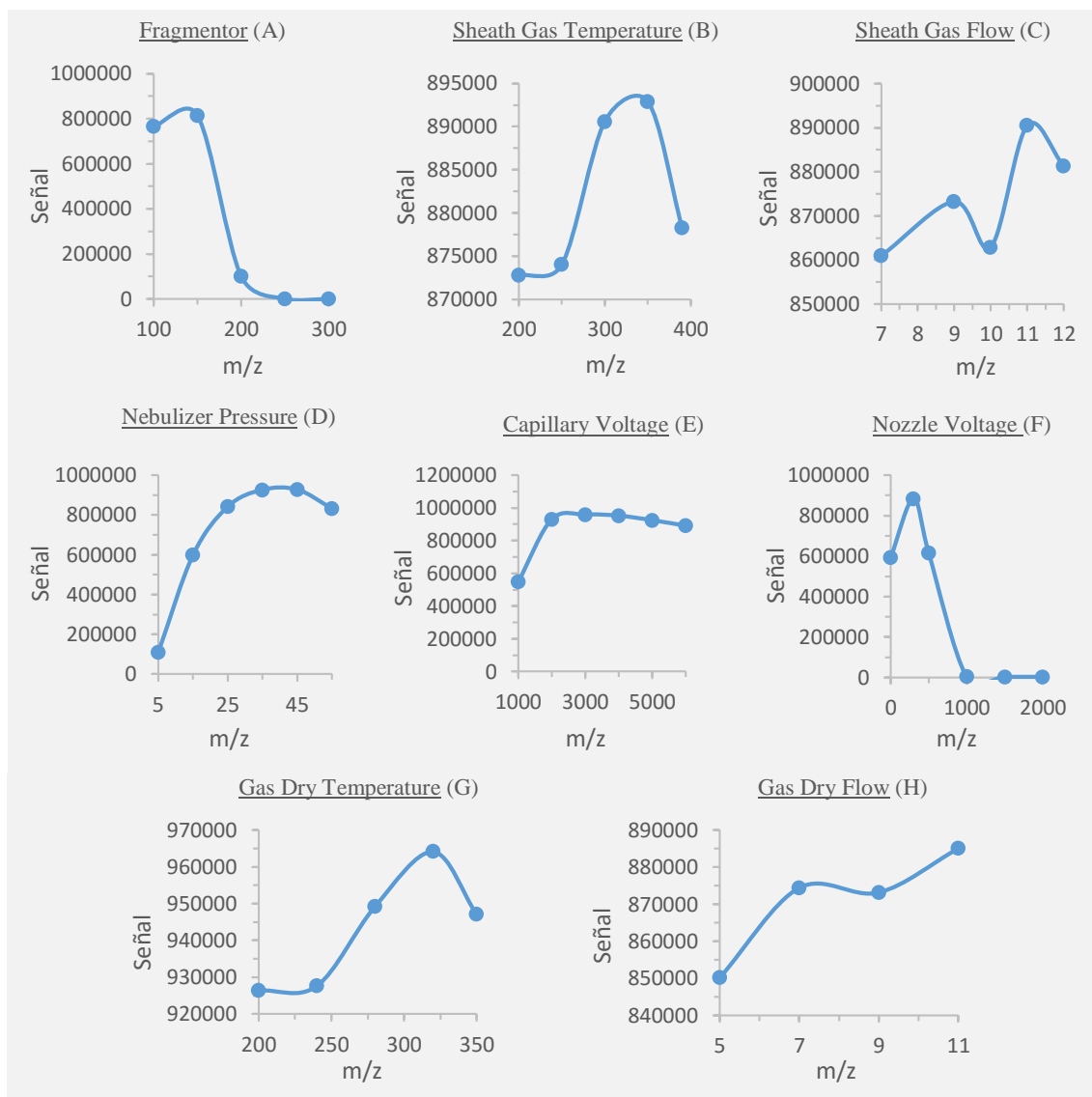


Figura 16: Respuesta instrumental en función de la magnitud de los parámetros de la fuente ESI Jet Stream

A) Fragmentor Voltage B) Temperatura del “Sheath Gas” C) Flujo del “Sheath Gas” D) Presión del gas de nebulización E) Voltaje del capilar F) Nozzle Voltage G) Temperatura del gas de secado H) Flujo del gas de secado

En esta fuente de ionización electrospray se aplica una corriente de gas cilíndrica (*sheath gas*) que permite concentrar los iones en una zona de confinamiento térmico, permitiendo que el flujo de los iones hacia el analizador sea más uniforme y que por tanto un mayor número de iones consigan entrar en el mismo.

Tanto la temperatura de esa corriente de gas (*sheath gas temperature, SGT*) como el flujo (*sheath gas flow, SGF*) fueron optimizados para los seis péptidos en el rango de temperaturas de 200 °C a 390 °C a intervalos de 50 °C con flujos comprendidos entre 7 y 12 ml/min con una variación 2 ml/min por ensayo. En la Figura 16B y Figura 16C se muestran los resultados obtenidos para la optimización de los dos mencionados parámetros para el péptido Vitro 1. Para lo seis péptidos se observa una tendencia idéntica, de manera que se obtiene una continua y significativa mejora de la sensibilidad cuando la temperatura SGT asciende de 250 °C a 300 °C, obteniéndose el máximo

de sensibilidad a un valor de 350 °C. para todos los péptidos, excepto para el péptido Apo 1 que lo presenta a 390 °C. Un aumento de la temperatura del SG, permite que la zona de confinamiento esté más definida, llevando a una mayor densidad de iones en la entrada del analizador. A excepción del péptido Apo 1, para valores superiores a 350 °C de STG se observa una significativa caída de la sensibilidad en un corto intervalo de temperaturas debido probablemente a la degradación térmica de los iones generados [51]. En esta discusión de resultados hay que tener en cuenta también la diferente composición de la fase móvil empleada para cada uno de los péptidos. Un porcentaje mayor de modificador orgánico se traduce en un menor punto de ebullición y, por tanto, de una menor temperatura para la evaporación de las gotas. Así, el péptido Vitro 1, que eluye con un 90% de fase acuosa, experimenta el punto óptimo de SGT a 360 °C, mientras que el péptido V2, que eluye con un 40% de fase orgánica, presenta una SGT óptima de 200 °C. En cuanto al FSG, no se observa una tendencia definida común a todos los péptidos, si bien es cierto que un aumento del flujo del SG lleva generalmente a un aumento de la sensibilidad, debido al estrechamiento del flujo de iones hacia el analizador.

Uno de los principios básicos en los que se basa la fuente de ionización electrospray es el *efecto venturi*, responsable de la nebulización del eluyente líquido proveniente del equipo de cromatografía. En este sentido, el gas de nebulización es el responsable de dicha nebulización y su presión (*nebulizer pressure, NP*) juega un papel fundamental en el proceso y, por tanto, en la eficiencia de la ionización y en la sensibilidad. La NP se optimizó para los seis péptidos en el rango de presiones comprendido entre 5 y 55 psi. En la Figura 16D se muestra la respuesta instrumental obtenida para el péptido Vitro1. Al igual que para este péptido, los restantes péptidos muestran una tendencia idéntica, consistente en el incremento de la sensibilidad a medida que aumenta la presión del gas de nebulización. Sin embargo, el valor óptimo asociado a cada péptido es diferente, observándose un incremento de la NP óptima a medida que aumenta el porcentaje de modificador orgánico al que eluyen los diferentes péptidos.

Como se ha comentado anteriormente, en el proceso de ionización con la fuente ESI *Jet Stream* de Agilent se hace uso de un gas auxiliar para mejorar el rendimiento de la ionización e incrementar el número de iones que alcanzan el analizador (*sheath gas*). Sin embargo, esta corriente puede actuar como aislante del campo eléctrico generado por la diferencia de potencial (*Capillary Voltage, CV*) aplicado entre los extremos del capilar para generar las gotas de las moléculas cargadas. De esta manera, existe un parámetro adicional (*Nozzle Voltage, NV*) que permite aplicar un potencial extra en el extremo del capilar y superar el efecto aislante del SG y mantener el campo eléctrico de la zona de confinamiento creada por el flujo de SG, mejorando la eficiencia de la ionización.

