



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL DE GLIADINA: CAPTURA DE PÉPTIDOS CON APTÁMEROS E IDENTIFICACIÓN POR LC-ESI-MSMS

Paula Gómez Meijide

Julio 2020, Oviedo



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
Centro Internacional de Postgrado
Máster en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas

Noemí de los Santos Álvarez y Pablo Rodríguez González, Profesores Titulares del Departamento de Química Física y Analítica de la Facultad de Química de la Universidad de Oviedo.

CERTIFICAN:

Que el presente Trabajo, titulado “Digestión gastrointestinal de gliadina: captura de péptidos con aptámeros e identificación por LC-ESI-MSMS” ha sido realizado por la alumna Paula Gómez Meijide bajo nuestra dirección, constituyendo su Trabajo Fin de Máster del Máster Internacional en Ciencias Analíticas y Bioanalíticas de la Universidad de Oviedo en el curso académico 2019-20, y cuya presentación autorizamos.

Oviedo, 20 de Julio de 2020

Fdo.: Noemí de los Santos Álvarez

Fdo.: Pablo Rodríguez González

Índice:

1. Introducción.....	1
1.1 La enfermedad celiaca	1
1.2 El gluten.....	3
1.3. Métodos analíticos para la detección de gluten en alimentos	5
1.3.1 Métodos inmunológicos.....	6
1.3.2 Métodos de amplificación de ADN.....	7
1.3.3 Nuevas tendencias: utilización de aptámeros.....	8
1.4 Análisis de péptidos derivados del gluten por espectrometría de masas	11
1.4.1 Fuente de ionización de electroespray	12
1.4.2 Espectrometría de masas en tándem.....	15
1.5 Hidrólisis de proteínas mediante digestiones enzimáticas	17
2. Objetivos	19
3. Experimental.....	20
3.1 Reactivos	20
3.2 Material.....	21
3.3 Equipo HPLC-ESI-MS/MS	21
3.4 Procedimientos experimentales	23
3.4.1 Simulación gastrointestinal de la digestión in-vitro de la PWG	23
3.4.2 Modificación de las partículas magnéticas con el aptámero	24
3.4.3 Captura de péptidos con aptámeros inmovilizados sobre partículas magnéticas.....	24
3.4.5 Análisis por inyección en flujo-espectrometría de masas.....	25
3.4.6 Análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas.....	25
4. Resultados y discusión.....	27
4.1 Estudio del patrón de fragmentación del péptido 33-mer	27
4.2 Optimización de los parámetros de la fuente de ionización.....	28
4.3 Estudio de la disociación inducida por colisión del péptido 33-mer.....	32
4.4 Optimización de los parámetros de la celda de colisión.....	33

4.5 Análisis cualitativo del péptido 33-mer por HPLC-MS/MS.....	35
4.6 Identificación de otros péptidos capturados mediante HPLC-MS/MS	40
5. Conclusiones	44
6. Bibliografía.....	45
Anexo.	50

1. Introducción

1.1 La enfermedad celiaca

La enfermedad celiaca (EC) es una enfermedad de carácter autoinmune que afecta a individuos genéticamente predispuestos. Se desencadena por la ingesta del gluten de trigo, cebada, centeno y avena e induce un proceso inflamatorio crónico en el intestino delgado (Jiang *et al.*, 2020). Dicho proceso conduce al aplanamiento progresivo de las vellosidades intestinales dando lugar a una mucosa intestinal plana con atrofia vellosa, hiperplasia de las criptas e infiltración del epitelio por los linfocitos, que ocasionalmente pueden experimentar una transformación maligna (*Figura 1*). La principal consecuencia de la enfermedad es la dificultad en la absorción de los nutrientes (Parada y Araya, 2010).

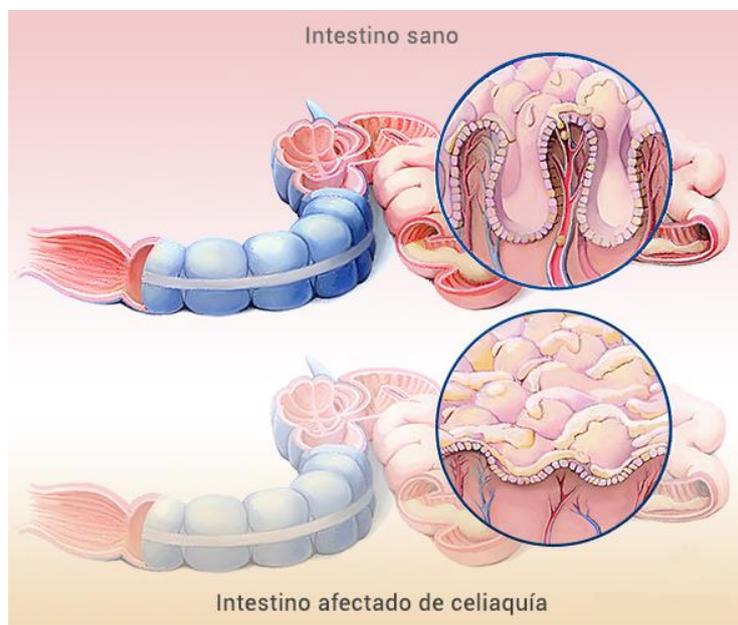


Figura 1: Comparación de un intestino delgado sano y de un paciente enfermo de celiacía (<https://www.aepnaa.org/ver/patologias>).

El espectro de manifestaciones clínicas es muy complejo y variado en función del paciente, pudiendo producir diarreas, dolor abdominal, estreñimiento, vómitos y desnutrición. Las complicaciones más graves son hallazgos no específicos extraintestinales como la falta de crecimiento, la fatiga crónica, el dolor en las articulaciones, la anemia, la osteoporosis e incluso complicaciones neurológicas (Clifford *et al.*, 2019). Muchas de estas manifestaciones extradigestivas se deben a carencias crónicas de oligoelementos debido a la malabsorción intestinal; otras, en cambio, son de carácter autoinmunitario (Rodrigo, Garrote y Vivas, 2008).

La enfermedad celiaca es un trastorno cuyo desarrollo depende de la combinación de varios factores genéticos y ambientales. La presencia de los marcadores de susceptibilidad genética HLA-DQ2 y/o HLA-DQ8 positivos explica alrededor del 40% de la susceptibilidad genética de la enfermedad. El otro 60% se debe a genes no relacionados con HLA (Koehler, Wieser y Konitzer, 2014).

Los genes HLA (complejo mayor de histocompatibilidad) codifican un conjunto de proteínas presentadoras de antígenos que se expresan en muchas células humanas y son esenciales para que el organismo distinga entre moléculas propias y externas. Están involucrados en muchos procesos antiinflamatorios y autoinmunes además de contribuir a la susceptibilidad de desarrollar enfermedades infecciosas. La relación existente entre los genes del tipo HLA y la EC se debe al papel fundamental de los linfocitos T CD4+, que son capaces de reconocer péptidos derivados del gluten presentes en la mucosa intestinal de pacientes celíacos y no en el caso de pacientes sanos (Plaza-Izurieta *et al.*, 2015).

Por otro lado, existen factores ambientales que tienen un papel importante en el desencadenamiento de la EC, como la lactancia materna, que generalmente retrasa la aparición de la enfermedad, aunque no la previene; la edad en la que se introducen en la dieta los alimentos con gluten y las infecciones de determinados patógenos, como el adenovirus 12 y el virus de la hepatitis C (Rodrigo, Garrote y Vivas, 2008).

La enfermedad celíaca es frecuente en todo el mundo, afecta a alrededor del 1% de la población, lo que la convierte en una de las enfermedades autoinmunes más prevalentes. Esta prevalencia ha aumentado significativamente durante los últimos años, desde un porcentaje de incidencia del 0.6% en los años noventa, pasando por un 0.8% en la década de los dos mil hasta el valor actual gracias a la mejora en las herramientas de diagnóstico (Osorio, Mejías y Rustgi, 2019). Sin embargo, se estima que únicamente entre el 20-30% de los pacientes están diagnosticados. Es por eso que se compara la enfermedad con un iceberg para explicar las diferentes manifestaciones clínicas que existen (*Figura 2*):

- Celiaquía clásica o sintomática: Los pacientes que la padecen presentan los síntomas gastrointestinales más comunes, como diarrea, pérdida de peso, vómitos y dolor abdominal, además de daños en la mucosa intestinal. Todos ellos muestran test serológicos positivos. Constituye el grupo de pacientes más fácil de diagnosticar y es, por tanto, la parte visible de la enfermedad (World Gastroenterology Organisation, 2020).
- Celiaquía silente o asintomática: La presentan aquellos individuos que no tienen síntomas gastrointestinales, pero por el contrario sí muestran una mucosa intestinal dañada con atrofia en las microvellosidades y dan positivo en los test serológicos de diagnóstico. Se estima que el 50% de los pacientes no diagnosticados padece esta forma clínica asintomática de la enfermedad.
- Celiaquía latente: Es característica de los pacientes que son positivos en los test serológicos pero por el contrario, no presentan síntomas gastrointestinales ni daños en la mucosa. Aun así, la situación de estos pacientes es muy susceptible al cambio y a evolucionar hacia la presencia de síntomas y cambios histológicos (Counts y Sierpina, 2006).

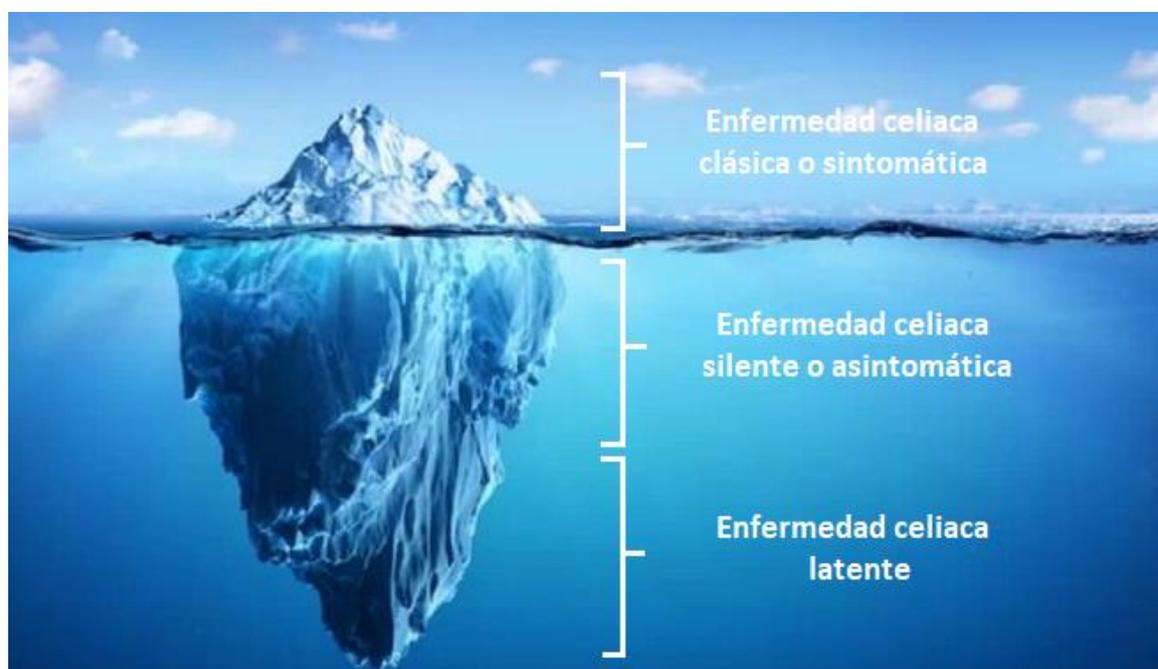


Figura 2: Comparación de las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad celiaca con un iceberg (creada a partir de https://entremontanas.com/wp-content/uploads/Iceberg_2195790412_14253284_660x371.jpg).

En la actualidad el único tratamiento efectivo existente para la enfermedad es que el paciente siga una dieta estricta en ausencia de gluten durante toda su vida. Esto conlleva generalmente un impacto negativo en la calidad de vida de los individuos que la padecen, ya que en todo momento deben tener un cuidado riguroso y estar alerta para evitar ingerirlo de manera accidental (Caio *et al.*, 2019).

1.2 El gluten

El gluten, según el Codex Alimentarius, se define como la fracción proteica de trigo, centeno, cebada, avena y sus variedades híbridas y derivados que es insoluble en disoluciones acuosas y en NaCl 0.5 M. Las distintas proteínas que componen el gluten se dividen en dos fracciones según el método de fraccionamiento de Osborne. De esta forma, las glutelinas constituyen la fracción insoluble del gluten en disoluciones de etanol-agua y las prolaminas, la fracción soluble. Según el cereal de procedencia, las prolaminas y glutelinas tienen un nombre específico que se indica en la *Tabla 1* (Martín-Esteban *et al.*, 2010).

Tabla 1: Nombre concreto de prolaminas y glutelinas en función del cereal de procedencia.

Especie	Prolamina	Glutelina
Trigo	Gliadina	Glutenina
Centeno	Secalina	Secalinina
Cebada	Hordeína	Hordenina
Avena	Avenina	Avenalina

1.3. Métodos analíticos para la detección de gluten en alimentos

Conocer las propiedades físico-químicas de las proteínas del gluten, así como las interacciones que se producen entre ellas, no sólo ha permitido conocer la complejidad de la producción de alimentos sin gluten, sino también ha servido para desarrollar protocolos de extracción y métodos de detección de gluten en muestras de alimentos.

La disponibilidad de métodos analíticos sensibles y robustos para la cuantificación de gluten en alimentos es de gran importancia no sólo para garantizar la salud de las personas sensibles al gluten, sino para que exista un control sobre la industria alimentaria. El éxito en la determinación depende de tres factores muy importantes: de la eficiencia de extracción de las proteínas en las materias primas y alimentos procesados, de la utilización de un patrón de referencia de gluten para la calibración y de la sensibilidad y selectividad de la técnica analítica empleada (Miranda-Castro *et al.*, 2016).

La preparación de la muestra debe ser lo más simple posible para aumentar la reproducibilidad y minimizar las modificaciones de las proteínas. Tradicionalmente se han utilizado disoluciones acuosas de alcohol considerando que únicamente se extraía la fracción de prolaminas; sin embargo, actualmente se sabe que eso no es cierto ya que también son capaces de extraer glutelinas monoméricas. Se ha demostrado que este tipo de disoluciones son efectivas para la extracción de prolaminas en materias primas como las harinas, pero no ocurre lo mismo en productos procesados que se someten a altas temperaturas, donde existe una disminución en la solubilidad de las proteínas debido a la formación de enlaces disulfuro durante la elaboración del producto.

Por esta razón, las disoluciones de extracción que se utilizan hoy en día incluyen agentes desnaturizantes reductores como el 2-mercaptoetanol, el ditiotreitól o el tris(2-carboxietil)-fosfina que, en combinación con la extracción de alcohol, son capaces de disolver agregados del gluten. Estas disoluciones también reducen los enlaces disulfuro de las glutelinas polimerizadas, haciéndolas también solubles. De esta forma, se ha mejorado considerablemente la recuperación de gluten en alimentos procesados con respecto al uso exclusivo de disoluciones acuosas de alcohol (Díaz-Amigo y Popping, 2013) (Díaz-Amigo y Popping, 2012).

Existen diferentes opciones comerciales: la llamada "disolución cóctel", desarrollada por un grupo español y con patente europea EP 1 424 345 B1, combina agentes reductores y desagregantes para extraer las proteínas del gluten por completo. El principal inconveniente que presenta es que contiene 2-mercaptoetanol que interfiere con la unión específica de los anticuerpos cuando se utilizan métodos de detección inmunoquímicos. Para solucionar este problema se propuso otra disolución conocida como disolución de extracción universal de prolaminas y glutelinas (UPEX) cuya composición está patentada con el número WO 201/07039 A2. En ella se incluyen agentes reductores como el tris(2-carboxietil)-fosfina que es muy específico para la rotura de puentes disulfuro y menos tóxico que otros reductores comúnmente utilizados y agentes desagregantes, como la N-lauroilsarcosina, que

contribuye a la apertura de cadenas peptídicas. Además, recientemente se ha descrito una nueva disolución universal de extracción de gluten, la UGES, bajo la patente WO 201231612, que es capaz de proporcionar una alta eficiencia de extracción tanto en matrices simples como en complejas que incluso hayan sido procesadas con calor (Mena y Sousa, 2015).

Un punto crítico en el análisis de gluten es la ausencia de un patrón certificado de referencia debido a que existen cientos de proteínas diferentes que varían entre los distintos tipos de cereales e incluso dentro de las mismas cosechas en diferentes años. Por ello, el Grupo de Trabajo sobre Análisis de la Prolamina y su Toxicidad (PWG, por sus siglas en inglés) creó la gliadina PGW, un patrón de gliadina obtenido a partir de 28 cultivos de trigo representativos de los diferentes países europeos productores de este cereal (Scherf *et al.*, 2020). A pesar de que el material no fue aprobado por el Instituto de Materiales de Referencia y Medidas de la Unión Europea (IRMM, por sus siglas en inglés), es el estándar de gliadina más utilizado, ya que es el que mejor se ha caracterizado hasta la fecha (Bruins-Slot *et al.*, 2016).

Existen diferentes métodos analíticos cualitativos y cuantitativos para la detección de gluten en alimentos. La detección de gluten se basa principalmente en pruebas inmunológicas, métodos relacionados con el ADN y métodos basados en el uso de la espectrometría de masas. Es importante considerar también una nueva tendencia que ya está consolidada, la utilización de aptámeros en biosensores. Sin embargo, únicamente los primeros se consideran universalmente aceptados como métodos de referencia. Aun así, todas las metodologías presentan ventajas y desventajas que los hacen más adecuados para tareas específicas.

1.3.1 Métodos inmunológicos.

Las técnicas inmunológicas son las aceptadas actualmente para la determinación de gluten en alimentos, siendo una de las herramientas más eficaces. Están basadas en la utilización de anticuerpos específicos frente a las fracciones nocivas del gluten. Sin embargo, la obtención de dichos anticuerpos con la suficiente calidad y especificidad es uno de los principales retos ya que las fracciones dañinas del gluten no están claramente identificadas (Martín-Esteban *et al.*, 2010).

Los enzimoimmunoensayos también conocidos como ELISA son los métodos inmunológicos más populares para la cuantificación del gluten, en los que se emplean anticuerpos monoclonales como el Skerritt, el R5 o el G12. El anticuerpo Skerritt es específico contra la gliadina y se ha demostrado que reconoce las glutelinas de bajo peso molecular. El R5 se une fuertemente a los epítomos QQFPF, QQQFP, LQPFP y QLPFP de las α -, β -, ω - y γ - gliadinas. Y por último, el G12 es capaz de reconocer el epítomo QPQLPY del péptido 33-mer de la α 2-gliadina, que es el considerado péptido inmunodominante (Panda y Garber, 2019).

Dentro de los ELISA existen dos tipos de ensayos: los de tipo sándwich y los competitivos. Los ensayos ELISA tipo sándwich no son adecuados para la cuantificación de gluten en alimentos hidrolizados, ya que se requiere la presencia de al menos dos epítomos en la molécula diana, lo cual es poco probable tras la hidrólisis. Para solucionar este problema se desarrollaron ensayos competitivos utilizando los anticuerpos R5 y G12 que requieren exclusivamente la presencia de un epítopo activo para reaccionar con el anticuerpo. A pesar de que en el ensayo competitivo con el anticuerpo R5 se llega a límites de detección de 5 mg/kg, se ha demostrado que ninguno de los métodos es completamente compatible con el cóctel de extracción (Amaya-González, 2015a). El éxito de los ensayos basados en anticuerpos está limitado por las propiedades físico-químicas particulares de las proteínas. Las modificaciones estructurales que se producen en las proteínas y la homología con otras proteínas no relacionadas deben ser cuidadosamente evaluadas. Se deben evitar falsos negativos producidos por las pérdidas de los epítomos de unión del anticuerpo, o falsos positivos causados por la reactividad cruzada y las uniones no específicas (Díaz-Amigo y Popping, 2012).

