



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

Análisis cuantitativo de péptidos/proteínas intactas o modificados post-traduccionalmente mediante HPLC y Espectrometría de masas.

Montserrat Redondo Velasco

Oviedo, septiembre 2020

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxiribonucleico.

Ar: Argón.

Arg: Arginina.

ARN: Ácido Ribonucleico.

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero.

ARNt: Ácido Ribonucleico de transferencia.

Asn: Asparagina.

ATP: Adenosín fosfato.

BNPP: Bis-4-nitrophenyl-phosphate.

Boc-Met: Boc Methionine.

C: Carbón.

Ca: Calcio.

capHPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia capilar.

CH₄: Metano.

CO₂: Dióxido de carbono.

ELISAs: Inmunoensayos enzimáticos heterogéneos específicos.

ESI: Ionización por electrospray.

Fe: Hierro.

FIA: Flow Injection Analysis

Gln: Glutamina.

GPI anchor: Anclaje de glicosilfosfatidilinositol.

H: Hidrógeno.

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia.

ICAT: Isotope-coded affinity tags.

ICP: Plasma Acoplado inductivamente.

ICPQQQ: Plasma acoplado inductivamente con triple cuadrupolo.

ICP-MS: Plasma acoplado inductivamente con analizador de masas.

ICP-MS/MS: Plasma acoplado inductivamente con analizador de masas en tandem.

IDA: Dilución isotópica.

IMAC: Cromatografía de afinidad con metales.

LC-MS: Cromatografía de líquidos con espectrometría de masas.

LODs: Límite de detección.

Lys: Lisina.

MALDI: Desorción/ionización mediante láser asistida por Matriz.

MOAC: Cromatografía de afinidad con óxidos metálicos.

MS: Espectroscopía de masas.

m/z: Relación masa carga.

O: Oxígeno.

P: Fosforo.

PTMs: Modificaciones post-traduccionales.

pSer: Fosforserina.

pThr: Fosfotreonina.

pTyr: Fosfotirosina.

Q: Cuadrupolo.

S: Azufre.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico.

Se: Selenio.

Ser: Serina.

sTyr: Sulfotirosina.

Thr: Treonina.

TOF: Tiempo de vuelo.

Tyr: Tirosina.

%RSD: Desviación estándar relativa.

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Listado de Figuras:

Figura 1: Estructura de un aminoácido. Figura adaptada Branden et al. [1].	1
Figura 2: Niveles estructurales en las proteínas. Figura adaptada Brandem et al. [1].	2
Figura 3: Proceso de fosforilación/desfosforilación en las proteínas.	5
Figura 4: IMAC (izquierda) y MOAC (derecha). Grimsrud et al. [21].	8
Figura 5: Inmunoprecipitación (residuo Tyr). Grimsrud et al. [21].	8
Figura 6: Modo “mass-shift” para el elemento ^{32}S en el ICP-MS/MS. Figura adaptada Diez et al. [34].	16
Figura 7: Nebulizador de Consumo Total con entrada de flujo de gas opcional al plasma [31].	18
Figura 8: HPLC capilar Agilent 1200 series y horno de columna Spark Holland.	23
Figura 9: HPLC (Agilent 1260 Infinity II, Alemania).	24
Figura 10: ICP-MS triple Quad 8800 de Agilent.	24
Figura 11: Estructura de la Boc-Met (izquierda) y estructura del BNPP (derecha).	26
Figura 12: FIagrama para el S. Se muestra la Boc-Met y el patrón inorgánico de S con sus correspondientes concentraciones.	29
Figura 13: FIagrama para el P. Se muestra el BNPP y el patrón inorgánico de P con sus correspondientes concentraciones.	29
Figura 14: Representación de la recta de calibrado para el S. Se representa el área frente a la concentración de patrón en ppb.	30
Figura 15: Representación de la recta de calibrado para el P. Se representa el área frente a la concentración de patrón en ppb.	30
Figura 16: Representación gráfica de la intensidad de señal frente al %ACN para cada uno de los flujos de Ar:CO ₂ en el caso del S.	32
Figura 17: Representación gráfica de la intensidad de señal frente al %ACN para cada uno de los flujos de Ar:CO ₂ en el caso del P.	32

Figura 18: "Heat map". Se representa la variación de la señal a lo largo del gradiente cromatográfico con la %RSD acumulada para cada uno de los flujos y %ACN para el S.	33
Figura 19: "Heat map". Se representa la variación de la señal a lo largo del gradiente cromatográfico con la %RSD acumulada para cada uno de los flujos y %ACN para el P.	33
Figura 20: Mapa 3D para el S. Se representa el incremento de sensibilidad en la señal para cada uno de los flujos Ar:CO ₂ y %ACN, en un gradiente del 2% al 70% de ACN.	34
Figura 21: Mapa 3D para el P. Se representa el incremento de sensibilidad en la señal para cada uno de los flujos Ar:CO ₂ y %ACN, en un gradiente del 2% al 70% de ACN.	35
Figura 22: Posición de carga (izquierda) y de inyección (derecha) de la válvula del equipo HPLC Agilent 1260 Infinity II.....	36
Figura 23: FIagrama Patrones de S y P inorgánicos y β-Caseína al 2% de Fase móvil B.....	37
Figura 24: Cromatograma β-Caseína. Señal de S en naranja, señal de P en azul.....	38

Listado de Tablas:

Tabla 1: Principales modificaciones post-traduccionales [10].....	4
Tabla 2: Ventajas e inconvenientes de la fuente de ionización ESI y MALDI [8,25, 26,27,28].....	11
Tabla 3: Ventajas y desventajas del análisis de péptidos y proteínas mediante MS elemental [31].	16
Tabla 4: Gradiente empleado para el análisis de β-caseína.....	27
Tabla 5: Concentraciones de S para la Boc-Met y P para el BNPP obtenidas con la desviación estándar combinada, teniendo en cuenta el factor respuesta y el análisis individual de la concentración del patrón certificado (n=4).	31
Tabla 6: Recuperación cromatográfica para el S en la β-Caseína con la desviación estándar combinada, teniendo en cuenta el factor respuesta (n=3) y el análisis individual de la recuperación de la proteína (n=2).	38

Tabla 7: Concentraciones de S teóricas y experimentales de proteína con la desviación con la desviación estándar combinada teniendo en cuenta el factor de respuesta (n=3) y el análisis individual de la proteína por FIA (n=3) o por HPLC (n=2). 40

Tabla 8: Grado de fosforilación teórico y experimental con su desviación estándar combinada teniendo en cuenta el factor de respuesta (n=3) y el análisis individual de la proteína por FIA (n=3) o por HPLC (n=2). 40

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Importancia de las proteínas en procesos biológicos.....	1
1.1.1 Importancia del proteoma y de su estudio.....	3
1.1.2 Modificaciones post-traduccionales (PTMs)	3
1.1.3 Fosfoproteínas	5
1.2 Importancia de la espectrometría de masas para el análisis cuantitativo de proteínas intactas y péptidos	9
1.2.1 Fuentes de ionización débiles: ESI/MALDI.....	10
1.2.2 Espectrometría de masas elemental. Cuantificación absoluta de péptidos y proteínas	13
2. OBJETIVOS	22
3. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS.....	23
3.1 Instrumentación	23
3.2 Reactivos.....	25
4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.....	26
4.1 Análisis de patrones de S y P por FIA-ICP-QQQ	26
4.2 Corrección de la señal mediante flujo de CO ₂	26
4.3 β-Caseína.....	27
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1 Análisis de patrones de S y P por FIA-ICP-QQQ	29
5.2 Corrección de la señal mediante flujo de CO ₂	31
5.3 β-Caseína.....	35
6. CONCLUSIONES.....	42
7. ANEXOS	43
8. BIBLIOGRAFÍA	44

1.INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia de las proteínas en procesos biológicos

Las proteínas son macromoléculas biológicas formadas por largos polímeros de aminoácidos, las cuales se encuentran en todas las células. Presentan propiedades catalíticas actuando como enzimas, son elementos estructurales, receptores de señales o transportadoras de sustancias. En la naturaleza hay 20 aminoácidos diferentes, siendo todos ellos α -aminoácidos. La posibilidad de combinaciones entre ellos hace posible la presencia de diversas proteínas con características diferentes. Todos los aminoácidos en su estructura presentan un átomo central de carbono (C_{α}) en el cual se encuentran unidos un grupo carboxilo y otro amino y diferenciándose únicamente por la presencia de una cadena lateral R la cual varía en cuanto tamaño, carga eléctrica, solubilidad en agua y estructura como se muestra en la Figura 1.

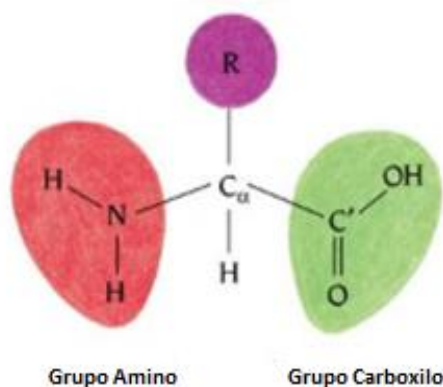


Figura 1: Estructura de un aminoácido. Figura adaptada Branden et al. [1].

Las proteínas presentan cuatro niveles de estructura:

- Estructura primaria: Se basa en la formación de enlaces covalentes (enlaces peptídicos) que une a los aminoácidos en una cadena polipeptídica. Los enlaces peptídicos se forman por la condensación de un grupo carboxilo de un aminoácido con el grupo amino del siguiente dando lugar a la eliminación de una molécula de agua. Este proceso se repite durante la elongación de la cadena [1].
- Estructura secundaria: Disposición estable de esos aminoácidos, en ella se forman enlaces de hidrógeno entre los grupos amino y carboxilo, la más común es la hélice α [2].

- Estructura terciaria: Estructura tridimensional en la cual se generan unos dominios compactos a partir de los pliegues de las cadenas lineales formadas por secuencias particulares de aminoácidos. Puede estabilizarse mediante la formación de enlaces disulfuro, por oxidación de dos aminoácidos de cisteína o mediante enlaces de tipo no covalente como es el caso de los puentes de hidrógeno. Las propiedades funcionales y biológicas de la proteína dependen principalmente de esta estructura terciaria [1].
- Estructura cuaternaria: Se basa en la unión de varias subunidades polipeptídicas [2]. En la Figura 2 se muestran los diferentes niveles estructurales de las proteínas.

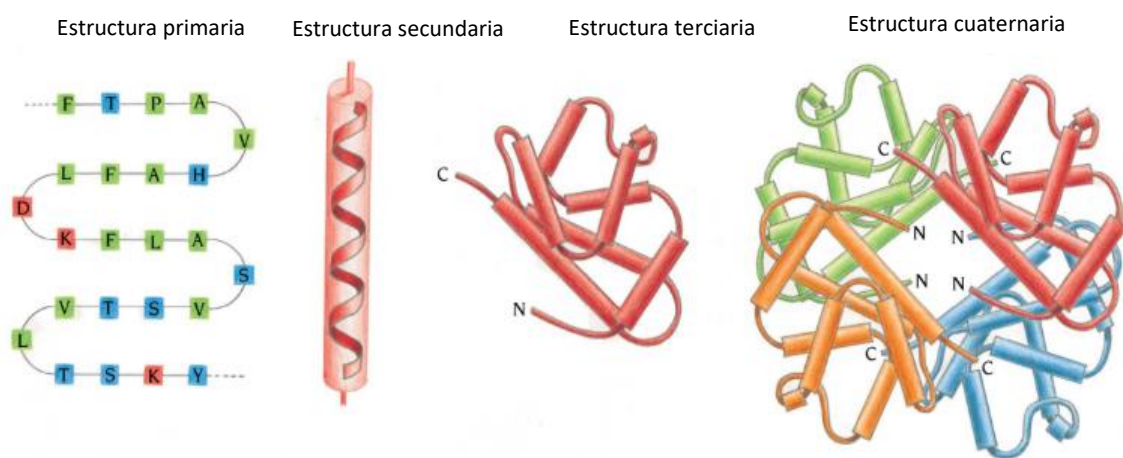


Figura 2: Niveles estructurales en las proteínas. Figura adaptada Brandem et al. [1].

Las proteínas son sintetizadas en los ribosomas, para ello es necesario la formación del Ácido ribonucleico mensajero (ARNm). Las secuencias de Ácido desoxirribonucleico (ADN), que se encuentran dentro de la membrana nuclear, mediante la enzima ARN polimerasa son copiadas a ARNm que permite abandonar la membrana nuclear. El ARNm está formado por una única hebra del ADN inicial, Por otro lado, el ARN de transferencia (ARNt) es el encargado de proporcionar los aminoácidos al ribosoma. Este posee una secuencia de tres pares de bases denominado anticodón mediante el cual se une al ARNm proporcionando la especificidad aminoácido-codón según el código genético [2].

1.1.1 Importancia del proteoma y de su estudio

Se calcula que de los 3000 genes que componen el genoma humano, pueden dar lugar a más de un millón de proteínas, por lo que es necesario conocer las funciones biológicas de estos productos génicos [3]. El conjunto de las proteínas de un organismo biológico es a lo que se le denomina proteoma. El estudio de este proteoma es a lo que se le denomina proteómica [4]. Este estudio, presenta una mayor complejidad que el estudio del genoma debido a que un solo gen puede dar lugar a varias proteínas durante la transcripción génica, las cuales a su vez pueden sufrir modificaciones post-traduccionales (PTMs) [3]. Asimismo, el genoma humano es constante a lo largo de su vida y el proteoma tiene un carácter dinámico [5]. El proteoma no solo se basa en el estudio de las proteínas, dado que, al tener este carácter dinámico, también estudia las posibles interacciones entre las proteínas, su identificación y sus posibles modificaciones [6].

El conocimiento sobre estas propiedades de las proteínas da información sobre el funcionamiento del organismo [6]. Su campo de aplicación está ligado a áreas como la biomedicina, en la cual los niveles de proteína puede ser indicadores de diversas patologías o biomarcadores dando lugar al diagnóstico de enfermedades y el posible desarrollo de nuevos medicamentos [7]. Uno de los objetivos principales actualmente en proteómica es la cuantificación absoluta de proteínas [8].