Los parámetros CV y NV fueron optimizados para los seis péptidos en el intervalo de 1000 a 6000 V para CV y de 0 a 2000 V para NV. En el parámetro CV se observa un comportamiento

prácticamente idéntico para los seis péptidos, observándose un incremento significativo de la señal cuando el CV aumenta de 1000 V a 2000 V. El valor óptimo es de 3000 V para la mayoría de los péptidos, a excepción del Vitro 2 que lo presenta a 6000 V. Prácticamente lo mismo sucede en el caso del NV, si bien es cierto que en este caso todos los péptidos experimentan una drástica pérdida de sensibilidad cuando el parámetro asciende de 500 a 1000 V.

Tradicionalmente, la evaporación de las gotas de disolvente se lleva a cabo con una corriente de gas caliente de secado (*Drying Gas, DG*), generalmente de N₂. Con la modernización de las fuentes de ionización y la aparición de parámetros como el SG, el papel del DG ya no es tan determinante en el proceso de ionización, aunque sigue siendo importante para reducir el número de moléculas neutras que alcanzan la zona de alto vacío. Aun así, para los seis péptidos se observa una continua mejora de la sensibilidad a medida que aumenta la temperatura del DG hasta un valor común de 350 °C, a partir del cual la sensibilidad cae de manera generalizada. El valor óptimo se sitúa en los 350 °C para todos los péptidos a excepción del Apo 2 que lo presenta a 330 °C. En cuanto al flujo, se observa un continuo incremento de la señal, sin observarse pérdida de sensibilidad a valores progresivamente más elevados, dentro del intervalo ensayado.

En la Tabla 5 se muestran los valores óptimos de la fuente de ionización ESI *Jet Stream* empleada para el análisis por espectrometría de masas en el presente TFM.

Tabla 5: Valores óptimos de los parámetros de la fuente de ionización ESI *Jet Stream*

Sheath Gas Temperature	Sheath Gas Flow	Capillary Voltage	Nebulizer Pressure	Gas Dry Temperature	Gas Dry Flow	Nozzle Voltage
350 °C	11 mL/min	2000 V	15 psi	250 °C	10 mL/min	300 V

Los valores que se recogen en la Tabla 4 y Tabla 5, respectivamente, son los que se emplean desde este momento para todos los análisis por espectrometría de masas.

4.2 DETERMINACIÓN DE LA PUREZA ESPECTRAL DE LOS PÉPTIDOS SELECCIONADOS

La correcta aplicación de la Ecuación (13) requiere la medida exacta de la composición isotópica de los péptidos tanto naturales como enriquecidos o, en otras palabras, la determinación de la pureza espectral de los clusters correspondientes a los iones producto de interés. Los analizadores de cuadrupolo son analizadores de baja resolución, de manera que los picos a una m/z determinada pueden presentar una cola que contribuya a las señales correspondientes a una o dos unidades de masa inferiores. Por este motivo, si no se tiene en cuenta la contribución de la cola de los picos sobre las masas inferiores, las distribuciones isotópicas medidas experimentalmente presentarán una desviación respecto de la distribución isotópica teórica de los péptidos, pudiendo conducir a errores significativos en la determinación. Por este motivo, se procedió al estudio de la pureza

espectral para cada uno de los péptidos de abundancia natural a fin de determinar dicha contribución, denominada factor de fraccionamiento, y expresada en forma de fracción. Este factor es característico de cada instrumento y fue determinado en modo de trabajo SIM (subapartado 3.3.3.1) y SRM a baja resolución (subapartado 3.3.3.4) utilizando disoluciones de 10 ppm de los péptidos de abundancia natural según procedimiento 3.3.1.2.

Para llevar a cabo el estudio en modo SIM se emplearon los clusters M^+ a m/z 1235,7 para el péptido Apo 1; a m/z 983,5 para Apo 2; a m/z 842,5 para C3 1; a m/z 888,5 para C3 2; a m/z 1648,8 para Vitro 2 y a m/z 887,5 u para Vitro 1. Las diferentes relaciones m/z medidas en cada uno de los clústeres seleccionados se realizó según el procedimiento 3.3.5, mostrándose a continuación los resultados para el péptido Vitro 1. En la Figura 17 se muestra la distribución isotópica teórica (azul) del péptido Vitro 1, así como la distribución isotópica experimental obtenida (naranja).

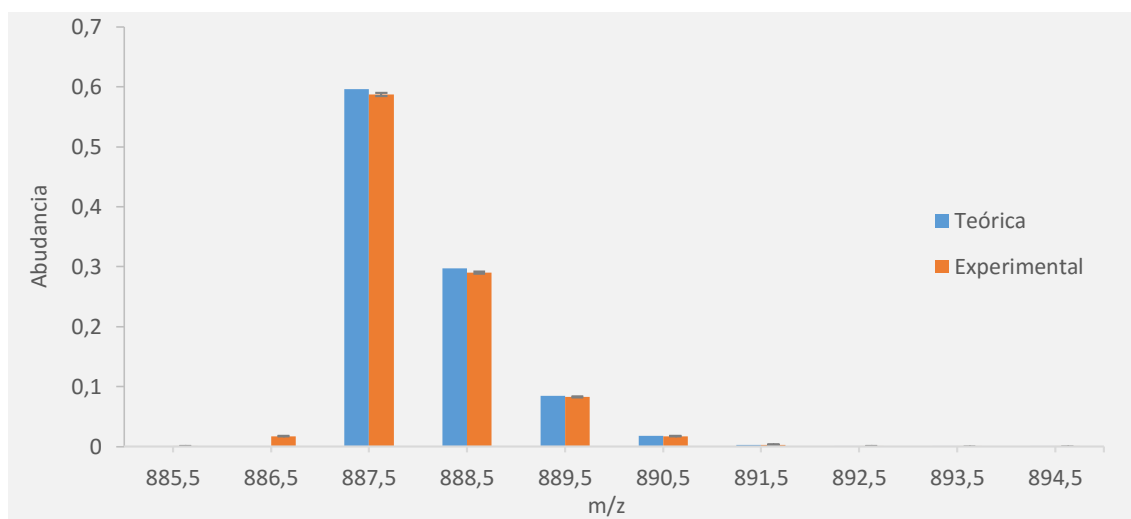


Figura 17: Distribución isotópica teórica (azul) y experimental (naranja) del péptido Vitro1 para el cluster molecular 887,5 u medido en modo SIM a una concentración de aproximada de 10 ppm

En la Figura 17 se observa que no existe concordancia completa entre la distribución isotópica teórica y la distribución isotópica experimental. Las abundancias medidas experimentalmente que constituyen la distribución isotópica experimental son menores que las análogas teóricas e incluso se observan dos abundancias medidas experimentalmente a 886,5 u y 885,5 u, respectivamente, que no se hallan en la distribución isotópica teórica. Ello se debe a que experimentalmente la abundancia de la masa monoisotópica (m/z : 887,5) contribuye a 887,5 u, 886,5 u y 885,5 u, debido a la cola del pico a 887,5 u sobre las relaciones m/z a 886,5 y 885,5.

A partir de la distribución isotópica experimental y las distribuciones isotópicas teóricas de los tres clústeres moleculares con masa monoisotópica 887,5 (M), 886,5 (M-1) y 885,5 (M-2), respectivamente, y por aplicación de regresión lineal múltiple, según procedimiento 3.3.5 y Ecuación (8), se obtuvieron, para los seis péptidos, los factores de fraccionamiento que se

muestran en la siguiente Tabla 6, donde x_M se corresponde con la contribución del pico a m/z 887,5 x_{M-1} a la contribución del pico a m/z 886,5 y x_{M-2} a la contribución del pico a m/z 885,5.

Tabla 6: Factores de fraccionamiento de los seis péptidos en modo de adquisición SIM a resolución estándar donde x_M se corresponde con la contribución del pico a m/z 887,5 x_{M-1} a la contribución del pico a m/z 886,5 y x_{M-2} a la contribución del pico a m/z 885,5.

