

Máster en Técnicas Cromatográficas Aplicadas
Curso 2017-2018

Desarrollo de método HPLC 2D off-line para análisis cualitativo de proteínas mediante Q-TOF-MS

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1.	LA PROTEÓMICA.....	2
2.2.	TÉCNICAS DE ANÁLISIS	3
2.2.1.	Electroforesis bidimensional (2DE).....	3
2.2.2.	LC-MS/MS	4
2.2.3.	MDLC-MS/MS	4
2.3.	CONCATENACIÓN	6
2.4.	MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR MS/MS.....	7
3.	OBJETIVOS.....	11
4.	EXPERIMENTAL	12
4.1.	MUESTRAS.....	12
4.2.	INSTRUMENTACIÓN EN LA 1D	12
4.3.	INSTRUMENTACIÓN EN LA 2D	12
4.4.	PUESTA A PUNTO DEL CROMATÓGRAFO DE LA 1D.....	13
4.5.	OPTIMIZACIÓN DE GRADIENTE DE 1D	14
4.6.	CURVA DE CALIBRACIÓN	14
4.7.	TRATAMIENTO DE MUESTRA	14
4.8.	CONCATENACIÓN.....	16
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	17
5.1.	PUESTA A PUNTO DEL CROMATÓGRAFO DE LA 1D.....	17
5.2.	OPTIMIZACIÓN DEL GRADIENTE CROMATOGRÁFICO EN LA 1D.....	18
5.3.	CURVA DE CALIBRADO	19
5.4.	TRATAMIENTO DE MUESTRA	21

5.5. CONCATENACIÓN.....	22
6. CONCLUSIÓN.....	25
7. TRABAJO FUTURO.....	26
8. BIBLIOGRAFÍA	27
ANEXO 1	29

1. RESUMEN

El presente trabajo describe el desarrollo de un proyecto de proteómica que trata de desarrollar un método de análisis de proteínas mediante cromatografía líquida en dos dimensiones (2D-HPLC) off-line. Como instrumento cromatográfico en la primera dimensión se utilizó un ÄKTA Pure 25 con un detector DAD acoplado a un colector de fracciones automático. Por otro lado, el instrumento utilizado en la segunda dimensión fue un nano-HPLC acoplado a un espectrómetro de masas en tándem (MS/MS) Triple-TOF. El análisis en ambas dimensiones se llevó a cabo mediante fase reversa (RP), por ello, para aportar ortogonalidad a la separación 2D se utilizó la estrategia de *“2D-RPLC pH alto-pH bajo”*. Es decir, la separación y fraccionamiento de la muestra en la primera dimensión se llevó a cabo en medio básico y posteriormente, en la segunda dimensión las fracciones se analizaron a pH ácido. El método de masas utilizado para el análisis de proteínas fue *“data-dependent acquisition”* (DDA).

El instrumento utilizado para el análisis y posterior fraccionamiento de la muestra había sido instalado recientemente. Por ello, el proyecto empezó por la puesta a punto del equipo. Para dicha puesta a punto se realizaron diversas pruebas de reproducibilidad y de la precolumna que iba a ser utilizada como tratamiento de limpieza de muestra on-line. Tras valorar los resultados obtenidos con la precolumna se decidió descartar el uso de la misma.

Tras la puesta a punto del equipo, se optimizó el gradiente para obtener así una distribución homogénea de las proteínas a lo largo del cromatograma y conseguir así fracciones de complejidad parecida. Posteriormente se estudió el uso de la concatenación como estrategia para aumentar la cantidad de proteínas identificadas. Para ello, se fraccionaron dos muestras idénticas en diferentes cantidades de fracciones; una en 13 fracciones y otra en 44. Las 44 fracciones fueron concatenadas obteniendo así un total de 11 fracciones combinadas. Por último, las fracciones de ambas muestras, y una muestra sin fraccionar, fueron analizadas mediante nano-HPLC-MS/MS y los resultados obtenidos se compararon. En base a los resultados, por un lado, se llegó a la conclusión de que, la concatenación no es una estrategia a seguir en el método diseñado. Por otro lado, mediante la incorporación de una separación y fraccionamiento cromatográfico previo (de una segunda dimensión) al análisis por nano-HPLC-MS/MS se triplicó el número de proteínas identificadas consiguiendo un total de 4041 .

2. INTRODUCCIÓN

2.1. LA PROTEÓMICA

Las proteínas, son biopolímeros formados por pequeñas moléculas denominadas aminoácidos (aa) que se unen entre sí por medio de un enlace peptídico.

Los aminoácidos se caracterizan por estar formados por un ácido carboxílico (-COOH) con un grupo amino (-NH₂) unidos a su carbono α. El carbono queda saturado con un átomo de hidrógeno (-H) y un radical (-R) variable siguiendo la estructura que se muestra en la *imagen 1*.¹ Este radical variable determina la identidad y las propiedades de cada uno de los diferentes aminoácidos. Se conocen cientos de aminoácidos diferentes, pero solo 20 forman parte de las proteínas. La estructura molecular de estos aa se muestra en el **ANEXO 1**.

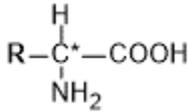


Imagen 1: Estructura general de los aminoácidos.

Los aa se encuentran unidos linealmente por medio de enlaces peptídicos. Estas uniones se forman por una reacción de deshidratación entre el grupo carboxilo del primer aa con el grupo amino del segundo. A la secuencia de los aa en la cadena peptídica y la naturaleza y posición de cualquier derivado unido a ella de forma covalente se le denomina “estructura primaria” de la proteína. Posteriormente, se forman diversos puentes de hidrógeno entre diferentes grupos de una misma cadena peptídica. De este modo, la cadena se pliega y adopta su “estructura secundaria”. La cadena puede adoptar diferentes formas espaciales (hélice alfa o lámina beta) en función de los grupos entre los que se forme el puente de hidrógeno. Al ordenamiento tridimensional de dichas formas espaciales se le denomina “estructura terciaria”. Por último, la “estructura cuaternaria” de las proteínas se forma mediante la unión de varias cadenas polipeptídicas con estructura terciaria para formar un complejo proteico (ver *imagen 2*).

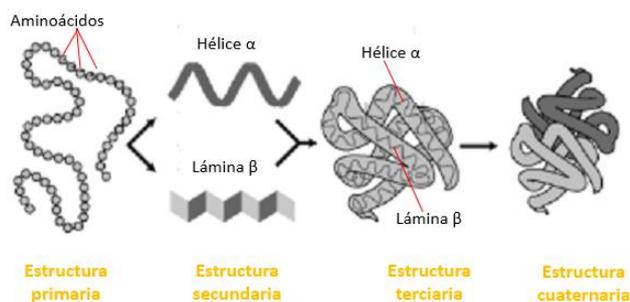


Imagen 2: Estructura de las proteínas.

Las proteínas llevan a cabo la mayoría de las funciones celulares en los organismos vivos. A la colección de proteínas expresadas en un sistema celular en un momento, ubicación y condición particular se le denomina "proteoma".² Al contrario que el genoma, el proteoma es muy dinámico, pudiendo variar según cambios ambientales, condiciones de estrés, patologías, administración de fármacos, etc. Por lo tanto, las diferencias entre un estado "normal" y uno patológico se traducen también a nivel molecular en cambios en los patrones de expresión de las proteínas. Estos factores incrementan la complejidad del proteoma.³

La *proteómica* es la ciencia dedicada al estudio de la expresión de las proteínas y de sus cambios en dependencia del contexto biológico. Para el estudio de esta relación, es necesario disponer de técnicas que permitan realizar la separación e identificación de muchas proteínas simultáneamente además de cuantificar la magnitud de los cambios en la expresión de las mismas.

2.2. TÉCNICAS DE ANÁLISIS

Muchos de los métodos utilizados en proteómica, permiten obtener una separación física de mezclas muy complejas de proteínas separadas mediante la combinación factible de dos (o más) técnicas de separación.⁴

2.2.1. Electroforesis bidimensional (2DE)

Una de las herramientas más usadas para la separación y cuantificación de proteínas a gran escala es la electroforesis bidimensional (2DE), que combina métodos de isoelectroenfoque (IEF) y de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE). De este modo, las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoelectrónico (pI) en la primera dimensión y posteriormente, en base a su peso molecular.⁵ La complejidad de las formas proteicas se reveló por primera vez mediante 2DE.⁶ No obstante, la electroforesis bidimensional posee ciertas limitaciones para analizar proteínas hidrofóbicas, ya que, por su escasa solubilidad, están

subrepresentadas en los mapas electroforéticos bidimensionales obtenidos hasta ahora. Por otra parte, aquellas proteínas que poseen puntos isoeléctricos muy ácidos o básicos son difíciles de focalizar. Debido a dichas limitaciones, en los últimos años ha existido la tendencia a trabajar con péptidos en lugar de proteínas.