1.1.2 Modificaciones post-traduccionales (PTMs)

Las PTMs tienen lugar una vez que las proteínas son traducidas en el ribosoma, y estas dependerán de la proteína a la cual se asocian, la célula donde se encuentra y los demás factores ambientales [6]. Estas modificaciones son de carácter covalente y modulan las interacciones moleculares, la localización de las proteínas y su estabilidad [9]. Además, regulan la actividad de las proteínas en la mayoría de las células eucariotas, cambiando las propiedades de la proteína mediante una adición de un grupo modificador a uno o más aminoácidos. Se conocen 300 tipos de PTMs, algunas de las más importantes se encuentran recogidas en la Tabla 1.

Tabla 1: Principales modificaciones post-traduccionales [10].

Tipo de PTMs	Aminoácido	Comentarios
Fosforilación	pTyr, pSer, pThr	De carácter reversible, da lugar a la activación y desactivación enzimática, control de interacciones moleculares.
Acetilación	Residuos N-terminal, Lys	Regulación de las interacciones entre ADN y proteínas y entre proteína, Estabilidad y actividad de proteínas.
Metilación	Arg, Lys, N-terminus	Regulación de la expresión de los genes
Acilación	Lys, Thr, Ser, N-terminus	Localización y actividad de la proteína, incluido la interacciones entre proteínas y proteína con la membrana, transmisión de señales.
Glicosilación	“N-linked” (Asn) “O-linked” (Ser, Thr) GPI anchor	Reversible, estabilidad de la proteína, solubilidad, señal de secreción, regulación de interacciones, reconocimiento extracelular e interacciones.
Sulfonación	sTyr	Localización de proteínas, regulación de las interacciones entre proteínas y entre receptor ligando.
Formación de enlaces disulfuro	Cys	Cruce intra e intermolecular, estabilidad de proteínas.
Deamidación	Asn, Gln	Regulación de las interacciones entre proteínas y entre proteína y ligando.

Tradicionalmente se estudiaban de manera individual cada PTMs en cada uno de los aminoácidos de una proteína determinada. En la actualidad, se conoce que estas modificaciones no tienen lugar de manera individual en sitios determinados, ya que ocurren en un conjunto con el fin de ajustar las interacciones moleculares, modular la actividad y estabilizar la proteína en general [11].

La identificación de las proteínas que sufren las PTMs, la localización de los aminoácidos en los cuales tienen lugar, la cuantificación y la caracterización de esas PTMs dentro de las proteínas, presenta una importancia a la hora de conocer los procesos biológicos. Sin embargo, presenta una dificultad ya que las PTMs se encuentran a niveles subestequiométricos en las proteínas, como es el caso de la fosforilación la cual tiene lugar en torno al 5% de la proteína [12].

1.1.3 Fosfoproteínas

Desde su primera detección en glucógeno fosforilasa en 1955, la fosforilación se ha convertido en un objetivo de estudio en cuanto al área de proteómica [13]. Se basa en un proceso reversible que tiene lugar en las células mamífera, de tal manera que un tercio de las proteínas se une covalentemente a un grupo fosfato a lo largo de su vida. La fosforilación puede tener lugar en diferentes sitios de la proteína para permitir a esta adoptar diferentes funciones. Por lo tanto, una misma proteína puede presentar diferentes formas de fosforilación, siendo este un proceso dinámico [14]. Se estima que el 30% de todas las proteínas celulares son fosforiladas, en diversos sitios y cada fosforilación podría tener un efecto distinto en la función de las proteínas [12].

Hay dos grupos de enzimas, las quinasas y fosfatasa las cuales se encargan de mantener el control espacial y temporal de los procesos tanto de fosforilación como desfosforilación [14], procesos que se muestran en la Figura 3. Las quinasas catalizan la transferencia de grupos fosforilos de un compuesto de alta energía como es el caso del Adenosín trifosfato (ATP) al grupo hidroxilo presente en las cadenas laterales de los aminoácidos de Serina (Ser), Treonina (Thr) y Tirosina (Tyr) [15]. Estas dos enzimas constituyen el 2% de los genes del genoma humano [12].

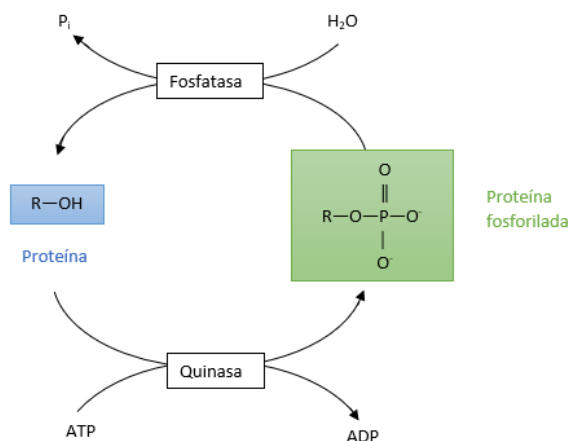


Figura 3: Proceso de fosforilación/desfosforilación en las proteínas.

La fosforilación en las proteínas ocurre de manera reversible pudiendo producir cambios en la función de las proteínas a través de alteraciones enzimáticas, cambios en la estabilidad de la proteína o variación en la interacción de proteínas durante un corto periodo de tiempo [14]. Además, desempeña un papel clave en la transferencia de información dentro de la célula que gobierna las vías de transducción de señales, en la comunicación intercelular durante el desarrollo, en la activación del sistema inmune y en el funcionamiento del sistema nervioso [12]. De esta manera el nivel de fosforilación de proteínas en las células está directamente relacionado con la actividad celular y de las proteínas y por lo tanto un cambio en el grado de fosforilación puede dar lugar a enfermedades [16] como el cáncer [11] o el Alzheimer [17].

Teniendo en cuenta la importancia de la fosforilación en las proteínas, se describen posteriormente las metodologías usadas tradicionalmente para su medida.

Una de las metodologías más empleadas, es la llamada electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE), en la cual es posible la separación y el aislamiento de proteínas, pudiendo incluso resolver las diferentes PTMs de una proteína específica.

Para la detección de fosfoproteínas, se usa el marcaje de proteínas ^{32}P "in vitro" o "in vivo" a través de ATP marcado. Esta técnica se combina con el uso de geles de electroforesis (1D y 2D) y permite la comparación de dos niveles de expresión de la fosforilación en dos estados celulares diferentes mediante la detección del isótopo en las bandas de las proteínas mediante una película autorradiografiada o con equipos de imágenes digitales [18]. Sin embargo, el uso de materiales radioactivos puede causar problemas para el operario, alterar los niveles de fosforilación, causar daños celulares y no conseguir cuantificaciones con una alta precisión [19].

Estas limitaciones de la técnica conllevaron al desarrollo de alternativas en las cuales no se usaban métodos radioactivos, sino que se usaban anticuerpos específicos a los aminoácidos fosforilados como es el caso de "Western-blot", la cual requiere la disponibilidad de estos anticuerpos específicos de alta calidad. Para el análisis de fosfoproteínas, la Fosfoserina (pSer), Fosfoteonina (pThr) y Fosfotirosina (pTyr) representan los principales epítomos los cuales serán reconocidos por los anticuerpos. Los anticuerpos específicos se encuentran en una membrana sólida en la cual se transferirá el gel 1D o 2D donde se habrá realizado la separación de las proteínas. Haciendo uso de los fosfoanticuerpos, ha sido posible el desarrollo de inmunoensayos enzimáticos heterogéneos específicos (ELISAs) para proteínas fosforiladas, siendo los más utilizados los ELISAs tipo sándwich. En este caso se genera un producto coloreado

el cual se puede medir espectrofotométricamente, tras la adición de los anticuerpos y sustratos. A pesar de proporcionar una cuantificación absoluta, esta técnica presenta las mismas limitaciones que la técnica de “Western-Blot” a la hora de disponer de anticuerpos fosforilados [20].

También se usa la tinción directa de fosfoproteínas la cual tiene lugar de manera muy sencilla mediante el uso de reactivos diseñados selectivamente a esas fosfoproteínas directamente sobre el gel. Se usa para el análisis de células, tejidos u organismos, pero presenta una baja selectividad y sensibilidad [12].

Teniendo en cuenta la dificultad a la hora de detectar o caracterizar esas PTMs, se usan estrategias de purificación de los orgánulos o especies proteicas de interés [11]. Las estrategias de enriquecimiento más usadas son la cromatografía de afinidad con metales (IMAC) e Inmunoprecipitación [12]. También se usan como alternativa, la cromatografía de afinidad con óxidos metálicos (MOAC) [21].

- IMAC: Algunos iones metálicos como son el Fe^{3+} y Ga^{3+} presentan la capacidad de reaccionar con un aminoácido que se encuentre fosforilado con el fin de reducir la complejidad de una muestra para poder analizar proteínas minoritarias [11,12]. Esto se debe a que los metales se encuentran cargados positivamente lo cual permite la unión de los grupos fosfatos que se encuentran cargados negativamente. Es necesario realizar una derivatización de los péptidos mediante una esterificación metílica haciendo selectiva la técnica a los fosfopéptidos y eliminando así las posibles uniones inespecíficas a los grupos carboxilos [22].
- MOAC: Surgió como alternativa al IMAC, se basa en el empleo de óxidos metálicos como el TiO_2 . Esta estrategia permite una mayor selectividad y recuperación de fosfopéptidos [21]. Ambas técnicas de cromatografía de afinidad se muestran en la Figura 4.



Figura 4: IMAC (izquierda) y MOAC (derecha). Grimsrud et al. [21].

- Inmunoprecipitación: se utilizan anticuerpos específicos al fosforo al igual que en el caso de “Western Blot”. Después de la esta se pueden usar métodos analíticos como la electroforesis en gel 1D y 2D. Al presentar una dificultad en la caracterización se suelen usar métodos de marcaje con isótopos estables. Este último método es específico para residuos de Tyr [12] como se muestra en la Figura 5.

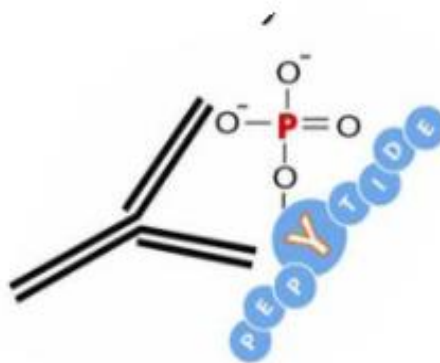


Figura 5: Inmunoprecipitación (residuo Tyr). Grimsrud et al. [21].

Estas técnicas de enriquecimiento son usadas previamente al análisis por espectrometría de masas (MS) molecular, como son el caso de las fuentes de ionización débiles explicadas en el apartado 1.2.1, debido a que, en estas técnicas, los péptidos no fosforilados causan interferencias dado su mayor facilidad de ionización y mayor abundancia, dificultando así la detección del péptido no fosforilado [23].

1.2 Importancia de la espectrometría de masas para el análisis cuantitativo de proteínas intactas y péptidos

En la mayoría de los estudios realizados en proteómica, se basan en la comparación del proteoma de una muestra con un estado de referencia, lo que se conoce como cuantificaciones relativas. En este caso tienen lugar cambios en determinadas muestras, tanto en expresión o regulación de las proteínas en al menos dos sistemas biológicos diferentes los cuales se compararán. Por otro lado, la cuantificación absoluta determina la cantidad o concentración total de una proteína de manera individual, siendo una herramienta más precisa y reproducible para aplicaciones en sistemas biológicos. Se pueden establecer mediante esta cuantificación absoluta modelos de interacción entre sistemas, para lo que es necesario conocer la concentración de proteína, sus cambios, la velocidad de degradación y los niveles de PTMs. Durante la preparación de la muestra, las proteínas pueden sufrir alguna pérdida o degradación dando lugar a una variación en el valor de concentración inicial [6].

Los avances en los últimos 20 años de la MS junto con las herramientas bioinformáticas la han convertido en una herramienta más que los métodos tradicionales para el estudio del proteoma [6]. Prueba de ello son su elevada sensibilidad y la posibilidad de detectar, secuenciar, identificar y cuantificar [24], no sólo las proteínas, si no también sus posibles PTMs en muestras de origen biológico [6,7]. A pesar de todos estos avances, hoy en día, la MS no ha reemplazado el empleo de inmunoensayos en el campo de análisis clínicos [6]. En el caso de MS molecular, en la cuantificación absoluta, es necesario el uso de patrones específicos para cada proteína o péptido con el fin de obtener una cuantificación absoluta ya que la señal obtenida mediante estas fuentes de ionización depende de la estructura de la molécula y de la matriz de la muestra, no pudiendo relacionar directamente con la concentración de analito. Por el contrario, en el caso de MS elemental se puede obtener una cuantificación absoluta sin la necesidad de patrones específicos de un péptido o proteína, lo cual supone una gran ventaja en la actualidad, al igual que la posibilidad del análisis de suero lo cual previamente con técnicas como "isotope-coded affinity tags" (ICAT), además de solo proporcionar una cuantificación relativa, solo era posible el análisis en cultivos [8].

Otra de las aplicaciones de la MS en proteómica es el estudio de las posibles PTMs en las proteínas, un ejemplo de ello es en el caso de la fosforilación en un residuo de aminoácido de Tyr el cual tiene una masa de 163 Da tras este proceso de modificación incrementa su masa a 243 Da por la adicción de un grupo HPO_3 (80Da), esto se observa

de manera directa en un incremento de masas en la proteína o el péptido tróptico por MS o por el residuo de aminoácido Tyr en MS/MS [11].

Esta técnica analítica, proporciona tanto información cuantitativa como cualitativa. Las moléculas se introducen en primer lugar en una fuente de ionización en la cual van a adquirir una carga positiva o negativa dando lugar a iones los cuales pasan a través de un analizador de masas separándose en función de su relación masa/carga (m/z) y llegando finalmente al detector dando lugar a unas señales representadas en espectros en el ordenador. Los espectros muestran la abundancia relativa de las especies en función de su relación m/z [25].