Péptido	x_M	x_{M-1}	x_{M-2}
Vitro 1	$0,970 \pm 0,004$	$0,03 \pm 0,02$	$0,002 \pm 0,002$
Vitro 2	$0,962 \pm 0,002$	$0,026 \pm 0,002$	$0,0096 \pm 0,0006$
Apo 1	$0,949 \pm 0,003$	$0,048 \pm 0,004$	$0,0020 \pm 0,0002$
Apo 2	$0,976 \pm 0,002$	$0,024 \pm 0,004$	$0,0008 \pm 0,0008$
C3 1	$0,979 \pm 0,004$	$0,021 \pm 0,004$	$0,0006 \pm 0,0004$
C3 2	$0,9790 \pm 0,0004$	$0,019 \pm 0,001$	$0,00077 \pm 0,00002$

Si las distribuciones isotópicas teóricas de los diferentes péptidos se recalculan según la Ecuación (9) con los factores de fraccionamiento que se muestran en la Tabla 6, se corregiría la distribución isotópica experimental como se muestra para la Vitro 1 en la Figura 18.

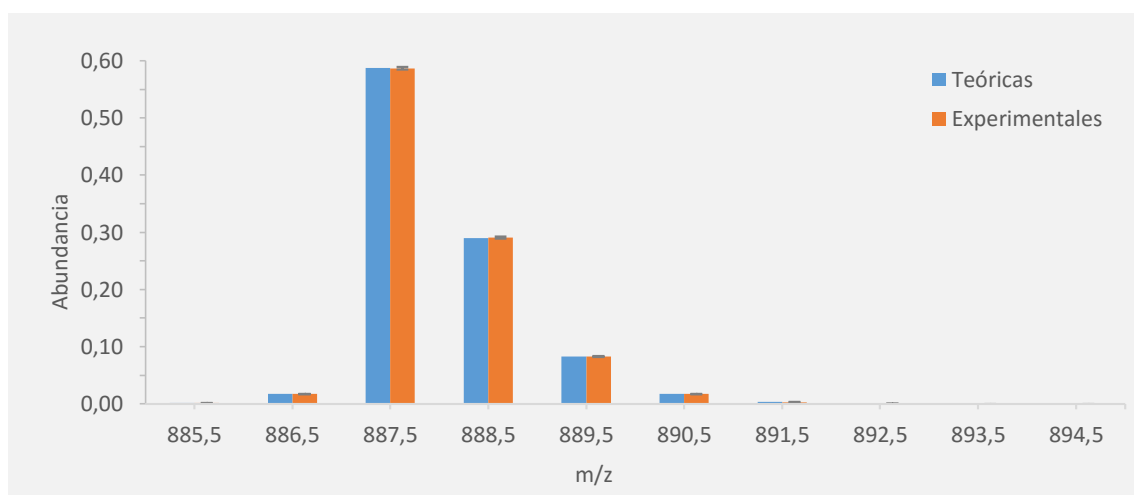


Figura 18: Distribución isotópica teórica corregida con factores de fraccionamiento (azul) y experimental (naranja) del péptido Vitro1 para el cluster molecular 887,5 u medido en modo SIM a una concentración de 10 ppm

En la Figura 18, y a diferencia de la Figura 17, se observa una completa concordancia entre la distribución isotópica experimental y la distribución isotópica teórica corregida con los factores de fraccionamiento calculados previamente, por lo que la determinación de estos últimos por el método de adquisición SIM se estima como correcta.

A fin de validar los resultados obtenidos con el método SIM, se procedió a la determinación de los factores de fraccionamiento por el método de adquisición SRM a baja resolución utilizando un ancho de ventana de 20 u en el primer cuadrupolo. Se escogieron para los seis péptidos de

abundancia natural los clusters moleculares M^{2+} (Tabla 2) dado que son los iones precursores mayoritarios y además permiten una transmisión más fácil del cluster molecular completo. Se monitorizaron para cada cluster molecular M^{2+} dos iones producto en los que se estudió su distribución isotópica monitorizando 8 m/z en cada uno de ellos. El centro seleccionado para los clústeres moleculares precursores fue de m/z de 429 para Vitro 1, 613 para Apo 1, 441 para C3 1, 488 para Apo 2, 818 para Vitro 2 y 417 para C3 1.

En la Tabla 7 se muestran los factores de fraccionamiento para los seis péptidos en modo de adquisición SRM a baja resolución para los iones producto seleccionados para el análisis.

Tabla 7: Factores de fraccionamiento en modo de medida SRM a baja resolución

Péptido	Ion producto	X_M	X_{M-1}	X_{M-2}
Vitro 1	614,4 - 621,4 u	$0,973 \pm 0,002$	$0,0267 \pm 0,0009$	$0,00234 \pm 0,00008$
	642,4 - 649,4 u	$0,967 \pm 0,002$	$0,028 \pm 0,002$	$0,0050 \pm 0,0002$
Vitro 2	945,5 - 952,5 u	$0,961 \pm 0,004$	$0,035 \pm 0,003$	$0,00160 \pm 0,00005$
	1074,5 - 1081,5 u	$0,956 \pm 0,001$	$0,032 \pm 0,001$	$0,0018 \pm 0,0001$
Apo 1	773,4 - 780,4 u	$0,964 \pm 0,002$	$0,028 \pm 0,002$	$0,0023 \pm 0,0001$
	1007,5 - 1014,5 u	$0,956 \pm 0,002$	$0,038 \pm 0,002$	$0,0032 \pm 0,0004$
Apo 2	587,3 - 594,3 u	$0,978 \pm 0,001$	$0,023 \pm 0,001$	$0,00187 \pm 0,00005$
	797,4 - 805,4 u	$0,976 \pm 0,001$	$0,020 \pm 0,001$	$0,0034 \pm 0,0001$
C3 1	529,3 - 536,3 u	$0,985 \pm 0,001$	$0,0162 \pm 0,0002$	$0,0018 \pm 0,0008$
	642,4 - 649,4 u	$0,982 \pm 0,001$	$0,019 \pm 0,001$	$0,0007 \pm 0,0004$
C3 2	587,3 - 594,3 u	$0,9840 \pm 0,0003$	$0,0137 \pm 0,0003$	$0,00097 \pm 0,00003$
	773,4 - 780,4 u	$0,9773 \pm 0,0011$	$0,0189 \pm 0,0013$	$0,00220 \pm 0,00006$

Si de los datos recogidos en la Tabla 7 se comparan los factores de fraccionamiento de los dos clústeres moleculares producto de cada péptido, se observa una gran similitud en los valores, por lo que la medida de los factores de fraccionamiento obtenidas por el método de adquisición SRM a baja resolución se estima como correcta. Conocidos los factores de fraccionamiento es posible recalcular las distribuciones isotópicas teóricas asociadas a los clusters moleculares fragmento de los seis péptidos marcados isotópicamente. En la Figura 19 se muestra la distribución isotópica teórica (azul) y la distribución isotópica experimental obtenida (naranja) para el cluster 1 y cluster 2 del péptido Vitro 1.

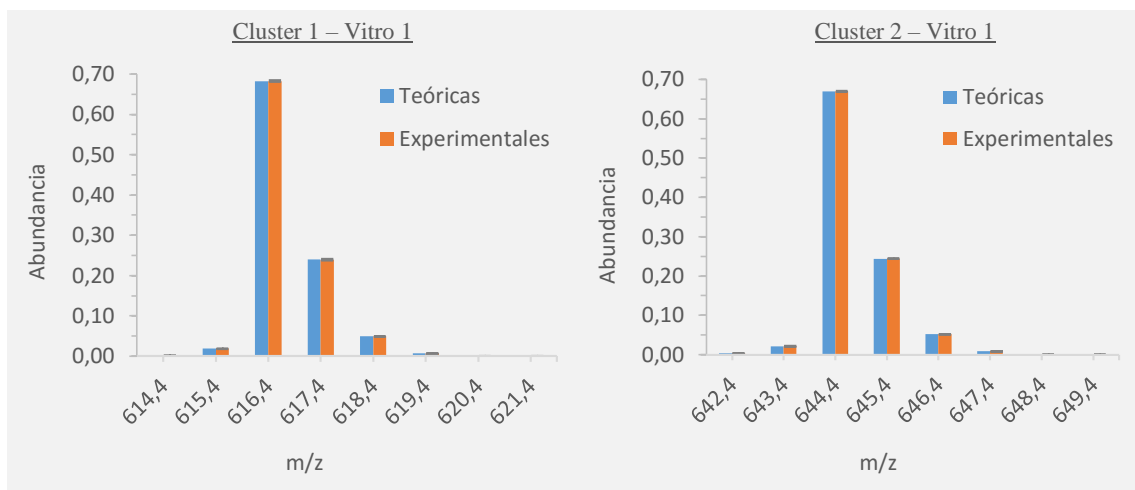


Figura 19: Distribución isotópica teórica corregida con factores de fraccionamiento (azul) y experimental (naranja) del péptido Vitro 1 para el ion producto a m/z 616,4 y el ion producto a m/z 644,4 medidos en modo SRM a baja resolución a una concentración aproximada de 10 ppm

A partir de los datos recogidos en la Tabla 7, conocidos los datos obtenidos por el método de adquisición SIM a resolución estándar (Tabla 6) y a partir de la Figura 19 y la Figura 18, respectivamente, se puede establecer que los factores de fraccionamiento obtenidos con ambos modos de adquisición son comparables y, por tanto, se considera que su determinación está validada.