2.2.2. LC-MS/MS

Por otro lado, la cromatografía líquida (LC) combinada con espectrometría de masas en tándem (MS/MS) se ha convertido en una técnica ampliamente utilizada para el análisis de proteomas complejos, como extractos de células u orgánulos. El tipo de cromatografía líquida más usada para LC-MS/MS es la de fase reversa (RP) debido a su alto poder de separación y la compatibilidad de las fases móviles con técnicas de ionización como la ionización por electrospray (ESI). No obstante, debido a la complejidad de las muestras de péptidos generadas a partir de un digesto de proteoma, a menudo se requiere una separación de péptidos adicional antes de RPLC-MS/MS.⁷

2.2.3. MDLC-MS/MS

Cada vez se estudian estructuras biológicas más complejas mediante MS/MS, es por ello que ha aumentado la necesidad de métodos de separación más potentes y con mayor resolución. En consecuencia, el desarrollo y uso de la cromatografía líquida multidimensional (MDLC) en proteómica ha prosperado en los últimos años. La separación multidimensional, cumple dos funciones en combinación con la espectrometría de masas en tándem. Por un lado, resuelve mejor los péptidos que difieren en carga e hidrofobicidad para minimizar la supresión iónica y mejorar la eficiencia de ionización. Por otro lado, simplifica la complejidad de los iones peptídicos que entran al espectrómetro de masas para minimizar el submuestreo. Este último aspecto es importante porque el proceso de MS en tándem es impulsado por la “adquisición de datos dependientes de datos” (método descrito en el apartado 2.4.) y tiene un tiempo de ciclo finito. Una mayor capacidad máxima y una mejor capacidad de resolución mejoran la adquisición de datos y pueden conducir a una mejor representación de las proteínas en la mezcla.⁸ La MDLC reduce la complejidad de la mezcla de péptidos en el análisis de MS, lo que resulta en un mayor número de péptidos y proteínas identificadas (ver *imagen 3*).

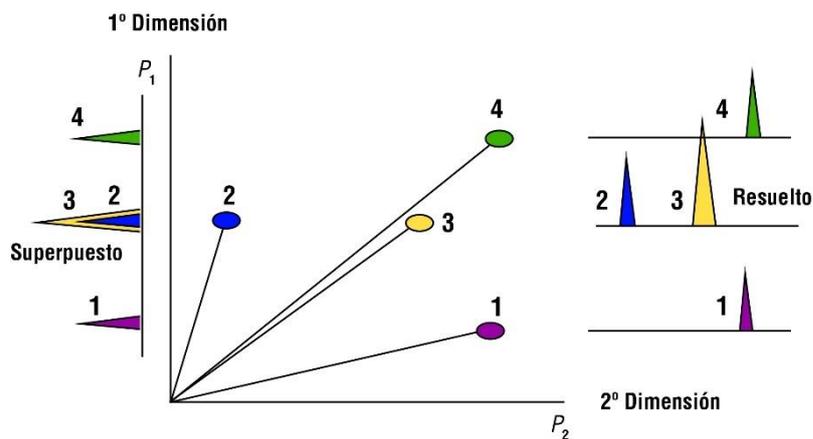


Imagen 3: Concepto de separación ortogonal en 2D.⁸

Habitualmente, en 2D-LC-MS/MS se utiliza el intercambio catiónico fuerte (SCX) como técnica de separación en la primera dimensión y RPLC en combinación con MS/MS en la segunda para proporcionar ortogonalidad a la separación de péptidos.⁷ No obstante, en 2005 Gilar et al.⁹ sugirieron que, a pesar de la ortogonalidad moderada, el uso de una RP de pH alto como primera dimensión tiene la ventaja de una mejor eficacia de separación. Esto fue confirmado posteriormente por una comparación detallada del análisis de una mezcla de proteína compleja mediante dos técnicas de separación en 2D; RP(pH alto) x IP-RP(pH bajo)-HPLC y SCX x IP-RP-HPLC.¹⁰

La ortogonalidad en modos 2DRP (pH 10-pH 2) es producto de cambios en la distribución de carga dentro de las cadenas peptídicas al alterar la acidez del eluyente. Los aa más afectados son aquellos que son capaces de transportar cargas positivas o negativas. Por ejemplo, Asp y Glu (ver anexo 1) son neutros a pH 2 y se consideran moderadamente hidrofóbicos. Sin embargo, a pH 10, tienen carga negativa y pasan a considerarse hidrófilos. Pasa lo contrario con aminoácidos con propiedades básicas (Arg, Lys y His).^{11, 12, 13}

El método 2DRP (pH 10-pH 2) aumenta el número de proteínas identificadas en comparación con el análisis cromatográfico de una única dimensión. Mediante la segunda separación se puede conseguir separar compuestos que coeluyen en la primera dimensión y de esta forma, aumentar la detección. Además, simplifica la manipulación de fracciones y el mantenimiento del instrumento puesto que, la cantidad de sales utilizada es mucho menor que en el caso de SCX. Por otro lado, ofrece la posibilidad de una predicción de retención en ambas dimensiones. Esta información se puede utilizar para la selección a priori de las condiciones de separación en función de la composición de la muestra y de este modo, reducir el tiempo de análisis.¹²

2.3. CONCATENACIÓN

El concepto de concatenación se introdujo previamente para reducir el tiempo de análisis para la implementación práctica de HPLC-2D.¹³ Trata de fraccionar la muestra en la primera dimensión y combinar varias fracciones que *a priori* tengan poca superposición en la segunda dimensión del modo que se muestra en la *imagen 4*. Posteriormente, se lleva a cabo el análisis de las fracciones combinadas en la segunda dimensión por medio de PRLC-MS/MS.

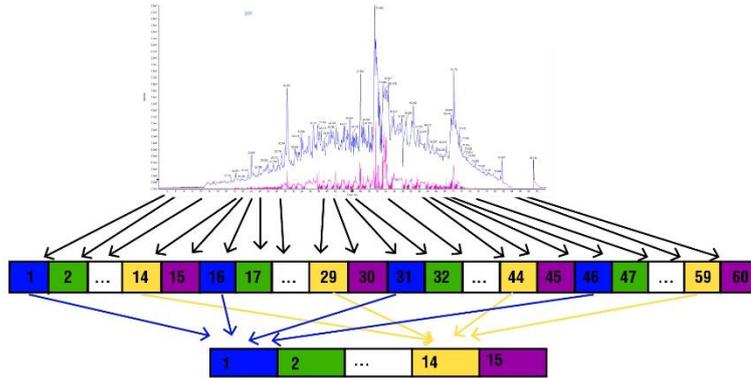


Imagen 4: Esquema de estrategia de concatenación.¹³

En la *imagen 5a*, se muestra el resultado que se obtendría mediante el análisis de una muestra de fracciones combinadas, si ésta fuera analizada en la segunda dimensión con el mismo método utilizado en la cromatografía de la primera dimensión (pH 2). Con la concatenación, se observan varios grupos de péptidos a lo largo de un amplio intervalo de tiempo de elución de LC, lo que indica un buen uso del espacio. Esto demuestra que mediante la concatenación mejora la cobertura del análisis mientras se mantiene un alto rendimiento. Sin embargo, un espacio de separación significativo permanece sin utilizar. Por otro lado, realizando la 2DRP (pH 10-pH 2) y gracias a la semiortogonalidad que este método aporta, se conseguiría el resultado que se muestra en la *imagen 5b*. De este modo, el espacio de separación se cubre ampliamente y de forma uniforme obteniendo así un método de mayor capacidad mediante el que identificar una mayor cantidad de péptidos.¹³

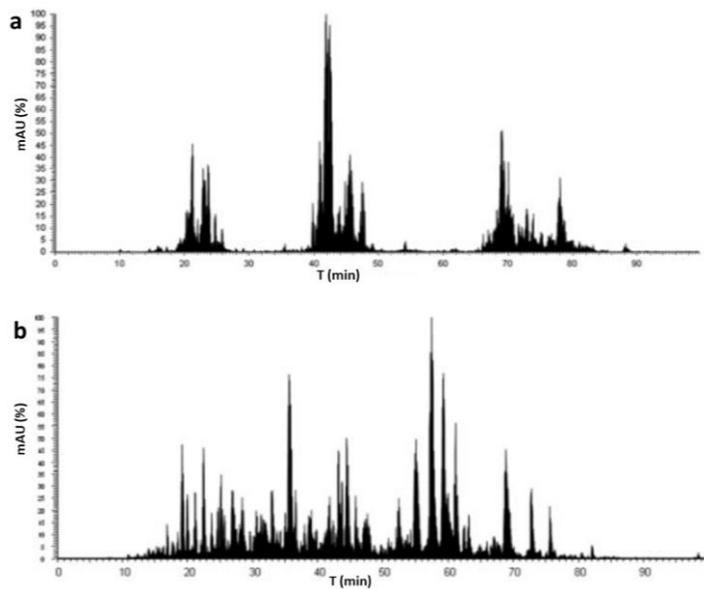


Imagen 5: Resultados de análisis en la segunda dimensión de fracciones combinadas **a)** muestra analizada por método 2DRP (pH bajo-pH bajo) **b)** muestra analizada por método 2DRP (pH alto-pH bajo).¹³

A pesar de los buenos resultados obtenidos en diversos proyectos, la concatenación no es siempre una estrategia efectiva. Cuanta más ortogonalidad exista entre la primera y la segunda dimensión del método, más posibilidad de coelución existe. Por lo tanto, dependiendo del método y las condiciones utilizadas, puede identificarse un mayor número de proteínas analizando fracciones de una muestra sin concatenarlas.