1.2.1 Fuentes de ionización débiles: ESI/MALDI

Con el fin de obtener información estructural de las proteínas, las fuentes de ionización más empleadas son ionización por electrospray (ESI) y desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) [8]. Estas fuentes de ionización se basan en la transformación de biomoléculas en fase líquida a iones en fase gas [26] haciendo posible la determinación de la secuencia de aminoácidos y péptidos [27].

ESI se basa en el estudio de muestras no volátiles, térmicamente lábiles y en disolución. En el caso de compuestos neutros se puede llevar a cabo su análisis mediante procesos de protonación [25]. Se produce tras la aplicación de un campo eléctrico fuerte, el cual se obtiene tras una diferencia de potencial de 3-6 kV, a presión atmosférica a un líquido el cual pasa a lo largo de un capilar, lo cual produce la nebulización de la muestra. Se produce una acumulación de cargas al final del capilar, el cual dará lugar a la formación de gotas, que se dispersan y se pulverizan en el espacio [27]. En el espectro obtenido en el caso de las proteínas y péptidos en los cuales ocurre la protonación es complicado a la hora de interpretar, esto se debe a que una sola proteína puede dar lugar a su clúster de iones característico con iones múltiplemente cargados. El número de cargas de molécula dependerá del peso molecular de esta y de los sitios básicos o ácidos accesibles [25].

En el caso de MALDI las muestras analizadas son de compuestos no volátiles y térmicamente lábiles como el caso de proteínas u oligonucleótidos. En primer lugar, la muestra se disuelve en un disolvente con moléculas orgánicas pequeñas el cual se denomina matriz. Estas moléculas se caracterizan por una absorción en las longitudes de onda del láser. Posteriormente se eliminan todos los restos de disolvente líquido que pudieran quedar en la mezcla anterior dando lugar a una solución sólida que se deposita sobre un cristal, el analito tiene que estar incorporado dentro de la matriz sobre el cristal.

En segundo lugar, en condiciones de alto vacío en el espectrómetro de masas se irradia mediante pulsos con el láser la solución sólida, dando lugar al paso de la matriz y el analito a fase gaseosa [27].

Las principales ventajas e inconvenientes de las fuentes de ionización débiles se encuentran recogidos en la Tabla 2.

Tabla 2: Ventajas e inconvenientes de la fuente de ionización ESI y MALDI [8,25, 26,27,28].

ESI	Ventajas	Análisis de biomoléculas de diversos tamaños y polaridades.
		Posibilidad de acoplarse a cromatografía de líquidos.
		Análisis más rápidos y con mayor rendimiento al usar MS en tándem.
		Análisis de proteínas con un peso molecular por encima de 100000u. Posibilidad de formación de iones multicargados y por lo tanto de análisis de proteínas largas e intactas.
	Inconvenientes	Sensible a las sales, disolventes y por la matriz de la muestra.
		Necesidad de muestras polares.
Necesidad de disolventes de carácter polar, normalmente acidificados, en donde el analito sea soluble.		
MALDI	Ventajas	Análisis directo de muestras en estado sólido.
		Técnica no destructiva.
		Menos sensible a sales y detergentes.
		Preparación de muestra sencilla.

		Al acoplarse con el analizador de masas de tiempo de vuelo (TOF), es capaz de analizar un amplio rango de masas mayores de 100000u.
		Posibilidad de repetir el análisis de una misma muestra.
		Posibilidad de análisis de imagen de proteínas.
	Inconvenientes	Poca reproducibilidad debido a la dependencia en el método de preparación de la muestra, por lo que dificulta la cuantificación.
		No se puede acoplar "on-line" a cromatografía.

1.2.1.1 Análisis de proteínas intactas o de péptidos mediante espectrometría de masas (estrategias Top-down y Bottom-up)

La intensidad de señal obtenida mediante estas fuentes de ionización débiles depende de la estructura de la molécula y de la matriz, no pudiéndose relacionar directamente con la concentración de analito, por lo que para obtener cantidades absolutas es necesario el uso de patrones específicos del analito de interés [8]. Para obtener esa cuantificación se pueden llevar a cabo dos metodologías diferentes:

Por un lado, es posible el uso de "Bottom up". La proteína se somete a un proceso de digestión enzimática a través del cual se obtienen sus péptidos correspondientes. Las proteínas se pueden identificar mediante comparación de los espectros de los péptidos correspondientes con unas bases de datos teóricas. La cuantificación de los péptidos se puede llevar a cabo mediante comparación de intensidades de los péptidos de la muestra con patrones específicos que se sintetizan químicamente incorporando isótopos enriquecidos [6]. Sin embargo, la digestión enzimática de las proteínas no suele realizarse de manera completa y reproducible, siendo esta una posible fuente de error en los análisis [16].

Por otro, es posible el uso de "Top down". Las proteínas son analizadas de forma directa, por lo que no es necesario la digestión enzimática siendo la preparación de muestra menor, disminuyendo así una posible fuente de error y menor pérdida de la muestra, lo que se traduce en un menor tiempo de análisis global. Además, se obtiene la secuencia completa de aminoácidos por lo que no se pierde información de las PTMs,

[6] y puede proporcionar la identificación de isoformas de proteínas procedentes de modificaciones en la cadena de aminoácidos, variaciones genéticas o en la transcripción y los posibles procesos proteolíticos de las proteínas [13].

1.2.2 Espectrometría de masas elemental. Cuantificación absoluta de péptidos y proteínas

Para la cuantificación absoluta de proteínas, una de las técnicas de MS elemental más empleada es el plasma acoplado inductivamente con analizador de masas (ICP-MS). Se basa en el análisis de muestras en disolución, emplea una fuente de ionización fuerte, un plasma de Argón (Ar) a presión atmosférica [29]. El plasma de Ar se forma por radiofrecuencias en la antorcha, la cual opera a una temperatura de 6000K y 10000K. Los iones formados en el canal central del ICP pasan a una interfase de extracción la cual se encuentra a vacío moderado de presión 1-2 torr, a través de unos orificios de dos conos de metal denominados “sampler” y “skimer”. Los iones posteriormente pasan a dos zonas de alto vacío en donde se encuentra un sistema de lentes de extracción que se encargan de enfocar el haz de iones hacia la celda de colisión si existe o directamente al analizador de masas en caso de ausencia de esta. Finalmente, el detector es el encargado de transformar el haz de iones en una señal eléctrica procesada. En principio la señal que se obtiene de los elementos no depende del entorno químico de estos. El alto vacío se genera mediante unas bombas turbomoleculares [29].

Los elementos como el C, H, N y O no se pueden medir mediante esta técnica debido a que se trabaja a presión atmosférica, esto puede suponer una desventaja al ser estos los elementos mayoritarios en las proteínas [6]. Al principio, el análisis de proteínas se basó en el análisis de metaloproteínas, pero se observó que la unión de los metales a la proteína era débil [29]. Actualmente estos análisis no solo se basan en los metales, sino que también es posible el análisis de otros heteroátomos presentes en las proteínas de manera natural mediante dilución isotópica (IDA), usando un patrón enriquecido en uno o en varios isótopos del heteroátomo, para la cuantificación absoluta de proteínas [7]. Otro método para llevar a cabo la cuantificación absoluta es el método de calibración directa el cual se realiza mediante curvas de respuesta o a través de adiciones estándar, ambos con patrones inorgánicos los cuales contengan el heteroátomo de interés o mediante el uso de patrones internos los cuales contengan también el heteroátomo de interés [30]. En esta cuantificación absoluta de proteínas, sin embargo, puede haber errores debido a las posibles pérdidas causadas durante la preparación de muestra [6].

1.2.2.1 Ventajas e inconvenientes del uso de la espectrometría elemental versus la molecular en proteómica

La principal ventaja de estos equipos es la obtención de una medida cuantitativa absoluta sin la necesidad de unos patrones específicos, como en el caso anterior, siempre que el analito contenga un elemento detectable por ICP. Además de los heteroátomos es posible realizar la medida de isótopos presentes o incluidos de manera artificial en la biomolécula [31]. Esto permite la posibilidad de un análisis tanto multi-elemental como multi-isotópico [32].

Sin embargo, presenta desventajas en cuanto la falta de información estructural y dificultad a la hora de identificar el péptido o la proteína, siendo necesario para ello procesos de separación previos [29].

La desventaja se encuentra en que en el caso de los elementos de mayor interés en las muestras biológicas como son el P, S, Se, Ca y Fe, se generan un gran número de interferencias poliatómicas debido a la formación de cluster por combinación con los elementos mayoritarios en el plasma como el C, N, O y Ar. Esta limitación se puede ver reducida por el uso de instrumentos que reduzcan estas interferencias como el caso del sector magnético o celdas de colisión/reacción. El aumento en la resolución del sector magnético produce una disminución en cuanto a la transmisión de los iones y por lo tanto en la sensibilidad. Por ello los instrumentos ICP con cuadrupolo se usan las celdas de colisión/reacción con gases de colisión como el H₂, He, O₂ y NH₃, pudiendo separar las interferencias de los iones determinados. Sin embargo, estas celdas también producen una disminución de la sensibilidad de otros elementos en cuanto a la capacidad del cuadrupolo para el caso de análisis multi-elemental. En la actualidad, se usan equipos como Plasmas acoplado inductivamente con espectrometría de masas en tandem (triple cuadrupolo, ICPQQQ) los cuales permiten una reducción de las interferencias y un control de las reacciones en fase gas obteniendo una alta sensibilidad [14].

1.2.2.2 Ventajas del ICP-MS/MS (en Tándem)

El uso de la MS en tándem minimiza las desventajas presentes en los equipos ICP-MS convencionales como la baja sensibilidad y selectividad para el caso de elementos no metálicos [7] y las interferencias poliatómicas [8]. La MS en tándem permite obtener unos límites de detección (LODs) menores para el caso de elementos no metálicos como el azufre y el fósforo y una mayor sensibilidad [7].

En el caso del plasma Acoplado Inductivamente con analizador de masas en Tándem (ICP-MS/MS), dependiendo de las características analíticas, la naturaleza del elemento y las posibles interferencias, se puede emplear dos modos de trabajo diferentes: modo “on-mass” y modo “mass-shift”.

- Modo “on-mass”, la m/z original del analito es seleccionada tanto en el primer cuadrupolo (Q1) como en el segundo cuadrupolo (Q2), siendo desplazadas en la celda sus interferencias mediante reacción con un gas, de esta manera el analito no va a reaccionar en la celda de colisión, pero si su interferencia isobárica.
- Modo “mass-shift”, se selecciona en el Q1 la masa del analito de interés m_1/z , el cual reacciona en la celda original, dando lugar a un ion producto m_2/z separándolo así de las posibles interferencias [33].

Para eliminar las posibles interferencias poliatómicas procedentes de la matriz de muestras, en especial en disoluciones de alto contenido orgánico se puede usar el ICPQQQ con una celda de colisión de O_2 . Un ejemplo del modo de medida “mass-shift” se da en el caso de medir elementos como el fósforo o el azufre. Para ello, en el Q1 se seleccionan los iones analíticos de interés (ej: ^{31}P , ^{32}S y ^{34}S) y sus interferencias isobáricas a esa m/z , siendo este el primer nivel de especificidad. Posteriormente en la celda de colisión tiene lugar la reacción de los iones de interés con el O_2 dando lugar a un nuevo producto con 16 unidades de masa mayor. El O_2 va a reaccionar antes con los iones que con las interferencias ya que tienen una mayor velocidad de reacción con estos. Finalmente, el segundo nivel de especificidad corresponde al Q2, en este se fija el valor de m/z en 16 unidades mayor que en el caso del primer cuadrupolo proporcionando la detección de los elementos libres de interferencias, como se muestra en la Figura 6. Otra de las ventajas del ICPQQQ es que a diferencia del cuadrupolo simple se pueden medir las relaciones isotópicas del azufre sin necesidad de correcciones matemáticas [34].

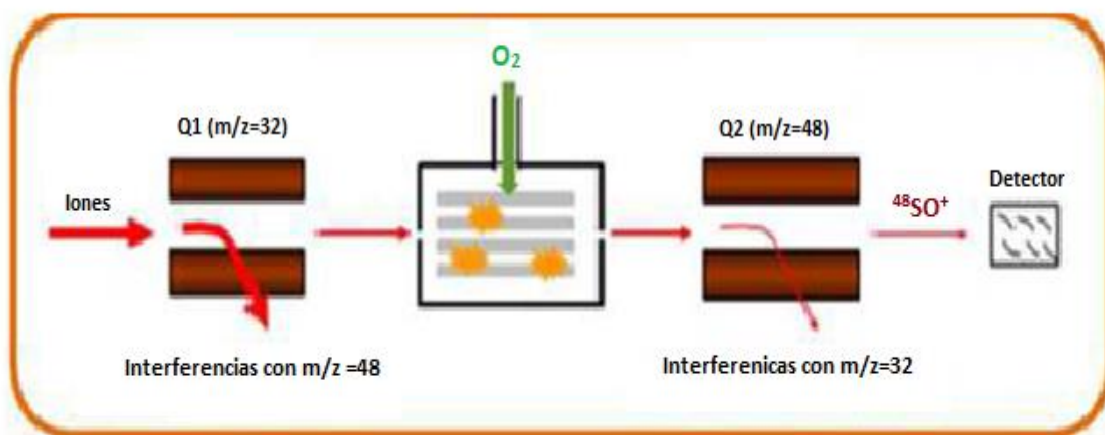


Figura 6: Modo “mass-shift” para el elemento ^{32}S en el ICP-MS/MS. Figura adaptada Diez et al. [34].

Para el caso de la detección del P en los procesos de fosforilación también se puede usar celdas de colisión presurizadas con He. Por otro lado, para el caso de proteínas que contengan azufre o péptidos tripticos se pueden usar al Xenón como gas de colisión [34].