4.3 DETERMINACIÓN DEL ENRIQUECIMIENTO ISOTÓPICO DE LOS PÉPTIDOS MARCADOS

La determinación del enriquecimiento isotópico de los péptidos enriquecidos isotópicamente utilizados a lo largo del presente TFM es esencial de cara a conocer la distribución isotópica teórica real de los mismos para ser empleados en la determinación cuantitativa de los péptidos de abundancia natural.

A partir de las distribuciones isotópicas corregidas con el factor de fraccionamiento se calcularon 100 enriquecimientos isotópicos teóricos en el intervalo de enriquecimiento comprendido entre 97% y 100%, llevando asociado cada enriquecimiento una determinada distribución isotópica teórica. Las distribuciones isotópicas experimentales corregidas con los factores de fraccionamiento que se recogen en la Tabla 6 y Tabla 7, respectivamente, fueron comparadas, por regresión lineal, con las 100 distribuciones teóricas calculadas, siendo el valor óptimo de enriquecimiento aquel que proporciona la menor suma cuadrática de residuales (subapartado 3.3.6).

En la Figura 20 se muestra, para el péptido Vitro1, una representación en la que se refleja la variación de la suma cuadrática de residuales en función del enriquecimiento isotópico del mismo.

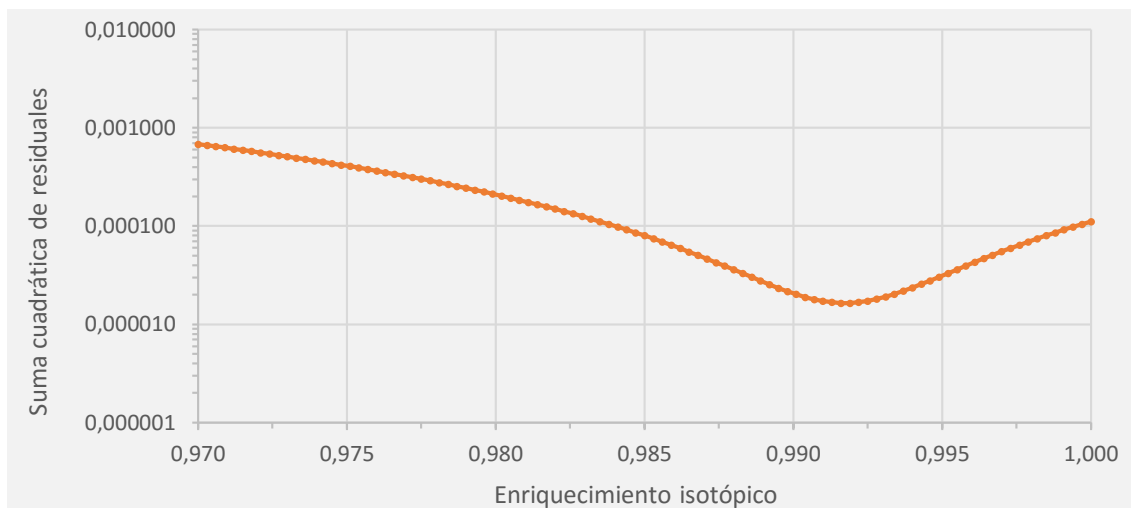


Figura 20: Suma cuadrática de residuales en la determinación del enriquecimiento isotópico del péptido Vitro1 enriquecido en dos átomos de ^{13}C

En la Figura 20 se observa que la menor suma cuadrática de residuales se corresponde con un enriquecimiento del péptido $^{13}\text{C}_2\text{-Vitro1}$ del $99,16 \pm 0,02 \%$, obtenido de la medida de cinco réplicas independientes. En la Tabla 8 se recogen los enriquecimientos isotópicos medios de los seis péptidos en los dos modos de adquisición.

Tabla 8: Enriquecimiento isotópico medio de los péptidos en modo de adquisición SIM y SRM a baja resolución. incertidumbre expresada como dos veces la desviación estándar obtenida de cinco replicas independientes.

Péptido	SIM	SRM (Fragmento 1)	SRM (Fragmento 2)
Vitro 1	$99,17 \pm 0,08 \%$	$99,19 \pm 0,08 \%$	$99,2 \pm 0,2 \%$
Vitro 2	$99,4 \pm 0,2 \%$	$99,0 \pm 0,4 \%$	$99,2 \pm 0,2 \%$
Apo 1	$98,5 \pm 0,8 \%$	No determinado	$98,6 \pm 0,4 \%$
Apo 2	$99 \pm 2 \%$	$99 \pm 2 \%$	$99,2 \pm 0,4 \%$
C3 1	$99,21 \pm 0,4 \%$	$99,0 \pm 0,4 \%$	$99,2 \pm 0,4 \%$
C3 2	$98,9 \pm 0,8 \%$	$98,68 \pm 0,08 \%$	$98,8 \pm 0,4 \%$

A partir de los datos recogidos en la Tabla 8 se puede establecer que existe una completa correlación al 95% de confianza entre los valores de enriquecimiento isotópico obtenidos por los métodos de adquisición SIM y SRM a baja resolución, en este último caso también para los dos clústeres moleculares de los iones producto, a excepción del péptido Apo 1 cuyo clúster molecular del ion producto ($773,4 - 780,4 \text{ u}$) no pudo ser empleado para la determinación del enriquecimiento isotópico debido a la existencia de interferencias espectrales. Aun así, la determinación se considerada validada al disponer de al menos un cluster molecular producto completo para la Apo 1 que puede ser comparado con el medido con el método de adquisición SIM y disponer de dos clústeres moleculares productos completos por ion precursor para los cinco péptidos restantes.

4.4 OPTIMIZACIÓN DE LA MEDIDA DE LA COMPOSICIÓN ISOTÓPICA DE LOS PÉPTIDOS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN TÁNDEM A RESOLUCIÓN ESTÁNDAR

La determinación del enriquecimiento isotópico de los péptidos enriquecidos isotópicamente requiere el empleo de un método de adquisición SRM a baja resolución para evitar la monitorización de un gran número de transiciones por cada ion precursor. Sin embargo, en la optimización del tiempo necesario para lograr una digestión completa de cada proteína objeto de estudio es suficiente con monitorizar las cuatro transiciones asociadas a cada ion producto. Para ello se utiliza un método de adquisición SRM a resolución estándar, pero es necesario comprobar previamente que las abundancias obtenidas experimentalmente se corresponden con las teóricas. Para este propósito se usó el programa *IsoPattern* [52] que proporciona la contribución individual de cada transición SRM a la composición isotópica de los iones producto seleccionados. En la Tabla 9 se muestra la contribución individual de cada transición SRM a la composición isotópica del cluster del ion producto a m/z 616,3 para el péptido Vitro 1.

Tabla 9: Contribución de las distintas transiciones SRM a la composición isotópica del cluster del ion producto a m/z 616,3 para el péptido Vitro1

	Iones precursores						
	444,26	444,76	445,26	445,76	446,26	446,76	447,26
616,3	0,596322	0,086349	0,010723	0,000950	0,000070	0,000004	0,0000002
617,3		0,211164	0,030577	0,003797	0,000338	0,000025	0,000002
618,3			0,043692	0,006327	0,000786	0,000070	0,000005
619,3				0,006650	0,000963	0,000120	0,000011
620,3					0,000813	0,000118	0,000014
621,3						0,000083	0,000012
622,3							0,000007
Iones producto							

Como se observa en la Tabla 9, las transiciones de m/z 444,26→616,3; 444,76→617,3; 445,26→618,3 y 445,76→619,3 son las cuatro transiciones mayoritarias asociadas al cluster del ion producto a m/z 616,3.