Dentro de las técnicas inmunológicas, se encuentra también el Western Blot, que consiste en la extracción de las prolaminas del alimento, seguida de su separación electroforética en geles de poliacrilamida, la posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa y la incubación con anticuerpos marcados específicos contra las gliadinas para finalmente ser revelados mediante una reacción enzimática. El límite de cuantificación de esta técnica es de 8 mg/kg, algo superior al sistema ELISA competitivo mencionado anteriormente. Aun así y a pesar de que es mucho más complejo llevarlo a cabo, la información cualitativa obtenida es mayor debido a que las proteínas extraídas se someten a una separación electroforética antes de la interacción con el anticuerpo específico en la membrana, por lo que se conoce información relacionada con la masa molecular de las proteínas extraídas. Además, existe una mayor eficacia en la determinación de proteínas insolubles ya que la separación tiene lugar en condiciones desnaturizantes. Por este motivo, en ocasiones se utiliza como prueba de confirmación para evitar falsos positivos y negativos tras haber sometido la muestra al ensayo ELISA (Martín-Esteban *et al.*, 2010).

1.3.2 Métodos de amplificación de ADN

Los métodos analíticos fundamentados en la detección de ADN son eficaces cuando el alimento ha sido procesado ya que las proteínas pueden haberse desnaturizado o sufrido degradaciones, por lo que su determinación inmunológica daría lugar a resultados erróneos. En cambio, el ADN se puede detectar aunque se haya fragmentado durante el proceso. De esta forma, es posible utilizar el ADN como marcador de la presencia de las proteínas del gluten en alimentos (Haraszi *et al.*, 2011).

Actualmente se han descrito varios métodos para la detección utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Con esta técnica se amplifica una secuencia concreta de ADN copiándola repetidas veces, pudiendo así realizar su detección y estudio posterior. Sin embargo, a pesar de ser

una técnica extremadamente sensible y selectiva, el contenido en ADN puede no relacionarse con la concentración de las proteínas del gluten. La relación entre las proteínas y el ADN varía en función del grado de expresión genética en distintos cultivos de cereales, así como de las condiciones de almacenamiento y del tipo de procesamiento del alimento, pudiendo afectar a las proteínas, al ADN, o a ambos. Por esta razón, los análisis basados en la amplificación del ADN son siempre pruebas indirectas y más apropiadas como métodos de cribado y como complemento a la proteómica (Díaz-Amigo y Popping, 2012).

1.3.3 Nuevas tendencias: utilización de aptámeros.

Los aptasensores y aptaensayos electroquímicos han surgido recientemente como una nueva estrategia de bajo coste para detectar gluten en alimentos utilizando aptámeros que se unen de manera selectiva al péptido inmunodominante 33-mer (López-López *et al.*, 2017). Los aptámeros son moléculas cortas de ADN o ARN de entre 40-100 nucleótidos que adoptan una estructura tridimensional característica que permite la unión de forma selectiva y con gran afinidad a una gran variedad de moléculas como proteínas, fármacos y otros tipos de moléculas pequeñas tanto orgánicas como inorgánicas (Spiridonova, 2010). Su capacidad de plegarse originando conformaciones terciarias muy variadas, tal y como se muestran en la *Figura 4*, les permite interactuar con la molécula diana y los convierte en un receptor ideal de captura (de-los-Santos-Álvarez *et al.*, 2008).

Se generan a partir de un proceso de selección *in-vitro* llamado evolución sistemática de ligandos mediante enriquecimiento exponencial (SELEX, por sus siglas en inglés). Este proceso imita la selección natural basándose en una serie de pasos de selección y amplificación que se repiten a partir de una biblioteca aleatorizada de oligonucleótidos de ADN o ARN sintetizados químicamente que se exponen a una molécula diana en unas condiciones determinadas en las que sólo unas pocas secuencias serán capaces de unirse a la diana. El gran número de secuencias de oligonucleótidos de partida asegura la producción de aptámeros con afinidad por una gran variedad de moléculas (Svigelj *et al.*, 2018).

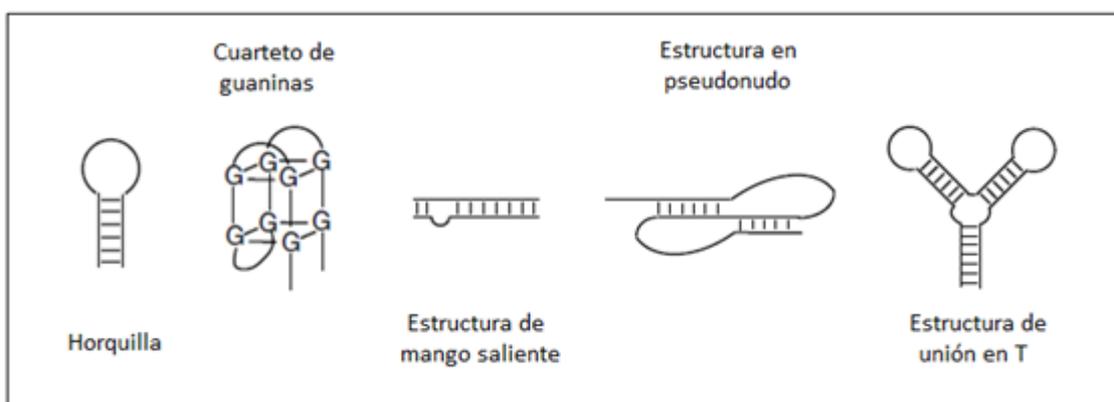


Figura 4: Diferentes estructuras tridimensionales que puede adoptar un aptámero (López-López, 2015).

La utilización de aptámeros como elementos de reconocimiento molecular para el desarrollo de nuevos métodos alternativos de detección de gluten en alimentos se justifica por tres razones

principales. En primer lugar, por la posibilidad de obtenerlos químicamente de manera sencilla y de forma rentable con alta reproducibilidad. En segundo lugar, porque la afinidad con la molécula diana es similar a la que presentan los anticuerpos monoclonales, pero cuentan con una mayor estabilidad debido a su naturaleza química. Por último, porque se pueden combinar fácilmente con diferentes grupos que permiten su marcaje, proporcionando una gran flexibilidad de adaptación a diferentes técnicas analíticas (Malvano *et al.*, 2017).

El uso de aptámeros permite distinguir entre moléculas con diferencias mínimas en su estructura, pudiendo ser incluso enantioselectivos. Además, sus constantes de disociación son del orden de 10^{-6} - 10^{-10} M, siendo comparables a las de los anticuerpos monoclonales. Asimismo, la forma en la que se obtienen es mucho más sencilla que en el caso de los anticuerpos obtenidos *in-vivo* inmunizando animales, por lo que de esta forma se evitan los problemas éticos asociados (Tombelli, Minunni y Mascini, 2005).

El grupo de investigación de Electroanálisis de la Universidad de Oviedo ha realizado de manera exitosa en los últimos años una selección de aptámeros de ADN que reconocen el péptido inmunodominante 33-mer de la $\alpha 2$ -gliadina, y a partir de él crearon diversos formatos de aptasensores y aptasensayos para la detección de gluten (Amaya-González *et al.*, 2014) (Amaya-González, *et al.*, 2015a) (Amaya-González, *et al.*, 2015b) (López-López *et al.*, 2017).

En uno de los aptasensayos, el péptido 33-mer se inmovilizó en partículas magnéticas y se utilizó un aptámero marcado con biotina de concentración conocida como reactivo limitante. Se realizó un ensayo competitivo donde las secuencias peptídicas reconocidas por el aptámero se unen a él mediante la reacción de reconocimiento molecular, mientras que el aptámero sobrante se une al péptido 33-mer inmovilizado en las partículas magnéticas. Utilizando una enzima conjugada a estreptavidina para que se una a la marca del aptámero sobre las partículas, es decir, a la biotina, y añadiendo el sustrato enzimático se genera un producto electroactivo que se mide electroquímicamente. De esta forma, cuanto mayor contenido de gluten haya en la muestra, menor cantidad de aptámero se une a las partículas modificadas con 33-mer, menos cantidad de enzima se inmoviliza, menos producto enzimático se obtiene y menos señal se mide cronoamperométricamente.

Se utilizaron dos aptámeros diferentes, el Gli1 y el Gli4, obteniendo límites de detección de 4,9 y 0,5 mg/kg respectivamente, estando el valor de uno de ellos muy por debajo de los obtenidos con los métodos inmunoquímicos recomendados. Además, los estudios de selectividad señalaron que ambos aptámeros reconocen el trigo, la cebada y el centeno con una sensibilidad similar al mismo tiempo que son insensibles a las proteínas del arroz, el maíz y la soja, ingredientes altamente utilizados en los productos sin gluten ya que son inocuos para los pacientes celíacos (Miranda-Castro *et al.*, 2016).

Las secuencias de los aptámeros Gli1 y Gli4 son CTA GGC GAA ATA TAG CTA CAA CTG TCT GAA GGC ACC CAA T y CCA GTC TCC CGT TTA CCG CGC CTA CAC ATG TCT GAA TGC C respectivamente,

estando ambas formadas por 40 nucleótidos. Sin embargo, no todos los nucleótidos juegan un papel importante a la hora de unirse con la molécula diana.

La región donde se produce la reacción de reconocimiento molecular es generalmente de 10-15 nucleótidos. Estos nucleótidos están involucrados en estructuras secundarias, formando horquillas, cuartetos de guaninas o estructuras en pseudonudos. Existe una segunda región que incluye nucleótidos que, aunque no tienen un contacto directo con la molécula diana, sí tienen una labor importante en la interacción de afinidad que se produce. El resto de los nucleótidos de la secuencia no son esenciales y se pueden eliminar con el fin de mejorar la afinidad respecto al aptámero de partida y reducir su coste; es lo que se conoce como aptámeros truncados.

A la hora de realizar el truncado se tuvo en cuenta como punto de partida el análisis de las estructuras secundarias que presentan los dos aptámeros y las dos secuencias de nucleótidos que se repiten en ambos casos. El Gli1 y el Gli4 tienen estructuras similares, con más de un bucle. La primera secuencia común en ambos aptámeros (TG TCT GAA) se encuentra en un bucle en los dos casos, mientras que la segunda secuencia se encuentra de forma íntegra en un bucle del Gli1 (AG CTA CAA) y únicamente una parte (CTA CA) en el Gli4 en una zona central del aptámero. Estas secuencias al ser comunes a ambos aptámeros, podrían estar involucradas en la reacción de reconocimiento molecular, por lo que se sintetizaron aptámeros truncados de menor tamaño a partir de ellas.

Tal y como se muestra en la *Figura 5*, el aptámero truncado del Gli1 o Gli1T se obtuvo eliminando los extremos 5' y 3' de la secuencia, dando lugar a una cadena de 17 nucleótidos. Por el contrario, el aptámero truncado del Gli4 o Gli4T se obtuvo únicamente eliminando parte de la secuencia del extremo 5', originando una cadena de 19 nucleótidos. Sin embargo, sólo el Gli4T mostró una afinidad similar a la del aptámero completo (Svigelj *et al.*, 2020).

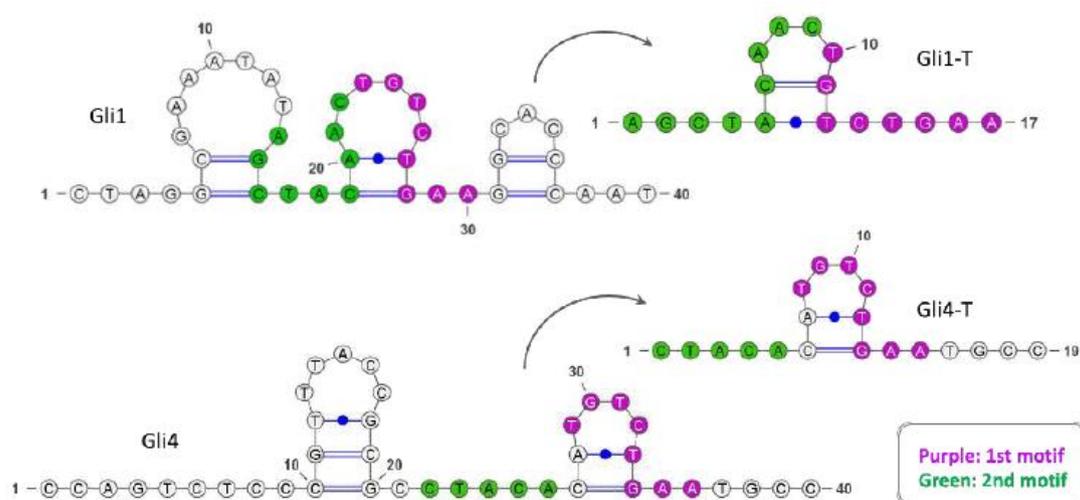


Figura 5: Estructuras secundarias del Gli1 y Gli4 y de los correspondientes aptámeros truncados (adaptada de Svigelj *et al.*, 2020).

Estudios anteriores realizados por el grupo de investigación determinaron que el hecho de añadir una marca al aptámero en el extremo 5' decrece su afinidad hacia los péptidos y proteínas

(Amaya-González *et al.*, 2015b). Por este motivo, es recomendable añadir una secuencia de 5 timinas entre el aptámero y la marca de biotina en el extremo 5´.

1.4 Análisis de péptidos derivados del gluten por espectrometría de masas

La espectrometría de masas aplicada a la proteómica comenzó a ganar importancia a partir de mediados de los años ochenta cuando se desarrollaron las fuentes de ionización de electroespray (ESI, por sus siglas en inglés) e ionización/desorción por láser asistida por una matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) ya que permitían una ionización suave y la transferencia de los iones a fase gas sin una fragmentación excesiva. Hasta ese momento, la espectrometría de masas estaba limitada a moléculas pequeñas y estables térmicamente, por lo que el desarrollo de estas fuentes de ionización aumentó drásticamente el campo de aplicaciones de la espectrometría de masas, convirtiéndose en una técnica de referencia en nuevos campos como la proteómica.

Durante los últimos años, esta técnica ha demostrado un gran potencial y versatilidad en el análisis de alérgenos en alimentos, superando las limitaciones asociadas a los métodos inmunológicos caracterizados por la reactividad cruzada que puede tener lugar con los anticuerpos. De esta forma, las técnicas proteómicas asociadas a la espectrometría de masas se están consolidando como una alternativa a los ensayos ELISA ya que permiten la detección individual de trigo, cebada, centeno y avena mediante la monitorización de biomarcadores peptídicos, ganando importancia en investigación para realizar la identificación, caracterización y cuantificación de péptidos y proteínas; se espera que en un futuro próximo pueda aplicarse también en la industria (Manfredi *et al.*, 2015).

Existen distintas estrategias a la hora de realizar un análisis proteómico. Entre ellas se encuentra la caracterización e identificación de proteínas intactas conocida como estrategia *top-down* y la identificación de proteínas digeridas o estrategia *bottom-up* (Liao *et al.*, 2017). Utilizando la aproximación *top-down* se lleva cabo una separación de las proteínas, por ejemplo mediante electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) o cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC), y se realiza el análisis directamente mediante espectrometría de masas en tándem. Al finalizar se tiene acceso a la secuencia de la proteína completa, por lo que es posible localizar y caracterizar en poco tiempo las modificaciones postransduccionales que se producen en la molécula. Sin embargo, los espectros de masas obtenidos son muy complejos por lo que esta estrategia requiere el uso de bases de datos y herramientas bioinformáticas complejas, las cuales están poco desarrolladas en la actualidad.

Si por el contrario se emplea la estrategia *bottom-up*, el primer paso es similar, se realiza una separación de las proteínas mediante 2D-PAGE o HPLC. La siguiente etapa es una digestión enzimática para dar lugar a los péptidos, los cuales se analizan por espectrometría de masas en tándem generalmente tras aplicar una separación previa por HPLC. Este procedimiento es el más utilizado ya

que, a pesar de que sólo se identifica una parte de la proteína, la interpretación de los espectros de masas es mucho más sencilla que en el caso anterior debido a que el número de proteínas es menor. Finalmente, la caracterización se realiza utilizando la gran variedad de herramientas bioinformáticas disponibles.

La estrategia que más se utiliza para la determinación de los péptidos derivados del gluten es la estrategia *shotgun*, un procedimiento muy similar al *bottom-up*, pero sin la primera etapa, es decir, las proteínas se digieren sin la separación electroforética previa (Figura 6). De esta forma, una mezcla de proteínas se digiere utilizando enzimas proteolíticas y los péptidos generados se separan mediante cromatografía líquida. Acto seguido, los péptidos separados se ionizan e introducen en el analizador de masas (Reinders y Sickmann, 2009).

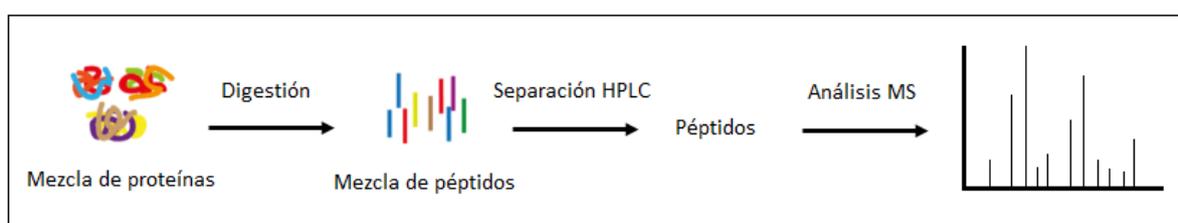


Figura 6: Diagrama de la estrategia *shotgun* (elaboración propia).

La fuente de ionización empleada tiene un impacto significativo en el análisis por espectrometría de masas. Existen diferentes opciones y cada una presenta una serie de ventajas dentro de su campo de aplicación, por lo que la elección de la fuente de ionización ha de hacerse en función de la estructura del analito de interés, del estado físico de la muestra y del objetivo del análisis. Dependiendo de la cantidad de energía interna que se transfiere a la muestra durante el proceso de ionización existen fuentes que dan lugar a la ionización molecular, a la fragmentación de la molécula y a la atomización e ionización. En la determinación de péptidos, se busca una ionización de los mismos sin dar lugar a procesos de fragmentación.

Las fuentes de ionización utilizadas comúnmente con este fin son la fuente MALDI y el electrospray. La ionización con MALDI genera iones monocargados por lo que la interpretación del espectro es sencilla. Por este motivo, la fuente de ionización MALDI surgió como una nueva alternativa para la caracterización de proteínas gracias a su robustez y a la capacidad de ionizar proteínas intactas. Además, es capaz de tolerar la presencia de contaminantes externos, como los detergentes, que se utilizan con frecuencia para la extracción del gluten. El principal inconveniente que presenta es que no se puede acoplar “en línea” con técnicas de separación cromatográficas.

1.4.1 Fuente de ionización de electrospray

La fuente ESI es muy útil para el análisis de proteínas complejas y de mezclas de péptidos debido fundamentalmente a su capacidad para generar iones de moléculas polares de alto peso molecular en fase gas a partir de disoluciones y a su facilidad de acoplamiento con HPLC. En los últimos años se ha

desarrollado una versión miniaturizada del ESI denominada nanoespray (nanoESI) que se ha convertido en la mejor fuente de ionización para introducir proteínas de gran tamaño cuando se sospecha que el contenido de los analitos es muy bajo. El uso de nanoESI proporciona un aumento en la sensibilidad y un menor efecto de matriz por lo que se está consolidado como la mejor opción para la realización de análisis en proteómica (Alves *et al.*, 2019).

La utilización del electroespray como método para disipar una muestra líquida de forma homogénea es antigua. El efecto físico en el que se fundamenta fue descrito por primera vez por Geoffrey Taylor. Más tarde, Malcom Dole realizó una serie de experimentos con el fin de generar un haz de moléculas de masa molecular elevada, pero no fue hasta 1988, cuando el grupo de John Fenn pudo demostrar que era posible transferir moléculas grandes, como las proteínas, en forma de iones a fase gaseosa sin fragmentarlas. A partir de ese momento, diferentes grupos de investigación comenzaron a trabajar con la fuente de electroespray acoplándola a espectrómetros de masas, lo que dio lugar a una amplia variedad de aplicaciones dentro del campo del análisis biomolecular (Wilm, 2011).

EL acoplamiento de la fuente ESI a la espectrometría de masas es extremadamente útil para la determinación de moléculas polares grandes, no volátiles y con capacidad de ionizarse, como las proteínas o los ácidos nucleicos. La disolución que llega a la fuente de electroespray está compuesta por un disolvente polar que contiene el analito a una concentración muy baja, del orden de 10^{-6} - 10^{-4} M. Además, la transferencia de iones desde la fase condensada hasta que los iones se encuentran aislados en fase gaseosa comienza a presión atmosférica y avanza de forma gradual hasta el alto vacío que se produce en el analizador de masas.

Una de las primeras ventajas observadas de la fuente de ionización ESI fue su capacidad de obtener iones de las moléculas con carga múltiple, lo que produce la reducción de la escala m/z , permitiendo la utilización de analizadores de masas con rangos de m/z limitados, como los cuadrupolos. De esta forma, este tipo de fuente de ionización se puede emplear tanto para moléculas polares (de alto y bajo peso molecular), como para complejos metálicos iónicos y otros analitos inorgánicos solubles en disolventes polares (Gross, 2011).