1.2.2.3 Empleo de las estrategias “Bottom up” o “Top down” con ICP-MS/MS

Los avances producidos tanto en HPLC como en ICP-MS/MS hacen posible tanto el análisis de proteínas intactas como el de péptidos. La falta de patrones específicos, hacen el empleo de ICP óptimo para el análisis de estas, dando lugar a una cuantificación más fiable y al posible conocimiento de sus PTMs. Algunas de las posibles ventajas y desventajas que presenta el análisis de proteínas intactas mediante la estrategia “top down” y el análisis de péptidos mediante la estrategia “bottom-up” se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Ventajas y desventajas del análisis de péptidos y proteínas mediante MS elemental [31].

	Ventajas	Inconvenientes
Péptidos	Recuperación del analito en la columna completo	Errores procedentes de la preparación de muestra (digestión triptica)
	Fácil interpretación con “bottom up”	Sólo para muestras simples (por el contenido de S)

Proteínas	Buenos LODs para proteínas en muestras complejas separadas previamente	Dificultad para obtener recuperaciones cuantitativas
	No depende de la eficiencia de la digestión	Dificultad para identificar a las proteínas.

En el caso de muestras complejas de proteínas intactas, es necesario una separación previa de estas para poder cuantificar cada una de ellas por separado dado que el resultado obtenido mediante el análisis por ICP muestra el contenido total del elemento. De esta manera cada uno de los picos cromatográficos harán referencia al contenido del elemento en cada una de las proteínas [16].

La muestra es introducida de forma líquida al plasma tras la separación previa por cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) [30], y ambos se conectan mediante un nebulizador [14].

El empleo de los gradientes cromatográficos en fase reversa, en el cual se aumenta el contenido de disolvente orgánico supone un problema a la hora de introducir carbono al plasma, disminuyendo la eficacia de este o incluso llegando a apagar [35]. Para solventar este problema, se puede añadir un gas auxiliar como el O₂, lo cual hace necesario el uso de conos de platino. También se puede reducir la entrada de materia orgánica al plasma mediante el uso de HPLC capilar (capHPLC) y nano, pero el empleo de flujos menores hacen necesario el uso de un micronebulizador, el cual hace que toda la muestra inyectada llegue al plasma [14].

Otra de las estrategias para reducir el cambio del factor de respuesta a lo largo del gradiente, fue la adición de flujo metano directamente al plasma [31], el montaje empleado se muestra en la Figura 7.

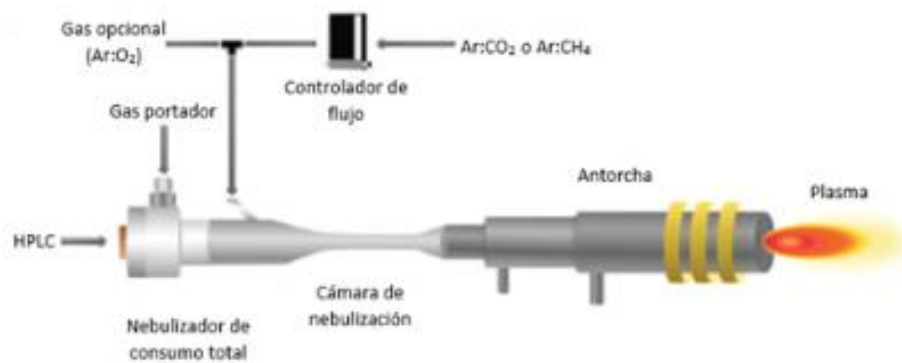


Figura 7: Nebulizador de Consumo Total con entrada de flujo de gas opcional al plasma [31].

A pesar de observar una mejora, se encontró mayores ventajas al introducir el flujo de dióxido de carbono, dando una mejor corrección de la señal de los elementos manteniendo la sensibilidad, eliminando también el riesgo de inflamabilidad del metano. Además, se comprobó que en el caso del CO₂ los errores cuantitativos eran menores y solo se necesitaba un flujo igual para todos los elementos analizados. Se pueden llegar a detectar niveles de cientos de attomoles de proteínas suponiendo una posibilidad para diferentes aplicaciones biológicas que requieran la caracterización cuantitativa de proteínas o de PTMs [16]. El montaje para el caso del flujo del dióxido de carbono es el mismo que en el caso del de metano, como se muestra en la Figura 7.

El empleo de cromatografía de líquidos capilar emplea valores de flujos de fase móvil menores disminuyendo así el consumo de fase móvil y de muestra, una alta eficacia en la separación, una reducción de las interferencias proporcionadas por los iones poliatómicos, fondos más bajos y menores límites de detección (LODs) [36].

1.2.2.4 Complementariedad de las técnicas ICP-MS y técnicas de espectrometría molecular (ESI)

Como conclusión, la configuración híbrida de cromatografía de líquidos con espectrometría de masas (LC-MS) con detección de MS elemental y molecular tiene el potencial de identificar y cuantificar proteínas intactas de manera simultánea [6]. De esta manera, con la MS elemental se puede obtener una cuantificación absoluta sin la necesidad de patrones específicos, lo cual se ve complementado con la información molecular de la MS molecular [8]. A pesar de las ventajas que presenta la MS elemental, es necesario complementar el uso de esta con la MS molecular con el fin de conocer la

secuencia de aminoácidos de los péptidos o proteínas y obtener la información necesaria relacionada con la estequiometría [14].

Para obtener el valor de cantidad total de proteína, hay que tener en cuenta que el resultado obtenido es información de un determinado heteroátomo, por lo que es necesario conocer la relación heteroátomo/proteína con el fin de transformar esa información elemental en cantidad de proteína [8].

1.2.2.5 Análisis de proteínas/péptidos mediante heteroátomos (heteroatom-tagged proteomics)

Los heteroátomos pueden encontrarse unidos de manera natural a las proteínas. Este es el caso del Se, P o metales dando lugar a las llamadas selenoproteínas, fosfoproteínas y metaloproteínas. También es posible encontrar de manera natural el S, a diferencia de los elementos comentados anteriormente, el S está codificado genéticamente en los aminoácidos cisteína (Cys) y metionina (Met), por lo que la mayoría de las proteínas lo contienen en su estructura. En el caso de las metaloproteínas a través de la cuantificación de los metales se puede conocer cómo afectan estos a procesos biológicos, bioquímicos y a sus funciones [8]. Los metales suelen tener más de un isótopo estable por lo que se puede hacer la cuantificación mediante IDA [29]. La posible pérdida del metal durante el proceso de separación puede dar lugar a errores en la cuantificación. Otros heteroátomos que se encuentran unidos de manera covalente, aunque su unión a la proteína sea más fuerte, presentan un alto potencial de ionización dando lugar a interferencias poliatómicas.

De esta manera si se detectan los heteroátomos presentes de manera natural, se puede llevar a cabo una cuantificación prescindiendo de los procesos de marcaje reduciendo así la complejidad del proceso analítico y minimizando las posibles fuentes de error [8]. El azufre se encuentra unido a los aminoácidos metionina y cisteína de manera covalente, los cuales tienen una abundancia natural en las proteínas del 5%, siendo esta opción más interesante para llevar a cabo las cuantificaciones de proteínas [34].

Para ciertas aplicaciones en biomedicina, es necesario una alta sensibilidad, por lo que los heteroátomos presentes de manera natural en la biomolécula no son suficiente, aunque se emplee ICPQQ. Por esto se usan técnicas de marcaje para unir heteroátomos a la proteína, aumentando así la sensibilidad y selectividad de los análisis cuantitativos. De esta manera es posible cuantificar cualquier péptido o proteína, aunque no tenga heteroátomos en su estructura. Sin embargo, esto puede producir cambios en

las propiedades de las biomoléculas además de ser procesos más laboriosos y largos. Por otro lado, es importante conocer la proporción en la que se encuentra ya que un posible exceso de reactivo, al igual que los posibles productos o fragmentos dan lugar a un error en la cuantificación.

Una de las técnicas de marcaje es directamente sobre la proteína, mediante reacciones químicas en las cuales el heteroátomo se une covalentemente a la proteína, un ejemplo de ello es el uso de mercurio. El mercurio no presenta interferencias isobáricas pero su alto potencial de ionización hace menos sensible su detección además de presentar una alta toxicidad. Otro ejemplo es el uso de halógenos los cuales son capaces de conjugarse a la proteína, en especial el yodo dado que presenta un bajo potencial de ionización facilitando así su ionización en el plasma, aunque sea menos sensible que los metales, es más sensible que los heteroátomos presentes de manera natural en la proteína. En vez de una reacción química, el marcaje también se puede llevar a cabo mediante el uso de reactivos quelatos los cuales contengan un metal detectable en ICP-MS/MS el cual se une covalentemente a la proteína. Los más usados son los elementos de tierras raras ya que presentan un potencial de ionización bajo, pocas interferencias poliatómicas, bajo fondo y por lo tanto una alta sensibilidad en la señal.

También es posible el uso de inmunoensayos dada su alta sensibilidad, selectividad y rendimiento. En este caso un anticuerpo marcado con un heteroátomo es capaz de reconocer a un antígeno proteína o analito incluso en mezclas complejas. Con el fin de aumentar la sensibilidad por el bajo número de heteroátomos marcados en cada anticuerpo, se hace uso de las nanopartículas en las cuales en cada una de ellas puede haber miles de heteroátomos [8].

1.2.2.6 Análisis de fosfoproteínas grado de fosforilación (P/S)

El estudio de PTMs como la fosforilación, presenta una serie de problemas: Las proteínas se encuentran en una proporción baja dentro de la célula, la estequiometría de la fosforilación es baja, no siempre ocurre en la misma parte de la proteína, es dinámica en un alto rango y el análisis cuantitativo de fosfopéptidos es muy problemático. El análisis de la fosforilación se puede llevar a cabo mediante técnicas MS, en especial ICP-MS, ya que se puede conseguir una señal del ^{31}P independiente de la naturaleza de los aminoácidos del fosfopéptidos a analizar y de la matriz. Para obtener una medida de cuantificación relativa, se mide la relación P/S que posteriormente con el fin de obtener el grafo de fosforilación una vez conocida la secuencia de la proteína o el péptido [37]. La secuencia se puede obtener mediante ESI

y bases de datos informáticas [35]. Hay que tener en cuenta que el fosforo tiene un alto potencial de ionización por lo que puede llegar a dificultar la medida y en el caso de hacer uno de una separación previa mediante cromatografía, el uso de los modificadores orgánicos también afecta a la estabilidad de la señal como se ha comentado con anterioridad. [37].

2.OBJETIVOS

Desde el punto de vista experimental, los principales objetivos de este trabajo fueron los siguientes:

- Uso del nebulizador convencional acoplado al ICP-QQQ para el análisis de dos patrones certificados de S (Boc-Met) y P (BNPP) mediante FIA.
- Optimización del flujo de gas de Ar:CO₂, para compensar los cambios de sensibilidad durante el gradiente cromatográfico en fase reversa con HPLC capilar y nebulizador de consumo total.
- Adaptar un HPLC de flujo normal a condiciones de flujo de fase móvil capilar.
- Cuantificación de la proteína β -caseína, y obtención del grado de fosforilación de esta.

Por otro lado, los objetivos desde el punto académico de este trabajo fueron:

- Conocimiento de los fundamentos teóricos de las técnicas analíticas empleadas (HPLC, HPLC capilar, ICP-MS/MS), al igual que experiencia en el manejo experimental de éstas.
- Interpretación y tratamiento de los datos obtenidos en los diversos análisis.

3. INSTRUMENTACIÓN Y REACTIVOS

3.1 Instrumentación

HPLC capilar (Agilent 1200 series, Alemania)

El mecanismo de separación empleado fue de fase reversa con una columna BIOshell™ A400 protein C4 (Sigma- Aldrich, Suiza) de 15 cm de longitud, 0,3 mm de diámetro interno y 3,4 µm de tamaño de partícula. Para controlar la temperatura de la columna se empleó un horno de columna Spark Holland (Mistral, Países bajos). El HPLC empleado y el horno se muestra en la Figura 8.



Figura 8: HPLC capilar Agilent 1200 series y horno de columna Spark Holland.

HPLC de flujo normal (Agilent 1260 Infinity II, Alemania).

La columna y el mecanismo en este caso fue el mismo que en el caso del HPLC capilar. En este caso, el horno se encuentra en uno de los módulos del equipo por lo que no es necesario un horno externo como en el HPLC anterior como se muestra en la Figura 9.

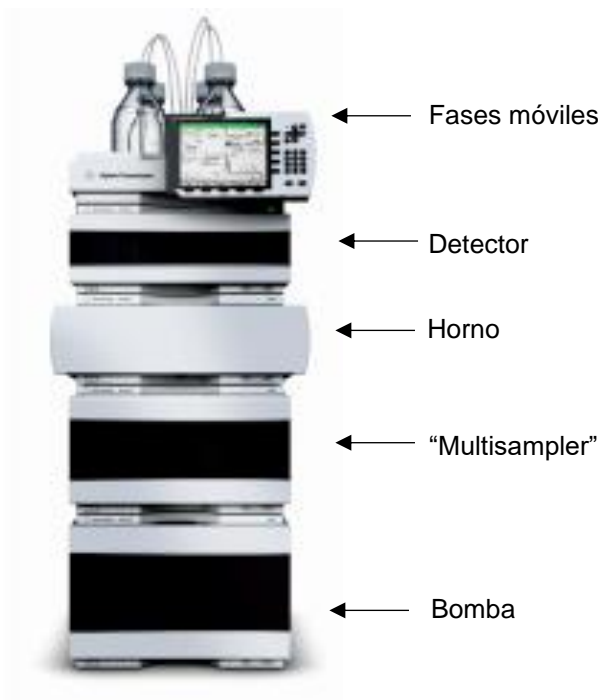


Figura 9: HPLC (Agilent 1260 Infinity II, Alemania).

ICP-MS triple Quad 8800 (Agilent, Japón).

Para poder acoplar el capHPLC al ICPMS se empleó un kit capilar G3680A de Agilent que consiste en un nebulizador de consumo total dentro de una cámara de nebulización de cuarzo. El ICP empleado fue un ICP-MS triple Quad 8800 de Agilent (Japón) el cual se muestra en la Figura 10.



Figura 10: ICP-MS triple Quad 8800 de Agilent.

En el caso del análisis en FIA (Flow Injection Analysis) de los patrones certificados de S y P, se empleó un nebulizador convencional y una válvula de 6 vías Rheodyne Sigma Aldrich (Alemania).