Para comprobar que las abundancias medidas experimentalmente están siendo correctamente monitorizadas, las abundancias isotópicas teóricas correspondientes a las cuatro transiciones mayoritarias fueron comparadas con las abundancias isotópicas medidas experimentalmente asociadas a dichas transiciones, obtenidas éstas por inyección por triplicado de 5 µL de los péptidos de abundancia natural según procedimiento 3.3.1.1 y método de adquisición SRM a resolución estándar. En la Figura 21 se muestran las abundancias isotópicas teóricas (azul) y las

abundancias isotópicas medidas experimentalmente (naranja) de los dos cluster moleculares fragmento asociados al cluster molecular del ion precursor de m/z : 444,3 del péptido Vitro1.

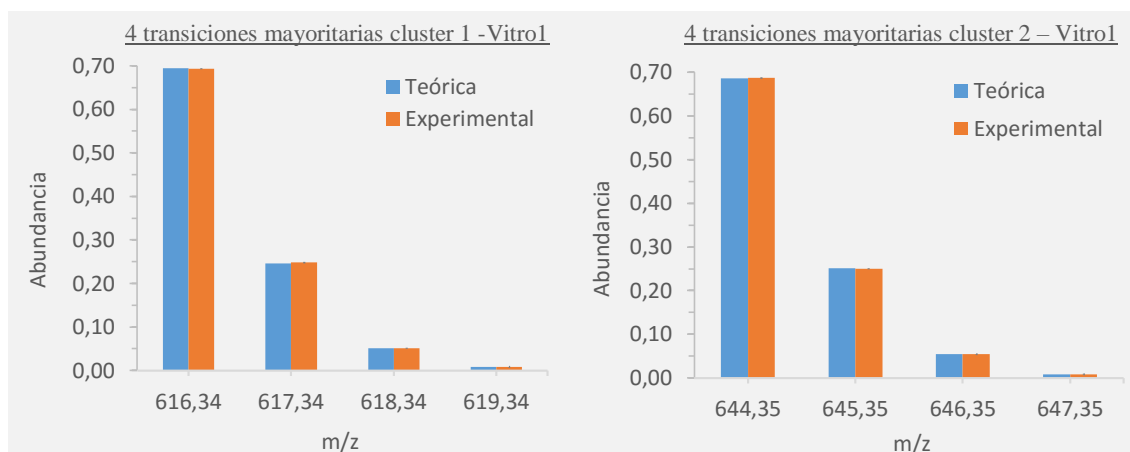


Figura 21: Distribución isotópica teórica (azul) y experimental (naranja) del péptido Vitro1 para los clusters de los iones producto a m/z 616,4 y a m/z 644,4 medidos en modo SRM resolución estándar a una concentración aproximada de 10 ppm

En la Figura 21 se observa que existe una correlación completa entre las distribuciones isotópicas experimentales de los dos clústeres de los iones producto seleccionados para el péptido Vitro 1 y las análogas distribuciones isotópicas teóricas. Al igual que sucede para el péptido Vitro 1, para los restantes cinco péptidos se obtiene una total correlación entre las abundancias teóricas y las medidas experimentalmente, considerándose por tanto que la medida experimental de abundancias isotópicas es correcta.

Comprobada la correcta medida experimental de abundancias, se procedió al desarrollo del estudio de la digestión trípica conjunta de las tres proteínas en función del tiempo.

4.4.1 OPTIMIZACIÓN DEL TIEMPO DE DIGESTIÓN ENZIMÁTICA PARA CADA PROTEÍNA BIOMARCADORA

Uno de los principales requisitos de los métodos de cuantificación absoluta de proteínas mediante el empleo de péptido enriquecidos isotópicamente es que la digestión trípica de las proteínas en sus péptidos proteotípicos constituyentes sea cuantitativa. A este fin, se evaluó la digestión enzimática conjunta de las tres proteínas (Apo, Vitro y C3) en función del tiempo, según el procedimiento descrito en el subapartado 3.3.7.

Se considera que la hidrólisis enzimática es completa cuando la relación de fracciones molares de los péptidos de abundancia natural liberados de las proteínas y los péptidos enriquecidos isotópicamente añadidos a la muestra previamente a la digestión es constante en el tiempo. Se muestra en la Figura 22 los resultados obtenidos para cada una de las proteínas, indicándose los resultados para cada péptido y cluster de ion producto seleccionado. Los resultados se obtuvieron según se describe en el apartado 3.3.1.1. Se midió un triplicado de inyección de las diferentes alícuotas obtenidas en el tiempo, medidas por método de adquisición SRM a resolución estándar

monitorizando las cuatro principales transiciones de dos clústeres de iones producto por cada ion precursor M^{2+} (Tabla 2) asociado a cada proteína.

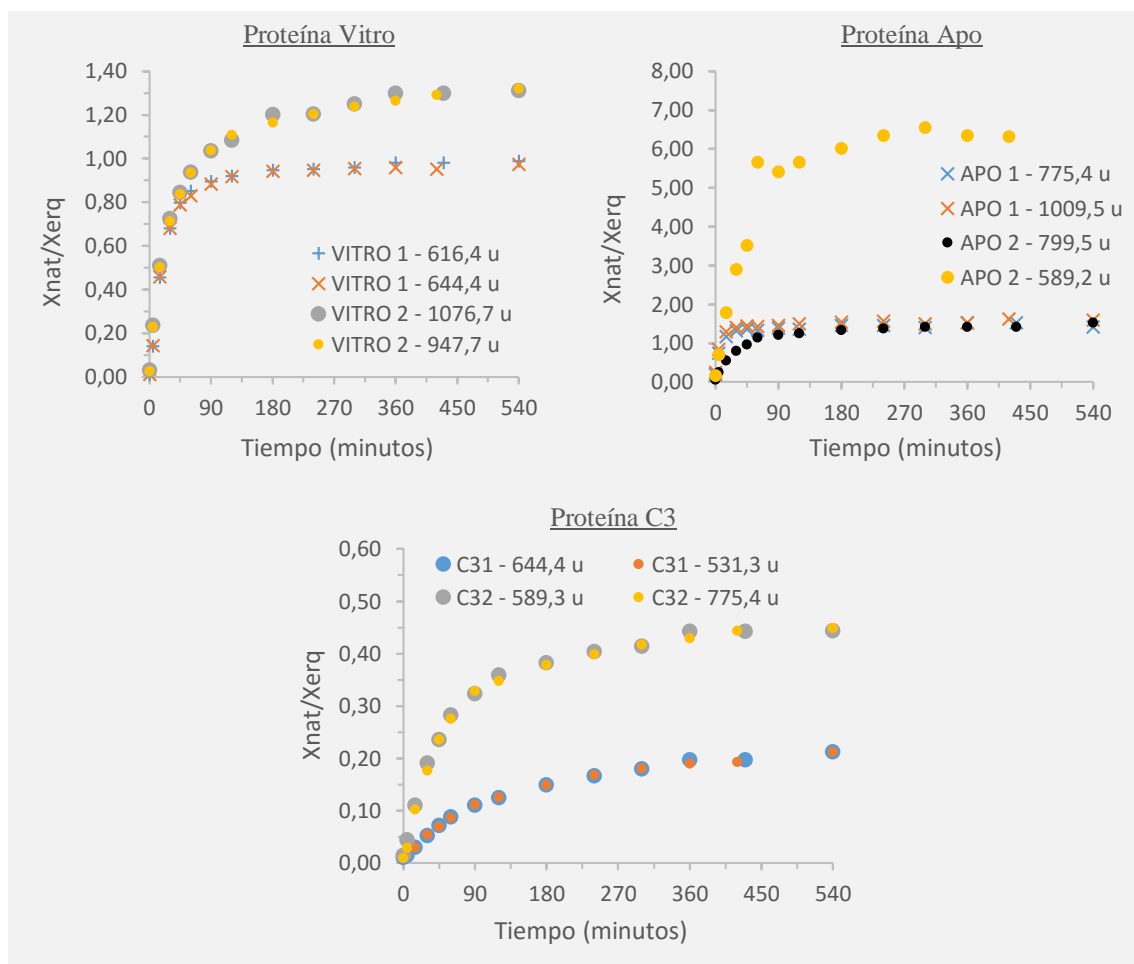


Figura 22: Relación de fracciones molares de los péptidos de abundancia natural y los enriquecidos isotópicamente en función del tiempo de digestión trípica de las 3 proteínas objeto de cuantificación

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 22 es posible determinar los tiempos de digestión enzimática necesarios para que esta última sea cuantitativa, recogiendo estos valores en la siguiente Tabla 10.