En cuanto al fundamento teórico, la formación de iones por ESI se basa en tres etapas: la creación de un spray eléctricamente cargado, la reducción del tamaño de las partículas y la liberación de los iones completamente desolvatados (*Figura 7*). Para ello, la disolución con el analito se inyecta a través de una bomba de jeringa mecánica o mediante el acoplamiento de una técnica de separación, como la cromatografía de líquidos, en un capilar de aproximadamente 75 μm de diámetro a un caudal de 1-20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se aplica un voltaje muy alto, 2-6 kV, en la punta del capilar metálico en relación con el cono de muestreo, que se sitúa a 1-3 cm, dando lugar a un campo eléctrico de 10^6 Vm^{-1} (Barnejee y Mazumdar, 2012).

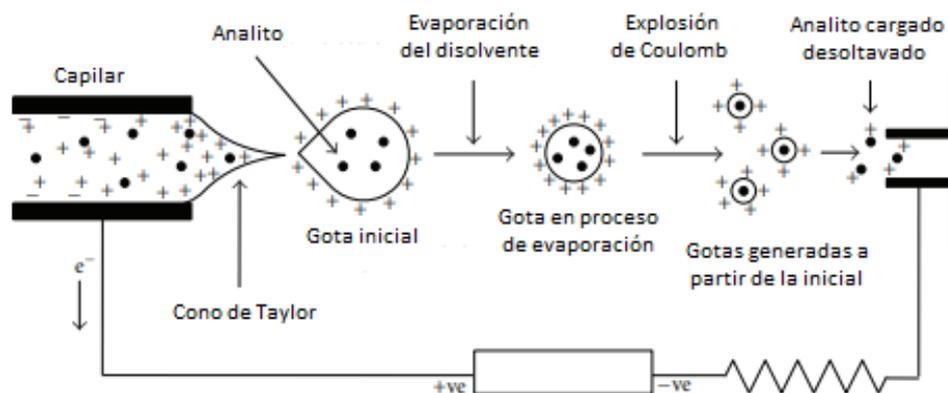


Figura 7: Esquema del proceso de ionización por electroespray (Barnejee y Mazumdar, 2012).

El spray generado está compuesto por una gran cantidad de gotas de analito altamente cargadas, cuya polaridad será positiva o negativa dependiendo del voltaje aplicado. Si se examina con un microscopio las gotas generadas en la punta del capilar a medida que aumenta el voltaje se observa como a valores pequeños las gotas tienen forma esférica, mientras que, a voltajes altos, cuando la tensión superficial es mayor que las repulsiones electroestáticas, se genera un spray muy fino que se conoce como cono de Taylor.

Las gotas producidas en la punta del capilar son conducidas hacia el analizador de masas a la vez que se produce la evaporación del disolvente gracias a una corriente de gas inerte, generalmente nitrógeno calentado. De este modo el tamaño de la gota se reduce poco a poco, aumentando la densidad de carga en la superficie de la gota. Este aumento en la densidad de carga hace que las repulsiones electroestáticas venzan la tensión superficial de la gota, dando lugar a una desolvatación donde se crean los iones en estado gaseoso, proceso denominado explosión de Coulomb.

La ionización por electroespray se considera una técnica suave en cuanto a la cantidad de energía interna que se transmite a la muestra, apenas produce fragmentación, y los iones generados presentan carga múltiple. La carga dependerá del voltaje aplicado: cuando se trabaja en modo positivo y se utilizan disoluciones ácidas, el analito M se carga incorporando n protones a su estructura $[M+nH]^{n+}$; por el contrario, cuando se aplica un voltaje negativo, las disoluciones empleadas son básicas, de manera que la carga en el analito se debe a la pérdida de protones, $[M-nH]^{n-}$. El número máximo de cargas que puede presentar un péptido o una proteína está directamente relacionado con la cantidad de aminoácidos básicos (arginina, lisina o histidina) presentes en su estructura.

En la mayoría de los casos, únicamente se observa el ion molecular con un número determinado de cargas. Sin embargo, al tratarse de una fuente de ionización a presión atmosférica es importante tener en cuenta que se pueden producir iones cuya carga no se deba a la adición o a la pérdida de un protón, sino a la unión al analito de otros iones presentes en disolución, como son el Na^+ , el K^+ , el Cl^- o el NH_4^+ , generándose así iones aducto que presentarán una m/z superior al ion molecular (Gross, 2011).

1.4.2 Espectrometría de masas en tándem

Se conoce como espectrometría de masas en tándem (MS/MS) a cualquier metodología que involucre al menos dos etapas de análisis de masa, ya sea en conjunto con un proceso de disociación o tras una reacción química que provoque un cambio en la masa o en la carga de un ion. El modo más común de operar es utilizar el primer analizador para aislar un ion precursor, fragmentarlo en la celda de colisión, y analizar esos fragmentos en un segundo analizador de masas.

Uno de los analizadores más utilizados en MS/MS es el triple cuadrupolo (QqQ) que consta de dos analizadores de masa en serie (Q) con una celda de colisión entre ellos. En los primeros instrumentos la celda de colisión utilizada era un cuadrupolo, de ahí su nombre original, pero actualmente se utilizan hexápolos u octápolos. En la celda de colisión se produce la fragmentación de los iones mediante procesos de disociación inducidos por colisión (CID). La activación de los iones por CID se basa en la aceleración y colisión del haz de iones procedentes del primer analizador de masas con un gas, generalmente N_2 , de tal manera que se produce la fragmentación del ion precursor formado en la fuente de ionización. Cuando se aplica una diferencia de potencial entre los dos extremos de la celda, que es lo que se conoce como energía de colisión, los iones son acelerados en el interior de la misma, de modo que la energía cinética adquirida se transforma durante la colisión con el gas en energía interna que se emplea en la rotura de los enlaces más débiles de la molécula. Normalmente, las colisiones que tienen lugar son de baja energía, inferiores a 100 eV. Una particularidad importante es que la fragmentación producida no es aleatoria, sino que los iones se rompen en los enlaces más vulnerables, por lo que existe un patrón de fragmentación característico de cada analito que se obtiene de forma reproducible y refleja la probabilidad de los distintos mecanismos de fragmentación.

Cuando se trabaja con un único analizador de masas existen dos modos de medida, el modo barrido o *scan* y la monitorización de iones selectiva o SIM. Utilizando el modo *scan* se realiza un barrido de las m/z seleccionadas, detectando todos los iones generados en ese rango de m/z . Es un modo de adquisición de datos muy utilizado para análisis cualitativos y como paso previo a un análisis cuantitativo cuando se desconoce lo que hay en la muestra. En contraposición, en el modo SIM únicamente se miden los iones de una m/z seleccionada previamente. Esto lo convierte en una forma de medida muy útil para el análisis cuantitativo ya que se aumenta la sensibilidad y se reducen los límites de detección debido a que se mide un menor número de m/z , por lo que el fondo espectral es menor, y la relación señal/ruido, mayor.

En la espectrometría de masas en tándem existe un abanico más amplio de modos de medida, que son el barrido de iones producto, barrido de iones precursores, barrido de pérdidas neutras y la monitorización selectiva de reacciones:

- El barrido de iones producto (*Figura 8A*) consiste en seleccionar un ion precursor de una determinada m/z con el modo SIM y determinar todos los iones producto resultantes de la CID realizando un *scan* con el segundo analizador de masas. Es un modo de medida muy utilizado para elucidar la estructura de un analito desconocido.
- El barrido de iones precursores (*Figura 8B*) se realiza midiendo en modo *scan* en el primer cuadrupolo, y monitorizando con SIM únicamente determinados iones producto en el segundo analizador de masas. Se utiliza comúnmente para detectar un conjunto de compuestos en una muestra con grupos funcionales específicos.
- El barrido de pérdidas neutras (*Figura 8C*) utiliza el modo de medida *scan* en ambos analizadores de manera sincronizada, de modo que la diferencia de masa de los iones entre el primer y el segundo cuadrupolo permanece constante. En el caso de que exista una diferencia entre ambos analizadores, esa diferencia se corresponde a un fragmento neutro que se genera en la celda de colisión. Por tanto, se trata de una forma de medida muy útil para detectar moléculas que contienen un grupo funcional determinado que producen un fragmento no cargado.
- La monitorización selectiva de reacciones (SRM) (*Figura 8D*) se lleva a cabo seleccionando una m/z determinada del analito en cuestión en el primer analizador y una m/z correspondiente al ion producto generado de mayor intensidad en el segundo. De esta forma, se utiliza un modo SIM en los dos analizadores de masas. Es el modo de medida más utilizado en MS/MS para la cuantificación de analitos de fragmentación conocida en muestras complejas, ya que la relación señal/ruido es muy elevada. Este modo proporciona una gran sensibilidad y selectividad ya que se eliminan las posibles interferencias espectrales que se producirían en otros tipos de modos de medida (Hoffmann y Stroobant, 2007).

Cabe resaltar que la cuantificación absoluta de péptidos hace uso normalmente de análogos marcados isotópicamente y del análisis por dilución isotópica para la corrección de los errores derivados de la preparación de la muestra o de los efectos de matriz en la fuente ESI. Por ejemplo, la técnica AQUA (Absolute Quantification), que utiliza la dilución isotópica para marcar un péptido sintético semejante a los generados durante la digestión como si fuese un patrón interno, permite la determinación de la concentración de proteínas (Chahrour, Cobice y Malone, 2015).

Sin embargo, la mayoría de los métodos de cuantificación de proteínas desarrollados hasta la fecha son relativos, se basan en la medida de la intensidad de señal de muestras marcadas isotópicamente, ya sea un marcaje químico con la técnica ICAT (Isotope-coded affinity tag), metabólico utilizando la técnica SILAC (Stable isotope labeling by aminoacid in cell culture) o mediante catálisis

enzimática empleando ^{18}O . Sin embargo, éstas no proporcionan información sobre la concentración de péptidos o proteínas en una muestra, ya que están basadas en proteómica diferencial.

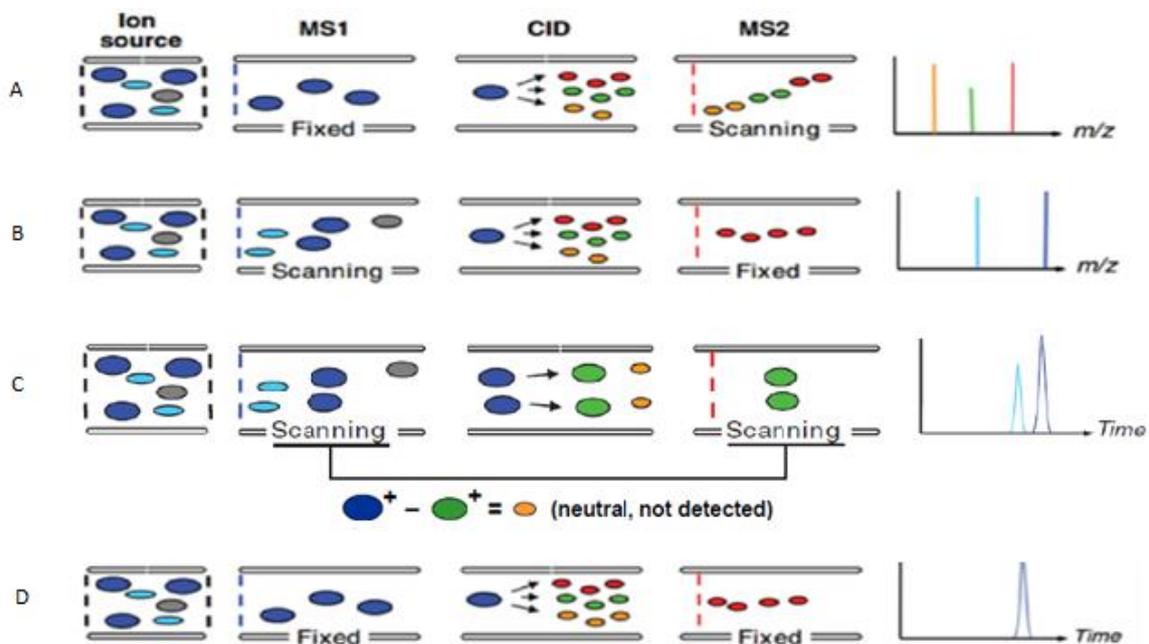


Figura 8: Modos de trabajo en espectrometría de masas en tándem (adaptada de Domon y Aebersold, 2006).

1.5 Hidrólisis de proteínas mediante digestiones enzimáticas

La aplicación exitosa de la aproximación *shotgun* en el análisis del gluten depende de la eficacia de la digestión. En el ámbito de la proteómica, la utilización de tripsina como enzima proteolítica es la opción más utilizada no sólo por su alta eficacia sino por su especificidad y su bajo coste. La tripsina rompe el esqueleto peptídico en los aminoácidos lisina y arginina, dando lugar a péptidos de cadena corta con un residuo básico en el extremo C-terminal, lo que permite su análisis mediante MS/MS incluso con equipos de triple cuadrupolo en los que el rango de m/z es más limitado.

Debido a la baja cantidad de los aminoácidos lisina y arginina en la secuencia de las prolaminas del trigo, la digestión trípica produce un bajo número de péptidos de alto peso molecular con relaciones m/z fuera del rango de trabajo de los cuadrupolos. Por este motivo, la hidrólisis de las prolaminas del trigo se realiza utilizando quimiotripsina que rompe la cadena proteica en el grupo carboxi-terminal de aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, el triptófano y la tirosina y también de otros con menor afinidad como la leucina y la metionina. En comparación con la tripsina, la digestión con quimiotripsina genera un mayor número de péptidos de menor tamaño que sí pueden ser analizados por LC-MS/MS, permitiendo la secuenciación peptídica de las proteínas objeto de estudio (Colgrave, Byrne y Howitt, 2017).

Si se pretende simular el proceso de digestión que ocurre en el organismo de los pacientes para así producir los péptidos que se generan en el interior del cuerpo humano, la opción ideal sería llevar a cabo una digestión *in-vivo*, pero no es posible debido a los problemas éticos que conlleva. Lo que se

utiliza en estos casos son modelos de digestión *in-vitro*, que realizan una simulación de las condiciones fisiológicas del tracto gastrointestinal superior, como son el pH, la temperatura, la agitación y la composición química de la fase oral, gástrica y la correspondiente al intestino delgado, que es donde se produce la absorción de los nutrientes. Estos modelos han sido ampliamente utilizados para el estudio de los péptidos digeridos procedentes del gluten. Existen diferentes métodos, tanto estáticos como dinámicos, por lo que la diversidad de los protocolos utilizados hace que la comparación entre estudios sea prácticamente imposible (Boukid *et al.*, 2019).

Ante la necesidad de armonización de los protocolos de digestión existentes, el grupo de investigación INFOGEST, formado por expertos multidisciplinares de más de 35 países, decidió establecer un modelo estático para la digestión de los alimentos, ya que el procedimiento sería más simple. Dicha digestión implica la exposición al alimento a tres etapas sucesivas: oral, gástrica e intestinal. Desde su publicación en 2014, este método de digestión *in-vitro* ha sido ampliamente utilizado en todo el mundo en los ámbitos de la ciencia, tanto agrícola como en el de la ciencia de los alimentos (Brodkorb *et al.*, 2019).

El grupo del Prof. Chaitan Khosla de la Universidad de Stanford ha optimizado durante varios años el proceso de digestión *in-vitro* del gluten. Así, estudiaron las diferencias obtenidas con distintas enzimas, incluyendo pepsina, tripsina, quimiotripsina, elastasa y carboxipeptidasa A; evaluaron el tiempo de reacción necesario y la relación de proteína:enzima necesaria para la digestión. La conclusión alcanzada tras el estudio es que se obtienen los mejores rendimientos realizando una digestión gástrica con pepsina durante 1-2 horas, y una intestinal con tripsina y quimiotripsina durante 30 minutos. Además, se determinó que la relación proteína:enzima necesaria para que se produzca la digestión es de 100:1 (Sealey-Voyksner *et al.*, 2010).

2. Objetivos

El objetivo científico principal de este Trabajo Fin de Máster es el estudio de la captura del péptido 33-mer por parte del aptámero Gli4T tras realizar una simulación de digestión gastrointestinal *in-vitro* de la α -gliadina mediante Cromatografía de Líquidos y Espectrometría de Masas en tándem.

Dentro de este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos más específicos:

- Estudiar la influencia de la duración de cada reacción enzimática en la eficacia de la generación del péptido 33-mer y posterior captura con aptámeros inmovilizados sobre partículas magnéticas.
- Realizar la optimización de los parámetros de la fuente de ionización y de la celda de colisión del espectrómetro de masas con el fin de lograr la máxima sensibilidad durante los análisis.
- Optimizar un método SRM para la determinación e identificación del péptido 33-mer en las distintas fracciones de los digeridos.
- Identificar otros péptidos capturados por el aptámero en las distintas fracciones de los digeridos.

Además de estos objetivos científicos, el principal objetivo académico planteado en la realización de este Trabajo Fin de Máster ha sido aprender a utilizar diferentes técnicas de bioconjugación, profundizar en la técnica de análisis utilizada (HPLC-ESI-MSMS), trabajar dentro de dos grupos de investigación diferentes del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo, ser consciente de la dificultad que existe a la hora de obtener resultados en un laboratorio de investigación y, sobre todo, ser capaz de utilizar técnicas analíticas de forma autónoma e interpretar los resultados obtenidos de ellas.

3. Experimental

3.1 Reactivos

Para llevar a cabo la digestión enzimática se utilizó un patrón de gliadina del Prolamin Working Group que se adquirió a R-Biopharm AG (Alemania). También se utilizó un patrón del péptido 33-mer de la casa comercial Biomedal (España) con una pureza del 98,27% para realizar la optimización del método de análisis y cuya secuencia de aminoácidos es LQLQFPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF.

Se emplearon partículas magnéticas de 1,0 μm de diámetro funcionalizadas con estreptavidina de Thermo Fischer Scientific. Las partículas se suministraron en forma de suspensión con una concentración de 10 mg/mL ($7\cdot 10^9$ micropartículas/mL) en disolución reguladora de fosfato (PBS) de pH 7,4, que contiene 0,01% de Tween 20 y 0,09% de NaN_3 como conservantes.

El aptámero utilizado (Gli4T) cuya secuencia de bases en sentido 5' \rightarrow 3' es CTA CAC ATG TCT GAA TGC C, fue proporcionado por Metabion International (Alemania) en forma liofilizada y tras su purificación por HPLC. Se encuentra funcionalizado en el extremo 5' con 5 timinas y una biotina.

Para la separación cromatográfica se utilizó acetonitrilo (ACN, $\geq 99\%$) de Fischer Comercial, ácido fórmico (FA, $\geq 99\%$) de Sigma-Aldrich, y agua ultrapura obtenida a partir de un equipo de la casa comercial Millipore (Francia).

El resto de reactivos utilizados se detallan en la *Tabla 2*. Todas las disoluciones realizadas a partir de ellos se hicieron con agua ultrapura purificada con un sistema Direct-Q de Millipore (Francia).

Tabla 2: Reactivos utilizados durante los diferentes procedimientos experimentales.

Reactivo	Casa comercial
Pepsina porcina	Sigma-Aldrich
Tripsina de pancreas bovino	Sigma-Aldrich
Quimiotripsina	Sigma-Aldrich
NaOH	Sigma-Aldrich
NaH_2PO_4	Sigma-Aldrich
HCl	J. T. Baker
Ácido trifluoroacético (TFA)	Merck
PBS	Sigma-Aldrich
TRIS-HCl 1M pH 7.4	Sigma-Aldrich
NaCl ($\geq 98\%$)	Sigma-Aldrich
MgCl_2	Sigma.Aldrich
Tween 20 (70%)	Sigma-Aldrich
Urea	Sigma-Aldrich

Las disoluciones que se han utilizado a lo largo del procedimiento experimental son:

- Disolución BS: 50 mM TRIS pH 7,4, NaCl 0,25M y MgCl_2 5 mM.
- Disolución BST: BS y Tween 20 al 0,01%.

- Disolución PBS 1x y Tween 20 al 0,005%.