3.2 Reactivos

Los reactivos y patrones empleados fueron los siguientes:

- Agua MilliQ obtenida con un sistema ChemLabour Millipore (EEUU) con un filtro 0,22 μ m.
- Acetonitrilo Optima LC/MS de Fisher Scientific (EEUU).
- Ácido fórmico Merck KGaA (Alemania).
- Patrón certificado de S para ICP de 1000 mg/L Merck (Alemania).
- Patrón certificado de P para ICP de 1000 mg/L Merck (Alemania).
- Patrón BOC-Metionina (BOC-Met) de Sigma-Aldrich (Suiza).
- Patrón Bis(4-nitrofenil) fosfato (BNPP) de Sigma-Aldrich (Suiza).
- β -Caseína de leche bovina de Sigma-Aldrich (Suiza)
- Amoniaco al 32 % Merck (Alemania).

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

4.1 Análisis de patrones de S y P por FIA-ICP-QQQ

Se analizaron dos patrones certificados de S y de P de concentración conocida por FIA-ICP-QQQ con el fin de familiarizarse con el equipo. Los patrones empleados fueron Boc Methionine (Boc-Met) y Bis-4-nitrophenyl-phosphate (BNPP), que contienen en su estructura un átomo de S y un átomo de P respectivamente, como se muestra en la Figura 11.

Para ello, se prepararon disoluciones para el calibrado de P y de S en un rango de concentraciones entre 0 ppb y 500 ppb de patrones inorgánicos en HNO₃ al 2%, mediante el método de pesada. Del mismo modo se prepararon disoluciones de concentración 200ppb de Boc-Met y BNPP en agua mili Q. Se inyectaron en FIA los patrones inorgánicos de P y S, Boc-Met y BNPP empleando una válvula de 6 vías y el nebulizador convencional en el ICP-MS/MS. En el caso del ICP-QQQ el flujo de gas opcional fue de 6% de Ar:O₂ y de gas portador 0,85 L/min de Ar.

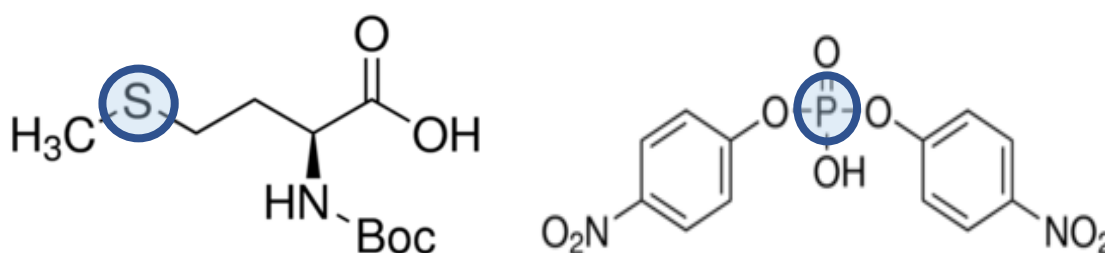


Figura 11: Estructura de la Boc-Met (izquierda) y estructura del BNPP (derecha).

4.2 Corrección de la señal mediante flujo de CO₂

Las fases móviles empleadas durante el análisis por capHPLC fueron las siguientes:

- Fase móvil A: Agua milliQ al 0,2% Ácido fórmico, 500ppb de patrón inorgánico de P y S.
- Fase móvil B: ACN al 0,2% Ácido fórmico, 500ppb de patrón inorgánico de P y S.

El gradiente cromatográfico empleado fue del 2% al 95% de B en un tiempo de 40 minutos. El flujo de fase móvil fue de 3,5µL/min y la temperatura del horno de 80 °C.

En el caso del ICP-QQQ el flujo de gas opcional fue de 6% de Ar:O₂ y de gas portador 0,85 L/min de Ar. Se realizaron gradientes cromatográficos usando flujos de Ar:CO₂ de 0-120 mL/min para estudiar como varia la señal de los analitos a lo largo del gradiente cromatográfico.

4.3 β-Caseína

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de las condiciones en flujo capilar para el análisis de la β-Caseína. Para el análisis de esta y la optimización de las condiciones, las fases móviles empleadas fueron las siguientes:

- Fase móvil A: Agua milliQ con un 0,2% de ácido fórmico.
- Fase móvil B: ACN con un 0,2% de ácido fórmico.

Se realizaron diferentes pruebas para mejorar los tiempos de análisis. Para ello se empleó un flujo de fase móvil de 4 µL/min, un volumen de inyección de 1 µL. El gradiente empleado para el análisis fue el mostrado en la Tabla 4.

Tabla 4: Gradiente empleado para el análisis de β-caseína.

Tiempo (min)	% Fase móvil B
0	2
5	2
18	60
21	90
24	90

En los análisis en FIA se empleó un flujo de fase móvil de 4 µL/min al 2% de B y un volumen de inyección de 1 µL/min.

En cuanto a la cuantificación de proteína intacta y la obtención de su grado de fosforilación se empleó patrones externos inorgánicos tanto de P como de S, en una concentración de 0,7 ppm y 1 ppm respectivamente inyección FIA. La β-Caseína se disolvió en agua con amoniaco a pH 8, en una concentración de 5 ppm. La proteína se

inyecto tanto en FIA como por columna capilar. Así mismo, las condiciones empleadas para el ICP-QQQ fueron las empleadas en los análisis previos. El flujo de Ar:CO₂ empleado fue de 80mL/min.

5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Análisis de patrones de S y P por FIA-ICP-QQQ

En primer lugar, se obtuvieron los valores reales de concentración para las disoluciones de patrones inorgánicos realizadas por pesadas. Los FIAGramas obtenidos de los patrones inorgánicos y los patrones certificados de S y P se muestran en las Figuras 12 (para el caso del S) y 13 (para el caso del P).

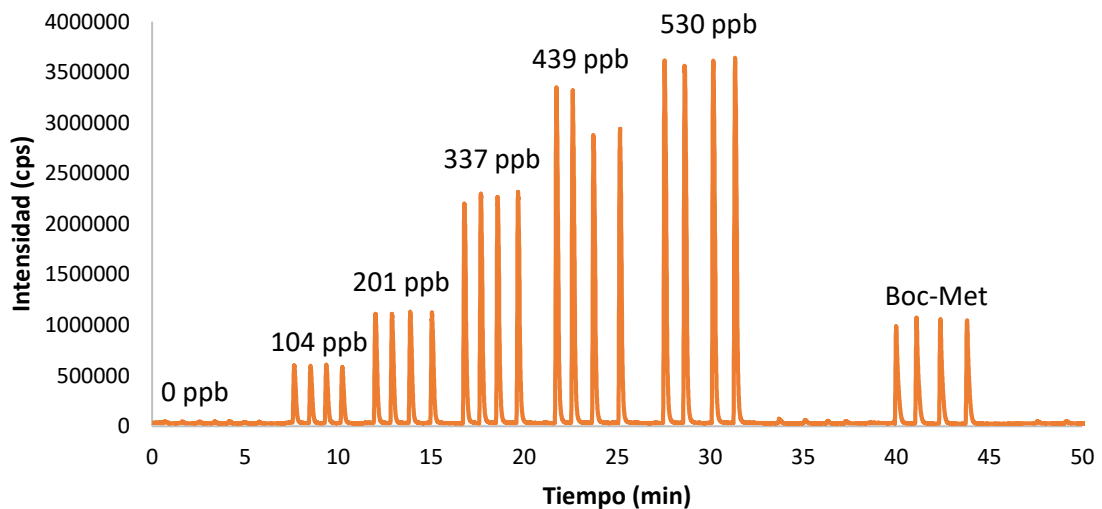


Figura 12: FIAGrama para el S. Se muestra la Boc-Met y el patrón inorgánico de S con sus correspondientes concentraciones.

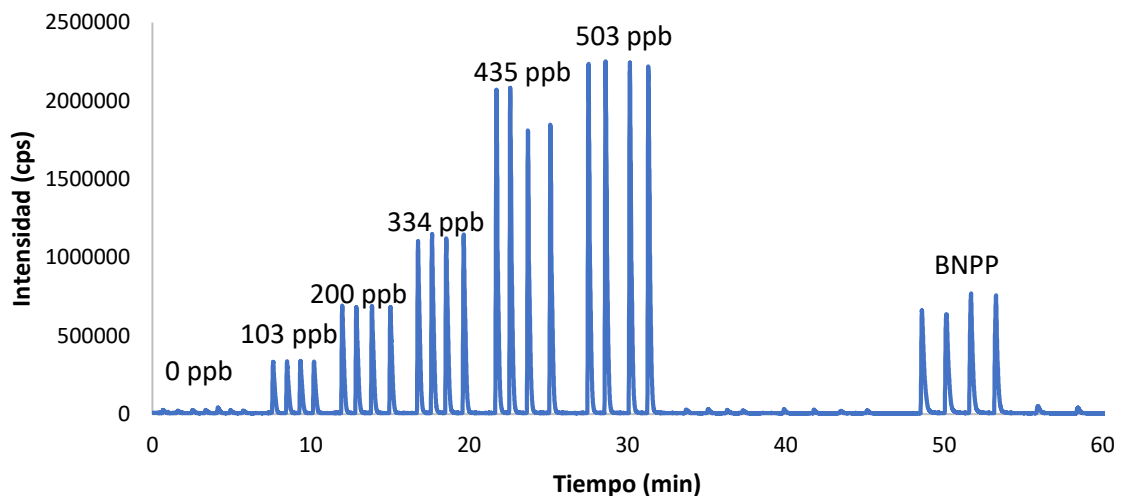


Figura 13: FIAGrama para el P. Se muestra el BNPP y el patrón inorgánico de P con sus correspondientes concentraciones.

Las rectas de calibrado mostradas en las Figuras 14 y 15 se obtuvieron a partir de las áreas de los FIAGramas, que se representaron frente a la concentración de S y de P respectivamente.

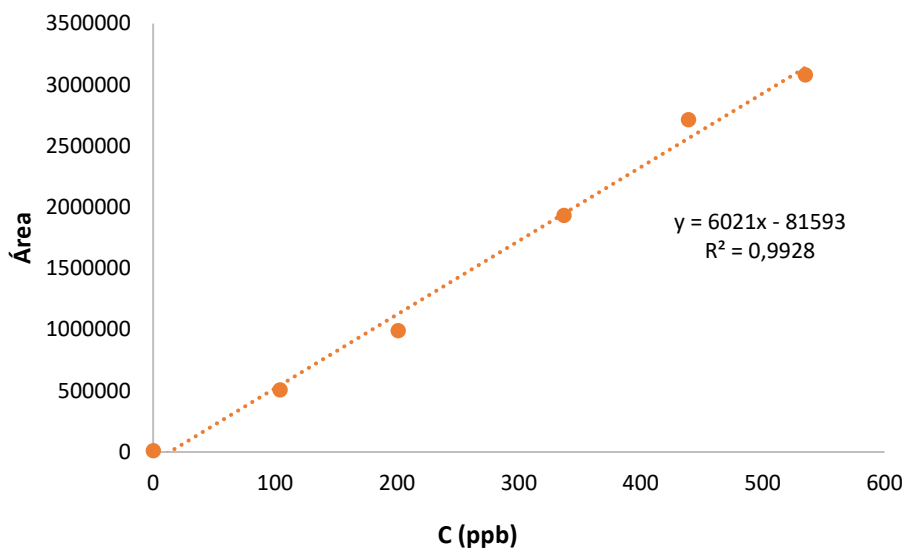


Figura 14: Representación de la recta de calibrado para el S. Se representa el área frente a la concentración de patrón en ppb.

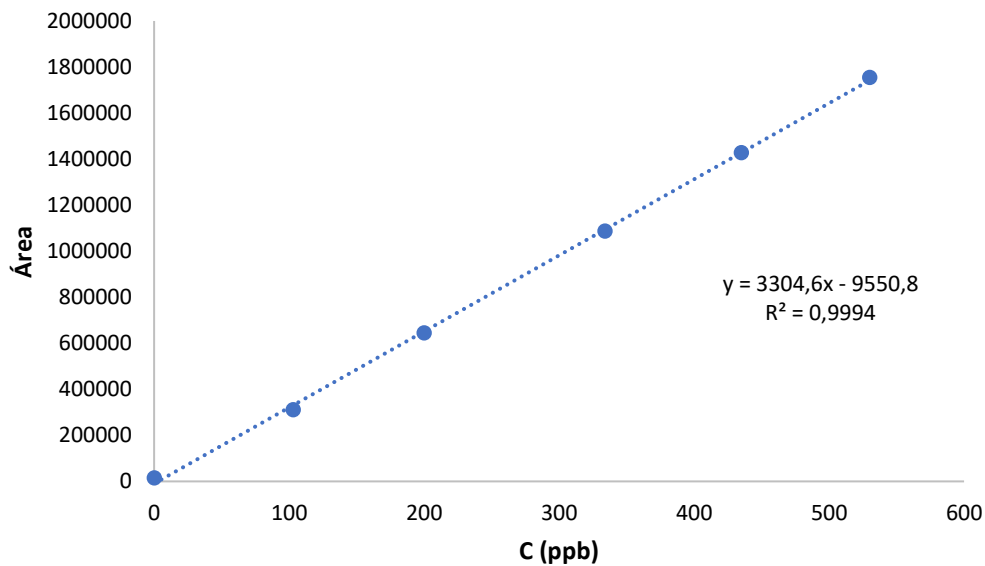


Figura 15: Representación de la recta de calibrado para el P. Se representa el área frente a la concentración de patrón en ppb.

Teniendo en cuenta las rectas de calibrado de los dos patrones inorgánicos se calculó el valor de concentración real de S y P en cada uno de los compuestos mostrado en la Tabla 5.

Tabla 5: Concentraciones de S para la Boc-Met y P para el BNPP obtenidas con la desviación estándar combinada, teniendo en cuenta el factor respuesta y el análisis individual de la concentración del patrón certificado (n=4).