2.4. MÉTODO DE IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR MS/MS

La HPLC separa los péptidos en base a sus características físico-químicas e introduce estos péptidos en el espectrómetro de masas aumentando así la cobertura de la muestra. En los métodos LC-MS/MS, tres eventos ocurren secuencialmente en el mismo espectrómetro de masas: (a) ionización: los péptidos que eluyen de la columna cromatográfica, se ionizan en la interfase y son introducidos en el espectrómetro de masas; (b) exploración de MS1: se miden la abundancia y las relaciones de masa-carga (m/z) de todos los iones en un momento dado; y (c) selección de iones precursores de interés y posterior fragmentación de los mismos explorando las abundancias y m/z de los fragmentos en MS2.¹⁴

Una manera de identificar proteínas a través de la espectrometría de masas es mediante el análisis de estos espectros de fragmentación para uno o más péptidos, los cuales fueron generados por el corte de la proteína utilizando las proteinasas Lys-C y Tripsina. Una de las características tecnológicas notables de los espectrómetros de masas en tándem es la capacidad de fragmentar ordenadamente los péptidos en diferentes posiciones del enlace peptídico.¹⁵ Por lo tanto, la diferencia de masa molecular entre los iones producto generados es la representación de cada aa en la cadena polipeptídica, proporcionando de esta forma la secuencia del péptido (ver *imagen 6*).¹⁶

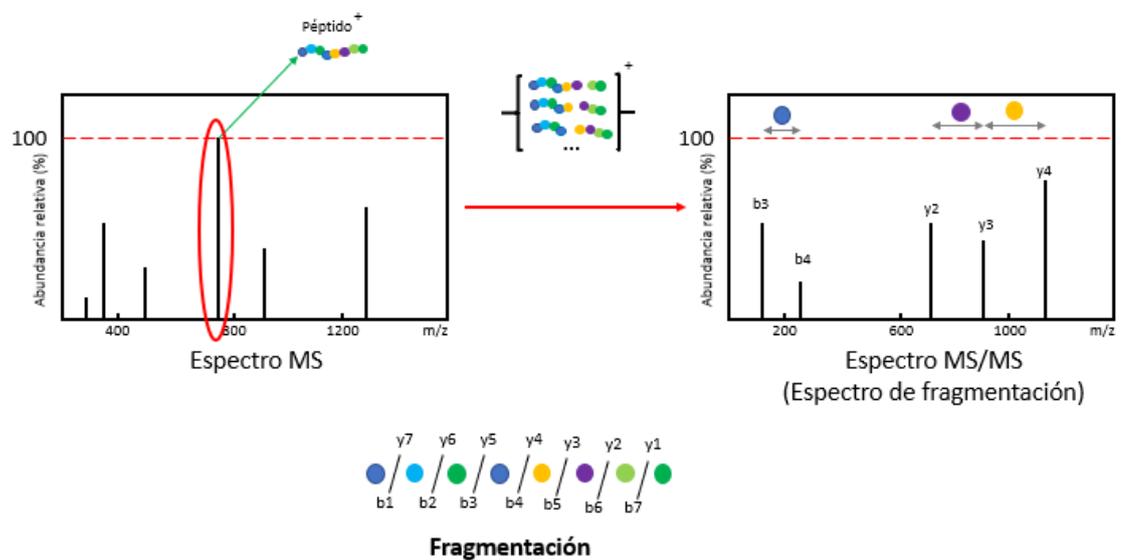


Imagen 6: Método de secuenciación de péptido mediante el análisis de su espectro de fragmentación.

Los datos de proteómica están sujetos a búsquedas en bases de datos u otro proceso que identifica y cuantifica péptidos y proteínas. Una búsqueda de base de datos típica convierte los datos brutos (conseguidos mediante la espectrometría de MS/MS) de un formato propietario del proveedor a un formato abierto. Relaciona los péptidos identificados con proteínas e informa sobre péptidos y proteínas identificadas con puntajes estadísticos y sus abundancias medidas.² Es decir, la base de datos nos informa de cada péptido y proteína identificada junto con un valor numérico al que se denomina FDR (tasa de descubrimientos falsos) que indica la probabilidad de un "falso positivo".¹⁷ En el presente trabajo, se establece que el FDR mínimo aceptable es de un 1% para dar por válida la identificación.

Los dos desafíos fundamentales en el análisis de datos proteómicos basados en LC-MS/MS son la identificación de las proteínas presentes en una muestra y la cuantificación de los niveles de abundancia de esas proteínas.¹⁵ La estrategia “*data-dependent acquisition*” (DDA) ha proporcionado una amplia detección y cuantificación relativa de miles de proteínas en una variedad de muestras biológicas.¹⁴

En el modo de trabajo DDA, el método de adquisición LC-MS/MS está programado para evaluar continuamente los datos LC-MS1 entrantes en base a un conjunto de criterios definidos por el usuario. Dependiendo del resultado de la evaluación, se modifican y configuran los parámetros de adquisición (a tiempo real) para recopilar los espectros de MS2 para los iones peptídicos precursores seleccionados.²

La selección de iones precursores se basa en las características de los iones MS1 (principalmente intensidad y estado de carga), exclusión dinámica y listas de inclusión/exclusión de determinadas m/z definidas por el usuario (ver *imagen 7*). Para maximizar la identificación de péptidos y proteínas que estén coeluyendo, DDA adquiere intencionadamente solo un único espectro MS2 para un péptido dado mediante la aplicación de un algoritmo conocido como “exclusión dinámica”. De este modo, previene la adquisición de más de un espectro MS2 del mismo ion precursor dentro del pico de elución del péptido.

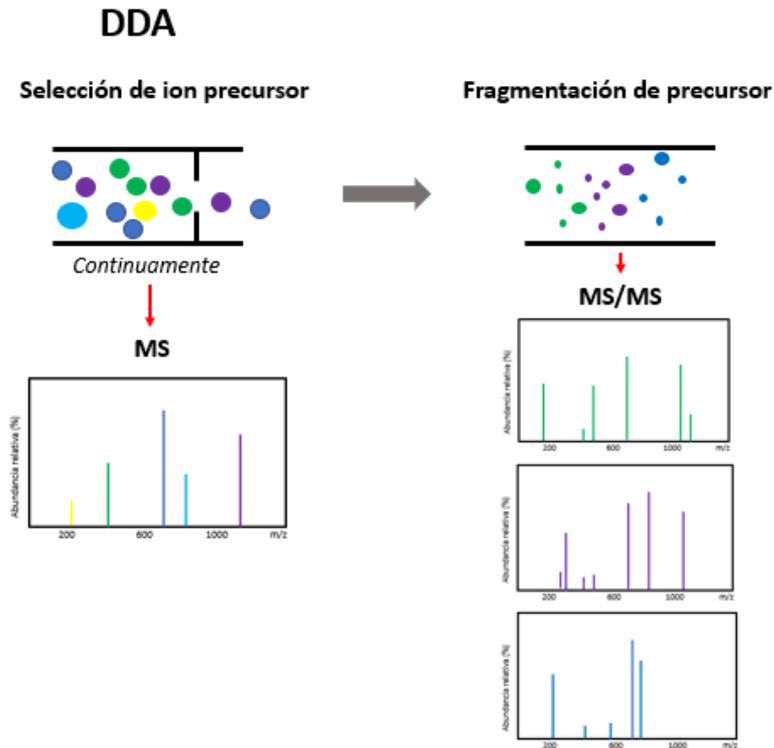


Imagen 7: Esquema de sistema de selección de ion precursor mediante el método “Data-dependent acquisition” (DDA).

La exclusión dinámica es esencial para la sensibilidad de DDA en términos de identificar más péptidos, pero ello provoca que DDA sufra varias limitaciones fundamentales.² Si demasiadas especies de péptidos coeluyen y aparecen en un único scan de MS1, luego DDA muestra solo los péptidos más abundantes. Además, en el método empleado en este proyecto, se establece un “tiempo de exclusión de iones seleccionados” de 15 s, es decir, una vez seleccionado un precursor, éste no vuelve a ser seleccionado hasta 15 s después. Este enfoque, disminuye la reproducibilidad y previene la medición de péptidos de baja abundancia. No obstante, a pesar de sus defectos, la flexibilidad, amplitud de detección y la simplicidad de configuración hacen que DDA sea el método LC-MS/MS preferido en el ámbito de análisis de proteínas.

En los últimos años, estrategias alternativas de adquisición LC-MS/MS, como la monitorización de reacciones múltiples (MRM) y la monitorización de reacciones paralelas (PRM) han proporcionado una cuantificación precisa y reproducible de hasta cientos de proteínas. El objetivo final de la proteómica es el desarrollo de estrategias de adquisición que tengan la amplitud de la DDA y la precisión de MRM/PRM para proporcionar una identificación y cuantificación reproducibles de cada proteína en cualquier muestra biológica.^{14,18,19}

3. OBJETIVOS

En este trabajo se presenta el diseño de un método 2D-HPLC off-line que tiene como objetivo conseguir identificar un mayor número de proteínas en muestras. Se han realizado optimizaciones, pruebas y consiguientes análisis de resultados de muchos de los apartados que constituyen el método con el fin de lograr dicho objetivo.

El análisis en ambas dimensiones se realizará en fase reversa (RP). Para dar ortogonalidad al método, se propone utilizar la estrategia de RP(pH alto)-RP(pH bajo) y así provocar cambios en la distribución de carga dentro de las cadenas peptídicas haciendo que el t_R de éstas cambie de una dimensión a otra. Mediante diversas pruebas se comprobará si esta combinación semiortogonal de técnicas es válida para obtener buenos resultados en cuanto a cantidad de proteínas identificadas.

Además, se estudiarán diferentes técnicas de “extracción en fase sólida” (SPE) como método de tratamiento de muestra. Por un lado, se realizarán análisis de diversas muestras tratadas on-line mediante una precolumna C18. Por otro, se estudiará también el uso de la SPE off-line tratando una serie de muestras con cartuchos de C18, R2R3 y SCX. Posteriormente, los resultados obtenidos se compararán para determinar el tratamiento óptimo.