3.2 Material

Todas las pesadas realizaron en una balanza analítica de Mettler Toledo (España), modelo AG135. Las etapas de incubación de la digestión se realizaron en un agitador termostatzado, modelo Thermomixer Confort, de la casa comercial Eppendorf Ibérica (España) que permite fijar la temperatura y la agitación. Cuando únicamente se quiere termostatzar a una determinada temperatura, se utilizó un *thermoblock* de Selecta (España) para incubar. También se empleó un vortex para homogeneizar las disoluciones en determinadas ocasiones con agitación. Para llevar a sequedad las muestras se utilizó un Concentrador Plus de la marca Eppendorf de Fischer Scientific (España). Tras haber realizado la reconstitución de las muestras, se utilizó una centrifuga Heraeus Multifugex3 L-R de Thermo Fisher Scientific (España) para separar el sobrenadante de lo que pudiese haber quedado sin disolver. La separación de las partículas magnéticas de la disolución se llevó a cabo mediante un imán DynaMag-2 adquirido a Life Technologies (Madrid, España) que cuenta con una capacidad para 16 viales de 1,5 mL. Durante los diferentes ensayos se utilizó material volumétrico de clase A, micropipetas de diferentes volúmenes, puntas de pipeta desechables, viales eppendorf de 1,5 mL y viales con inserto de 150 µL.

3.3 Equipo HPLC-ESI-MS/MS

Todas las operaciones experimentales en las que se realizó una separación cromatográfica o un análisis por inyección en flujo (FIA) se llevaron a cabo con el cromatógrafo HPLC modelo 1290 Infinity de Agilent Technologies que consta de un desgasificador, una doble bomba binaria que permite alcanzar presiones de hasta 1200 bares y un inyector automático termostatzado. El cromatógrafo de líquidos se acopló a un analizador de masas de tipo triple cuadrupolo, modelo 6460, también de Agilent Technologies, con una fuente de ionización electrospray con tecnología *jet-stream* (Figura 9). 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 generados. 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 una función focalizadora del flujo de iones, que, junto con la disposición ortogonal entre el capilar y la entrada al espectrómetro de masas mejora la sensibilidad porque sólo se introducen aquellos compuestos que estén ionizados mientras que se reduce el número de moléculas neutras que llegan al analizador. Por tanto, la utilización de la tecnología *jet-stream* proporciona mayor sensibilidad, robustez y mejora la trasmisión iónica en comparación con la configuración convencional.

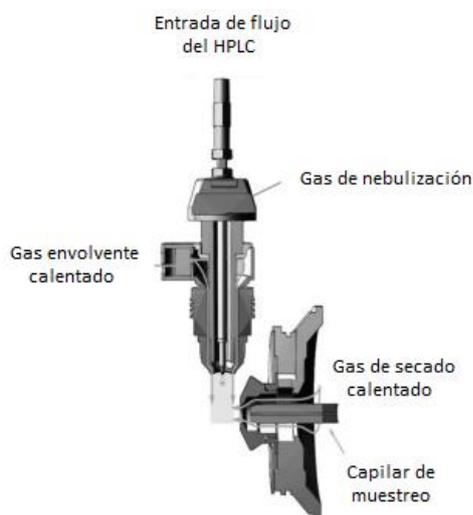


Figura 9: Esquema de la fuente de ionización ESI con configuración "jet-stream".

En la *Figura 10* se muestra un esquema del espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo. A la entrada del analizador de masas se puede observar un capilar de muestreo que se encarga de transmitir los iones al espectrómetro de masas. Es un capilar dieléctrico que tiene un recubrimiento de platino en los extremos para establecer una diferencia de potencial entre los mismos permitiendo una rápida alternancia de la polaridad iónica con mínimas pérdidas de iones. A continuación, se encuentra un octapolo que enfoca los iones hacia el primer cuadrupolo. La celda de colisión es un hexapolo presurizado con nitrógeno que se sitúa después del primer cuadrupolo. Mediante la aplicación de una diferencia de potencial entre la entrada y la salida de la celda de colisión (energía de colisión) los iones precursores que entran en la celda colisionan con las moléculas de gas neutras y se fragmentan por disociación inducida por colisión (CID). Tras la celda de colisión se sitúa el segundo cuadrupolo que analiza los iones producto. Finalmente, tras el segundo cuadrupolo se sitúa el detector que consta de un dínodo de alta energía con electroamplificación que puede trabajar en modo de adquisición positivo o negativo. El equipo también contiene un detector visible-ultravioleta que se encuentra después de la columna.

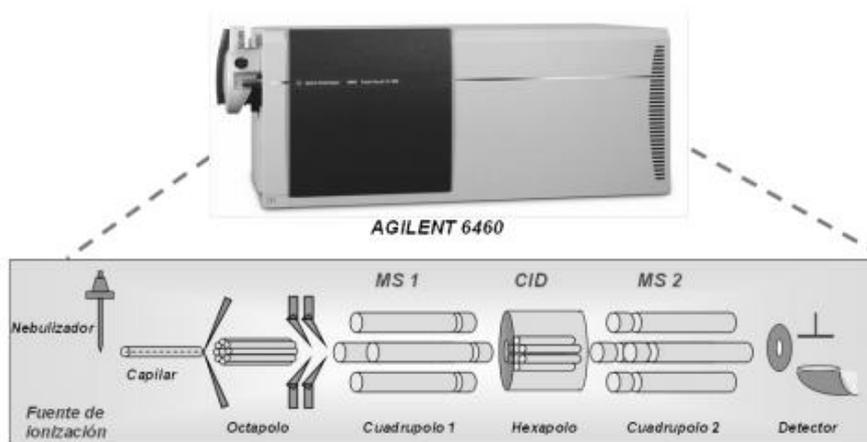


Figura 10: Esquema del espectrómetro de masas de tipo triple cuadrupolo Agilent 6460.

3.4 Procedimientos experimentales

3.4.1 Simulación gastrointestinal de la digestión in-vitro de la PWG

En la digestión de la PWG se simula tanto la digestión gástrica como la intestinal a partir de 2 mg de PWG. Se llevaron a cabo cuatro digestiones diferentes en las que en cada una de ellas el tiempo de actuación de las enzimas utilizadas es distinto. Las especificaciones de cada digestión se detallan en la *Tabla 3*. Se pretendía que la concentración de las enzimas fuese siempre la misma y que la variación se produjese únicamente en el tiempo de incubación, pero debido a un error experimental, la concentración de tripsina en la digestión 3 es mayor que el resto de los casos.

Tabla 3: Condiciones experimentales de las cuatro digestiones.

Digestión	PEPSINA		TRIPSINA		QUIMIOTRIPSINA	
	Tiempo (horas)	Concentración (mg/mL)	Tiempo (horas)	Concentración (mg/mL)	Tiempo (horas)	Concentración (mg/mL)
1	3	0,6	3	0,375	3	0,375
2	3	0,6	3	0,375	24	0,375
3	3	0,6	24	0,462	3	0,375
4	24	0,6	3	0,375	3	0,375

Para realizar la digestión intestinal (*Figura 11*), se añadieron 250 μ L de HCl 10 mM y 250 μ L de una disolución de pepsina de concentración 1,2 mg/mL en HCl 10 mM. Se incubó en un *thermomixer* el tiempo indicado previamente a 37 °C con 300 rpm de agitación.

En la digestión intestinal se utilizaron dos enzimas en dos etapas diferenciadas: tripsina y quimiotripsina (*Figura 12*). La muestra se neutralizó con 500 μ L de NaH₂PO₄ 100 mM. A continuación, se añadieron 600 μ L de una disolución de tripsina de concentración 1 mg/mL en HCl 1 mM. Se incubó en un *thermomixer* un a 37 °C con 300 rpm de agitación el tiempo correspondiente según la digestión.

En la última etapa de la digestión se utilizó la quimiotripsina. Se añadieron 955 μ L de una disolución de concentración 1 mg/mL en HCl 1 mM. Se incubó en un *thermomixer* un determinado tiempo a 37 °C con 300 rpm de agitación. Al finalizar, la reacción enzimática se detuvo utilizando TFA al 20%. Acto seguido, la muestra se llevó a sequedad en un concentrador y se almacenó en el congelador.

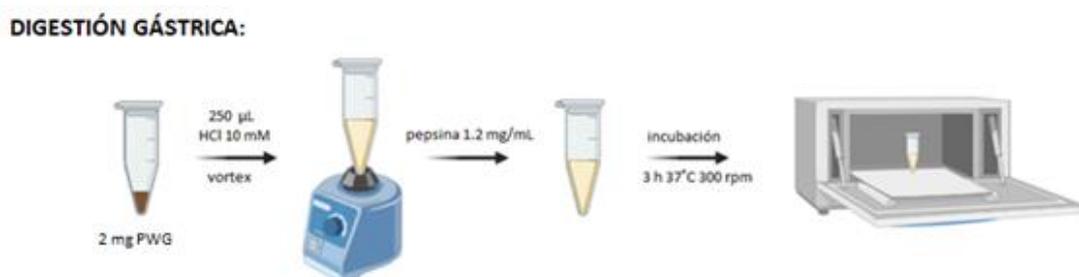


Figura 11: Esquema de la digestión gástrica simulada de la PWG.

DIGESTIÓN INTESTINAL:

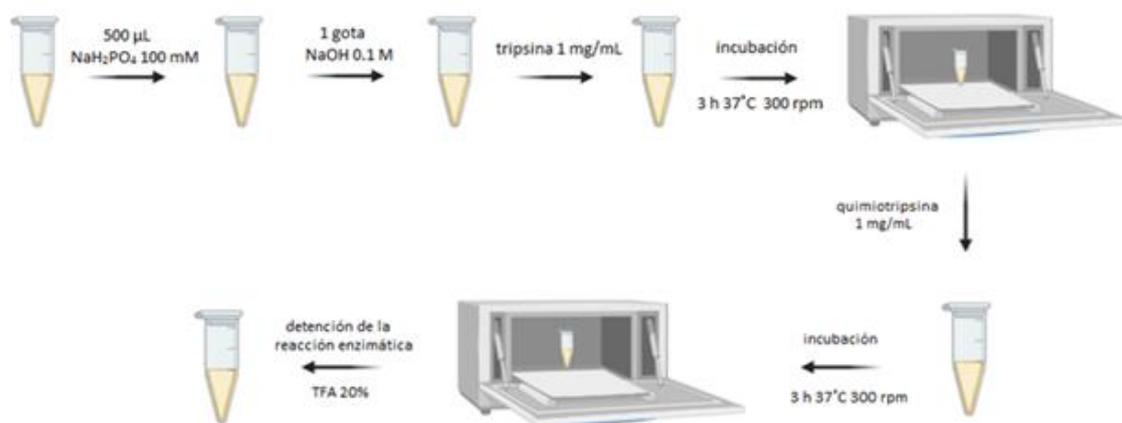


Figura 12: Esquema de la digestión intestinal simulada de la PWG.

3.4.2 Modificación de las partículas magnéticas con el aptámero

Se tomaron 50 µL de la disolución comercial de partículas magnéticas modificadas con estreptavidina y se diluyeron con 250 µL de PBS 1x que contenía 0,005% de Tween 20. A continuación, se lavaron dos veces con 500 µL de PBS 1x. Después, se resuspendieron en 250 µL del aptámero de captura Gli4T biotinilado 1 µM en PBS 1x. La suspensión resultante se incubó 30 min a 30 °C en un *thermomixer* con agitación. Al terminar, se lavaron dos veces: la primera con un buffer de PBS 1x + 0,005% de Tween20, y la segunda con BST. Por último, se reconstituyeron en 250 µL de BS y se almacenaron a 4 °C en la nevera.

3.4.3 Captura de péptidos con aptámeros inmovilizados sobre partículas magnéticas

La muestra se reconstituyó con 500 µL de BS, se añaden 200 µL de partículas magnéticas modificadas con el aptámero Gli4T y se incubaron 30 minutos a 30 °C con agitación a 1300 rpm en un *thermomixer* (en la *Figura 13* se muestra la interacción que se produce entre las partículas magnéticas y el digerido). Se realizó la separación magnética con la ayuda de un imán, se recuperó el sobrenadante y se sometió a una nueva interacción con 200 µL de partículas magnéticas en las mismas condiciones: incubación 30 minutos a 30 °C con agitación a 1300 rpm. Se realizó la separación magnética para recuperar las partículas. El sobrenadante, es decir, la fracción no capturada, se llevó a sequedad en un concentrador para ser analizado por espectrometría de masas. A partir de este momento se nombrará como no enlazado.

Los péptidos del primer stock de partículas magnéticas se eluyeron añadiendo 50 µL de agua previamente calentada e incubando a 95 °C durante 15 minutos en un *thermoblock* (la incubación se realizó dos veces con fracciones frescas de agua caliente). Los péptidos del segundo stock de partículas magnéticas se eluyeron de la misma forma. Finalmente, se mezclaron todas las proteínas eluidas en agua, se llevaron a sequedad en un concentrador, y se almacenaron en el congelador hasta ser analizadas.

Las partículas magnéticas utilizadas para hacer la captura se guardaron en 150 μL de BS a 4 $^{\circ}\text{C}$ ya que se quiere comprobar la eficacia de la elución, es decir, que todos los péptidos han sido eluidos y que no han quedado retenidos. Para ello, se incubaron en 50 μL de urea 8 M durante 1 hora a 25 $^{\circ}\text{C}$ con agitación a 1300 rpm, se realizó la separación magnética y el sobrenadante se llevó a sequedad para analizarlo posteriormente. A partir de aquí será nombrado como remanente. Realizando esta incubación se produce la disociación completa del complejo aptámero-proteína, quedando la proteína en disolución y el aptámero unido a las partículas magnéticas.

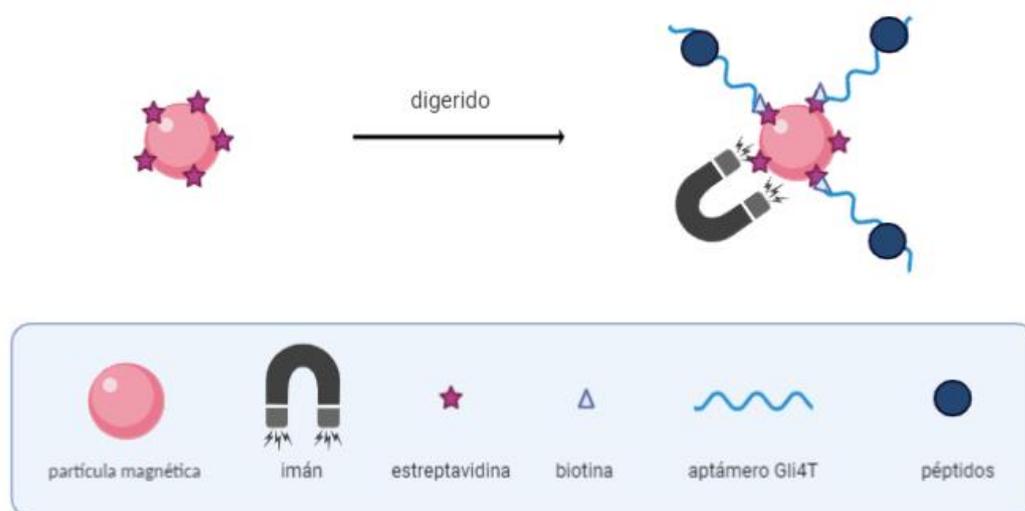


Figura 13: Esquema de la interacción del digerido con las partículas magnéticas modificadas.

Los péptidos se llevaron a sequedad tras finalizar el procedimiento experimental con el fin de conservarlos. Para poder analizarlos es necesario que se reconstituyan. Para ello, se añadieron 50 μL de una mezcla de $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ 85:15 con ácido fórmico al 0,1% (v/v), se homogenizaron con el vortex, se centrifugaron 5 minutos y el sobrenadante se traspasó a un vial con inserto.

3.4.5 Análisis por inyección en flujo-espectrometría de masas

El análisis por inyección en flujo (FIA) se realizó inyectando 1 μL de muestra a un flujo de 0,3 mL/min. El porcentaje de las fases móviles empleadas para la inyección había sido previamente optimizado por el grupo de investigación de Isótopos Estables Enriquecidos de la Universidad de Oviedo: un 58% de la fase móvil A, compuesta de agua ultrapura y ácido fórmico al 0,1% (v/v) y un 42% de la fase B, formada por ACN y ácido fórmico 0,1% (v/v).

3.4.6 Análisis por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

El análisis de las muestras se llevó a cabo utilizando una columna Peptide XB-C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μm , Aeris, Phenomenex). Las fases móviles empleadas fueron agua ultrapura y ácido fórmico al 0,1% (v/v), fase móvil A, y ACN y ácido fórmico 0,1% (v/v) que es la fase móvil B. Se inyectaron 5 μL de muestra a un flujo de 0,3 mL/min. El gradiente cromatográfico utilizado se muestra en la *Tabla 4* y había sido optimizado previamente por el grupo de investigación.

Tabla 4: Gradiente cromatográfico empleado en el análisis de las muestras mediante LC-ESI-MSMS.

Tiempo (min)	Fase A (%)	Fase B (%)
0	98	2
7	50	50
10	20	80
11	98	2
13	98	2

4. Resultados y discusión

4.1 Estudio del patrón de fragmentación del péptido 33-mer

Para estudiar cómo se ioniza el péptido 33-mer en la fuente de ionización de electroespray se inyectó en FIA un patrón del péptido de una concentración de 100 mg/kg en una mezcla de H₂O:ACN 85:15 con ácido fórmico al 0,1% (v/v). Se seleccionó como modo de adquisición el modo scan utilizando las condiciones ya detalladas en el apartado 3.3.6, de modo que se realizó un barrido de los iones generados desde m/z 100 hasta m/z 3000. En el cromatograma de la *Figura 14* se puede observar que el tiempo de retención del 33-mer es de 5,62 minutos. En la *Figura 1A* del anexo se muestra el cromatograma completo.

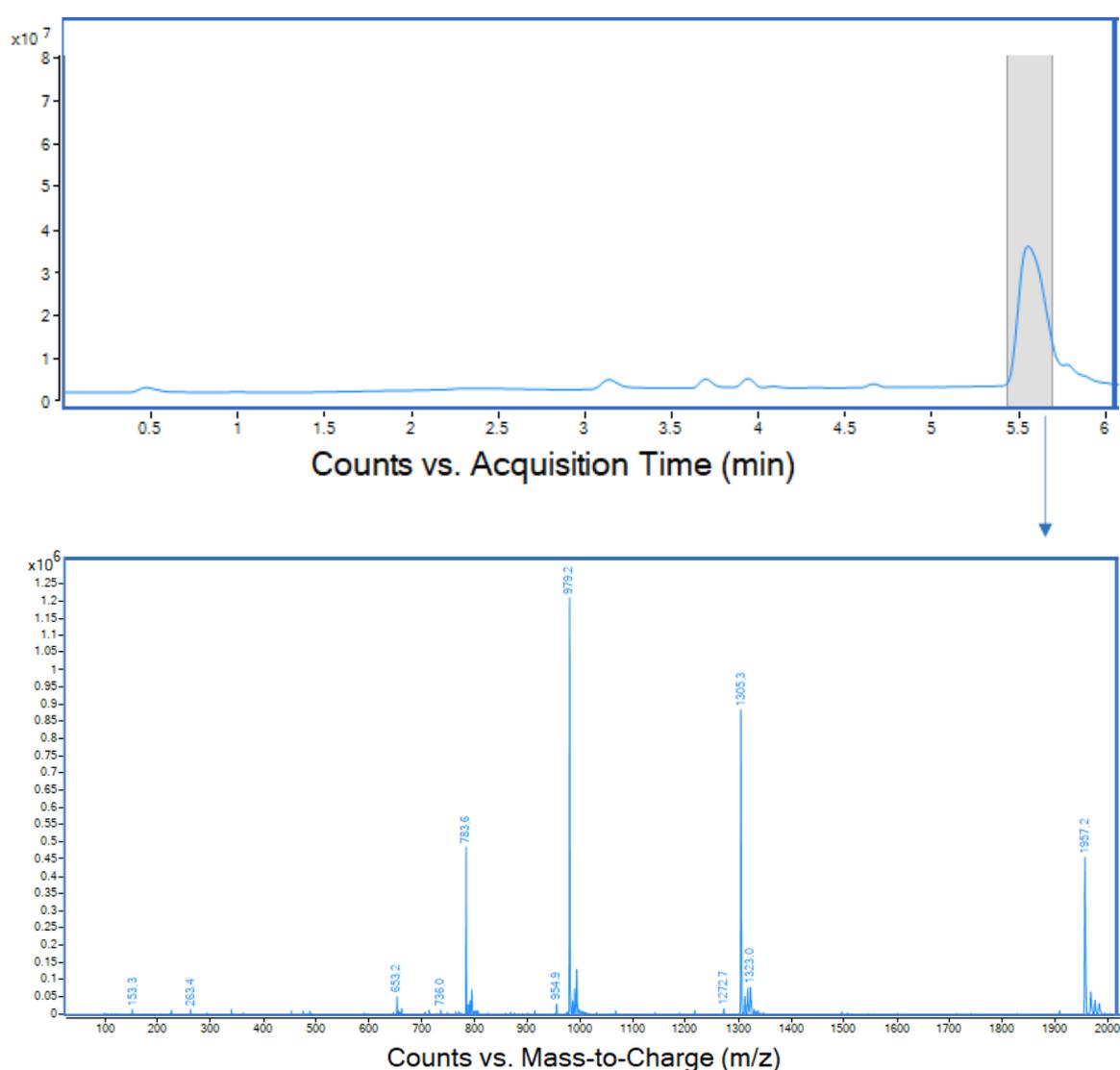


Figura 14: Cromatograma del péptido 33-mer obtenido en modo scan y su espectro de masas.