Tabla 10: Tiempo para hidrólisis trípica cuantitativa de las tres proteínas

Proteína	Apo	Vitro	C3
Tiempo de hidrólisis	60 min	300 min	360 min

A partir de los datos que se muestran en la Tabla 10 y las tendencias recogidas en la Figura 22, se observa que el tiempo de digestión requerido aumenta a medida que lo hace la masa molecular de las proteínas sometidas al proceso de digestión. Así, por ejemplo, la proteína Apo, con una masa molecular de 45399 Da, presenta un tiempo de hidrólisis cuantitativa de aproximadamente 60 minutos, mientras que la proteína Vitro, de masa molecular 75000 Da, y la proteína C3, con 190000 Da, muestran, respectivamente, tiempos de hidrólisis superiores entre sí a mayor masa molecular y, a su vez, con respecto a la proteína Apo.

4.5 OPTIMIZACIÓN DEL ANCHO DE VENTANA PARA MEDIDAS POR SRM A BAJA RESOLUCIÓN

La metodología experimental que se desarrolla en el presente TFM se aplicará a suero humano utilizando el modo de adquisición SRM a baja resolución. Esto implica que las ventanas de masa asociadas a los diferentes anchos de ventana deben permitir la transmisión completa de los clusters moleculares precursores de los doce péptidos que se someten a análisis conjunto por UHPLC según procedimiento 3.3.1.1. Sin embargo, se debe evitar que un exceso de ancho de ventana pueda dar lugar a la aparición de interferencias espectrales, común en muestras reales. Por este motivo, se probaron tres anchos de ventana diferentes: pequeña (10 u), mediana (15 u) y grande (20 u).

Como se ha comentado anteriormente, la transmisión completa del cluster del ion producto de cada péptido debe realizarse en ausencia de interferencias espectrales que puedan surgir del análisis de la muestra real. Por este motivo, se comprueba que se logra la completa transmisión del comentado cluster molecular a las tres ventanas de masa comentadas anteriormente, pero prestando especial interés en la ventana pequeña. En la Figura 23 se muestran los anchos de ventana obtenidos por inyección de 15 μ L de una disolución del péptido de abundancia natural de Apo2. Como se puede observar se monitorizan mediante *barrido de iones precursores* entre 470 u a 500 u, los iones precursores de las cuatro transiciones mayoritarias que generan los iones producto de interés en el péptido de abundancia natural (m/z : 799,5; 800,5; 801,5; 802,5).

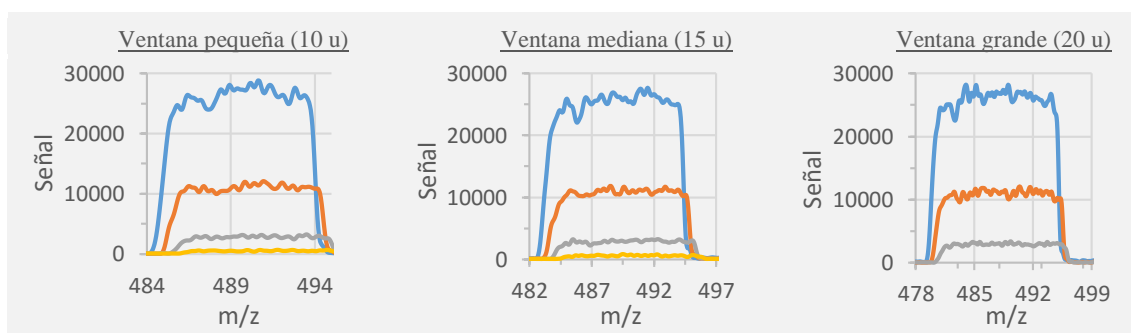


Figura 23: Anchos de ventana experimentales en función del ancho de ventana del método de adquisición *Precursor Ion Scan* para el cluster molecular del ion producto de m/z 799,5 del péptido de abundancia natural Apo 2

Como se observa en la Figura 23, en los tres anchos de ventana se consigue la completa transmisión del cluster molecular. Más relevante es que dicha transmisión se consiguió con el ancho de ventana de FWHM (ancho total a la semialtura) de 10 u, resultado especialmente importante de cara evitar interferencias espectrales derivadas del análisis de la muestra real.

Optimizado el ancho de ventana, se procedió a determinar el centro de la ventana para cada cluster de iones precursor en cada péptido de abundancia natural por FIA-MS según procedimiento 3.3.2 con el ancho de ventana de FWHM 10 u para el método de adquisición *Precursor Ion Scan*. En la Tabla 11 se muestran los centros de los clusters moleculares precursores M^{2+} de los péptidos

de abundancia natural para el ancho de ventana pequeño, así como el valor de este ancho de ventana expresado como el ancho total a la semialtura (FWHM).

Tabla 11: centros de los clusters moleculares precursores y ancho de ventana de los seis péptidos de abundancia natural utilizados a lo largo de este TFM.

Péptido	Centro del cluster molecular del ion precursor	FWHM
Vitro 1	442 u	10 u
Apo 1	616 u	10 u
C3 1	421 u	9 u
Apo 2	490 u	9 u
C3 2	443 u	9 u
Vitro 2	822 u	10 u

Los datos que se recogen en la Tabla 11 son los que se emplean desde este momento para el análisis por espectrometría de masas con el método de adquisición SRM a baja resolución.

4.6 ESTUDIOS DE RECUPERACIÓN DE DISOLUCIONES DE PÉPTIDOS

Los péptidos enriquecidos isotópicamente, en forma sólida, fueron liofilizados en el liofilizador Heto powerDry LL3000 (Thermo Scientific) durante 24 horas para eliminar la humedad. A partir de los sólidos secos, se prepararon gravimétricamente en agua Milli-Q mezclas individuales de aproximadamente 50 ppm de cada péptido de abundancia natural y los correspondientes análogos marcados isotópicamente. En la Tabla 12 se muestran las concentraciones de los patrones de péptidos enriquecidos isotópicamente empleados para la preparación de las mezclas 1:1 con sus análogos de abundancia natural.

Tabla 12: Concentración de los patrones de péptidos enriquecidos isotópicamente empleados para la preparación de mezclas 1:1 con sus análogos de abundancia natural

Péptido enriquecido	Apo 1	Apo 2	Vitro 1	Vitro 2	C3 1	C3 2
Concentración (ppm)	100,46	99,59	100,66	97,78	98,89	94,51

La concentración de los péptidos de abundancia natural fue determinada por IPD empleando los péptidos enriquecidos isotópicamente como referencia. En la Figura 24 se muestran las concentraciones esperadas (teóricas) y las determinadas experimentalmente de los péptidos de abundancia natural, determinadas éstas últimas por análisis individual por UHPLC según procedimiento 3.3.1.1 y con el método de adquisición SRM a baja resolución con las ventanas que se muestran en la Tabla 11.