Se estudiará también la concatenación como estrategia para aumentar el número de proteínas identificadas en el análisis. Para ello, dos muestras idénticas se dividirán en diferente cantidad de fracciones. Una de las muestras fraccionadas se concatenará y la otra no para determinar si esta estrategia es efectiva con el método planteado.

El objetivo secundario del trabajo es realizar la puesta a punto de un equipo y varias de las pruebas necesarias para ello. El aprendizaje en cuanto al manejo del equipo, el mantenimiento del mismo, los cambios de diferentes elementos del instrumento y el manejo del software.

Además de esto, el presente trabajo de final de master me brinda la oportunidad de aplicar y profundizar en los conocimientos adquiridos a lo largo del curso académico y ha ampliado mis conocimientos en cuanto al campo de la proteómica; las técnicas analíticas utilizadas, las tendencias analíticas actuales y la complejidad de las mismas.

4. EXPERIMENTAL

4.1. MUESTRAS

El departamento en el que se ha realizado el trabajo ha sido de neuroproteómica, por lo que las muestras utilizadas tanto para la puesta a punto del equipo, como para el diseño del método de análisis han sido de hipocampo. Se extraen las proteínas de estas muestras y se cuantifica la cantidad de estas mediante el “método de Bradford”. Posteriormente se tratan con un procedimiento de digestión controlada para dividir las proteínas en péptidos del modo que se describe en el artículo de *Shevchenko et al.*²⁰ El método de digestión de proteínas seguido no es completamente reproducible, es por esto que a lo largo del presente trabajo se habla de “cantidad de proteína digerida” y no de “cantidad de péptido”.

4.2. INSTRUMENTACIÓN EN LA 1D

El análisis y fraccionamiento de la muestra en la primera dimensión se lleva a cabo con un equipo ÄKTA Pure 25 “*high performance liquid chromatography*” (HPLC) (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) con un detector ultravioleta (DAD) acoplado a un fraccionador automático F9-R (GE Healthcare, Uppsala, Suecia). La separación se realiza con una precolumna XTERRA® RP18 (5 µm, 4.5 x 50 mm) y una columna XTERRA® RP18 (3.5 µm, 1 x 150 mm). La fase móvil utilizada es A; H₂O y B; ACN:H₂O (90:10) ambas a un pH de 9.8. Para ajustar el pH de ambas fases móviles se disuelve bicarbonato de amonio (NH₄HCO₃) a una concentración de 5 mM y con ayuda de un medidor de pH se añade hidróxido de sodio (NaOH) o ácido clorhídrico (HCl) hasta alcanzar el valor deseado. El loop utilizado es de 250 µL, de este modo se inyectan un total de 100 µL de muestra por análisis. Las longitudes de onda utilizadas para la detección de los péptidos son 280, 254 y 215 nm.

4.3. INSTRUMENTACIÓN EN LA 2D

El cromatógrafo utilizado en la segunda dimensión es un nano-LC-Ultra-1D Plus (Eksigent Technologies, Dublin, USA) con un inyector automático nanoLC-as-2 (Eksigent Technologies, Dublin, USA). La separación se lleva a cabo mediante una precolumna Thermo scientific C18 (5 µm, 0.1 x 20 mm, nanoViper) y una columna Thermo scientific C18 (3 µm, 0.075 x 250 mm, nanoViper). La fase móvil utilizada es A; H₂O B; ACN ambas con un 0.1% de HCOOH y se lleva a cabo el siguiente gradiente cromatográfico: 0 min, 3% B; 2min, 7% B; 60 min, 30% B; 75 min, 70% B; 76 min, 95% B; 81 min, 95% B; 82 min, 3% B; 92 min, 3% B. El flujo de la fase móvil es de 0.3 µL/min durante todo el análisis. La columna se mantiene a una temperatura constante de

40°C y las muestras a 4°C. Se inyecta un volumen de muestra de 2 µL a una concentración de 0.5 µg/µL (1 µg en columna) .

El sistema está acoplado a un espectrómetro de masas en tándem TripleTOF 5600 (AB Sciex) equipado con una interfase nanoelectrospray (ESI) trabajando en modo positivo. Tanto el gas de cono como el de desolvatación es nitrógeno, con un flujo de 25 L/h. El gas de colisión es también nitrógeno. Los péptidos se ionizan y llegan hasta el segundo analizador (*"time of light"* TOF) donde se realiza el *"survey"* para seleccionar los péptidos a fragmentar mediante SCANS de 0.25 s para iones de entre 350-1250 m/z. Se seleccionan como iones precursores los 35 más abundantes y con una carga de 2 a 5. Además, se establece que estos iones precursores deben tener siempre una intensidad superior a 150 cps y que, una vez seleccionado un ion precursor, no se vuelva a seleccionar el mismo ion durante los siguientes 15 segundos. Los iones precursores son seleccionados en el primer analizador (Q1) y fragmentados en la celda de colisión (Q2). Por último, dichos fragmentos son analizados mediante el segundo analizador (TOF) detectando solo iones de entre 100 y 1500 m/z. El tiempo de acumulación es de 0.1 s por cada ion precursor seleccionado obteniendo así un tiempo total de ciclo de 3.8 s. Con este método se realizan aproximadamente un total de 1452 ciclos por análisis (92 min) que corresponderían con un máximo de 50820 iones precursores de péptidos.

4.4. PUESTA A PUNTO DEL CROMATÓGRAFO DE LA 1D

Las primeras inyecciones de péptidos se realizan de forma manual, con un loop de 500 µL, una columna C18 y utilizando las longitudes de onda 280, 254 y 215 nm. Para el análisis cromatográfico se inyectan muestras de cantidades superiores a 200 µg de proteína digerida y se emplea el siguiente gradiente provisional; 0 min, 5% B; 30 min, 5% B; 90 min, 50% B; 110 min, 75% B; 110 min, 100% B; 130 min, 100% B; 130 min, 5% B; 160 min, 5%. Este gradiente provisional es utilizado en todas las pruebas realizadas durante la puesta a punto del equipo. Con dichas condiciones de análisis se obtienen buenos resultados; señales de péptido proporcionales a las cantidades inyectadas y se observa reproducibilidad en los análisis en los que se inyectan cantidades iguales.

Posteriormente se decide proceder al siguiente paso y conectar al cromatógrafo un inyector automático con un loop de 100 µL y una válvula adicional (*"versatile valve"*) para utilizar una precolumna como técnica de limpieza de muestra previa al análisis.

4.5. OPTIMIZACIÓN DE GRADIENTE DE 1D

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, las pruebas realizadas para la puesta a punto del equipo se han llevado a cabo con un gradiente provisional. El objetivo de la cromatografía en la primera dimensión es fraccionar la muestra para posteriormente, concatenarlas y así identificar una mayor cantidad de péptidos/proteínas mediante el análisis en la segunda dimensión. Para ello es necesario que las fracciones tengan una concentración similar entre sí. Por lo tanto, el objetivo de esta optimización es conseguir que los péptidos salgan de forma homogénea y, en la medida de lo posible, a lo largo de todo el gradiente. En este caso, el tiempo no se considera un “factor limitante” puesto que éste no será un proceso demasiado rutinario en el laboratorio y, además, es una única muestra la que se fracciona cada vez que se lleva a cabo el proceso. Se toma como punto de partida para la optimización el gradiente provisional y este se modifica tantas veces como sea necesario hasta conseguir el gradiente que se considere adecuado.

4.6. CURVA DE CALIBRACIÓN

Se plantea un calibrado externo de 8 puntos de entre 0-470 µg de proteína digerida para la determinación de la cantidad aproximada de péptidos en muestra por medio de HPLC-DAD.

Para ello se digieren 5, 10, 15, 25, 100, 300 y 470 µg de proteína (cuantificados por el método de Bradford) y se llevan a sequedad en vacío (“speed vac”). Las muestras se resuspenden en 100 µL de una disolución de %5 H₂O:ACN (95:5) a pH 9.8 (condiciones del comienzo del análisis cromatográfico) y se analizan utilizando el gradiente cromatográfico que previamente se ha optimizado.

4.7. TRATAMIENTO DE MUESTRA

El método habitualmente usado como técnica de tratamiento de muestra para péptidos es la “extracción en fase sólida” (SPE). Teniendo en cuenta las propiedades físico-químicas de los péptidos en este proyecto se estudian tres tipos de SPE; por un lado, extracción con cartuchos C18 (Thermo Scientific, Rockford USA, capacidad de 5 mg de proteína/péptido) y R2/R3 (Thermo Scientific, Rockford USA) y por otro, con cartuchos SCX (intercambio catiónico fuerte) de la casa comercial Thermo Scientific (Rockford, USA) con una capacidad de 4 mg de proteína/péptido).

Para realizar esta prueba, se digieren 8 muestras de 150 µg de proteína y se llevan a sequedad en vacío. Cada tipo de cartucho se estudia por duplicado, de forma que seis muestras son tratadas y otras dos no para así poder determinar la recuperación de cada técnica.

a) R2/R3

Los compuestos R2 y R3 son polímeros que se venden comercialmente en forma de polvo seco. Las columnas de R2/R3 se preparan de forma manual, por lo tanto, de entre los tratamientos de muestra que se van a estudiar, es el más laborioso. Se mezclan en un vial los “compuestos” R2 y R3 a partes iguales y se añade H₂O:ACN (30:70) 0.1% de ácido trifluoroacético (TFA) para activar la resina. El polímero es muy hidrófobo, por lo que quedará suspendido en la solución. Como

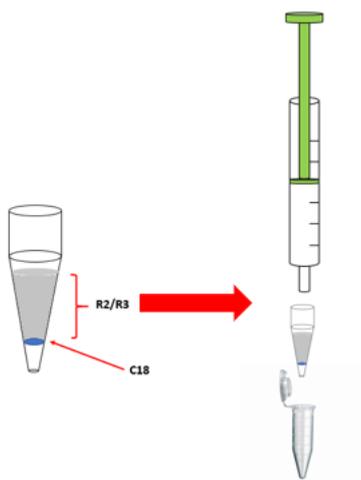


Imagen 8: Explicación esquemática de “mecanismo” R2/R3.

soporte de la resina se utiliza una punta de pipeta de 200 μ L que se tapona con un poco de C18 para luego rellenar la punta con 60 μ L de la disolución en suspensión que previamente ha sido preparada. Con una jeringa se saca la solución sobrante de la punta y de este modo la resina queda empacada (ver *imagen 8*).