Analizando el espectro de masas de la *Figura 14* (el espectro completo se muestra en la *Figura 2A* del anexo), se puede afirmar que el péptido 33-mer protonado a m/z = 3911,0, no está presente debido a la limitación del rango de masas del cuadrupolo. Sin embargo, sí se observan los iones del péptido 33-mer doble, triple y cuádruplemente cargados a m/z 1957,2; 1305,3 y 979,2,

respectivamente. El ion con carga +4 es el que presenta una mayor intensidad, seguido del +3 y del +2, por lo que se seleccionaron los iones +4 y +3 para todas las siguientes medidas realizadas en modo SIM.

4.2 Optimización de los parámetros de la fuente de ionización

Tras haber seleccionado los iones precursores del 33-mer que se van a monitorizar, se procedió a optimizar los parámetros instrumentales de la fuente que afectan a la eficiencia de ionización del analito y a la transmisión de los iones generados hacia el analizador de masas con el fin de obtener la máxima sensibilidad. Es importante tener en cuenta que dependiendo de las características del analito objeto de estudio y de la matriz en la que se encuentre, los parámetros óptimos serán diferentes, motivo por el cual es muy importante llevar a cabo esta optimización.

Los parámetros que tradicionalmente hay que estudiar de la fuente de ionización son la presión del nebulizador, el voltaje del capilar y la temperatura y el flujo del gas de secado. En nuestro caso, debido a la incorporación de la tecnología *jet-stream* en la fuente de ionización, es necesario estudiar tres parámetros adicionales: la temperatura y el flujo del “*sheath gas*” y el “voltaje del nozzle”.

En la *Tabla 5* se muestran los diferentes parámetros e intervalos estudiados para maximizar la señal de los iones de interés. Los rangos de estudio seleccionados son los aconsejados por la casa comercial del equipo, Agilent Technologies. Para realizar la optimización de las condiciones de la fuente se realizó la inyección en modo FIA del patrón del péptido 33-mer y se monitorizó la señal de los iones precursores a m/z 979,2 y 1305,3 en modo SIM.

Tabla 5: Rangos e intervalos estudiados para los parámetros de la fuente de ionización.

Parámetro	Rango de estudio	Intervalo
Temperatura del <i>sheath gas</i> (°C)	200 - 400	50
Flujo del <i>sheath gas</i> (L/min)	8 - 12	2
Presión del nebulizador (psi)	25 - 50	5
Voltaje del capilar (V)	2500 - 4500	500
Voltaje del nozzle (V)	0 - 2000	500
Temperatura del gas de secado (°C)	250 - 350	50
Flujo del gas de secado (L/min)	5 - 11	2

El primero de los parámetros optimizados tal y como se muestra en la *Tabla 5* fue la temperatura del *sheath gas*. Como ya se explicó anteriormente, el *sheath gas* permite concentrar los iones en una zona de confinamiento térmico, haciendo que el flujo de iones hacia el analizador de masas sea más uniforme y que un mayor número de ellos consigan penetrar en el analizador. El rango de temperaturas estudiado fue de 200 – 400 °C a intervalos de 50 °C. En la *Figura 15A* se muestra el resultado obtenido para la optimización de este parámetro utilizando los dos iones precursores

seleccionados. En ambos casos se obtiene una tendencia similar, de manera que según se aumenta la temperatura, la sensibilidad empeora, por lo que el valor óptimo es 200 °C.

El flujo del *sheath gas* fue estudiado entre 8 – 12 L/min a intervalos de 2 L/min. Analizando los resultados obtenidos (*Figura 15B*) se observa una continua mejora a medida que se aumenta el flujo del *sheath gas*, obteniendo la sensibilidad máxima a 12 L/min para los dos iones precursores.

El efecto venturi es uno de los mecanismos responsables de la nebulización del eluyente líquido que procede del equipo de cromatografía. La presión del gas de nebulización desempeña un papel muy importante en el proceso, y como consecuencia, en la eficiencia de ionización y en la sensibilidad. Por este motivo, la presión del nebulizador se optimizó para los dos iones precursores en un rango de 25 – 50 psi a intervalos de 5 psi. En la *Figura 15C* se muestra la respuesta instrumental. La tendencia observada vuelve a ser similar para los dos iones precursores: la variación en la sensibilidad no es muy significativa en este caso, pero es posible afirmar que se obtiene una mayor intensidad de señal a 25 psi.

El voltaje del capilar fue el siguiente parámetro de la fuente optimizado. Este voltaje corresponde a la diferencia de potencial aplicada entre los dos extremos del capilar para conseguir una mayor atracción electrostática de los iones precursores e incrementar su transferencia desde la fuente al espectrómetro de masas. Este parámetro se optimizó entre valores de 2500 – 4500 V a intervalos de 500 V. En la *Figura 15D* se observan los resultados obtenidos para los distintos valores estudiados. La tendencia es ascendente, de tal forma que a medida que se aumenta el voltaje del capilar aumenta la sensibilidad, por lo que el valor seleccionado fue de 4500 V.

Tal y como se explicó en el apartado 3.3, el proceso de ionización de la fuente ESI *jet-stream* hace uso de un gas auxiliar que mejora el rendimiento de ionización e incrementa el número de iones que alcanzan el analizador. Sin embargo, esta corriente puede actuar como aislante del campo eléctrico generado por la diferencia de potencial, el voltaje capilar, aplicado entre los extremos del capilar para generar las gotas de las moléculas cargadas. Por este motivo existe el parámetro del voltaje del nozzle, ya que permite la aplicación de un potencial extra en el extremo del capilar y superar el efecto aislante del *sheath gas*, mejorando así la eficiencia de ionización. Los valores estudiados son entre 0 – 2000 V a intervalos de 500V. Las intensidades de señal obtenidas aumentan de 0 a 500 V, lo que implica que es un parámetro necesario. A 500 V se observa el máximo de sensibilidad y a partir de ahí las señales comienzan a decrecer para el ion 1305,3 y el 979,2 llega a una zona de meseta. Por tanto, el valor de voltaje del nozzle seleccionado es 500 V.

Tradicionalmente, la evaporación de las gotas de disolvente se realiza con la corriente de gas de secado, que es N₂. Gracias a la modernización de las fuentes de ionización y a la aparición de nuevos parámetros como el *sheath gas*, el gas de secado ya no juega un papel tan determinante en el proceso de ionización, pero aun así se sigue utilizando ya que reduce el número de moléculas neutras que

alcanzan la zona de alto vacío. Esto se muestra en los resultados observados para los dos iones precursores, que son completamente opuestos (*Figura 15F*). Para el ion 979,2 el valor óptimo es 250°C, mientras que para el 1304,5 es 350°C. Ante esta situación de compromiso, se utilizará 350°C como temperatura óptima del gas de secado.

Por último, se estudió el flujo del gas de sacado. El rango objeto de estudio fue 5 – 11 L/min, con intervalos de 2 L/min. En la gráfica (*Figura 15G*) se observa como de 5 a 7 L/min se produce un aumento de la sensibilidad dando lugar a un máximo, esta disminuye ligeramente a 9 L/min y vuelve a ascender en 11 L/min. Para el caso del ion 979,2, la señal máxima se produce a 11 L/min, mientras que para 1305,3, a 7 L/min. Ambos valores de flujo proporcionan una muy buena sensibilidad en los dos casos, por lo que ante esta situación de compromiso se selecciona 11 L/min, el valor óptimo del ion 979,2 ya que la mejora en la sensibilidad respecto a 7 L/min es considerable si se compara con la pérdida de sensibilidad en el 1305,3 al pasar de 7 a 11 L/min.

A continuación, en la *Tabla 6*, se muestran los valores óptimos de trabajo de los parámetros de la fuente de ionización, que son los que se emplearán a partir de este momento para el análisis por espectrometría de masas.

Tabla 6: Valores óptimos de los parámetros optimizados de la fuente de ionización.

Parámetro	Valor óptimo
Temperatura del <i>sheath gas</i> (°C)	200
Flujo del <i>sheath gas</i> (L/min)	12
Presión del nebulizador (psi)	25
Voltaje del capilar (V)	4500
Voltaje del nozzle (V)	500
Temperatura del gas de secado (°C)	300
Flujo del gas de secado (L/min)	11

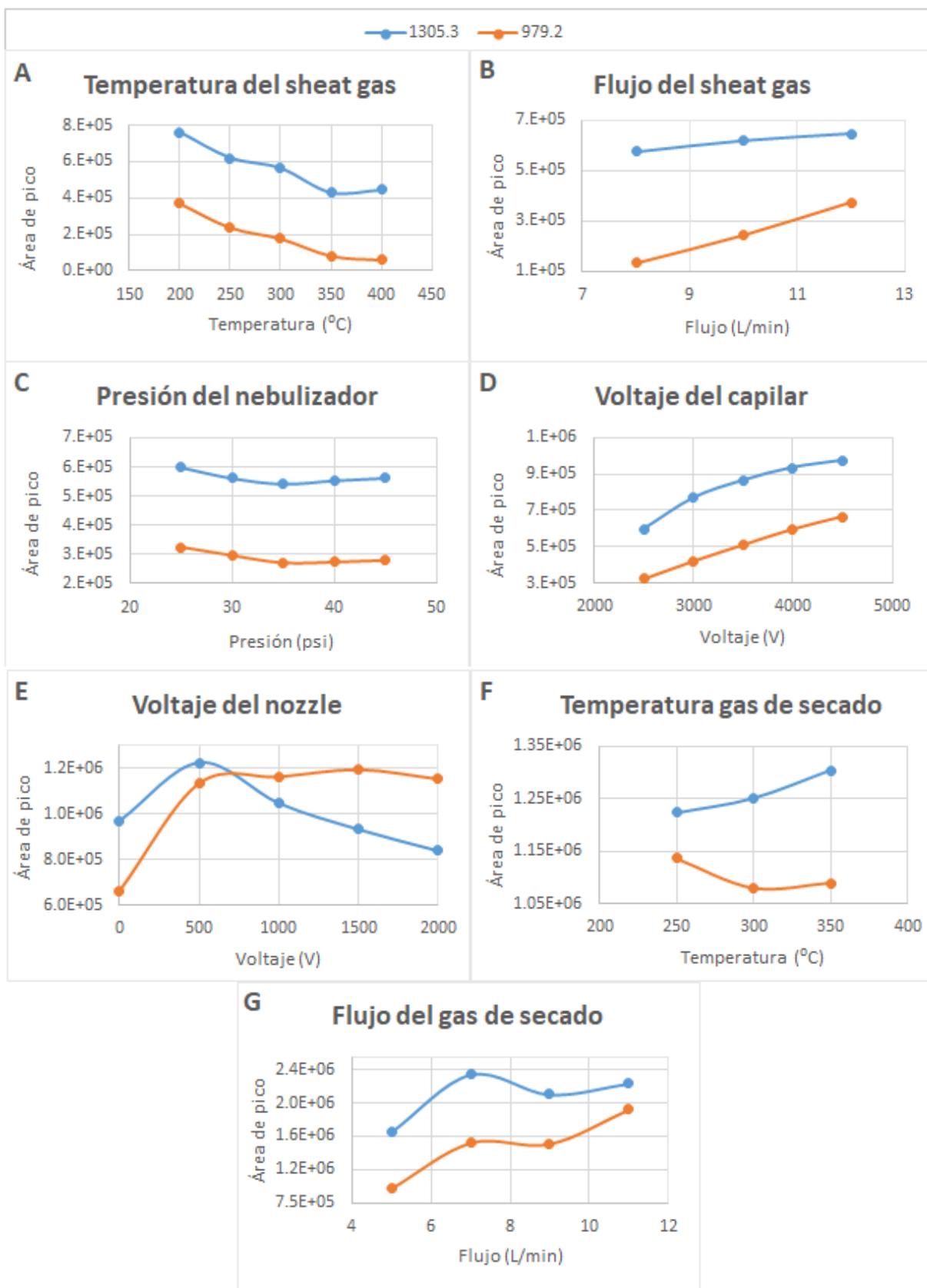


Figura 15: Representación de la respuesta instrumental en función de la magnitud de los parámetros de la fuente de ionización estudiados: temperatura del sheath gas (A), flujo del sheath gas (B), presión del nebulizador (C), voltaje del capilar (D), voltaje del nozzle (E), temperatura del gas de secado (F) y flujo del gas de secado (G).

4.3 Estudio de la disociación inducida por colisión del péptido 33-mer

Una vez seleccionados los iones precursores del 33-mer, se llevó a cabo un barrido de iones producto en FIA en las condiciones experimentales detalladas anteriormente. Dicho barrido de iones producto se realizó desde una m/z de 100 hasta 1000 y utilizando como iones precursores los iones 979,2 y 1305,3. En la *Figura 16* se muestra una ampliación de los espectros de masas obtenidos, los espectros completos se encuentran en las *Figura 3A* y *4A* del anexo.

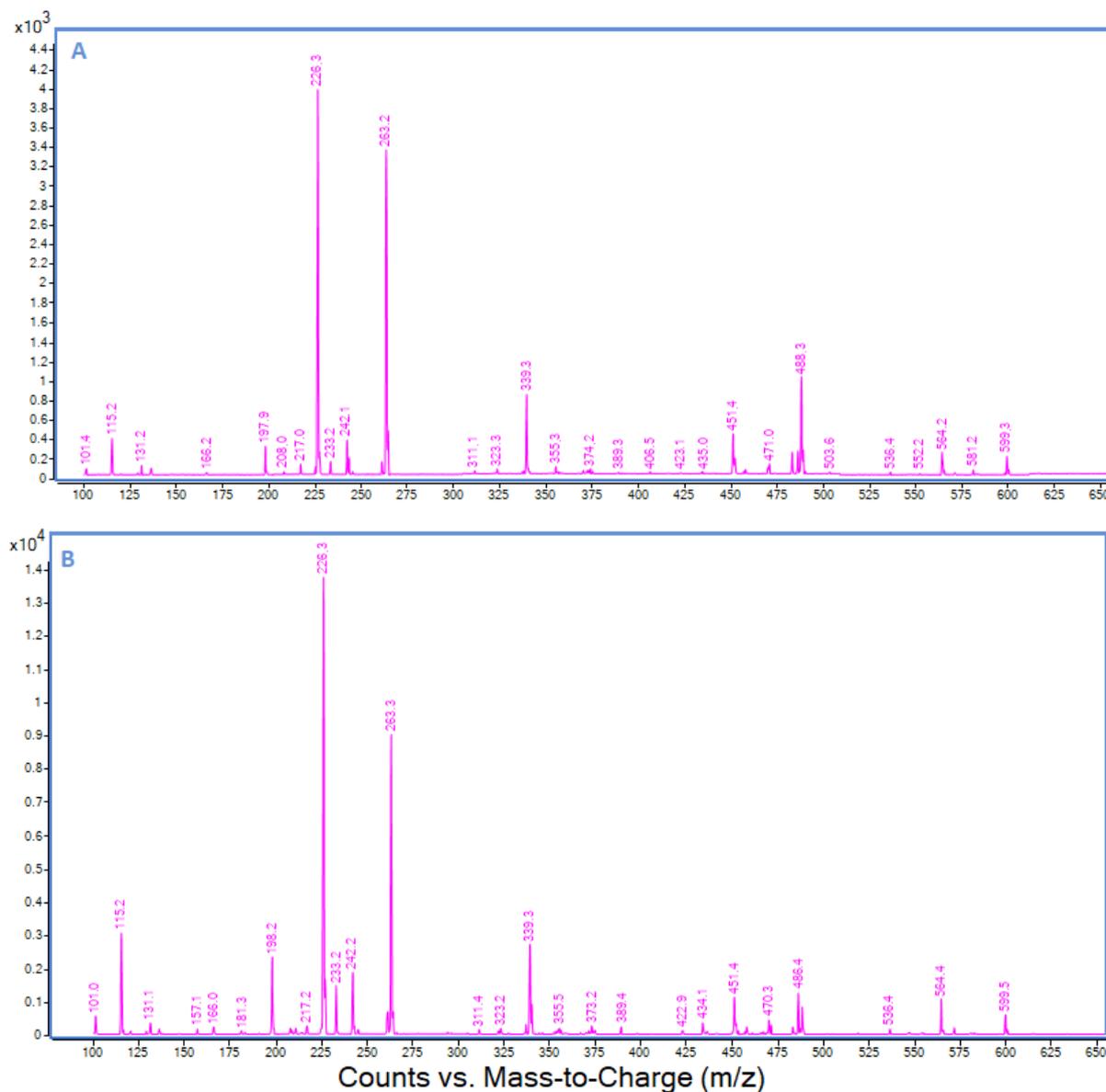


Figura 16: Espectro de masas del barrido de iones producto del ion precursor 979.2 (A) y del ion precursor 1305.3 (B).

Considerando el barrido de iones producto correspondiente al ion precursor 979.2, los fragmentos de mayor intensidad que se obtienen son los de m/z 226,3 y 263,3. Asimismo, teniendo en cuenta el barrido de iones producto del precursor 1305,3, los iones producto seleccionados son 263,4 y 488,1. Es verdad que en este segundo caso existe un ion producto con una intensidad mayor que el 488,1, el 263,3, pero se optó por utilizar este fragmento para poder monitorizar iones producto diferentes para los distintos iones precursores.

Cuando se produce la fragmentación de una proteína pueden ocurrir dos casos: que la carga de la molécula se encuentre en el fragmento N terminal de la secuencia, dando lugar a iones de clase a, b o c tal y como se muestra en la *Figura 17*, o, por el contrario, que la carga esté en el extremo C terminal, generándose iones del tipo x, y o z. En nuestro caso, en la celda de colisión tiene lugar la fragmentación de los iones precursores por disociación inducida por colisión, y este tipo de fragmentación produce la rotura del péptido en los enlaces CO-NH, lo que genera iones del tipo b e y.

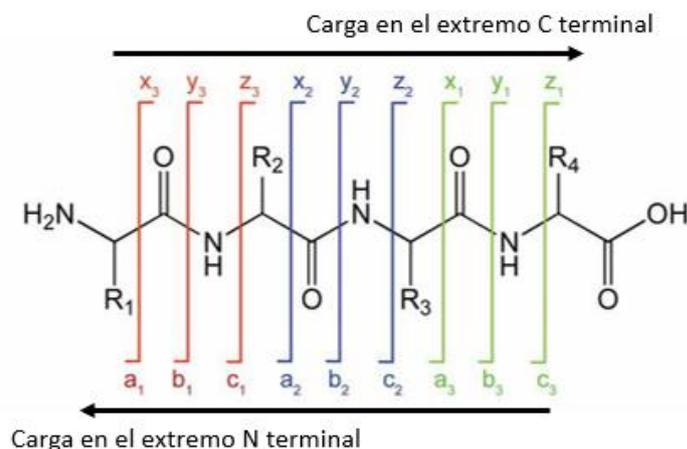


Figura 17: Tipos de iones generados en función de si la carga permanece en el extremo N o C terminal.

Según la bibliografía, los iones producto seleccionados para el ion precursor 979,2, es decir, 226,3 y 263,3, se corresponden con los fragmentos $b_2^+-NH_3$ y con el y_2^+ del 33-mer, mientras que los iones producto seleccionados para el ion precursor 1305,3, 263,4 y 488,1, se corresponden con los fragmentos y_2^+ e y_4^+ del péptido 33-mer (*Figura 18*) (Schalk *et al.*, 2017).

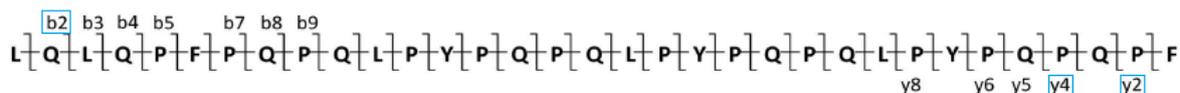


Figura 18: Fragmentos del 33-mer seleccionados como iones producto (adaptada de Schalk *et al.*, 2017).