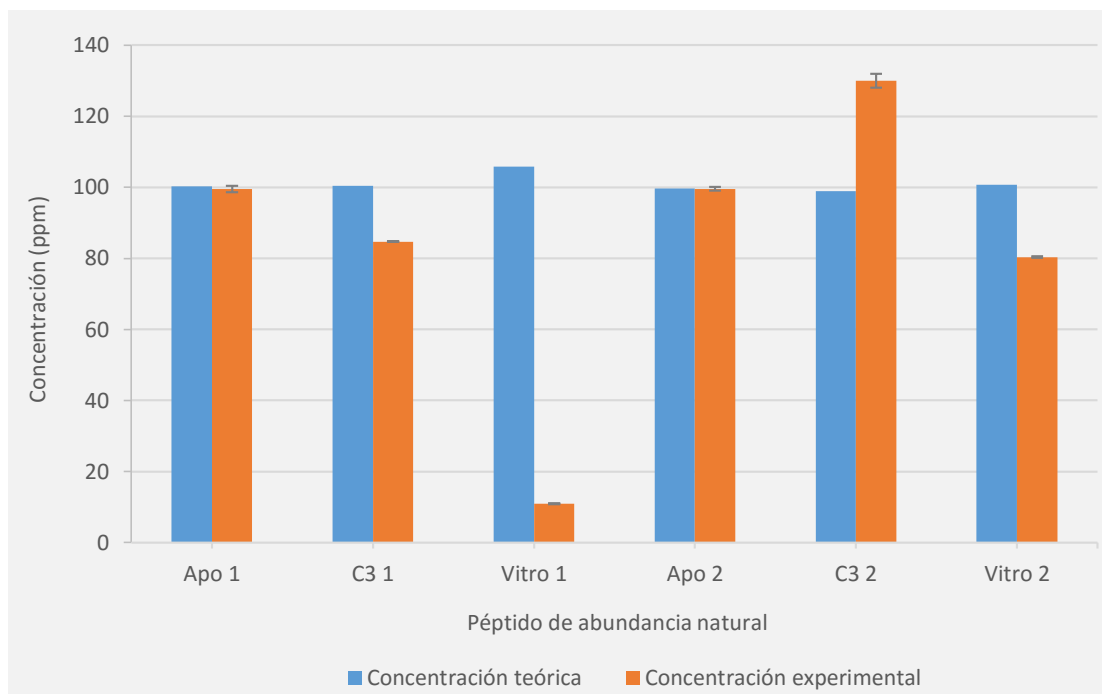


Figura 24: Representación de la concentración esperada (azul) y experimental (naranja) de los péptidos de abundancia natural en el estudio de recuperaciones individuales

A partir de los resultados que se muestran en la Figura 24 se obtuvieron los valores de recuperación que se muestran en la siguiente Tabla 13 por aplicación de la Ecuación (15).

Tabla 13: Recuperaciones obtenidas de los seis péptidos de abundancia natural empleando péptidos enriquecidos isotópicamente como referencia. La incertidumbre de las recuperaciones corresponde con la desviación estándar de tres mezclas independientes.

Péptido de abundancia natural	Concentración teórica (ppm)	Concentración experimental (ppm)	Recuperación (%)
Apo 1	100,3	99,5 ± 0,9	99,2 ± 0,9
C3 1	100,5	84,72 ± 0,09	84,29 ± 0,09
Vitro 1	105,9	10,93 ± 0,2	23,13 ± 0,3
Apo 2	99,72	99,6 ± 0,5	99,8 ± 0,5
C3 2	98,9	130 ± 2	131 ± 2
Vitro 2	100,72	80,35 ± 0,2	79,8 ± 0,2

A partir de los datos que se muestran en la Figura 24 y los recogidos en la Tabla 13 se puede establecer que para los péptidos Apo 1 y Apo 2, respectivamente, la recuperación es prácticamente del 100%. Los péptidos C3 1 y Vitro 2, respectivamente, muestran recuperaciones entorno al 80%. Sin embargo, los péptidos C3 2 y Vitro 1 experimentan, respectivamente, recuperaciones del 131% y 23,13%. Estos resultados se podrían achacar a la falta de un medio de disolución óptimo para el conjunto de los seis péptidos, tarea en la que el GIEE se encuentra inmerso.

5. CONCLUSIONES

En base a los Objetivos establecidos en el Capítulo 2 y los resultados expuestos en el Capítulo 4 se puede concluir que:

- Se han optimizado los parámetros de la fuente de ionización ESI *Jet Stream* con disoluciones individuales de los seis péptidos estudiados a lo largo de este TFM, encontrándose valores óptimos para cada uno de ellos. De esta manera, se seleccionaron unos valores de compromiso para cuando se trabaja con mezclas de los seis péptidos.
- Se ha determinado la pureza espectral de los péptidos de abundancia natural en modo de adquisición SIM y SRM a baja resolución, obteniéndose factores de fraccionamientos concordantes y se ha determinado el enriquecimiento isotópico de los seis péptidos enriquecidos isotópicamente.
- Se ha evaluado el tiempo de hidrólisis enzimática de las tres proteínas objetivo requerido para que ésta sea cuantitativa, siendo el tiempo óptimo de digestión de 60 minutos para la proteína Apo, 300 minutos para la proteína Vitro y 360 minutos para la proteína C3.
- Se han optimizado los anchos de ventana para el análisis por el método de adquisición SRM a baja resolución, siendo de 10 u para los péptidos Vitro1, Apo 1 y Vitro 2, y de 9 u para los péptidos C3 1, Apo 2 y C3 2.
- Se han realizado estudios de recuperación con mezclas individuales de los péptidos de abundancia natural, empleando como referencia los péptidos enriquecidos isotópicamente, siendo las recuperaciones obtenidas del 23,13 % para el péptido Vitro 1; 79,8 % para Vitro 2; 84,29% para C3 1; 131 % para C3 2 y 99,2% para Apo 1 y 99,8% para Apo 2.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Pizzirani, "Definition, Classification, and Pathophysiology of Canine Glaucoma," *Vet. Clin. North Am. - Small Anim. Pract.*, vol. 45, no. 6, pp. 1127–1157, 2015.
- [2] C. McMonnies, "An examination of the hypothesis that intraocular pressure elevation episodes can have prognostic significance in glaucoma suspects," *J. Optom.*, vol. 8, no. 4, pp. 223–231, 2015.
- [3] C. Barbas-Bernardos, E. G. Armitage, A. García, S. Mérida, A. Navea, F. Bosch-Morell, y C. Barbas, "Looking into aqueous humor through metabolomics spectacles – exploring its metabolic characteristics in relation to myopia," *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 127, pp. 18–25, 2016.
- [4] "Wikipedia," *Ojo humano*. [En línea]. Disponible en: https://es.wikipedia.org/wiki/Ojo_humano#/media/File:Eyesection-es.svg. [Acceso: 10-May-2016].
- [5] B. M. Braunger, R. Fuchshofer, y E. R. Tamm, "The aqueous humor outflow pathways in glaucoma: A unifying concept of disease mechanisms and causative treatment," *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, vol. 95, pp. 173–181, 2015.
- [6] American Academy of Ophthalmology, "Capítulo 2 - Presión intraocular y dinámica del humor acuoso," en *Glaucoma*, ELSEVIER, 2006.
- [7] E. Sellem, "Glaucomas de ángulo abierto, por cierre de ángulo, secundarios," *EMC - Tratado Med.*, vol. 16, no. 2, pp. 1–5, 2012.
- [8] IMO, "IMO: Instituto de microcirugía ocular," *Infografía: la prevención del glaucoma*, 2014. [En línea]. Disponible en: <http://www.imo.es/2014/03/11/infografia-la-prevencion-del-glaucoma/>. [Acceso: 10-May-2016].
- [9] American Academy of Ophthalmology, "Capítulo 1 - Introducción al Glucoma: Terminología, epidemiología y genética," en *Glaucoma*, ELSEVIER, 2012.
- [10] C. W. McMonnies, "Intraocular pressure and glaucoma: Is physical exercise beneficial or a risk?," *J. Optom.*, vol. 9, no. 3, pp. 139–147, 2015.
- [11] B. T. Whigham y R. R. Allingham, "Review: The role of LOXL1 in exfoliation syndrome/glaucoma," *Saudi J. Ophthalmol.*, vol. 25, no. 4, pp. 347–352, 2011.
- [12] H. A. Quigley y A. T. Broman, "The number of people with glaucoma worldwide in 2010