Se añaden 100 μ L de H₂O 0.1% TFA para limpiar la resina. Se carga la muestra (que previamente ha sido resuspendida en 400 μ L de H₂O 0.1% TFA) y se lava nuevamente con 100 μ L H₂O 0.1% TFA. Por último, la muestra se eluye con H₂O:ACN (40:60) 0.1% TFA.

b) C18

Se utilizan cartuchos de 20 mg de resina C18. Para activar el cartucho, se añaden 300 μ L de ACN y se centrifuga a 5.000 x g durante 1 minuto. El ACN se desecha y se repite el paso. A continuación, se acondiciona el cartucho, para ello añaden 300 μ L de H₂O 0.1% TFA tal y como se ha descrito en el paso anterior. Este paso se lleva a cabo dos veces. La muestra se disuelve en 400 μ L de H₂O 0.1% TFA, se carga en el cartucho y se centrifuga a 3.000 x g durante 1 minuto. La muestra se lava tres veces con 300 μ L de H₂O 0.1% TFA centrifugándola a 3.000 x g durante 1 minuto. Por último, la muestra se eluye en dos etapas con 300 μ L de H₂O:ACN (50:50) 0.1% TFA y centrifugando a 3.000 x g durante 1 minuto.

c) SCX

Para acondicionar el cartucho se añaden 400 μ L de una disolución de 10mM KH₂PO₄ 20% ACN a pH 3 y se centrifuga a 2.000 x g durante 5 min. La disolución se desecha y el proceso se repite una vez más. A continuación, la muestra se disuelve en 400 μ L de H₂O 0.1% TFA y se carga en el cartucho. Éste se centrifuga a 2.000 x g durante 5 min. La muestra se lava dos veces con 400 μ L de 10mM KH₂PO₄ 20% ACN a pH 3 y centrifugando a 2.000 x g durante 5 min. Por último, la

muestra se eluye con 300 μL de una disolución de 10mM KH_2PO_4 20% ACN a pH 3, 0.5 M KCl. El paso de elución se repite una vez más.

Se recogen el “flowthrough”, el primer lavado y el eluato de todas las muestras (y se llevan a sequedad) para estudiar la recuperación de cada punto del proceso. Denominamos “flow-through” (FT) a la parte de la muestra que no queda retenida en el sistema de extracción en fase sólida. De este modo, el método SPE seleccionado como método de tratamiento de muestra, podrá ser modificado y mejorado para obtener un mejor resultado.

4.8. CONCATENACIÓN

Una vez optimizado el gradiente, se pone a prueba la estrategia de concatenación. Para ello, dos muestras de 100 μg de proteína digerida se resuspenden en 100 μL de %5 $\text{H}_2\text{O}:\text{ACN}$ (95:5) a pH 9.8. Por un lado, una de las muestras se divide en 14 fracciones (F) de 180 μL que no van a ser concatenadas. Por otro lado, la otra muestra se divide en 44 fracciones de 60 μL que se concatenarán de la forma que se muestra en la *imagen 9* para obtener un total de 11 fracciones combinadas (FC).

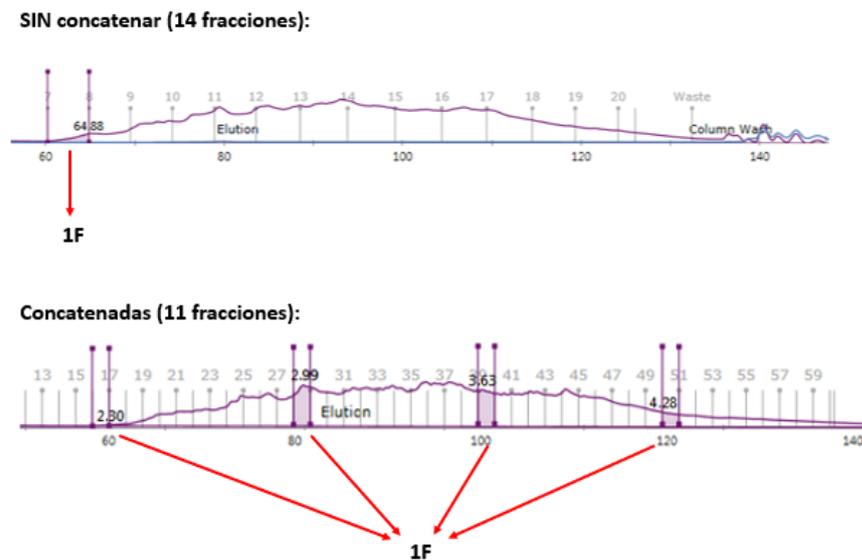


Imagen 9: Explicación esquemática de la estrategia de concatenación en la cromatografía de la primera dimensión, aplicada a dos muestras iguales y analizadas en las mismas condiciones.

Posteriormente, todas las fracciones se llevan a sequedad. Utilizando el área de cada fracción, y el área total de la muestra, se calcula la cantidad de proteína de cada. De este modo, las fracciones se resuspenden a una concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ y todas (F y FC) se analizan por medio de nano-HPLC-MS/MS con las condiciones anteriormente mencionadas en el apartado 4.3.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. PUESTA A PUNTO DEL CROMATÓGRAFO DE LA 1D

Se inyectan dos muestras de 100 µg de proteína digerida y en los cromatogramas no se observa señal de péptido. Dado que las pruebas sin precolumna ni inyector automático han salido bien, el fallo se achaca a uno de los nuevos elementos utilizados. Para comprobar cuál de los dos es el causante se realizan diversas pruebas con precolumna e inyección manual. En la *imagen 10* observamos que la señal de los péptidos se solapa con algún tipo de interferente.

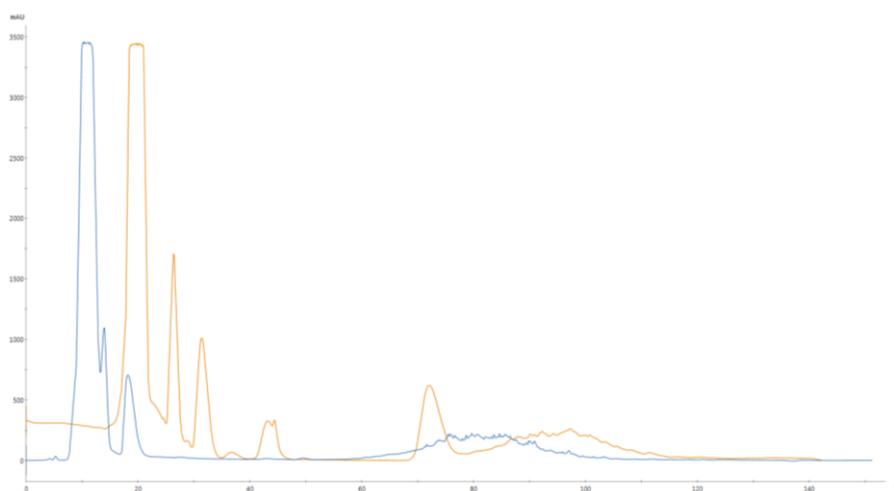


Imagen 10: Análisis de 200 µg de proteína digerida con inyección manual y precolumna (naranja) y sin precolumna (azul).

Los resultados se estudian detenidamente y se llega a la conclusión de que la precolumna, en lugar de promover la separación de los péptidos, hace que los interferentes se separen. Es decir, algunos de los compuestos utilizados en el tratamiento de muestra tienen cierta afinidad con la precolumna y esto hace que, en lugar de salir al comienzo del cromatograma junto con el resto de interferentes, tengan un tiempo de retención (t_R) mayor y la señal se solape con la de los péptidos.

Para asegurar que el problema es provocado únicamente por el uso de la precolumna, se procede a quitar la precolumna y se vuelve a conectar el inyector. Se analizan dos muestras y se obtienen los resultados mostrados en la *imagen 11*.

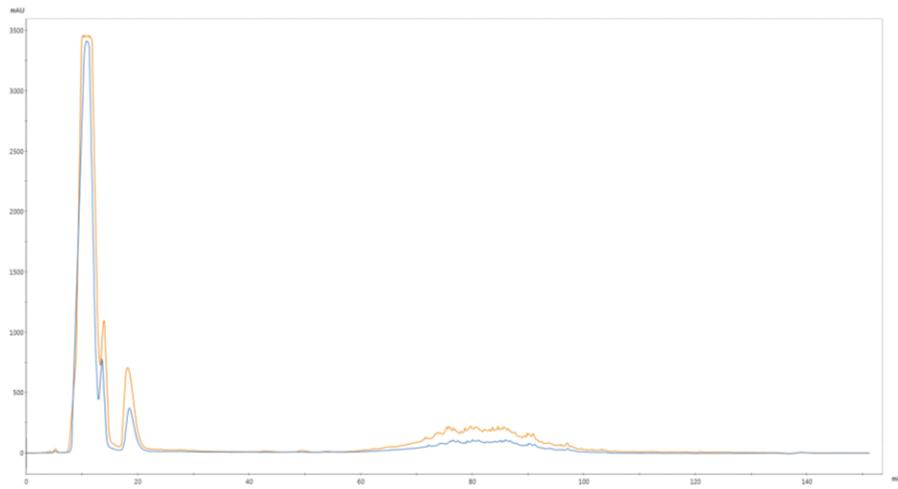


Imagen 11: Análisis de 200 μg de proteína digerida sin precolumna e inyección manual (naranja) y análisis de 100 μg de proteína digerida sin precolumna e inyección automática (azul).