4.4 Optimización de los parámetros de la celda de colisión

Al igual que se ha realizado la optimización de los parámetros de la fuente de ionización, es muy importante optimizar también los parámetros relacionados con la celda de colisión, que son el fragmentor y la energía de colisión.

El fragmentor es el voltaje que se aplica después del capilar de entrada al analizador de masas con la finalidad de extraer los iones generados. Este voltaje, dependiendo de los valores que se apliquen, influyen no solo en la transmisión iónica, sino también puede llegar a inducir la fragmentación de los iones precursores y, como consecuencia, una disminución de la señal instrumental. Teóricamente se considera un parámetro de la fuente de ionización; sin embargo, el hecho de que se encuentre entre ésta y el analizador de masas y que además influya en la fragmentación hace que sea necesario optimizarlo teniendo en cuenta las transiciones ion precursor \rightarrow ion producto estudiadas, por lo que se incluye en este apartado.

Para llevar a cabo la optimización, se realizó una inyección en FIA del patrón del péptido 33-mer de 100 mg/kg en una mezcla de H₂O:ACN 85:15 con ácido fórmico al 0,1% (v/v) y se monitorizaron mediante un procedimiento SRM las transiciones ion precursor → ion producto seleccionadas en el apartado 4.3: 979,2 → 226,3; 979,2 → 263,3; 1305,3 → 263,4 y 1305,3 → 488,1. Los rangos de estudio de los dos parámetros y los intervalos están detallados en la *Tabla 7*.

Tabla 7: Rangos e intervalos estudiados de los parámetros de la celda de colisión.

Parámetro	Rango de estudio	Intervalo
Fragmentor (V)	50 - 200	10
Energía de colisión (eV)	5 - 60	5

Tal y como se observa en la *Figura 17*, la respuesta instrumental del equipo es diferente dependiendo de la transición que se esté monitorizando. Por tanto, se selecciona como valor óptimo para cada una de ellas aquel en el que la sensibilidad de la señal sea máxima.

En los resultados obtenidos en la optimización del fragmentor (*Figura 18A*) se observa que, para las transiciones del ion precursor 979,2, la sensibilidad aumenta hasta llegar a un máximo bien diferenciado, a partir del cual la señal comienza a disminuir. En cambio, para el ion precursor 1305,3, aunque también se alcanza un máximo, las variaciones en la sensibilidad son menores, es decir, el valor de la energía de colisión influye en menor medida. En el caso de la transición 1305,3 → 263,4, inicialmente se observan una variación en las señales obtenidas que se deben a un problema instrumental que se produjo durante la medida.

El otro parámetro, la energía de colisión, es el que más influye en el grado de fragmentación de los iones producto que llegan a la celda. Si nos centramos en la *gráfica (Figura 18B)*, existen dos tendencias bien diferenciadas: las transiciones 979,2 → 263,3 y la 1305,3 → 488,1 llegan a una señal máxima a una determinada energía de colisión y partir de ahí la sensibilidad comienza a decrecer. Por otro lado, la respuesta en las transiciones 979,2 → 226,3 y 1305,3 → 263,4 aumenta a medida que el valor de la energía de colisión se incrementa hasta llegar a una meseta donde la señal permanece prácticamente constante.

Los valores óptimos de trabajo de ambos parámetros para cada transición se muestran en la *Tabla 8* y se utilizarán a partir de este momento, junto con los parámetros optimizados de la fuente de ionización, para el análisis por espectrometría de masas.

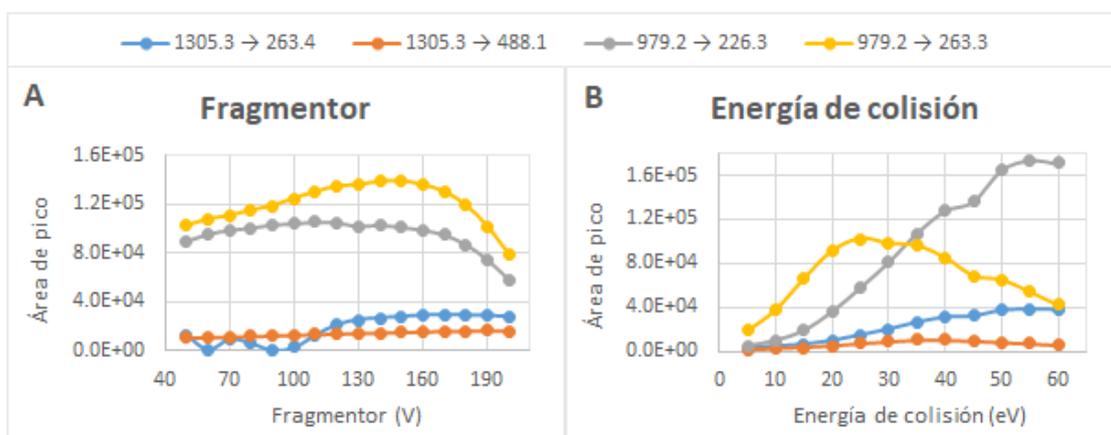


Figura 18: Representación de la respuesta instrumental en función de la magnitud de los parámetros de la celda de colisión estudiados: fragmentor (A) y energía de colisión (B).

Tabla 8: Valores óptimos para cada transición de los parámetros optimizados de la celda de colisión.

Transición	Fragmentor (V)	Energía de colisión (eV)
979.2 → 226.3	110	55
979.2 → 263.3	150	25
1305.3 → 263.4	180	55
1305.3 → 488.1	190	35

4.5 Análisis cualitativo del péptido 33-mer por HPLC-MS/MS

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Máster fue el estudio de la captura de péptidos con aptámeros generados tras la digestión gastrointestinal simulada de la gliadina. Los estudios se centraron en primer lugar en la identificación y confirmación de la presencia del péptido 33-mer en las distintas fracciones del digerido que se prepararon tras la digestión como se explicó en la sección 3.4.3: fracción de péptidos enlazados, fracción de péptidos no enlazados y fracción de péptidos remanentes

Los péptidos capturados por el aptámero, los no enlazados y los remanentes reconstituidos de las cuatro digestiones y el patrón del 33-mer de 100 mg/kg fueron analizados por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem en las condiciones experimentales que se detallaron en el apartado 3.4.6 y según los valores óptimos de los parámetros de la fuente de ionización y de la celda de colisión. Se monitorizaron en modo SRM las transiciones del péptido 33-mer seleccionadas previamente con el fin de realizar un análisis cualitativo y determinar la presencia o ausencia del péptido. Este análisis se repitió en tres días diferentes.

Para confirmar que la señal obtenida en las muestras se corresponde con la del péptido se calcularon las relaciones entre transiciones SRM del patrón utilizando como denominador la señal de la transición más abundante, 979,2 → 226,3. Los valores en las muestras deben coincidir con los del patrón teniendo en cuenta los márgenes de tolerancia determinados por la Directiva 2002/657/CE

(Directiva 2002/657/CE, 2002) para poder identificar con seguridad que se trata de nuestro analito (Tabla 9).

Tabla 9: Desviación relativa máxima permitida entre las relaciones SRM de patrón y muestras en función de la intensidad relativa de la transición estudiada respecto a la transición de mayor señal según la Directiva 2002/657/CE.

Intensidad relativa transición/transición de mayor señal	Desviación relativa máxima permitida
>50 %	± 20 %
>20 – 50 %	± 25 %
>10 – 20 %	± 30 %
≤ 10 %	± 52 %

Teniendo en cuenta la intensidad relativa de las transiciones SRM estudiadas del patrón, se determinaron las tolerancias máximas permitidas para cada relación de transiciones SRM según la directiva 2002/657/CE. En la *Tabla 10* se muestran las relaciones de transiciones obtenidas para el patrón y la desviación máxima permitida. Los resultados de las muestras se encuentran en la *Tabla 11*.

Tabla 10: Relaciones entre transiciones SRM del patrón y desviación máxima permitida según la Directiva 2002/657/CE.

Relación de transiciones	Relación de transiciones en el patrón	Desviación máxima permitida
1305,3 → 263,4 / 979,2 → 226,3	0,21	0,05
1305,3 → 488,1 / 979,2 → 226,3	0,05	0,02
979,2 → 263,3 / 979,2 → 226,3	0,75	0,15

Tabla 11: Relación de transiciones SRM promedio y desviación experimental en cada muestra.

CAPTURADO				
Digestión	Relación de transiciones	1305,3 → 263,4 / 979,2 → 226,3	1305,3 → 488,1 / 979,2 → 226,3	979,2 → 263,3 / 979,2 → 226,3
1	Relación de transiciones promedio	0,2	0,05	0,68
	Desviación experimental	0,02	0,01	0,01
2	Relación de transiciones promedio	0,22	0,06	0,68
	Desviación experimental	0,01	0,01	0,02
3	Relación de transiciones promedio	0,23	0,06	0,67
	Desviación experimental	0,002	0,01	0,03
4	Relación de transiciones promedio	0,21	0,06	0,66

	Desviación experimental	0,02	0,01	0,01
--	-------------------------	------	------	------

NO ENLAZADO

Digestión	Relación de transiciones	1305,3 → 263,4 / 979,2 → 226,3	1305,3 → 488,1 / 979,2 → 226,3	979,2 → 263,3 / 979,2 → 226,3
1	Relación de transiciones promedio	0,41	0,1	0,84
	Desviación experimental	0,11	0,01	0,27
2	Relación de transiciones promedio	0,44	0,14	0,66
	Desviación experimental	0,04	0,01	0,04
3	Relación de transiciones promedio	0,65	0,17	0,73
	Desviación experimental	0,04	0,04	0,01
4	Relación de transiciones promedio	0,41	0,11	0,63
	Desviación experimental	0,05	0,02	0,01

REMANENTE

Digestión	Relación de transiciones	1305,3 → 263,4 / 979,2 → 226,3	1305,3 → 488,1 / 979,2 → 226,3	979,2 → 263,3 / 979,2 → 226,3
1	<i>Relación de transiciones promedio</i>	0,35	0,09	0,7
	<i>Desviación experimental</i>	0,1	0,02	0,1
2	<i>Relación de transiciones promedio</i>	0,52	0,12	0,65
	<i>Desviación experimental</i>	0,21	0,02	0,04
3	<i>Relación de transiciones promedio</i>	0,29	0,07	0,7
	<i>Desviación experimental</i>	0,02	0,04	0,01
4	<i>Relación de transiciones promedio</i>	0,41	0,08	0,67
	<i>Desviación experimental</i>	0,08	0,02	0,02

Tras analizar los resultados, se establece que todos los valores de relaciones de transiciones obtenidos experimentalmente para los péptidos capturados por el aptámero se encuentran dentro de

los niveles de tolerancia de la directiva aplicada, por lo que se puede afirmar que el péptido 33-mer se ha identificado correctamente. En el caso de las fracciones no enlazadas y remanentes, la mayor parte de las relaciones de transiciones SRM monitorizadas se encuentran dentro del margen de error tolerado, pero es cierto que en algún caso concreto esto no ocurre. Para poder explicarlo, es importante tener en cuenta la cantidad de péptido que hay en cada muestra. En el cromatograma de la *Figura 20* se muestra una comparación de la señal del 33-mer obtenida teniendo en cuenta la suma de las señales de todas las transiciones para el capturado por el aptámero, la fracción no enlazada y la remanente en la digestión 1 medido el mismo día. La comparación de las señales en las digestiones 2, 3 y 4 es semejante a la observada en este caso.

Las intensidades obtenidas para las fracciones no enlazadas y remanentes son aproximadamente de un orden de magnitud inferior respecto a la del capturado por el aptámero, por lo que la sensibilidad en la medida del péptido en estas fracciones es mucho menor, lo que se traduce en una desviación experimental superior a la que marca la Directiva 202/657/CE cuando se analiza lo no enlazado y lo remanente.

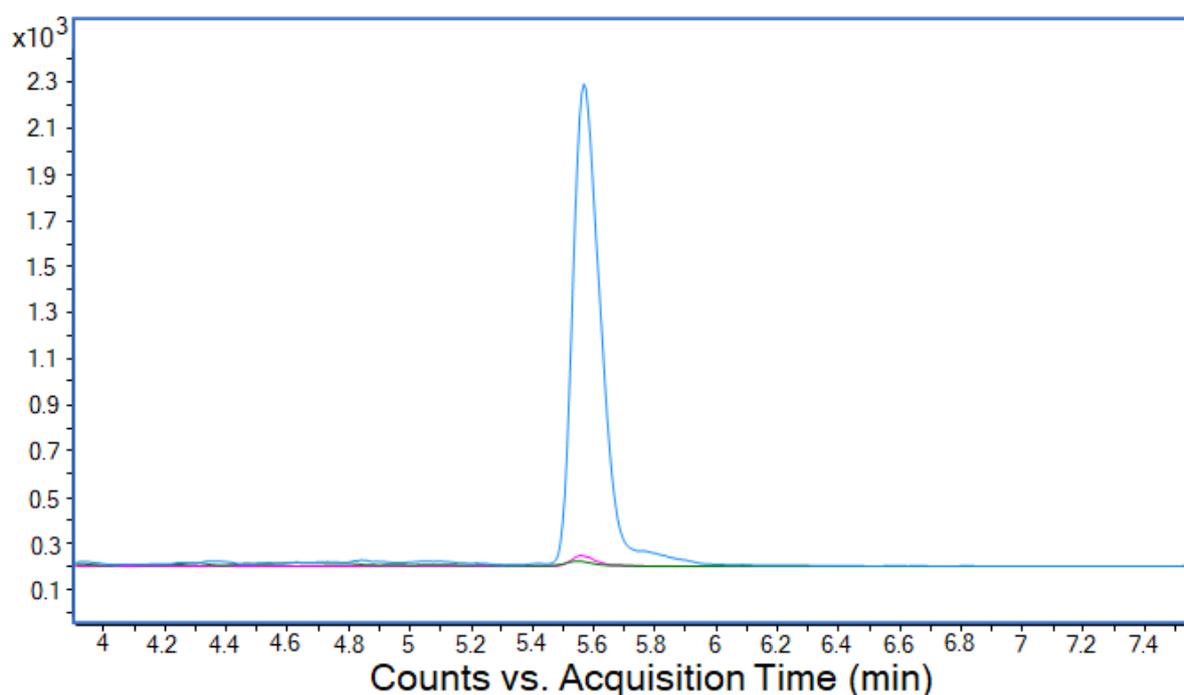


Figura 19: Cromatogramas obtenidos para la fracción capturada por el aptámero (azul), la no enlazada (rosa) y la remanente (verde) en la digestión 1.

En el cromatograma de la *Figura 19*, también se puede observar que la cantidad de péptido 33-mer que queda sin capturar o que no eluye de las partículas magnéticas con el primer disolvente es mínima.

Lo ideal sería poder cuantificar la concentración de 33-mer en cada una de las fracciones y transformarla en concentración de gliadina PWG para conocer el rendimiento del procedimiento de digestión y captura. Sin embargo, no se dispone de un patrón de péptido de pureza certificada y, además, no existe un consenso sobre la a la masa molecular de la gliadina PWG ya que varía entre los

diferentes cultivos. En su defecto, se han utilizado estos datos para proporcionar información relativa. A partir de la señal total de las transiciones monitorizadas en cada muestra, se realizó la suma de dicha señal para la fracción capturada por el aptámero, la no enlazada y la remanente en cada una de las cuatro digestiones. Utilizando este valor, se calcularon los porcentajes relativos de péptido en cada una de las fracciones para cada digestión (*Tabla 12*).

Tabla 12: Porcentajes relativos del péptido 33-mer en cada fracción para cada una de las digestiones.

	Digestión 1	Digestión 2	Digestión 3	Digestión 4
Capturado	97,77	93,08	93,36	93,02
No enlazado	0,73	5,71	6,28	5,12
Remanente	1,50	1,21	0,36	1,86

Teniendo en cuenta los datos de la *Tabla 12*, donde se expresan los porcentajes relativos del péptido 33-mer en cada fracción, se observa claramente como la mayor parte del él, entre el 93,02 y el 97,77 %, fue capturado por el aptámero y eluido con el primer disolvente. También se muestra que la captura del aptámero tuvo lugar con una eficiencia diferente en cada digestión, puesto que en las digestiones 2, 3 y 4 entre el 5,12 – 6,28 % del péptido no fue capturado mientras que en la digestión 1, únicamente el 0,73 % de él permaneció en disolución. Si nos centramos en la fracción no eluida con el primer disolvente sino con urea (fracción remanente) se puede concluir que es mínima en los cuatro casos. Gracias a esto, se podría afirmar que la captura del aptámero fue más eficiente en la primera digestión, ya que se capturó una mayor proporción de 33-mer.

Otro de los objetivos del presente trabajo era evaluar la eficiencia en cada una de las cuatro digestiones realizadas, entendiendo como eficiencia la cantidad de péptido 33-mer generado. Para ello, se sumó la señal del TIC del 33-mer (suma total de las transiciones monitorizadas de cada capturado) obtenida en cada una de las digestiones para la fracción capturada y se calcularon los porcentajes para cada digestión. Esto se repitió en tres sesiones de medida distintas para obtener una desviación estándar de los resultados.

Observando los resultados de la *Figura 20*, se puede afirmar que en la digestión 4 se generó una mayor cantidad de péptido 33-mer, seguido de la digestión 1, la 3 y finalmente la digestión 2. La única diferencia entre las digestiones 1 y 4, las que generaron una mayor cantidad de 33-mer, es la duración de la reacción enzimática con pepsina, 3 horas en la digestión 1 frente a 24 h en la digestión 4. De esta forma, se puede concluir que el tiempo de actuación de la pepsina influye en la digestión de la α -gliadina y, por tanto, en la cantidad de péptido 33-mer generado. Aun así, para poder hacer esta afirmación con una mayor fiabilidad sería necesario haber realizado de un número mayor de ensayos,

pero no fue posible debido a que el tiempo de trabajo experimental del presente Trabajo Fin de Máster fue limitado.

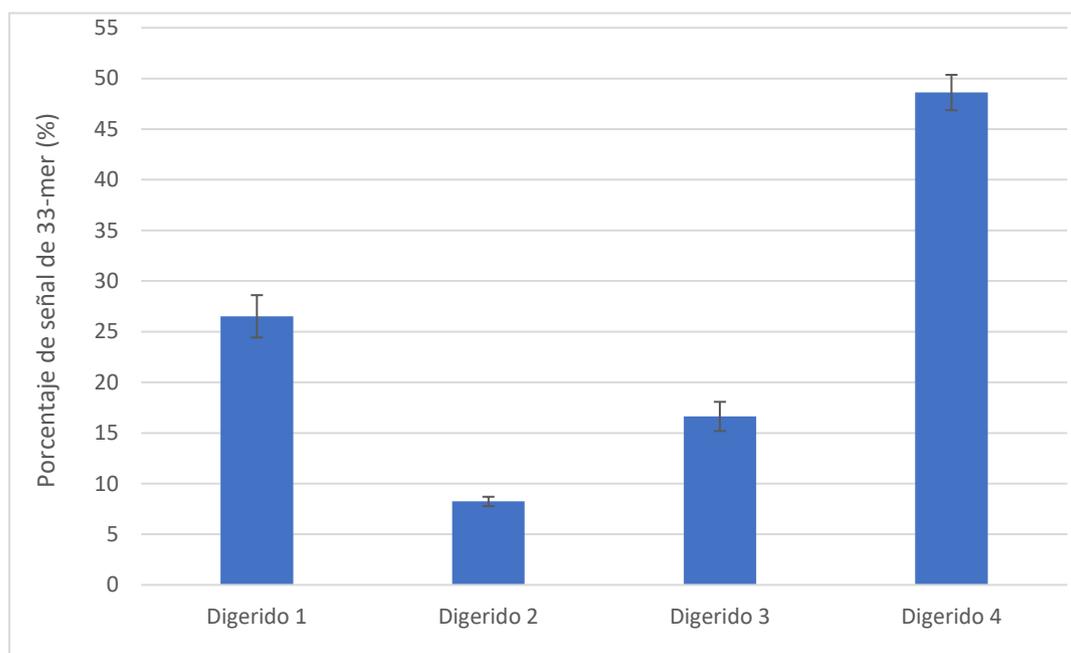


Figura 20: Porcentaje de señal para el péptido 33-mer en los capturados de cada una de las digestiones respecto a la suma total de las digestiones.