Patrón	Concentración experimental \pm SD (ppb)	Concentración teórica (ppb)
Boc-Met	194 \pm 3	196
BNPP	201 \pm 5	202

En vista a los resultados obtenidos, se comprueba que el ICP-QQQ se puede emplear para el análisis de biomoléculas a partir del S y/o P que puedan contener.

5.2 Corrección de la señal mediante flujo de CO₂

Desarrollado el experimento sobre el estudio de los flujos de CO₂ entre 0 mL/min y 120 mL/min para la corrección de la sensibilidad a lo largo del gradiente cromatográfico en fase reversa y con el fin de determinar el flujo óptimo de CO₂ se representan en las Figuras 16 y 17, las señales obtenidas para cada elemento monitorizado (S, P) en el ICP-MS/MS, a cada uno de los flujos de Ar:CO₂ experimentado a lo largo del gradiente.

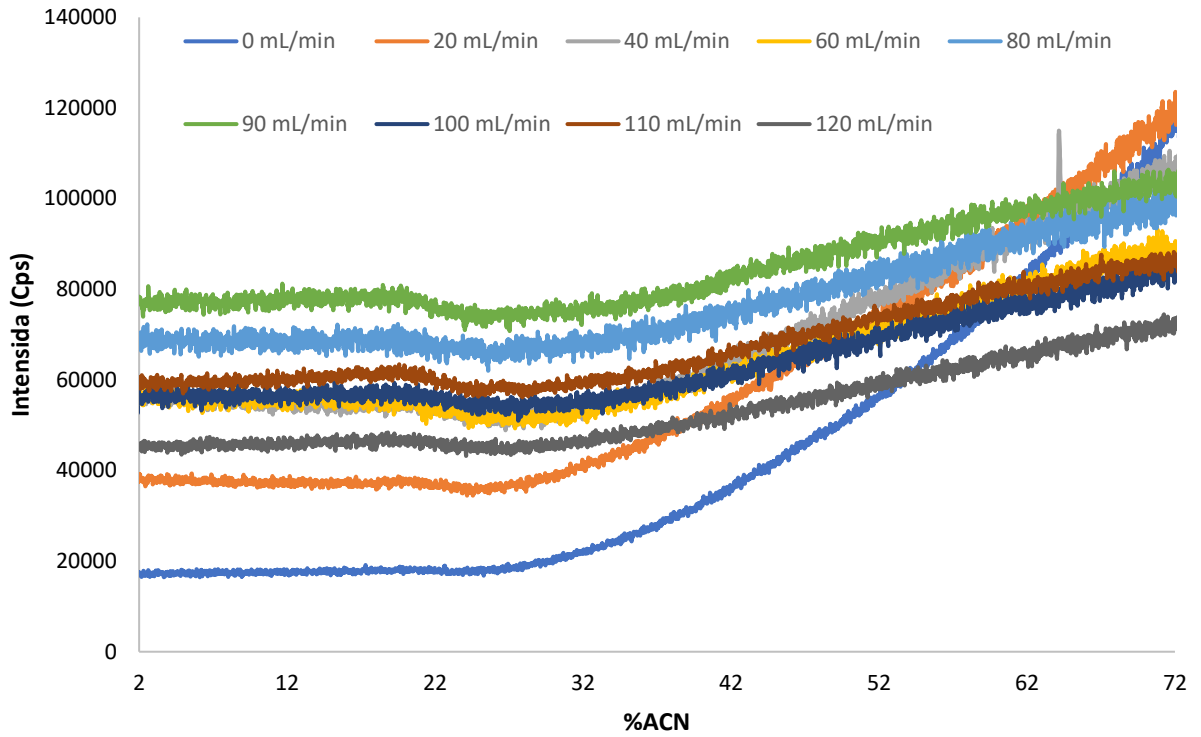


Figura 16: Representación gráfica de la intensidad de señal frente al %ACN para cada uno de los flujos de Ar:CO₂ en el caso del S.

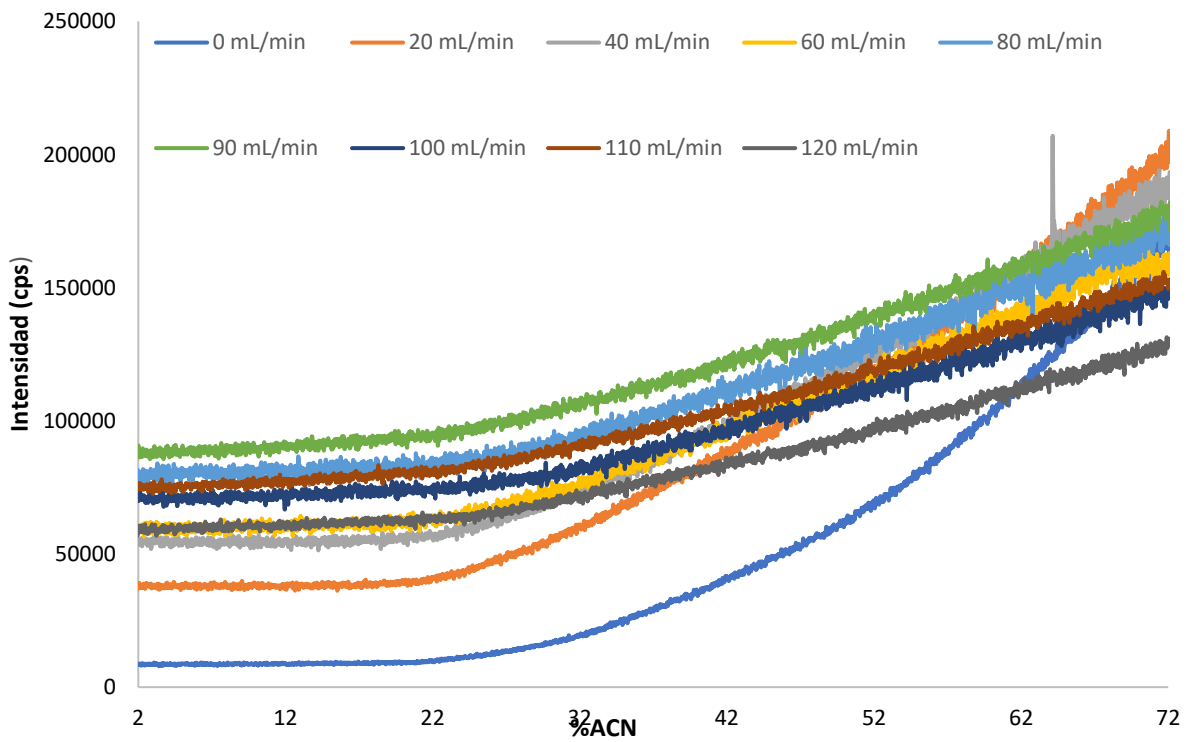


Figura 17: Representación gráfica de la intensidad de señal frente al %ACN para cada uno de los flujos de Ar:CO₂ en el caso del P.

Los cambios de sensibilidad a lo largo del análisis se representaron de dos maneras con el fin de evaluar la corrección de la señal elemental a lo largo del gradiente cromatográfico en capHPLC-ICP-MS/MS. En términos de desviación estándar relativa acumulada (%RSD), correspondiendo los menores valores de %RSD a aquellos flujos de gases capaces de proporcionar factores de respuesta de la señal más constantes a lo largo del gradiente tal como se muestran en los “Heat map” de las Figuras 18 y 19.

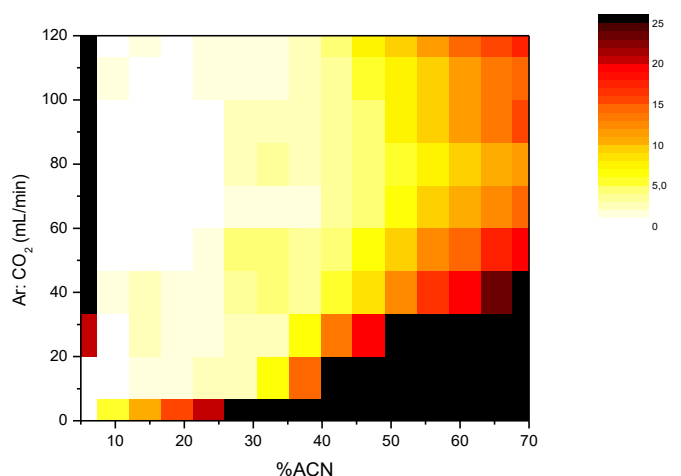


Figura 18: "Heat map". Se representa la variación de la señal a lo largo del gradiente cromatográfico con la %RSD acumulada para cada uno de los flujos y %ACN para el S.

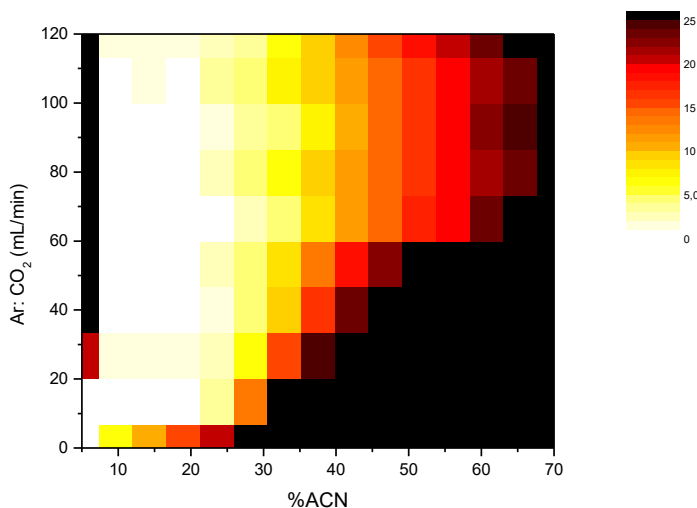


Figura 19: "Heat map". Se representa la variación de la señal a lo largo del gradiente cromatográfico con la %RSD acumulada para cada uno de los flujos y %ACN para el P.

En el caso de las representaciones gráficas de las Figuras 18 y 19, se observa que para el caso de un gradiente total (hasta 70% de %ACN), el flujo óptimo de Ar:CO₂ es de 80mL/min, siendo el valor obtenido de %RSD del 14% para el S y del 27% para el P. Estos valores son mucho mejores que los obtenidos en condiciones estándar (flujo de Ar:CO₂ de 0mL/min), 74% para el S y 103% para el P. Sin embargo, para el análisis específico de proteínas que eluyan a % de ACN medios (40%), el flujo óptimo es de 60mL/min cuyas %RSD son del 4% para el S y 18% para el P. También muy inferiores a las obtenidas en condiciones estándar a ese %ACN del 64% para el S y 26% para el P.

En las Figuras 16 y 18 para el S y 17 y 19 para el P se muestra una reducción clara en la variación de la señal a lo largo de los diferentes gradientes cromatográficos en fase reversa tras la adición controlada del gas Ar:CO₂ al plasma. A pesar de observar estas correcciones, se sigue observando un pequeño incremento de la señal, el cual puede ser debido a que la botella de gas de Ar:CO₂ empleada se estaba acabando en los días en los que se realizaron los experimentos.

También es posible llevar a cabo la representación gráfica en función de los posibles incrementos de sensibilidad. En este contexto, los mapas 3D proporcionados en las Figuras 20 y 21 (S y P, respectivamente) representan el %ACN del gradiente cromatográfico, los flujos de Ar:CO₂ empleados y el incremento de sensibilidad correspondiente. Este último parámetro se define como la señal obtenida en cada uno de los puntos de %ACN, para cada flujo de gas, dividido entre el valor de señal en el punto correspondiente de %ACN en condiciones estándar.

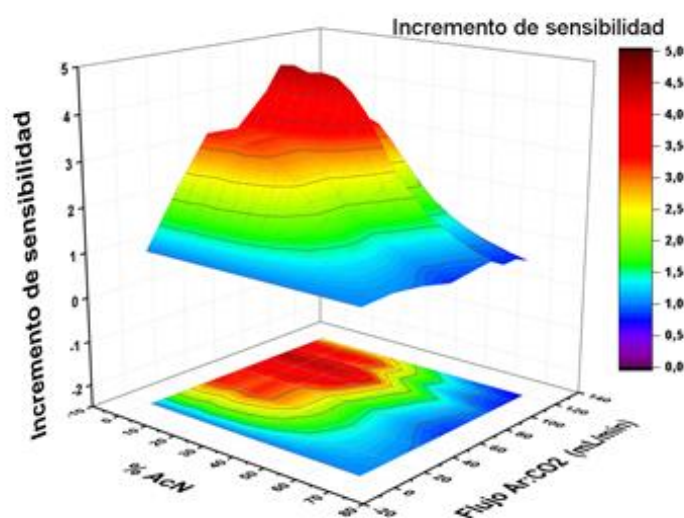


Figura 20: Mapa 3D para el S. Se representa el incremento de sensibilidad en la señal para cada uno de los flujos Ar:CO₂ y %ACN, en un gradiente del 2% al 70% de ACN.

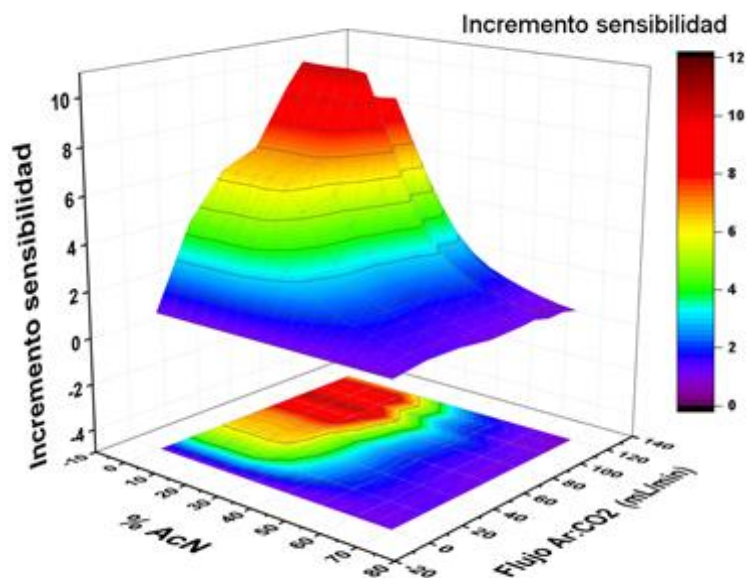


Figura 21: Mapa 3D para el P. Se representa el incremento de sensibilidad en la señal para cada uno de los flujos Ar:CO₂ y %ACN, en un gradiente del 2% al 70% de ACN.