Los resultados obtenidos en esta prueba son buenos, la señal de los péptidos es clara y proporcional a la cantidad analizada (100 μg). Como resultado, se tomó la decisión de prescindir de la precolumna y se planteó el uso de una SPE off-line como técnica de limpieza de muestra previa al análisis.

5.2. OPTIMIZACIÓN DEL GRADIENTE CROMATOGRÁFICO EN LA 1D

El primer objetivo de la optimización ha sido adelantar la señal de los péptidos, es decir, acelerar la salida de los mismos. Para ello, el primer cambio realizado es una rampa muy pronunciada al comienzo del cromatograma. El siguiente objetivo, es conseguir que los péptidos eluyan a lo largo de todo el cromatograma de forma regular. Es decir, se quiere conseguir una señal ancha y homogénea. Para eso, una vez se consigue adelantar la salida de los péptidos, se procede a cambiar el siguiente segmento de gradiente por uno menos pronunciado, y de este modo, provocar que los péptidos eluyan durante un tiempo mayor.

Teniendo en cuenta los objetivos a conseguir con la optimización, se realizan los cambios necesarios en el gradiente de la forma que se muestra en la *imagen 12*.

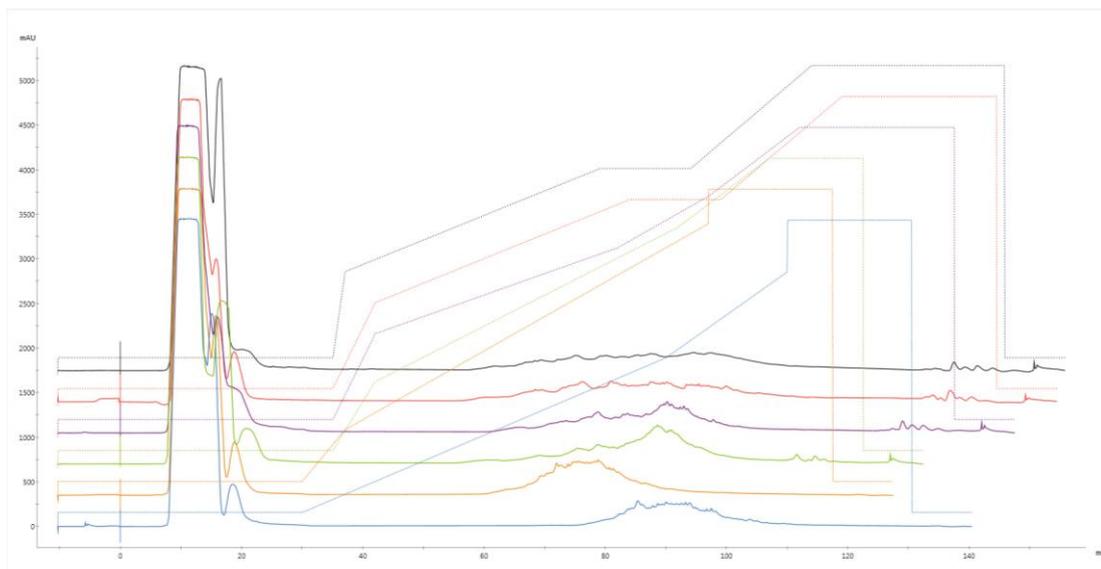


Imagen 12: Cambios realizados durante la optimización partiendo de un gradiente provisional (azul) utilizado para las pruebas previas del equipo, hasta llegar al gradiente óptimo (negro).

De esta manera se define el siguiente gradiente cromatográfico óptimo : 0 min, 5% B; 35 min, 5% B; 37 min, 30% B; 79 min, 60% B; 94 min, 60% B; 114 min, 90% B; 145 min, 90% B; 145 min, 5% B; 155 min, 5% B.

5.3. CURVA DE CALIBRADO

Como se puede observar en la *Tabla 1*, se obtienen resultados lógicos en los análisis de las muestras que forman el calibrado. Los tiempos de retención (de comienzo (t_s), y fin (t_E)), la magnitud de las señales (anchura y altura) y el área se ordenan de forma ascendente a medida que aumenta la cantidad de proteína digerida analizada.

Tabla 1: Resultados obtenidos del análisis de cada punto del calibrado.

ug	Area (min*mAU)	tS (min)	tE (min)	Anchura (min)	Altura (mAU)
0	0	0	0	0	0
5	24	79,9	98,3	18,3	4,1
10	191	71,0	99,7	28,7	16,6
15	258	67,6	99,9	32,2	21,1
25	536	68,1	104,1	36,0	40,0
100	4744	66,0	120,1	54,1	283,3
300	14977	57,7	129,1	71,5	704,8
470	22505	62,1	139,4	77,2	1032,0

La curva de calibrado se consigue representando las áreas obtenidas frente a la cantidad de péptido digerido analizada (ver *imagen 13*). De este modo se consigue una recta que sigue la

siguiente ecuación; $y = 49.16x - 279.63$. Por otro lado, el cuadrado del coeficiente de correlación (R^2) pronostica el cambio proporcional de Y con respecto a la X. Teniendo en cuenta que en la curva de calibrado obtenida, el valor de R^2 está cerca de 1, se puede decir que se ha obtenido una linealidad aceptable.

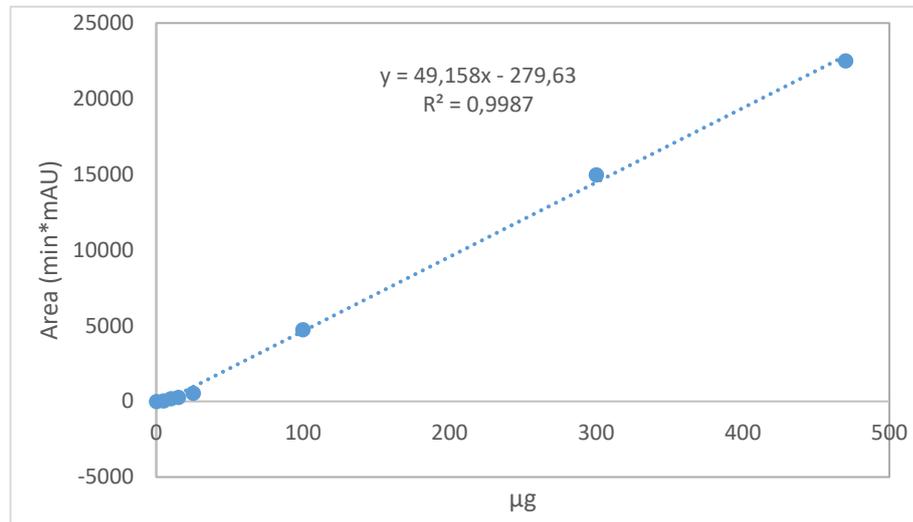


Imagen 13: Representación lineal de proteína digerida en cantidades de entre 0-470 µg.

Se realizan diversas pruebas de análisis de muestras con cantidades de entre 100 y 300 µg de proteína digerida. Se ha llevado a cabo la cuantificación de proteínas de dichas muestras utilizando la recta anteriormente mostrada y se ha observado que la cantidad de proteína digerida no es proporcional a la determinada mediante el uso del calibrado.

Es sabido que la digestión de las proteínas no es un método completamente reproducible, es decir, el rendimiento del proceso no es siempre el mismo. Por lo tanto, para poder utilizar una recta de calibrado como método de cuantificación, sería necesario construir una cada vez que se lleva a cabo el proceso de digestión. Esta recta únicamente sería útil para cuantificar muestras de proteínas que han sido digeridas al mismo tiempo que las muestras que construyen el propio calibrado. Teniendo en cuenta el costoso trabajo, tiempo y la cantidad de muestra que ello requiere, se ha llegado a la conclusión de que este no es un método de cuantificación adecuado.

En conclusión, la cuantificación aproximada de la cantidad de proteína digerida en cada fracción analizada se lleva a cabo mediante la cuantificación con un punto. Se analiza y fracciona una muestra de cantidad conocida de proteína digerida. En base al área total obtenida para esta muestra, y teniendo en cuenta el área de la fracción a estudiar, se determina la concentración aproximada de la misma.

5.4. TRATAMIENTO DE MUESTRA

Debido a diversos problemas con el equipo solo se han obtenido resultados para las pruebas de los cartuchos C18 y R2/R3. Los resultados se presentan en la *tabla 2* que se muestra a continuación.

Tabla 2: Resultados obtenidos para prueba de tratamiento de muestra.