4.6 Identificación de otros péptidos capturados mediante HPLC-MS/MS

Los péptidos capturados por el aptámero, la fracción no enlazada y la remanente reconstituidos de las cuatro digestiones fueron analizados por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en modo scan en las condiciones experimentales que se detallaron en el apartado 3.4.6 y según los valores óptimos de los parámetros de la fuente de ionización. Se realizó un barrido de los iones generados entre m/z 50 - 3000 con el fin de identificar otros péptidos derivados del gluten que pudieran haber sido capturados por el aptámero.

Con la ayuda de la herramienta “on-line” MS-Digest de la página web *Protein Prospector* (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm>) desarrollada en la UCSF (University of California San Francisco) que permite hacer digestiones simuladas de una proteína determinada teniendo con distintas enzimas, se elaboró una lista con todos los péptidos posibles que se pueden generar con la pepsina, tripsina y quimiotripsina.

Como el número de péptidos generados por la herramienta informática era muy elevado, únicamente nos centramos en aquellos péptidos generados entre el aminoácido 10 y el 132 de la proteína para cubrir la región de la proteína donde se encuentra el péptido 33-mer (aminoácidos 57-89). Sería muy interesante también hacer esta misma búsqueda en zonas más alejadas del péptido 33-mer y así determinar si el aptámero es capaz de capturar algún péptido que pertenezca a otras regiones de la α -gliadina, pero no se llevó a cabo por falta de tiempo.

La *Tabla 13* muestra el listado de todos los péptidos que se intentaron identificar en el análisis en modo scan del capturado, la fracción no enlazada y la remanente. Se muestran las m/z de cada péptido con carga +1, +2, +3 y +4.

Tabla 13: Listado de péptidos que se intentaron identificar de la α -gliadina en el análisis en modo scan de la fracción capturada, la no enlazada y la remanente.

Secuencia de aminoácidos de la α -gliadina	m/z carga +1	m/z carga +2	m/z carga +3	m/z carga +4
58 - 89	3798,95	1899,97	1266,98	950,49
60 - 89	3558,80	1779,90	1186,93	890,45
51 - 57	833,60	417,30	278,53	209,15
63 - 69, 75 - 81	842,44	421,72	281,48	211,36
32 - 38	801,39	401,19	267,80	201,10
96 - 102	847,39	424,20	283,13	212,60
60 - 67	954,50	477,75	318,83	239,38
82 - 89	973,48	487,24	325,16	244,12
45 - 56	1413,80	707,40	471,93	354,20
39 - 50	1423,70	712,35	475,23	356,68
84 - 95	1482,75	741,87	494,92	371,44
32 - 44	1511,73	756,36	504,58	378,68
26 - 38	1559,76	780,38	520,59	390,69
65 - 78	1665,86	833,43	555,95	417,21
90 - 102	1616,77	808,89	539,59	404,94
96 - 109	1625,78	813,39	542,59	407,20
10 - 25	1845,90	923,45	615,97	462,23
10 - 31	2604,27	1302,64	868,76	651,82
110 - 132	2908,39	1454,70	970,13	727,85

Para llevar a cabo la identificación se extrajeron las masas de las cuatro m/z características de cada péptido una a una en cada muestra. En el cromatograma se buscó que la señal cromatográfica correspondiente a cada una de las masas extraídas coincidiese en tiempo de retención, y después se analizó el espectro de masas de ese pico cromatográfico. Para ello se analizaron los perfiles isotópicos de las masas características del péptido para elucidar la carga del ion teniendo en cuenta la separación entre los isotopólogos del perfil que debería corresponder a un valor de $1/n$, siendo n la carga del ion. Es importante tener en cuenta que, al estar trabajando con un analizador de masas de cuadrupolo, es difícil distinguir entre los distintos grados de protonación. Lo ideal sería haber realizado este análisis en un equipo con un analizador de masas de alta resolución como el tiempo de vuelo, en el que se pueden realizar identificaciones no sólo a partir de los perfiles isotópicos sino también a través de valores de masa exacta.

Tras haber realizado la búsqueda de todos los péptidos en la fracción capturada, en la no enlazada y en la remanente de las cuatro digestiones, únicamente se identificó la posible presencia del péptido QQQFPGQQPFP, con la secuencia de aminoácidos 26 - 38, de la α -gliadina en el capturado

de la digestión 1 y en la fracción no enlazada 1. Según estos resultados este péptido se capturó parcialmente por el aptámero, pero solamente con las condiciones experimentales de la digestión 1.

En la *Figura 21* se muestra una parte del cromatograma obtenido en modo scan para la digestión 1 en el que se puede comprobar que las señales de las masas del péptido extraídas coinciden en tiempo de retención, 2,487 minutos. El siguiente paso para confirmar la identidad del péptido fue estudiar el espectro de masas a ese tiempo, que se muestra en la *Figura 5A* del anexo. Se encontraron las masas de los iones con carga +1, +2 y +3 y se comprobó la separación entre los isotopólogos de los perfiles de cada grado de protonación.

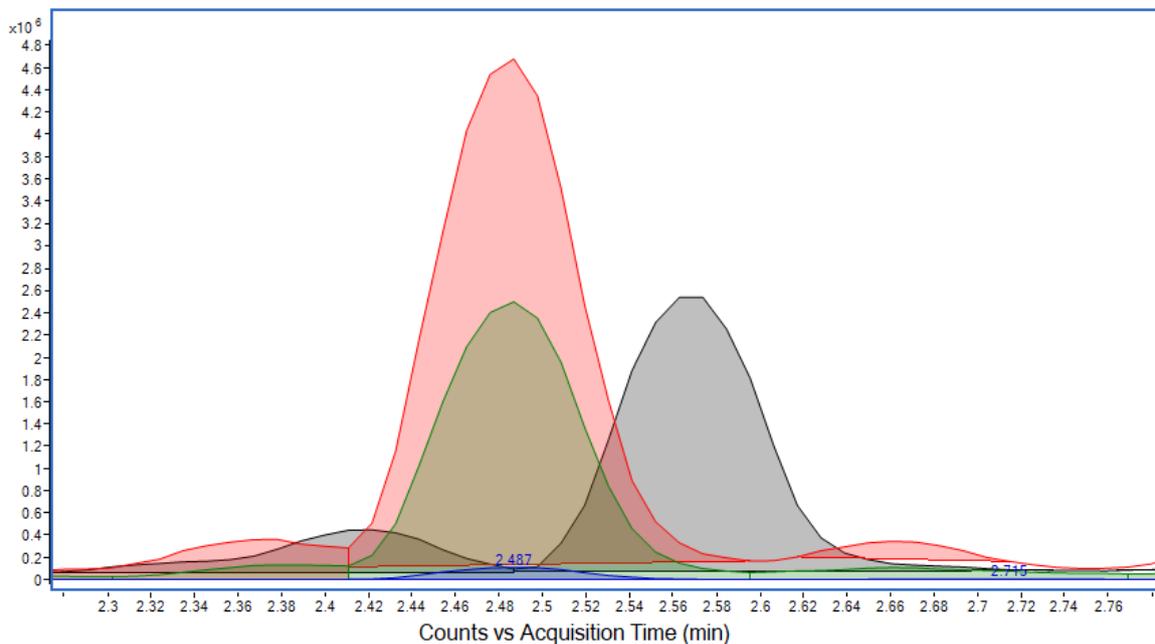


Figura 21: Cromatograma del péptido identificado con la secuencia de aminoácidos 26 – 38.

Tal y como se muestra en la *Figura 6A* del anexo, la distancia entre los isotopólogos del perfil isotópico del ion de m/z 1559,8 es de 1 m/z , lo que indica que la carga de ese ion es uno. Lo mismo sucede con el de 780,4, la distancia entre isotopólogos es de 0,5, por lo que se trata de un ion con carga +2. En este caso el cuadrupolo no es capaz de resolver el perfil isotópico, pero se pueden distinguir los máximos de cada isotopólogo. Cuando nos centramos en el ion de m/z 520,6 que correspondería teóricamente a un ion de carga +3, solamente podemos concluir que el perfil isotópico no se corresponde a ion de carga +1 o +2.

Realizando una búsqueda bibliográfica para interpretar el resultado obtenido, se encontró que las secuencias QQ(Q/P)FP es decir, QQQFP y QQPFP, son reconocidas por el anticuerpo monoclonal R5 que se utiliza para la determinación de péptidos inmunotóxicos derivados del gluten en ensayos tipo ELISA (Kahlenberg *et al.*, 2006). Ambas secuencias se encuentran dentro del péptido identificado en el capturado por el aptámero de la digestión 1: **QQQFPGQQPFP**. Existe otro anticuerpo monoclonal, el PN3, cuyo epítipo en la α -gliadina es la secuencia de aminoácidos QQQFPF, que también se encuentra dentro del péptido identificado: **QQQFPGQQPFP** (Ellis *et al.*, 1998).

Los anticuerpos humanos de clase IgE específicos de las secuencias QQPFP y PQQPF también son comunes en pacientes alérgicos al trigo. Además, las secuencias QXQFPF (siendo X Q, P o L) y QPQQPF también son epítomos importantes para los anticuerpos antigliadina humanos de pacientes con enfermedad celíaca. Esto se traduce en que estas secuencias son generadas *in-vivo*, y son inmunogénicas, por lo que el aptámero, además del 33-mer, también puede capturar otros péptidos inmunotóxicos como se acaba de demostrar.

5. Conclusiones

En el presente Trabajo Fin de Máster se ha realizado una simulación gastrointestinal de la digestión *in-vitro* de la PWG y se ha estudiado el proceso de captura del péptido 33-mer por el aptámero Gli4T una mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem con fuente de ionización electrospray.

A la vista de los resultados expuestos en el apartado 4 de la memoria, se puede concluir que:

- Se han realizado cuatro digestiones *in-vitro* de la PWG variando la duración de cada una de las tres reacciones enzimáticas y los péptidos generados se capturaron con el aptámero Gli4T inmovilizado sobre partículas magnéticas.
- Se han optimizado los parámetros experimentales del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con fuente de ionización electrospray para maximizar la sensibilidad en la determinación del péptido 33-mer.
- Se ha identificado y confirmado la presencia del péptido 33-mer en la fracción capturada por el aptámero en las cuatro digestiones, y tras comparar la señal obtenida con la correspondiente a las fracciones no enlazada y remanente, se ha establecido que la mayor parte del péptido fue capturado y eluido de las partículas magnéticas con el primer disolvente.
- En la digestión más corta (1) se capturó el péptido 33-mer más eficazmente mientras que cuando la primera etapa se alargó de 3 a 24 h (digestión 4) se liberó mayor cantidad de 33-mer, por lo que la actividad de la enzima pepsina es importante en la eficacia de la digestión.
- Se ha podido identificar en la fracción capturada de la digestión 1 un péptido con la secuencia de aminoácidos 26 – 38 de la α -gliadina, por lo que se puede concluir que el aptámero Gli4T es capaz de capturar otros péptidos además del 33-mer. El nuevo péptido identificado contiene varias secuencias de aminoácidos que son reconocidas por los anticuerpos monoclonales R5 y PN3 que se utilizan para la determinación de péptidos inmunotóxicos derivados del gluten en ensayos tipo ELISA.

Tras haber podido realizar todos los ensayos que aquí se describen, quiero dejar constancia de que se han cumplido con creces los objetivos académicos detallados previamente, ya que considero que el aprendizaje que he tenido me ha permitido superar los problemas que han ido surgiendo a lo largo de todo el desarrollo experimental.

6. Bibliografía

Alves, T. O., D'Almeida, C. T., Scherf, K. A. and Ferreira, M. S. (2019) 'Modern approaches in the identification and quantification of immunogenic peptides in cereals by LC-MS/MS', *Frontiers in Plant Science*, 10, pp. 1–13. doi: 10.3389/fpls.2019.01470.

Amaya-González, S., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A. J. and Lobo-Castañón, M. J. (2014) 'Aptamer binding to celiac disease-triggering hydrophobic proteins: A sensitive gluten detection approach', *Analytical Chemistry*, 86(5), pp. 2733–2739. doi: 10.1021/ac404151n.

Amaya-González, S., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A. J. and Lobo-Castañón, M. J. (2015a) 'Sensitive gluten determination in gluten-free foods by an electrochemical Aptamer-based assay', *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 407(20), pp. 6021–6029. doi: 10.1007/s00216-015-8771-6.

Amaya-González, S., López-López, L., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A. J. and Lobo-Castañón, M. J. (2015b) 'Affinity of aptamers binding 33-mer gliadin peptide and gluten proteins: Influence of immobilization and labeling tags', *Analytica Chimica Acta*, 873, pp. 63–70. doi: 10.1016/j.aca.2015.02.053.

Barnejee, S. and Mazumdar, S. (2012) 'Electrospray ionization mass spectrometry: a technique to access the informal beyond a molecular weight of the analyte', *Journal of AOAC International*, pp. 1–40. doi:10.1155/2012/282574.

Boukid, F., Prandi, B., Faccini, A. and Sforza, S. (2019) 'A complete mass spectrometry (MS)-based peptidomic description of gluten peptides generated during in vitro gastrointestinal digestion of durum wheat: Implication for Celiac Disease', *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 30(8), pp. 1481–1490. doi: 10.1007/s13361-019-02212-8.

Brodkorb, A., Egger, L., Alming, M., Alvito, P., Assunção, R., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu-Lacanal, C., Boutrou, R., Carrière, F., Clemente, A., Corredig, M., Dupont, D., Dufour, C., Edwards, C., Golding, M., Karakaya, S., Kirkhus, B., Le-Feunteun, S., Lesmes, U., Macierzanka, A., Mackie, A. R., Martins, C., Marze, S., McClements, D. J., Ménard, O., Mineuks, M., Portmann, R., Santos, C. N., Souchon, I., Singh, R. P., Vegarud, G. E., Wickham, M. S. J., Weitschies, W. and Recio, I. (2018) 'INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion', *Nature Protocols*, 14 (4), pp. 991-1014. doi: 10.1038/s41596-018-0119-1.

Bruins-Slot, I. D., Van-der-Fel-Klerx, H. J., Bremer, M. G. and Hamer, R. J. (2016) 'Immunochemical detection methods for gluten in food products: Where do we go from here?', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(15), pp. 2455–2466. doi: 10.1080/10408398.2013.847817.

Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D.A., De Giorgio, R., Catassi, C. and Fasano, A. (2019)

'Celiac disease : a comprehensive current review'. *BMC Medicine*, 17, 142.

Chahrour, O., Cobice, D. and Malone, J. (2015) 'Stable isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 113, pp. 2–20. doi: 10.1016/j.jpba.2015.04.013.

Clifford, S., Taylor, A. J., Gerber, M., Devine, J., Cho, M., Walker, R., Stefani, I., Fidel, S., Drahos, J. and Leffler, D. A. (2019) 'Concepts and instruments for patient-reported outcome assessment in celiac disease: literature review and experts ' perspectives', *Value Health*, 23(1), pp. 104–113 doi: 10.1016/j.jval.2019.07.018.

Colgrave, M. L., Byrne, K. and Howitt, C. A. (2017) 'Food for thought: selecting the right enzyme for the digestion of gluten', *Food Chemistry*, 234, pp. 389–397. doi: 10.1016/j.foodchem.2017.05.008.

Counts, D. R. and Sierpina, V. S. (2006) 'Celiac disease/gluten intolerance', *Explore: The Journal of Science and Healing*, 2(1), pp. 43–45. doi: 10.1016/j.explore.2005.10.010.

de-los-Santos-Álvarez, N., Lobo-Castañón, M. J., Miranda-Ordieres, A. J. and Tuñón-Blanco, P. (2008) 'Aptamers as recognition elements for label-free analytical devices', *Trends in Analytical Chemistry*, 27(5), pp. 437–446. doi: 10.1016/j.trac.2008.03.003.

Diaz-Amigo, C. and Popping, B. (2013) 'Accuracy of ELISA detection methods for gluten and reference materials: A realistic assessment', *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(24), pp. 5681–5688. doi: 10.1021/jf3046736.

Diaz-Amigo, C. and Popping, B. (2012) 'Gluten and gluten-free: issues and considerations of labeling regulations, detection methods and assay validation', *Journal of the AOAC International*, 95(2), pp. 337–348. doi: 10.5740/jaoacint

'Directiva 96/23/CE del Consejo en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos y la interpretación de los resultados'. Available at: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32002D0657&from=ES> (Accessed: 10 July 2020).

Federación de Asociaciones de Celíacos de España: aprender a leer el etiquetado. Available at: <https://celiacos.org/tratamiento/aprende-a-leer-el-etiquetado/> (Accessed: 8 May 2020).

Gross H. J. (2011) *Mass spectrometry. Trends in Genetics*. 2nd ed. Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-642-10711-5.

Haraszi, R., Chassigne, H., Maquet, A. and Ulberth, F. (2011) 'Analytical methods for detection of gluten in food—method developments in support of food labeling legislation', *Journal of AOAC International*, 94(4), pp. 1006–1026.

Hoffmann, E. and Stroobant, V. (2007) *Mass spectrometry: Principles and Applications*. 3rd ed. Wiley.

Ellis, H. J., Rosen-Bronson, S. O'Reilly, N. and Ciclitira, P. J. (1998) 'Measurement of gluten using a monoclonal antibody to a coeliac toxic peptide of A gliadin', *Gut*, 43(2), pp. 190–195. doi: 10.1136/gut.43.2.190.

Jiang, H., Zhang, X., Zhou, Y., Jiang, C. and Shi, Y. (2020) 'Infection, antibiotic exposure, and risk of celiac disease: A systematic review and meta-analysis', *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 35(4), pp. 557–566. doi: 10.1111/jgh.14928.

Kahlenberg, F., Sánchez, D., Lachmann, I., Tuckova, L., Tlaskalova, H., Méndez, E. and Mothes, T. (2006) 'Monoclonal antibody R5 for detection of putatively coeliac-toxic gliadin peptides', *European Food Research and Technology*, 222(1–2), pp. 78–82. doi: 10.1007/s00217-005-0100-4.

Koehler, P., Wieser, H., and Konitzer, K. (2014) *Celiac Disease and Gluten: Multidisciplinary Challenges and Opportunities*. 1st ed. Elsevier. USA. ISBN: 0128101342.

Liao, Y., Kuo, J., Chen, B., Tsuei, H., Lin, C., Lin, H. and Cheng, H. (2017) 'Development and validation of the detection method for wheat and barley glutes using mass spectrometry in processed foods'. *Food Analytical Methods*, 10, pp 2839–2847. doi: 10.1007/s12161-017-0827-0.

López-López, L. (2015). Formatos de ensayos innovadores para el control de la seguridad alimentaria: determinación de gluten en alimentos. Trabajo Fin de Máster. Universidad de Oviedo.

López-López, L., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Osideres, A. J. and Lobo-Castañón, M. J. (2017) 'Chemical disposable electrochemical aptasensor for gluten determination in food', *Sensors and Actuators B*, 241, pp. 522–527. doi: 10.1016/j.snb.2016.10.112.

Malvano, F., Albanese, D., Pilloton R. and Di-Matteo, M. (2017) 'A new label-free impedimetric aptasensor for gluten detection', *Food Control*, 79, pp. 200–206. doi: 10.1016/j.foodcont.2017.03.033.

Manfredi, A., Mattarozzi, M., Giannetto, M and Careri, M. (2015) 'Multiplex liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the detection of wheat, oat, barley and rye prolamins towards the assessment of gluten-free product safety', *Analytica Chimica Acta*, 895, pp. 62–70. doi: 10.1016/j.aca.2015.09.008.

Martín-Esteban, M., Cacho-Palomar, J. F., Cepeda-Sáez, F. y Prieto-Santos, I. (2010) 'Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con la enfermedad celíaca y los problemas que plantean las técnicas analíticas para el control del contenido de gluten en los alimentos'. Available at: http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/ampliacion/informes_2010.htm. (Accessed 15 May 2020).

Martín-Fernández, B., de-los-Santos-Álvarez, N., Martín-Clemente, J. P., Lobo-Castañón, M. J. and López-Ruiz, B. (2016) 'Challenging genosensors in food samples: The case of gluten determination

in highly processed samples', *Talanta*, 146, pp. 490–495. doi: 10.1016/j.talanta.2015.09.017.

Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N., Miranda-ordieres, A. J. and Lobo-castañón, M. J. (2016) 'Harnessing aptamers to overcome challenges in gluten detection', *Biosensors*, 6(16). doi: 10.3390/bios6020016.

Osorio, C. E., Mejías, J. H. and Rustgi, S. (2019) 'Gluten detection methods and their critical role in assuring safe diets for celiac patients', *Nutrients*, 11(12), pp. 17–20. doi: 10.3390/nu11122920.