En las representaciones de las Figuras 20 y 21, se puede observar que a medida que se aumenta el flujo de Ar:CO₂, al principio del gradiente, se incrementa la sensibilidad notablemente respecto de las condiciones estándar. Este incremento es mayor para el caso del flujo de 90 mL/min para ambos elementos. A medida que avanza el gradiente cromatográfico el incremento de sensibilidad es menor, ya que la señal se tiene que mantener constante a lo largo del gradiente.

5.3 β -Caseína

- Optimización de las condiciones cromatográficas

Para llevar a cabo el análisis de la proteína se empleó el equipo HPLC Agilent 1260 Infinity II, debido a que el HPLC capilar empleado en los experimentos anteriores se estropeó. Este equipo no se había usado previamente para análisis con flujo capilar, por lo que fue necesario adaptarlo para trabajar a flujos capilares, requeridos para el empleo del nebulizador de consumo total. Las conexiones internas del equipo estaban diseñadas para un flujo de fase móvil normal, por lo que se cambiaron conexiones con el fin de obtener el mismo perfil cromatográfico y tiempo de retención que el equipo anterior de capHPLC Agilent 1200 para la β -Caseína. Las conexiones que se cambiaron por las de 50 μ m fueron las siguientes:

- Desde “Jet weaver mixed” (lugar donde se homogenizan ambas fases móviles) hasta la posición 1 de la válvula de 6 vías.
- Desde la salida de la válvula de 6 vías a la columna.
- Desde la salida de la columna a la celda de flujo (en el caso de utilizar el detector UV-vis). En el caso de emplear ICP-MS/MS la conexión va desde la columna a la entrada del nebulizador.

En primer lugar, se llevó a cabo la optimización de las condiciones cromatográficas para la proteína. Para ello, se probó en condiciones estándar y con diferentes valores de “Flush out factor” el cual indica el tiempo en el que la válvula está en “mainpass” (posición de inyección) durante la inyección de la muestra antes de pasar a posición de “bypass” (posición de carga). Ambas posiciones se muestran en la Figura 22.

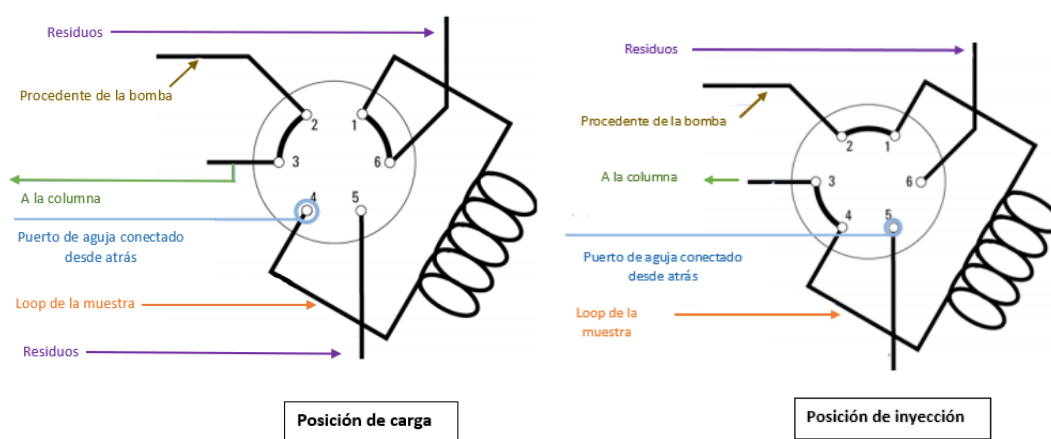


Figura 22: Posición de carga (izquierda) y de inyección (derecha) de la válvula del equipo HPLC Agilent 1260 Infinity II.

El “Flush out factor” tiene en cuenta la suma del volumen de inyección, el asiento del capilar y volumen de la válvula y el flujo de fase móvil empleado para obtener el tiempo que tarda en cambiar la posición la válvula.

Se comprobó que en el caso de los análisis por FIA, el área de los diferentes picos de patrones para el P y el S era constante para los diferentes valores del factor ya que la fase móvil era capaz de arrastrar a toda la muestra dentro del loop.

Sin embargo, se observó una influencia en el tiempo de retención en la proteína al variar el valor del factor, disminuyendo al disminuir el factor. En el caso de inyección por columna capilar, se probaron los diferentes valores entre 5 y 1 y las condiciones estándar. Se observó que en el caso del factor de 1 la muestra no llegaba a la columna

debido a que la válvula cambiaba de posición antes de que la fase móvil fuera capaz de arrastrar la muestra. Por lo que se seleccionó como valor óptimo un Factor de 1,8 disminuyendo el tiempo de retención de la proteína en 6 minutos con respecto un Factor de 5.

- **Cuantificación β -Caseína y obtención del grado de fosforilación**

Para la obtención de la recuperación de la columna, la cuantificación y grado de fosforilación de la proteína se llevó a cabo el FIAGrama de los patrones y β -caseína mostrado en la Figura 23 y el cromatograma de la β -caseína con sus respectivas isoformas mostrado en la Figura 24.

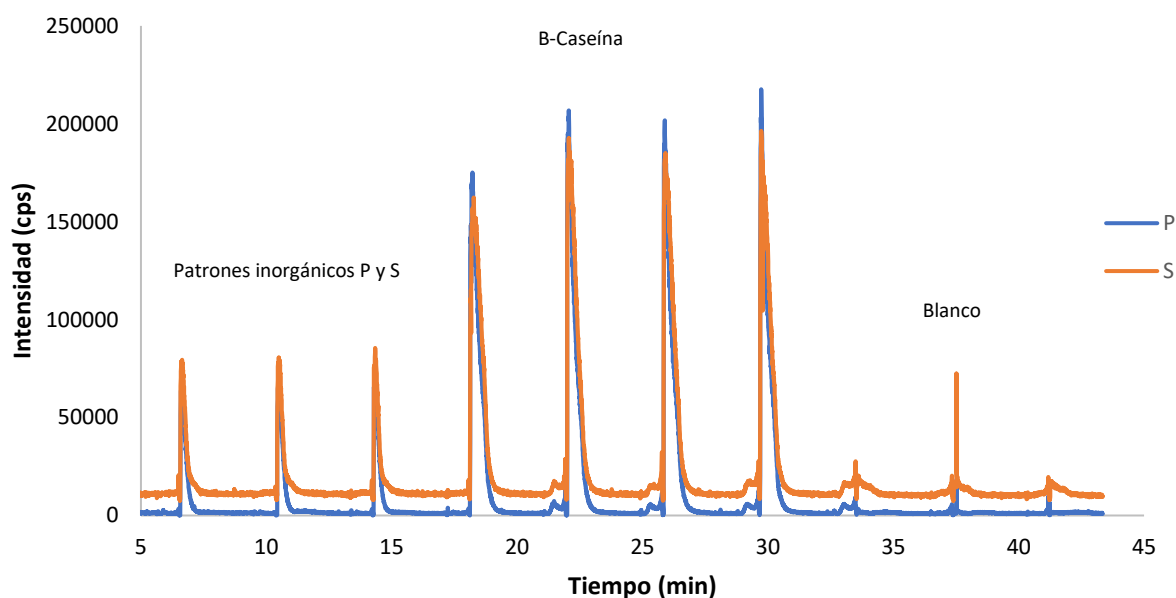


Figura 23: FIAGrama Patrones de S y P inorgánicos y β -Caseína al 2% de Fase móvil B.

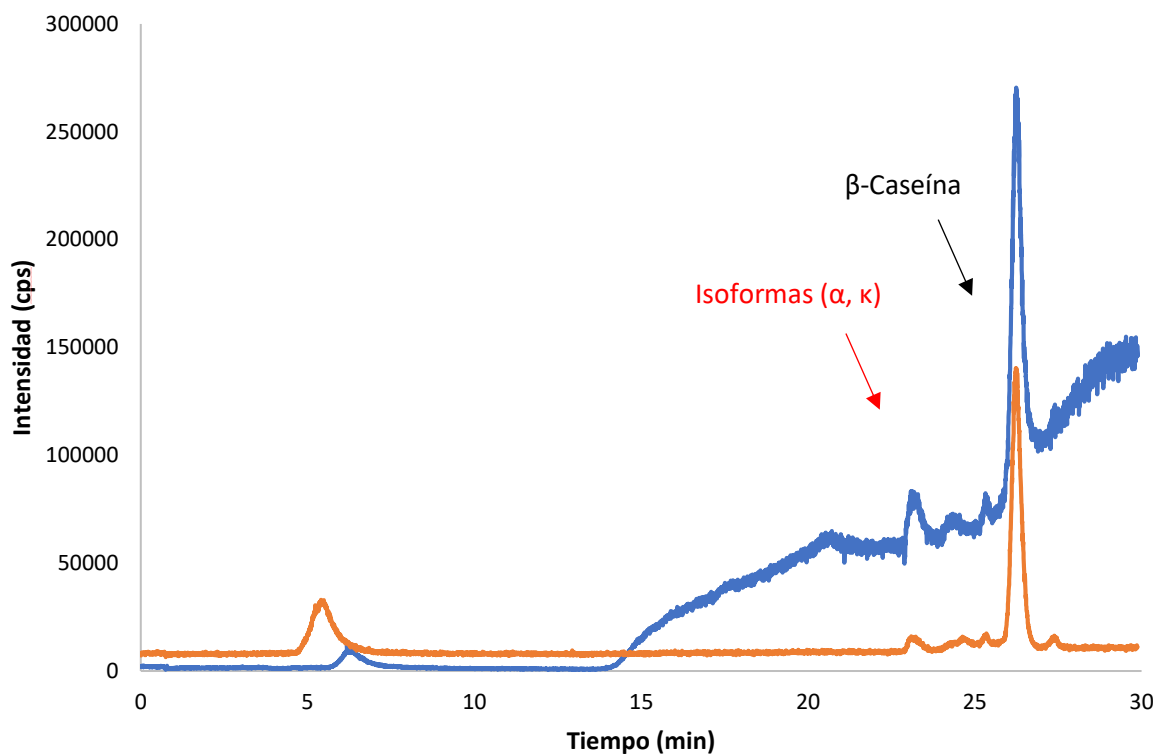


Figura 24: Cromatograma β -Caseína. Señal de S en naranja, señal de P en azul.

La cuantificación de la proteína se llevó a cabo mediante patrones externos, siendo un requisito que la recuperación cromatográfica sea cuantitativa. Esta se define como la relación de compuesto eluido respecto a la cantidad de compuesto inyectado. Para ello se relacionan los valores de áreas total de S de la proteína obtenidos en el FIAGrama (sin pasar por la columna) y en el cromatograma (pasando por la columna) mostrados en la Figuras 23 y 24.

En este caso se calculó la recuperación cromatográfica para la proteína intacta β -Caseína mostrada en la Tabla 6.

Tabla 6: Recuperación cromatográfica para el S en la β -Caseína con la desviación estándar combinada, teniendo en cuenta el factor respuesta ($n=3$) y el análisis individual de la recuperación de la proteína ($n=2$).

Recuperación cromatográfica β -Caseína \pm SD
105 \pm 4

Al ser un valor de recuperación cuantitativo, es posible llevar a cabo la cuantificación de la proteína mediante patrones externos.

- Cuantificación

Para obtener la cantidad de proteína intacta, es necesario conocer la estequiometría elemento:biomolécula, al ser el resultado obtenido mediante el análisis por ICP-MS/MS cantidad de S. Mediante la base de datos *SwitProt* es posible la búsqueda de la secuencia de la proteína intacta la cual consta de 6 Metioninas, por lo que la proteína posee 6 S en su estructura.

La cuantificación se llevó a cabo mediante el patrón inorgánico de S, teniendo en cuenta el área obtenido en los FIAGramas de los patrones inorgánicos y el área obtenido en el cromatograma para la β -Caseína mediante la Ecuación 1. Mediante cromatografía, el contenido de S que se tiene en cuenta es únicamente el del pico de β -Caseína, independientemente de que esta fuera pura o no, determinando la cantidad de proteína en disolución.

$$\text{Concentración } S_{\text{proteína}} = \frac{\text{Área}_{\text{HPLC proteína}}}{\text{Área}_{\text{FIA patrón}}} \cdot \text{Concentración } S_{\text{patrón}} \quad \text{Ecuación 1}$$

También es posible obtener la cantidad de S en la proteína teniendo en cuenta únicamente el valor de las áreas de los patrones y proteína en el FIAGrama de la Figura 23, teniendo en cuenta la Ecuación 2. Con el análisis por FIA se obtiene la cantidad de S total en disolución, que asumiendo que la proteína es pura, se puede trasladar en cantidad de proteína.

$$\text{Concentración } S_{\text{proteína}} = \frac{\text{Área}_{\text{FIA proteína}}}{\text{Área}_{\text{FIA patrón}}} \cdot \text{Concentración } S_{\text{patrón}} \quad \text{Ecuación 2}$$

La cantidad de S en la proteína obtenida de manera experimental por las dos metodologías posibles y la cantidad de S teórica se muestran en la Tabla 7. Se observa que los valores obtenidos de concentración de S corresponden al valor teórico por ambas metodologías.

Tabla 7: Concentraciones de S teóricas y experimentales de proteína con la desviación con la desviación estándar combinada teniendo en cuenta el factor de respuesta (n=3) y el análisis individual de la proteína por FIA (n=3) o por HPLC (n=2).

Concentración S proteína teórica (ppm)	Concentración S proteína experimental (FIA) ± SD (ppm)	Concentración S proteína experimental (HPLC) ± SD (ppm)
4,87	4,63 ± 0,37	4,77 ± 0,24

- Grado de Fosforilación

El grado de fosforilación se define como el número de átomos de fósforo presentes en la β-caseína. Se obtuvo a partir de la relación de áreas P/S en el pico cromatográfico, de la relación de áreas P/S de los patrones inorgánicos y la relación molar P/S en los patrones.