	MUESTRA	Area (min*mAU)	µg muestra	RECUPERACION (%)	RSD (%)
R2/R3	réplica 1	21681	148,0	98	25
	réplica 2	31177	212,8	141	
C18	réplica 1	15240	104,0	69	2
	réplica 2	14759	100,8	67	
CONTROL	1	21857	150	-	-
	2	22087	150		

Como se observa, se obtiene una mayor recuperación mediante los cartuchos de R2/R3. No obstante, pese a la notable diferencia de recuperación, la reproducibilidad del método R2/R3 es mucho menor que el de C18. Este es un resultado lógico puesto que, a diferencia de los cartuchos de C18 que son comerciales, los de R2/R3 se preparan de forma manual. El hecho de que los cartuchos R2/R3 no sean iguales entre sí es otra fuente de error que provoca una mayor falta de reproducibilidad en el proceso de SPE.

Además, en los cromatogramas que se muestran en la *imagen 14* podemos observar que mediante los cartuchos C18 se eliminan ciertos interferentes que no consiguen eliminarse utilizando la resina R2/R3.

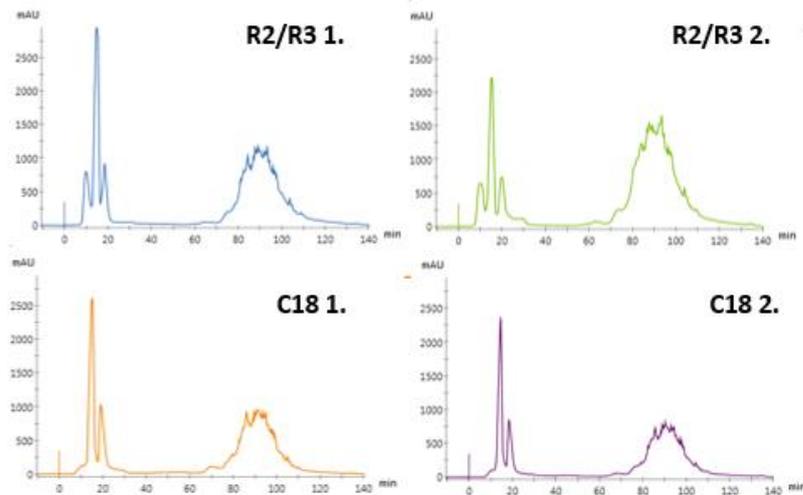


Imagen 14: Cromatogramas obtenidos para la prueba de tratamiento muestra.

Por último, no se obtiene señal en los análisis de los FT de la muestra en ninguno de los casos. Por lo tanto, se deduce que la muestra queda igualmente retenida en ambos cartuchos y que el procedimiento que se ha seguido para cargar la muestra es adecuado. Tampoco se obtiene señal alguna en los lavados de muestra recogidos, por lo que la pérdida de la muestra se debe a que ésta queda retenida en el cartucho tras la elución. Para aumentar el rendimiento de la extracción, se plantea utilizar un mayor porcentaje de disolvente orgánico para la elución en futuras pruebas.

En conclusión, se determina que los cartuchos de C18 son más adecuados como tratamiento de muestra por su fácil aplicación y mayor reproducibilidad. Sin embargo, los resultados de esta prueba no se toman como concluyentes debido a la falta de resultados. La prueba se repetirá con objetivo de estudiar también la SCX como tratamiento de muestra.

5.5. CONCATENACIÓN

Los resultados obtenidos se analizan mediante el software “ProteinPilot” y se comparan con el análisis de una muestra que no ha sido fraccionada (ver *tabla 3*).

Tabla 3: Resultados obtenidos mediante el software de análisis de datos “ProteinPilot” para tres muestras de proteína siguiendo diferentes estrategias de análisis.

	Muestra fraccionada y concatenada (11F)	Muestra fraccionada (13F)	Muestra sin fraccionar
Espectros adquiridos	326581	309813	32088
Espectros utilizados	151583	123886	15743
Peptidos id.	31816	37363	10022
Proteínas id.	3307	4041	1453

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para la muestra que no ha sido fraccionada, se deduce que el uso de una primera dimensión para fraccionar la muestra como técnica previa al análisis por nanoHPLC-MS/MS es muy efectiva. De este modo queda demostrado que mediante el fraccionamiento se reduce considerablemente la complejidad de la muestra y se consigue prácticamente triplicar el número de proteínas identificadas.

Se puede observar también que, pese a que la cantidad total de fracciones sin concatenar es mayor, mediante la estrategia de concatenación se adquiere un mayor número de espectros. Estudiando los cromatogramas obtenidos para la muestra concatenada (ver *imagen 15a*), se llega a la conclusión de que, mediante la concatenación, el espacio de análisis se cubre ampliamente y de forma uniforme consiguiendo así un método de mayor capacidad adquisitiva. Por el contrario, en *la imagen 15b* los cromatogramas de las fracciones no concatenadas muestran claras tendencias debido a la falta de ortogonalidad del método 2D-HPLC (RP pH alto-RP pH bajo).

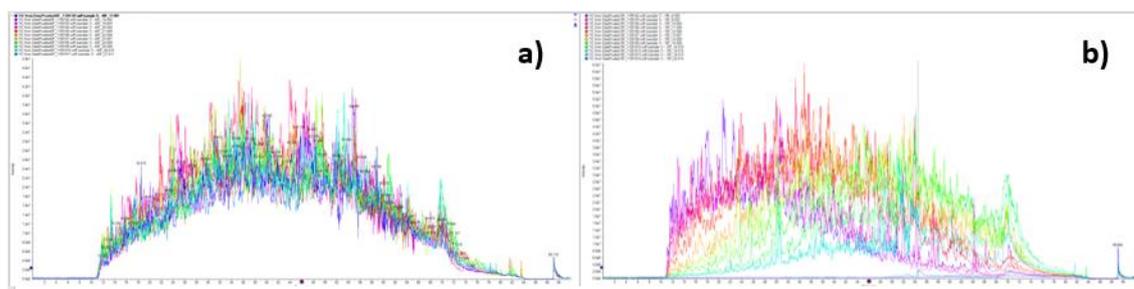


Imagen 15: Superposición de los cromatogramas de las fracciones analizadas. **a)** Fracciones concatenadas. **b)** Fracciones sin concatenar.

No obstante, en el caso de las fracciones no concatenadas, una cantidad menor de los espectros adquiridos son utilizados para identificar un mayor número de péptidos y proteínas. Esto se debe a que, por medio del análisis de fracciones sin concatenar, se favorece la detección de iones peptídicos menos abundantes. En este caso, dichos iones menos abundantes son significativamente útiles para la identificación de proteínas. Concatenando las fracciones, estos iones peptídicos quedan solapados por iones más abundantes y por no llegan a ser detectados mediante el sistema DDA. Por lo tanto, pese a que la adquisición total de datos es menor en fracciones no concatenadas, la cantidad de “información útil” es mayor.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente mencionado, se decide que las muestras se dividirán en un menor número de fracciones (entorno a 15) y que estas no se concatenarán. Además, este es un procedimiento que requiere un menor tiempo de trabajo y que facilita el cálculo aproximado de cantidad de proteína digerida en cada fracción.

6. CONCLUSIÓN

Tras el trabajo experimental y los resultados obtenidos en las pruebas realizadas, se obtienen varias conclusiones en base al objetivo principal de conseguir aumentar el número de proteínas identificadas.

En cuanto al tratamiento de limpieza de muestra, se determina que lo más óptimo es el uso de cartuchos comerciales de C18. Éste es un tratamiento rápido y sencillo mediante el cual se consiguen buenos resultados de reproducibilidad y una recuperación aceptable. Sin embargo, como se ha mencionado anteriormente, este resultado no se toma como concluyente ya que no se obtuvieron resultados de las muestras tratadas con SCX.

Con el método 2D-HPLC desarrollado en el presente trabajo el tiempo de análisis aumenta considerablemente (13 fracciones x 1h + 2h 30min de fraccionamiento en la 1D) con respecto a los métodos anteriormente utilizados para el análisis de muestras de proteínas (entre 1 y 4h). Pese al aumento del tiempo de análisis, se ha podido observar que la inclusión de una primera dimensión y fraccionamiento de muestra en el análisis de proteínas mediante HPLC es un acierto. Fraccionando la muestra se reduce la complejidad de la misma y se triplica el número de proteínas identificadas.

En cuanto a la concatenación, se ha podido concluir que en este caso no va a ser una estrategia a seguir. Por un lado, esta estrategia conlleva un tratamiento de muestra entre la 1D y la 2D más elaborado que si las fracciones no son concatenadas. Por otro lado, se ha podido comprobar que mediante este método no se alcanza el objetivo principal del presente trabajo.

Por último, tal y como se esperaba, el método 2D-HPLC (PR pH alto – RP pH bajo) aporta al método un bajo grado de ortogonalidad. Esto hace que, en el análisis en la segunda dimensión, las fracciones de una misma muestra no tengan una dispersión homogénea a lo largo del cromatograma y se obtiene un método de menor capacidad de adquisición. Pese a la falta de ortogonalidad, tras todo el proceso, se consigue el objetivo de identificar una mayor cantidad de proteínas.

7. TRABAJO FUTURO

Como se ha mencionado anteriormente, el tratamiento de muestra previo al análisis es uno de los factores que todavía quedan por optimizar en el método diseñado. Por la falta de resultados en las muestras tratadas con cartuchos SCX, la prueba se tomó como no concluyente. Por lo tanto, esta es una de los apartados del método que todavía han de estudiarse.

Se ha concluido que el uso de una primera dimensión es una forma eficaz de aumentar el número de proteínas identificadas. El siguiente paso para la optimización esta estrategia, es el estudio de la cantidad de fracciones a realizar de una misma muestra. Para ello, se dividirán en diferentes cantidades de fracciones (entre 10 y 20) varias muestras con la misma cantidad de proteínas y procedentes de un mismo digerido. Todas las fracciones se analizarán utilizando el mismo método cromatográfico en la segunda dimensión. De este modo, se relacionará la cantidad de fracciones de muestra, con el tiempo total de análisis de la mismas y la cantidad de proteínas identificadas.