Panda, R. and Garber, E. A. E. (2019) 'Detection and quantitation of gluten in fermented-hydrolyzed foods by antibody-based methods: challenges, progress, and a potential path forward', *Frontiers in Nutrition*, 97(6), pp. 1–12. doi: 10.3389/fnut.2019.00097.

Parada, A. and Araya, M. (2010) 'El gluten, su historia y efectos en la enfermedad celíaca', *Revista Medica de Chile*, 138(10), pp. 1319–1325. doi: 10.4067/s0034-98872010001100018.

Plaza-Izurieta, L., Fernández-Jiménez, N. and Bilbao, J. R. *Genetics of celiac disease. HLA and non-HLA gens (Chapter 1)*. Mena, M. C. and Sousa, C. *Analytical tools for gluten detection. Policies and regulation (Chapter 16)*. Edited by Arranz, E., Rosell, C. M. and Rodrigo, L. (2015) *Advances in the Understanding of Gluten related Pathology and the Evolution of Gluten-Free Foods*. 1st ed. Omnia Science doi: 10.3926/oms.274.

Rodrigo, L., Garrote, J.A. y Vivas, S. (2008) 'Enfermedad celíaca', *Medicina Clínica*, 131(7), pp 264–270. doi: 10.1016/S0025-7753(08)72247-4.

Reinders, J. and Sickmann, A. (2009) *Proteomics, Methods in Molecular Biology*. 1st ed. Humana Press doi: 10.1007/978-1-60761-157-8.

Ruiz-Carnicer, Á., Comino, I., Segura, V., Ozuna, C., Moreno, M., López-Casado, M. A., Torres, M. I., Barro, F. and Sousa, C. (2019) 'Celiac immunogenic potential of α -gliadin epitope variants from triticum and aegilops species', *Nutrients*, 11(2), 220. doi: 10.3390/nu11020220.

Schalk, K., Lang, C., Wieser, H., Koehler, P. and Scherf, K. A. (2017) 'Quantitation of the immunodominant 33-mer peptide from α -gliadin in wheat flours by liquid chromatography tandem mass spectrometry', *Scientific Reports*, 7, 45092. doi: 10.1038/srep45092.

Scherf, K. A., Catassi, C., Chirido, F., Ciclitira, P. J., Feighery, C., Gianfrani, C., Koning, F., Lundin, K. E., Schuppan, D., Smulders, M. J., Tranquet, O., Troncone, R. and Koehler, P. (2020) 'Recent Progress and Recommendations on Celiac Disease From the Working Group on Prolamin Analysis and Toxicity', *Frontiers in Nutrition*, 7, pp. 1–14. doi: 10.3389/fnut.2020.00029.

Sealey-Voyksner, J. A., Khosla, C., Voyksner, R. D. and Jorgenson, J. W (2010) 'Novel aspects of quantitation of immunogenic wheat gluten peptides by liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry', *Journal of Chromatography*, 1217(25), pp. 4167–4183. doi:

10.1016/j.chroma.2010.01.067.

Spiridonova, V. A. (2010) 'Molecular recognition elements: DNA/RNA-aptamers to proteins', *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, 4(2), pp. 138–149. doi: 10.1134/S1990750810020046.

Svigelj, R., Dossi, N., Toniolo, R., Miranda-Castro, R., De-los-Santos-Álvarez, N. and Lobo-Castañón, N. (2018) 'Selection of Anti-gluten DNA Aptamers in a Deep Eutectic Solvent', *Angewandte Chemie - International Edition*, 57(39), pp. 12850–12854. doi: 10.1002/anie.201804860.

Svigelj, R., Dossi, N., Pizzolato, S., Toniolo, R., Miranda-Castro, R., de-los-Santos-Álvarez, N. and Lobo-Castañón, M. J. (2020) 'Truncated aptamers as selective receptors in a gluten sensor supporting direct measurement in a deep eutectic solvent', *Biosensors and Bioelectronics*. doi: 10.1016/j.bios.2020.112339.

Tombelli, S., Minunni, M. and Mascini, M. (2005) 'Analytical applications of aptamers', *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), pp. 2424–2434. doi: 10.1016/j.bios.2004.11.006.

Wilm, M. (2011) 'Principles of Electrospray Ionization', *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(7). doi: 10.1074/mcp.M111.009407.

World Gastroenterology Organization Global Guidelines of Celiac Disease. Available at: <https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/celiac-disease/celiac-disease-spanish> (Accessed: 7 May 2020).

Anexo.

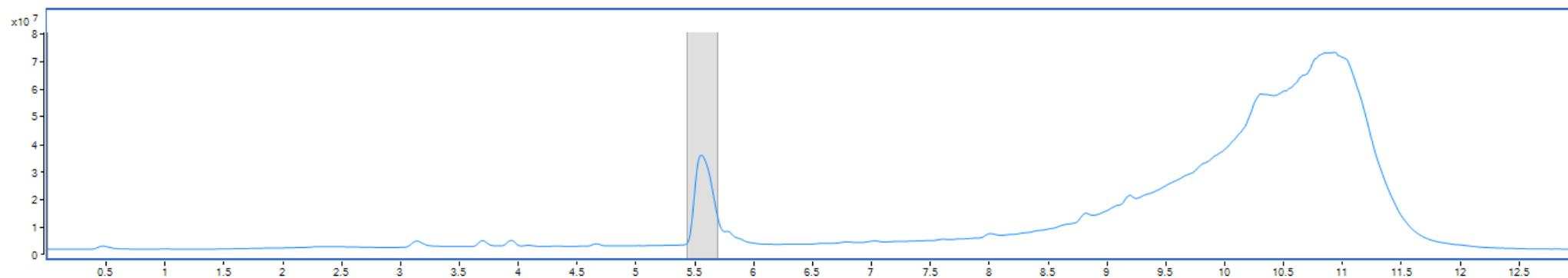


Figura 1A: Cromatograma completo del péptido 33-mer obtenido en modo scan.

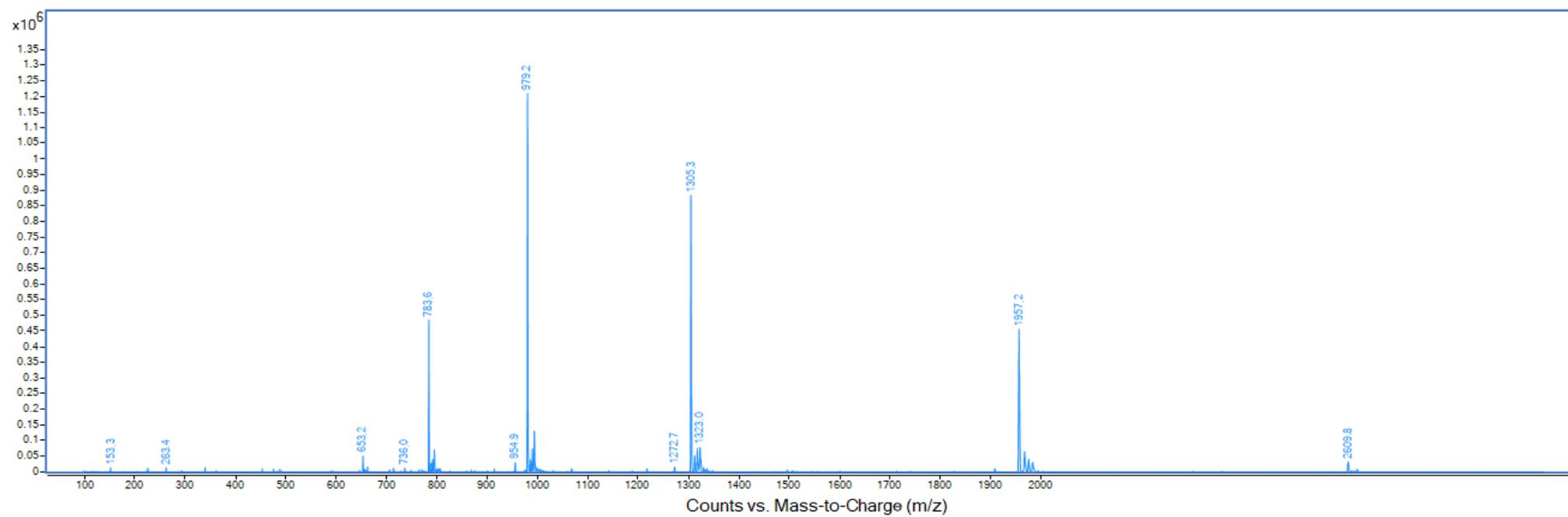


Figura 2A: Espectro de masas completo del péptido 33-mer obtenido en modo scan.

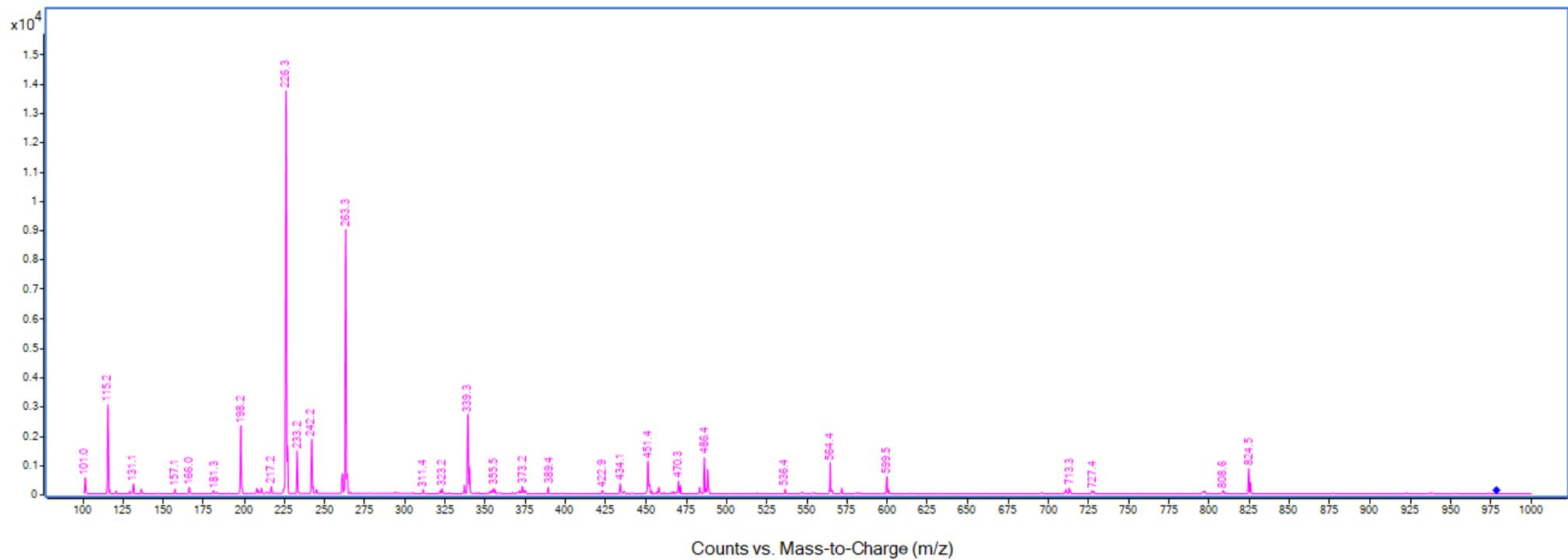


Figura 3A: Espectro de masas completo del barrido de iones producto del ion precursor 979.2.

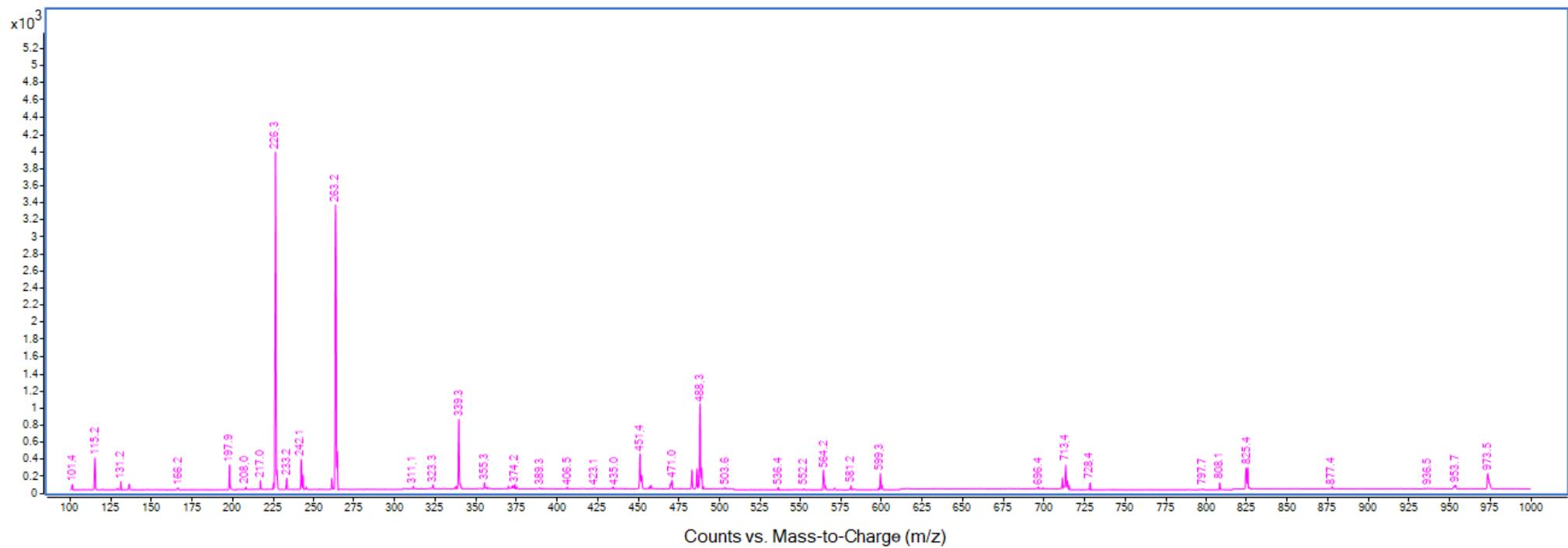


Figura 4A: Espectro de masas completo del barrido de iones producto del ion precursor 1305.3.

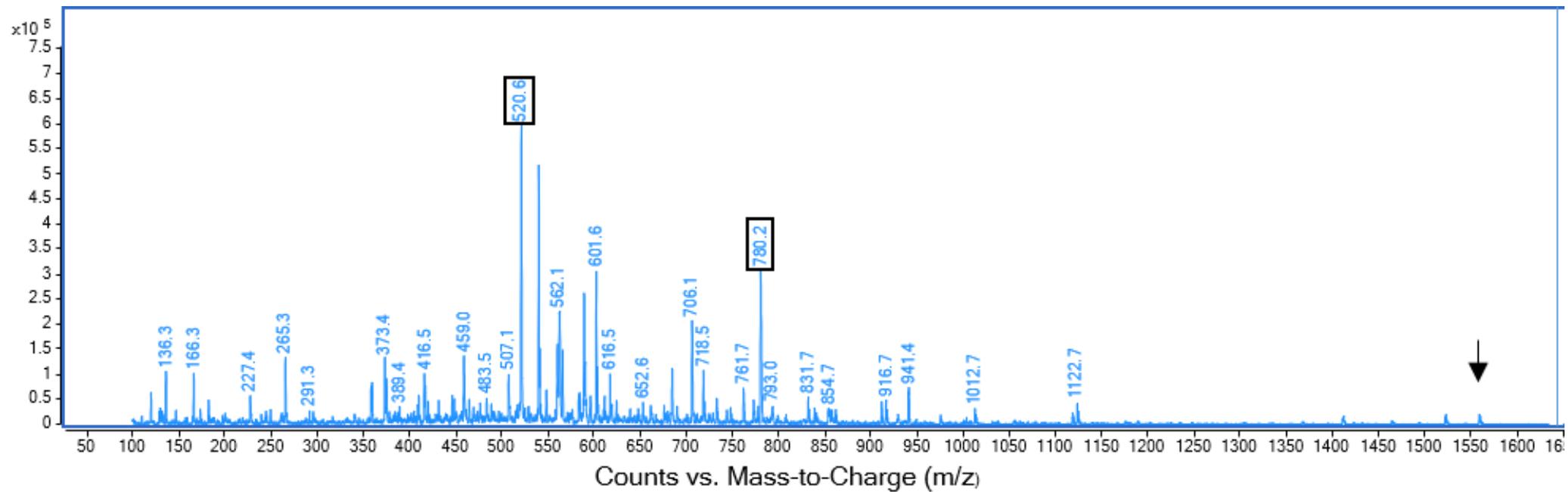


Figura 5A: Espectro de masas obtenido en modo scan donde se muestran los iones con carga +1, +2 y +3 del péptido con secuencia de aminoácidos 26 – 38.

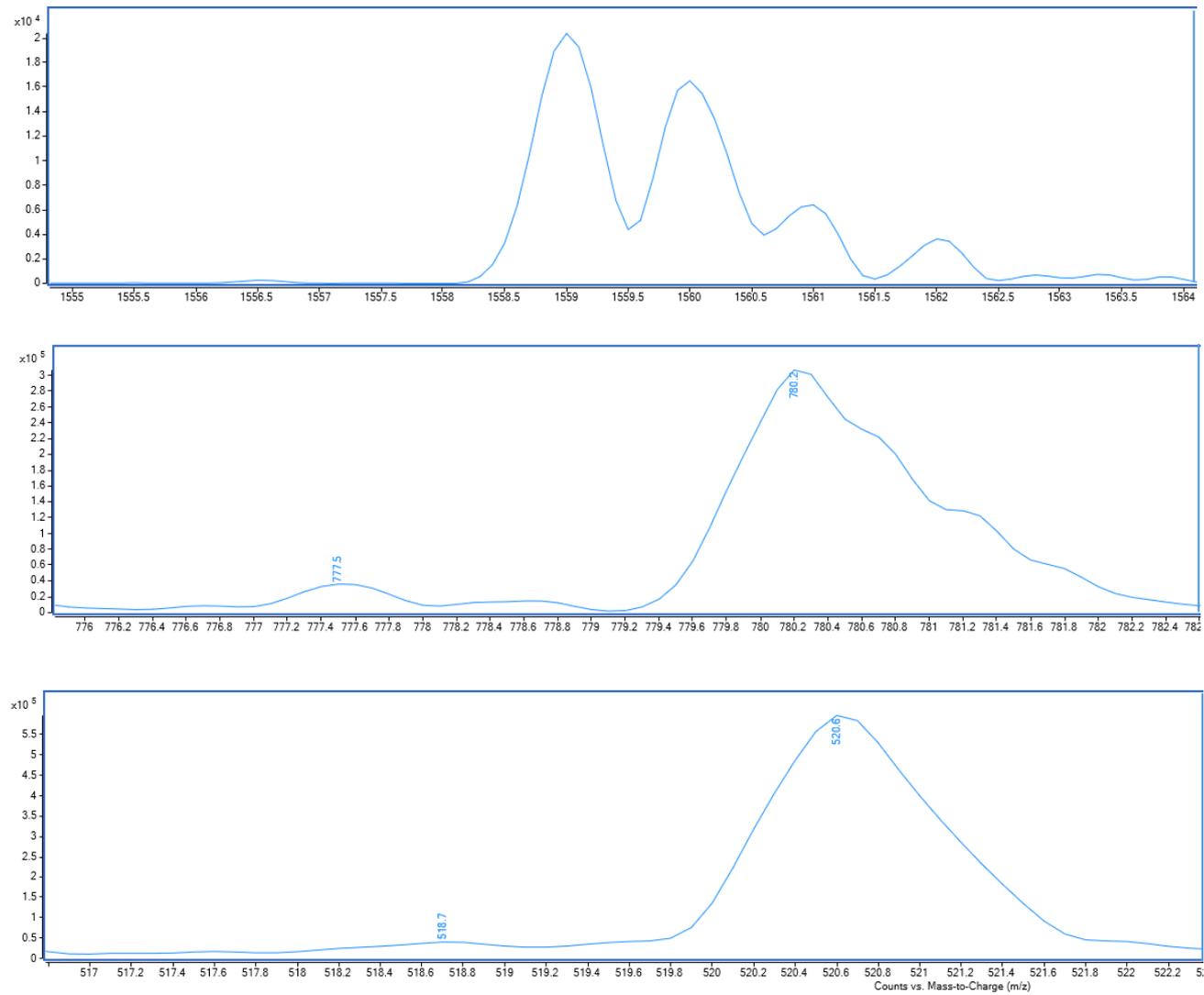


Figura 6A: Ampliación del espectro de masas obtenido en modo scan donde se muestran los iones con carga +1, +2 y +3 del péptido con secuencia de aminoácidos 26 – 38.