Al igual que en el caso de la cuantificación, también es posible obtener el grado de fosforilación teniendo en cuenta únicamente las áreas del FIAGrama de los patrones y proteína. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 8. En el caso de FIA el grado de fosforilación obtenido es el total (teniendo en cuenta las isoformas de la proteína y asumiendo que es pura) y en el caso del de HPLC solo se tiene en cuenta el grado de fosforilación de la β-caseína, excluyendo a las isoformas de esta.

Tabla 8: Grado de fosforilación teórico y experimental con su desviación estándar combinada teniendo en cuenta el factor de respuesta (n=3) y el análisis individual de la proteína por FIA (n=3) o por HPLC (n=2).

Grado de fosforilación teórico [16]	Grado de fosforilación experimental FIA ± SD	Grado de fosforilación experimental HPLC ± SD
4 - 5	4,63 ± 0,37	5,47 ± 0,80

Como se observa en la Figura 24, hay un problema de contaminación de P en el equipo de HPLC normal, el cual no se ha podido identificar. Esta contaminación en el equipo produce un aumento de la señal de P a lo largo del gradiente mayor que la

esperada, dando lugar a un error por exceso en el valor del grado de fosforilación respecto al valor teórico.

6. CONCLUSIONES

Desde el punto de vista experimental las conclusiones fueron las siguientes:

- Se puede llevar a cabo cuantificación absoluta de biomoléculas con columna capilar y flujos de fase móvil capilar mediante un equipo de HPLC convencional.
- La metodología basada en la adicción de gas Ar:CO₂ directamente al plasma, da lugar a la corrección de las variaciones en la sensibilidad de la señal durante el gradiente cromatográfico para elementos como el S y P en capHPLC-ICP-MS/MS.
- La cuantificación de proteínas mediante patrones inorgánicos genéricos inorgánicos es posible, al igual que la obtención del grado de fosforilación de estas mediante capHPLC-ICP-MS/MS teniendo en cuenta la corrección de las variaciones de sensibilidad durante el gradiente cromatográfico. Sin embargo, los resultados obtenidos para el grado de fosforilación no son los esperados, por lo que es necesario optimizar en mayor medida las condiciones cromatográficas de análisis.

Por otro lado, las conclusiones académicas fueron:

- Se han obtenido conocimiento tanto teóricos como prácticos de las técnicas experimentales empleadas para la elaboración del trabajo.
- Se ha desarrollado la competencia de la capacidad de solucionar problemas al tener que poner a punto un equipo de HPLC convencional para trabajar en modo capilar con el fin de poder realizar los últimos experimentos.

7. ANEXOS

Pruebas con el valor de "Flush-out Factor":

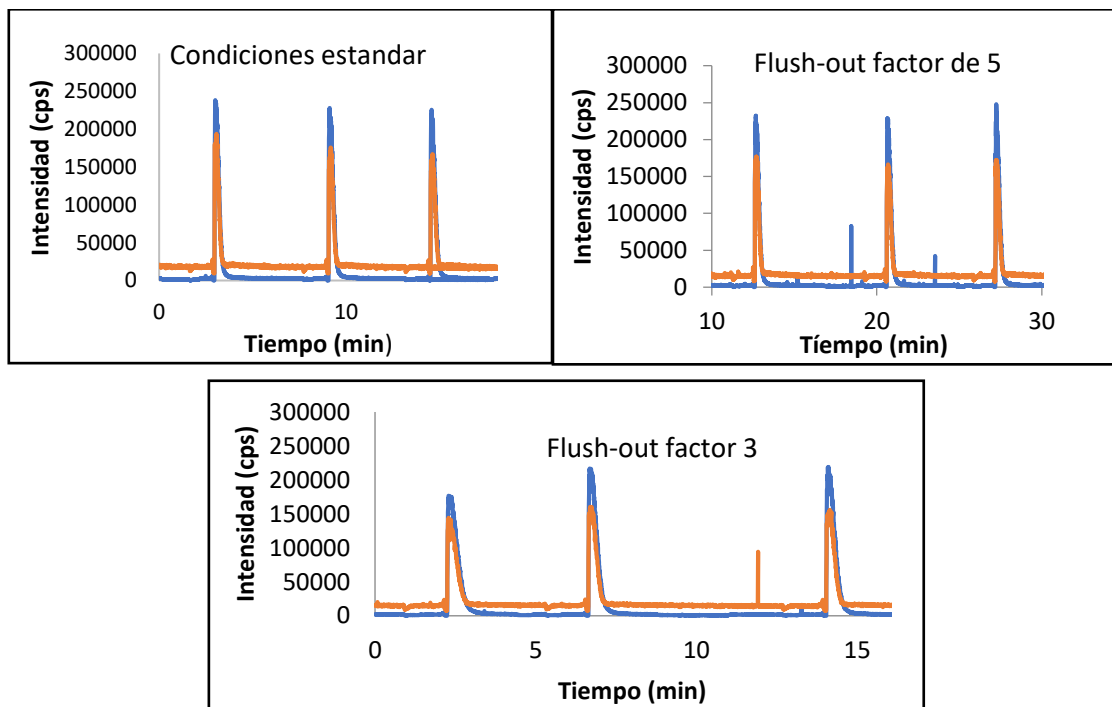


Figura A: Flush-out Factor para los diferentes análisis en FIA mediante HPLC-ICP-MS/MS.

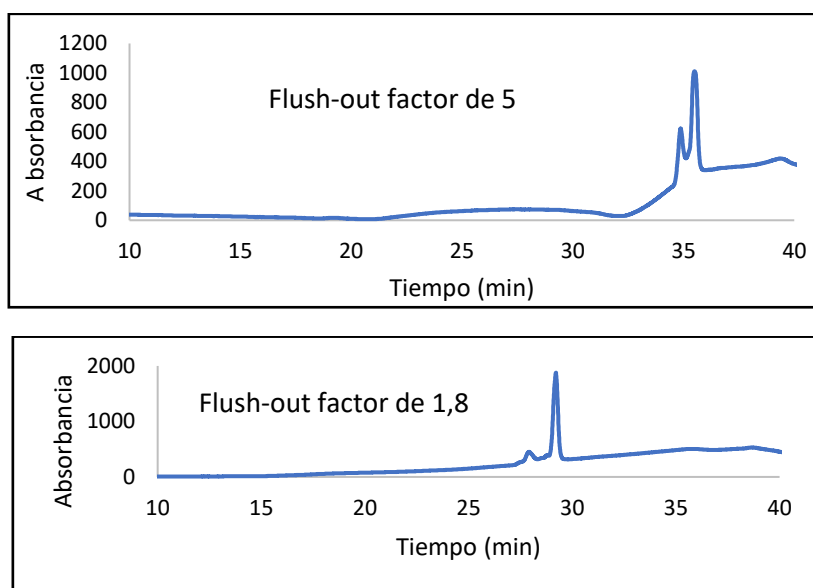


Figura B: Flush-out Factor para los diferentes análisis cromatográficos, detector UV.

8. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Branden C, Tooze J. *Introduction to Protein Structure*. 2^oed. New York: Garland Publishing; 2010.
- [2] Lehninger AL, Nelson DL, Cox MM. *Principios de bioquímica*. 6^oed. Barcelona: Omega; 2009.
- [3] Craig-Venter J, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M. The sequence of the Human Genome. *Science*. 2001; 291: 1304-1351.
- [4] Wasinger VC, Cordwell S J, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, Duncan MW, Harris R, Williams KL, Humphery-Smith I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*. 1995; 16(1): 1090-1094.
- [5] Patterson SD, Aebersold RH. Proteomics: The first decade and beyond. *Nat. Genet*. 2003; 33: 311-323.
- [6] Calderón-Celis F, Ruiz-Encinar J, Sanz-Medel A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. *Mass Spec. Rev*. 2018; 37: 715-737.
- [7] Calderón-Celis F, Diez-Fernandez S, Costa-Fernandez JM, Ruiz-Encinar J, Calvete JJ, Sanz-Medel A. Elemental Mass Spectrometry for Absolute Intact Protein Quantification without Protein-Specific Standards: Application to Snake Venomics. *Anal. Chem*. 2016; 88(19): 9699-9706.
- [8] Cid-Barrio L, Calderón-Celis F, Abásolo-Linares P, Fernández-Sánchez ML, Costa-Fernández JM, Ruiz-Encinar J, Sanz-Medel A. Advances in absolute protein quantification and quantitative protein mapping using ICP-MS. *Trends in Anal. Chem*. 2018; 104: 148-159.
- [9] Cantin GT, Yates JR. Strategies for shotgun identification of post-translational modifications by mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 2004; 1053(1–2): 7-14.
- [10] Mann M, Jensen ON. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol*. 2003; 21(3): 255-261.
- [11] Jensen ON. Interpreting the protein language using proteomics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2006; 7(6): 391-403.
- [12] Raggiaschi R, Gotta S, Terstappen GC. Phosphoproteome analysis. *Bioscience report*. 2005; 25(1-2): 33.

- [13] Angel TE, Aryal UK, Hengel SM, Baker ES, Kelly RT, Robinson EW, Smith RD. Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41: 3912-3928.
- [14] Maes E, Tirez K, Baggerman G, Valkenburg D, Schoofs L, Ruiz-Encinar J, Mertens I. The use of elemental mass spectrometry in phosphoproteomic applications. *Mass Spec. Rev.* 2016; 35(3): 350-360.
- [15] Mann M, Ong SE, Grønborg M, Steen H, Jensen ON, Pandey A. Analysis of protein phosphorylation using mass spectrometry: deciphering the phosphoproteome. *Trends in Biotechnol.* 2002; 20(6): 261-268.
- [16] Calderón-celis F, Sugiyama N, Yamanaka M, Sakai T, Diez-Fernández S, Calvete JJ, Sanz-Mendel A, Ruiz-Encinar J. Enhanced Universal Quantification of Biomolecules Using Element MS and Generic Standards: Application to Intact Protein and Phosphoprotein Determination. *Anal. Chem.* 2019; 91: 1105-1112.
- [17] Zhu X, Lee H, Raina AK, Perry G, Smith MA. The Role of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in Alzheimer's Disease. *Neurosignals.* 2002; 11(5): 270–281.
- [18] Jensen ON. Modification-specific proteomics: characterization of post-translational modifications by mass spectrometry. *Curr. Opin. Chem.Biol.* 2004; 8(1): 33–41.
- [19] Rabilloud T. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but it still climbs up the mountains. *Proteomics.* 2002; 2(1): 3-10.
- [20] Olive DM, Quantitative methods for the analysis of protein phosphorylation in drug development. *Expert Rev. Proteomics.* 2004; 1(3): 327-341.
- [21] Todolí JL, Mermet. Sample introduction systems for the analysis of liquid microsamples by ICP-AES and ICP-MS. *Spectrochimica Acta Part B.* 2006; 61(3): 239-283.
- [22] Ficarro SB, McClelland ML, Stukenberg PT, Burke DJ, Ross MM, Shabanowitz J, Hunt DF, White FM. Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotech.* 2002; 20(3): 301-305.
- [23] Macek B, Mann M, Olsen J. Global and site-specific quantitative phosphoproteomics: principles and application. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2009; 49: 199-221.
- [24] Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. *Nature.* 2000; 405(6788): 837-846.

- [25] Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, Ng KF, Suen MWM, Tai HL. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev.* 2003; 24: 3-12.
- [26] El-Aneed A, Cohen A, Banoub J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl. Spectrosc. Rev.* 2009; 44 (3): 210-230.
- [27] Hoffmann E, Edmon; Stroobant V. *Mass Spectrometry Principles and Applications.* 3^oed Chichester: Wiley; 2007.
- [28] Gross, J.H. *Mass Spectrometry.* 3^oed, Cham: Springer; 2017.
- [29] Calderón-celis F, Ruiz-Encinar J. A reflection on the role of ICP-MS in proteomics : Update and future perspective. *J. Proteomics.* 2019; 198: 11–17.
- [30] Bettmen J, Montes-Bayon M, Ruiz-Encinar J, Fernández Sánchez ML, Fernández de la Campla MR, Sanz-Medel A. The emerging role of ICPMS in proteomic analysis. *Journal of Proteomics.* 2009; 72(6): 989-1005.
- [31] Calderón-Celis F, Sanz-Medel A, Ruiz-Encinar J. Universal absolute quantification of biomolecules using element mass spectrometry and generic standards. *Chem. Commun.* 2018; 54(8): 904-907.
- [32] Calderón-celis F, Cid-barrio L, Ruiz-Encinar J, Sanz-medel A, Calvete JJ. Absolute venomics : Absolute quantification of intact venom proteins through elemental mass spectrometry. *J. Proteomics.* 2017; 164: 33–42.
- [33] Agilent 8800 Triple Quadrupole ICP-MS: Understanding Oxygen Reaction mode in ICP-MS/MS. *Technical overview. Agilent Technologies;* 2012: PN:5991-1708EN.
- [34] Diez-Fernández S, Sugishama N, Ruiz-Encinar J, Sanz-Medel, A. Triple Quad ICPMS (ICPQQQ) as a New Tool for Absolute Quantitative Proteomics and Phosphoproteomics. *Anal. Chem.* 2012; 84(14): 5851-5857.
- [35] Pereira-Navaza A, Ruiz-Encinar J, Sanz-Medel A, Absolute and accurate quantification of protein phosphorylation by using an elemental phosphorous standar and element mass spectrometry. *Angew. Chem. Ind. Ed.* 2007;119 (4): 575-577.
- [36] Schaumlöffel D, Ruiz-Encinar J, Łobiński R. Development of a Sheathless Interface between Reversed-Phase Capillary HPLC and ICPMS via a Microflow Total Consumption Nebulizer for Selenopeptide Mapping. *Anal. Chem.* 2002; 75(24):6837–6842.
- [37] Sanz-Medel, A. Heteroatom(isotope)-tagged proteomics via ICP-MS: Screening and quantification of proteins and their post-translational modifications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2008; 391 (3): 885-894.