Por otro lado, con intención de mejorar el método, se propone utilizar una columna diferente a la utilizada en la primera dimensión. La más utilizada para este tipo de análisis es la SCX, mediante la que se han conseguido muy buenos resultados en métodos similares. No obstante, pese a que esta técnica aportaría una mayor ortogonalidad al método, la SCX conlleva el uso de una gran cantidad de sales. Es necesario eliminar estas sales antes del análisis cromatográfico en la segunda dimensión. Para eso, las fracciones de la muestra deberían ser sometidas a una técnica de limpieza como podría ser una SPE de fase reversa (C18). Este paso adicional de limpieza de muestra, conlleva una disminución de la recuperación de muestra además de un método más laborioso en su totalidad. Para evitar los problemas anteriormente mencionados, se valora también el uso de una columna HILIC en la primera dimensión. Esta columna, aportaría ortogonalidad al método usando una fase móvil compatible con el espectrómetro de masas que se usará en la segunda dimensión. Se han conseguido buenos resultados en diversos trabajos realizados con este método.

8. BIBLIOGRAFÍA

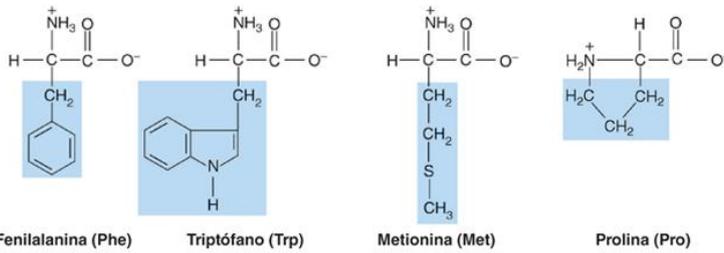
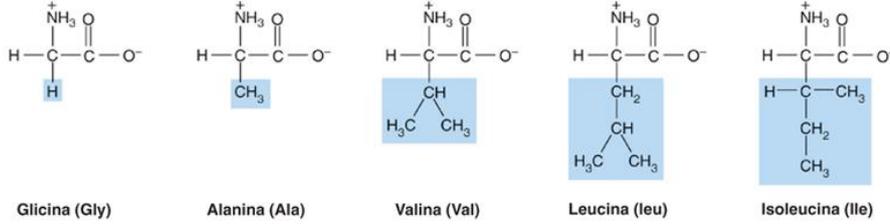
- (1) Leiva Enríquez, M. A. Bioquímica Básica. Universidad de San Carlos de Guatemala 2007, pp 1–13.
- (2) Wei, R. *A Step-Up LC-MS / MS for Proteomics*; Elsevier Ltd, 2017; Vol. 79.
- (3) Calamia, V.; Ruiz-romero, C.; Rocha, B.; Fernández-puente, P.; Mateos, J.; Montell, E.; Vergés, J.; Blanco, F. J. Pharmacoproteomic Study of the Effects of Chondroitin and Glucosamine Sulfate on Human Articular Chondrocytes. *arthritis Res. Ther.* **2010**, *12*.
- (4) Castellanos, L.; Gonzalez, L.J. ; Padrón, G. Proteómica; La Habana, Cuba; pp 367–403.
- (5) Wu, X.; Gong, F.; Wang, W. Protein Extraction from Plant Tissues for 2DE and Its Application in Proteomic Analysis. *Proteomics* **2014**, *14*, 645–658.
- (6) Shmith, L. M.; L., K. N. Proteoform: A Single Term Describing Protein Complexity. *Nat. Methods* **2014**, *10* (3), 186–187.
- (7) Wang, N.; Chuanhui, X.; Bryce, Y. J.; Liang, L. Off-Line Two-Dimensional Liquid Chromatography with Maximized Sample Loading to Reversed- Phase Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry for Shotgun Proteome Analysis. **2009**, *81* (3), 1049–1060.
- (8) Akira, M.; Yates III, J. R. Multidimensional LC Separations in Shotgun. *Anal. Chemistry* **2008**, *80* (19), 7187–7193.
- (9) Gilar, M.; Olivova, P.; Daly, A. E.; Gebler, J. C. Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography. *Anal. Chemistry* **2005**, *77* (19), pp 6426–6434.
- (10) Delmotte, N.; Lasaosa, M.; Tholey, A.; Heinzle, E.; Huber, C. G. Two-Dimensional Reversed-Phase × Ion-Pair Reversed Phase HPLC: An Alternative Approach to High Resolution Peptide Separation for Shotgun Proteome Analysis. *J. Proteome Res.* **2007**, *6* (11), pp 4363–4373.
- (11) Gokce, E.; Andrews, G. L.; Dean, R. A.; Muddiman, D. C. Increasing Proteome Coverage with Offline RP HPLC Coupled to Online RP NanoLC-MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol Biomed Life Sci.* **2013**, *879*, pp 610-614.
- (12) Dwivedi, R. C.; Spicer, V.; Harder, M.; Antonovici, M.; Ens, W.; Standing, K. G.; Wilkins, J. A.; Krokhin, O. V. Practical Implementation of 2D HPLC Scheme with Accurate Peptide

- Retention Prediction in Both Dimensions for High-Throughput Bottom-Up Proteomics. *Anal. Chemistry* **2008**, *80* (18), 7036–7042.
- (13) Wang, Y.; Yang, F.; Gritsenko, M. A.; Wang, Y.; Clauss, T.; Liu, T.; Shen, Y.; Monroe, M. E.; Lopez-ferrer, D.; Reno, T.; et al. Reversed-Phase Chromatography with Multiple Fraction Concatenation Strategy for Proteome Profiling of Human. *Proteomics* **2011**, *11*, pp 2019–2026.
- (14) Hu, A.; Noble, W. S.; Wolf-yadlin, A. Technical Advances in Proteomics : New Developments in Data-Independent Acquisition [Version 1 ; Referees : 3 Approved] Referee Status : *F1000Research* **2016**, *5* (419), 1–12.
- (15) Karpieitch, Y. V.; Polpitiya, A. D.; Anderson, G. A.; Smith, R. D.; Dabney, A. R. Liquid Chromatography Mass Spectrometry-Based Proteomics: Biological and Technological Aspects. *Ann Appl Stat.* **2011**, *4* (4), 1797–1823.
- (16) Pando Robles, V.; Ferreira Batista, C. Proteómica: Hacia El Entendimiento Del Lenguaje de Las Proteínas. In *Una ventana al quehacer científico del Instituto de Biotecnología-UNAM*; 2007; pp 97–108.
- (17) Correa, J. C. Diagnósticos de Regresión Usando La FDR (Tasa de Descubrimientos Falsos) Regression Diagnostics Using the FDR Technique. *Comun. en Estadística* **2010**, *3* (2), 109–118.
- (18) Meier, F.; Geyer, P. E.; Winter, S. V.; Cox, J.; Mann, M. BoxCar Acquisition Method Enables Single-Shot Proteomics at a Depth of 10,000 Proteins in 100 Minutes. *Nat. Methods* **2018**, *15*, pp 440-448.
- (19) Vowinckel, J.; Zelez, A.; Bruderer, R.; Mülleder, M.; Reiter, L.; Ralser, M. Cost-Effective Generation of Precise Label-Free Quantitative Proteomes in High-Throughput by microLC and Data-Independent Acquisition. *Nat. Methods* **2018**, No. February, 1–10.
- (20) Shevchenko, A.; Tomas, H.; Havli, J.; Olsen, J. V; Mann, M. In-Gel Digestion for Mass Spectrometric Characterization of Proteins and Proteomes. *Nat. Protoc.* **2006**, *1*, 2856–2860 pp.
- (21) Mckee, T.; McKee, J. R. Aminoácidos, Péptidos Y Proteínas. In *Bioquímica: Las bases moleculares de la vida*; 2014.

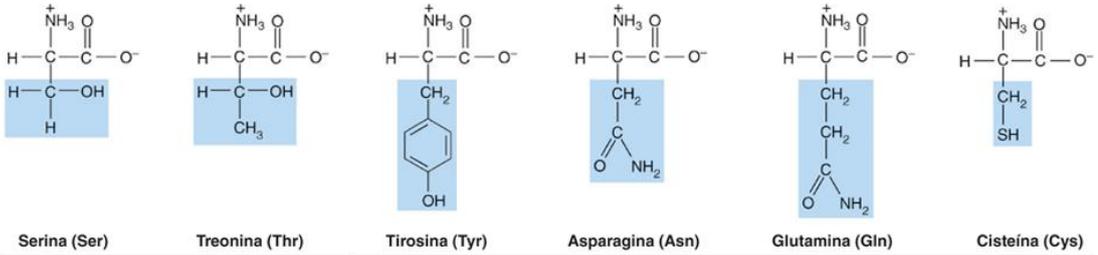
ANEXO 1

Estructura de los 20 aminoácidos conocidos y su clasificación en base a sus propiedades físico-químicas.²¹

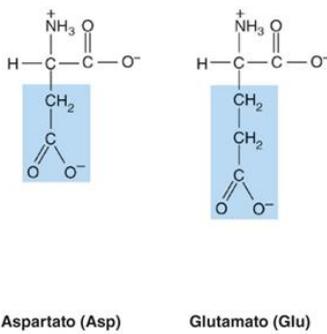
Aminoácidos apolares



Aminoácidos polares



Aminoácidos ácidos



Aminoácidos básicos