- and 2020.,” *Br. J. Ophthalmol.*, vol. 90, no. 3, pp. 262–7, 2006.
- [13] E. Viso, M. T. Rodríguez-Ares, y F. Gude, “Prevalence of pseudoexfoliation syndrome among adult Spanish in the Salnés eye Study,” *Ophthalmic Epidemiol.*, vol. 17, no. 2, pp. 118–124, 2010.
- [14] “OMS | Ceguera y discapacidad visual,” *WHO*, 2015.
- [15] P. José Manuel Díaz, “Prevención y tratamiento actual del glaucoma,” *Rev. Médica Clínica Las Condes*, vol. 21, no. 6, pp. 891–900, 2010.
- [16] H. González-Iglesias, L. Álvarez, M. García, J. Escribano, P. P. Rodríguez-Calvo, L. Fernández-Vega, y M. Coca-Prados, “Comparative proteomic study in serum of patients with primary open-angle glaucoma and pseudoexfoliation glaucoma,” *J. Proteomics*, vol. 98, pp. 65–78, 2014.
- [17] R. C. Diez, J. J. Román, y M. J. I. Barbosab, “Concepto de sospecha de glaucoma de Ángulo abierto: Definición, diagnóstico y tratamiento,” *Rev. Mex. Oftalmol.*, vol. 88, no. 4, pp. 153–160, 2014.
- [18] L. Agnifili, D. Pieragostino, A. Mastropasqua, V. Fasanella, L. Brescia, G. M. Tosi, P. Sacchetta, y L. Mastropasqua, *Molecular biomarkers in primary open-angle glaucoma: From noninvasive to invasive*, 1st ed., vol. 221. Elsevier B.V., 2015.
- [19] N. Rifai, M. a Gillette, y S. a Carr, “Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 24, no. 8, pp. 971–983, 2006.
- [20] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, y L. Stryer, “Capítulo 3 - Investigación en proteínas y proteomas,” in *Bioquímica*, Editorial Reverté, 2007, pp. 66–67.
- [21] B. Domon y R. Aebersold, “Mass spectrometry and protein analysis.,” *Science*, vol. 312, no. 5771, pp. 212–7, 2006.
- [22] R. Aebersold y D. Goodlett, “Mass Spectrometry in Proteomics,” *Chem Rev*, vol. 101, pp. 269–296, 2001.
- [23] R. Aebersold y M. Mann, “Mass spectrometry-based proteomics.,” *Nature*, vol. 422, no. 6928, pp. 198–207, 2003.
- [24] P. Edman, “Method for determination of the amino acid sequence in peptides,” *Acta Chemica Scandinavica*, vol. 4, no. 4. pp. 283–293, 1950.

- [25] J. Fenn, M. Mann, C. Meng, S. Wong, y C. Whitehouse, "Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules," *Science (80-.)*, vol. 246, no. 4926, pp. 64–71, 1989.
- [26] M. Karas y F. Hillenkamp, "Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons.," *Anal. Chem.*, vol. 60, no. 20, pp. 2299–2301, 1988.
- [27] University of Alabama at Birmingham, "Electrospray ionization (ESI)." [En línea]. Disponible en: <http://www.uab.edu/proteomics/massspec/education/images/ESI-600.png>. [Acceso: 17-Jul-2016].
- [28] Z. Yan, G. W. Caldwell, W. J. Jones, y J. A. Masucci, "Cone voltage induced in-source dissociation of glucuronides in electrospray and implications in biological analyses," *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 17, no. 13, pp. 1433–1442, 2003.
- [29] P. Rodríguez-González y J. I. García Alonso, "The Electrospray Ion Source," in *Isotope Dilution Mass Spectrometry*, 2013, pp. 300–301.
- [30] M. Dziadosz, J. P. Weller, M. Klintschar, y J. Teske, "Adduct supported analysis of γ -hydroxybutyrate in human serum with LC-MS/MS," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 405, no. 20, pp. 6595–6597, 2013.
- [31] N. B. Cech y C. G. Enke, "Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals," *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 20, no. 6, pp. 362–387, 2001.
- [32] C. Wang, H. He, J. Zhang, X. Li, y Z. Ma, "High performance liquid chromatography (HPLC) fingerprints and primary structure identification of corn peptides by HPLC-diode array detection and HPLC-electrospray ionization tandem mass spectrometry," *J. Food Drug Anal.*, vol. 24, no. 1, pp. 95–104, 2016.
- [33] E. Ollikainen, A. Bonabi, N. Nordman, V. Jokinen, T. Kotiaho, R. Kostianen, y T. Sikanen, "Rapid separation of phosphopeptides by microchip electrophoresis–electrospray ionization mass spectrometry," *J. Chromatogr. A*, vol. 1440, pp. 249–254, 2016.
- [34] J. F. Pickup y K. McPherson, "Theoretical considerations in stable isotope dilution mass spectrometry for organic analysis," 2002.
- [35] V. Brun, C. Masselon, J. Garin, y A. Dupuis, "Isotope dilution strategies for absolute quantitative proteomics," *J. Proteomics*, vol. 72, no. 5, pp. 740–749, 2009.
- [36] Y. Oda, K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn, y B. T. Chait, "Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol.

96, no. 12, pp. 6591–6, Jun. 1999.

- [37] B. T. Chait, D. Cowburn, y Y. Oda, “Method for the comparative quantitative analysis of proteins and other biological material by isotopic labeling and mass spectroscopy,” 6391649, 2002.
- [38] C. Fenselau y X. Yao, “¹⁸O₂-labeling in quantitative proteomic strategies: a status report.,” *J. Proteome Res.*, vol. 8, pp. 2140–2143, 2009.
- [39] S. P. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, y R. Aebersold, “Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags.,” *Nat. Biotechnol.*, vol. 17, no. 10, pp. 994–9, 1999.
- [40] J. Li, H. Steen, y S. P. Gygi, “Protein profiling with cleavable isotope-coded affinity tag (cICAT) reagents: the yeast salinity stress response,” *Mol Cell Proteomics*, vol. 2, no. 11, pp. 1198–1204, 2003.
- [41] P. L. Ross, Y. N. Huang, J. N. Marchese, B. Williamson, K. Parker, S. Hattan, N. Khainovski, S. Pillai, S. Dey, S. Daniels, S. Purkayastha, P. Juhasz, y S. Martin, “Multiplexed Protein Quantitation in,” *Mol. Cell. Proteomics*, pp. 1154–1169, 2004.
- [42] M. Fountoulakis y H. W. Lahm, “Hydrolysis and amino acid composition of proteins.,” *J. Chromatogr. A*, vol. 826, no. 2, pp. 109–34, Nov. 1998.
- [43] J. R. Barr, V. L. Maggio, D. G. Patterson, G. R. Cooper, L. O. Henderson, W. E. Turner, S. J. Smith, W. H. Hannon, L. L. Needham, y E. J. Sampson, “Isotope dilution--mass spectrometric quantification of specific proteins: model application with apolipoprotein A-I.,” *Clin. Chem.*, vol. 42, no. 10, pp. 1676–82, Oct. 1996.
- [44] V. Brun, A. Dupuis, A. Adrait, M. Marcellin, D. Thomas, M. Court, F. Vandenesch, y J. Garin, “Isotope-labeled protein standards: toward absolute quantitative proteomics.,” *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 6, no. 12, pp. 2139–49, Dec. 2007.
- [45] A. Dupuis, J. A. Hennekinne, J. Garin, y V. Brun, “Protein Standard Absolute Quantification (PSAQ) for improved investigation of staphylococcal food poisoning outbreaks,” *Proteomics*, vol. 8, no. 22, pp. 4633–4636, 2008.
- [46] S. a Gerber, J. Rush, O. Stemman, M. W. Kirschner, y S. P. Gygi, “Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 12, pp. 6940–6945, 2003.
- [47] R. J. Beynon, M. K. Doherty, J. M. Pratt, y S. J. Gaskell, “Multiplexed Absolute

Quantification in Proteomics using Artificial QCAT Proteins of Concatenated Signature Peptides.,” *Nat. Methods*, vol. 2, no. 8, pp. 587–589, 2005.

- [48] A. González-Antuña, P. Rodríguez-González, R. Ohlendorf, A. Henrion, V. Delatour, y J. I. García Alonso, “Determination of Cystatin C in human serum by isotope dilution mass spectrometry using mass overlapping peptides,” *J. Proteomics*, vol. 112, pp. 141–155, 2014.
- [49] A. González-Antuñaa, P. Rodríguez-González, y J. I. García Alonso, “Determination of the enrichment of isotopically labelled molecules by mass spectrometry,” *J. Mass Spectrom.*, vol. 49, no. 8, pp. 681–691, 2014.
- [50] D. Presser, “Agilent 6400 Series Triple Quadrupole QQQ Method Development and Optimization Triple Quadrupole LC/MS/MS Users Session and Optimization MassHunter Quant: Method setup Peak detection optimization Q Quant troubleshooting,” 2009.
- [51] J. A. Caruso, H. Emons, G. Hieftje, K. Jinno, U. Karst, G. Marko-Varga, J. Pawliszyn, y S. Richardson, “Electrospray Operational Parameters in TOF-MS,” in *Comprehensive Analytical Chemistry - Volumen 58*, ELSEVIER.
- [52] L. Ramaley y L. C. Herrera, “Software for the calculation of isotope patterns in tandem mass spectrometry,” *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, vol. 22, no. 17, pp. 2707–2714, Sep. 2008.