

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ

FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



**Diseño e implementación de un protocolo para la cuantificación absoluta de las
proteínas: Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, Factor de
Crecimiento Epidérmico y Adiponectina en base a Cromatografía Líquida
acoplada a Espectrometría de masas**

Tesis para obtener el Título profesional de Licenciado en Química

AUTOR

HUGO ALBERTO VIGIL RODRIGUEZ

ASESORA

Dr. Fanny Lys Casado Peña

julio, 2020

RESUMEN

Las heridas crónicas son lesiones que se caracterizan por no seguir el proceso usual de cicatrización y por su prevalencia en el tiempo, la cual causa que el costo del tratamiento para su curación se eleve y que el paciente experimente molestias debido a lo largo del proceso. Si bien existe una amplia oferta y desarrollo tecnológico de apósitos cutáneos, los apósitos actuales poseen algunas desventajas como dificultar los procesos naturales de cicatrización de heridas superficiales que solamente comprometen las primeras capas de piel, o por ser apósitos con una composición muy básica o general cuando se trata de heridas más específicas.

A un nivel molecular existen proteínas que desarrollan una variedad de funciones necesarias para el proceso saludable de cicatrización de heridas. Si se analiza los niveles referenciales de estas proteínas en sangre, se podría tener una herramienta útil para crear apósitos personalizados que contengan estas según las necesidades de cada paciente.

En este estudio, se ha diseñado e implementado un protocolo de análisis para cuantificar algunas de esas proteínas utilizando cromatografía líquida y espectrometría de masas como herramientas analíticas. Adicionalmente, se planea utilizar herramientas bio-informáticas para validar el método a ser desarrollado.

El protocolo establecido a partir de esta investigación tiene el potencial de ser utilizado para el diagnóstico o preparación de terapias relacionadas a heridas crónicas con un impacto positivo en la rama de la medicina regenerativa.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por su apoyo y comprensión incondicional en todo momento.

Al Dr. Alfredo Ibáñez del Instituto de Ciencias Ómicas y Biotecnología Aplicada, por su gran ayuda para el aprendizaje y manejo de los equipos utilizados en esta tesis.

A los miembros del Instituto Peruano de Ingeniería Celular y Manufactura Tisular A.C. (INGECEL), M.C. Iván Hernández por su tiempo y consejo sobre la justificación e implicancia clínica para el desarrollo de este proyecto. A la Lic. Jandely Flores por su tiempo y compromiso para resolver los asuntos logísticos de la búsqueda de reactivos y materiales.

Al laboratorio del Dr. Eric Cosio, por el préstamo de sus instalaciones y de insumos.

A mi asesora Fanny Casado, por su paciencia e instrucción a lo largo de la realización de esta tesis y a lo largo de esta etapa de mi vida.

Al profesorado de la sección de Química, por la enseñanza de conocimientos para desarrollar mi juicio crítico y compartir experiencias para mi formación como profesional ético.

A la Pontificia Universidad Católica del Perú, por su formación de calidad e innumerables recuerdos que llevaré conmigo.

Esta tesis ha sido parcialmente financiada por el Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad del Ministerio de la Producción del Perú, dentro del marco del proyecto “Desarrollo de un proceso para la regeneración autóloga de heridas empleando un soporte orgánico de bajo costo” (PIMEN-12-P-118-024-16).

TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUIMICA

TÍTULO : Desarrollo de un protocolo para el análisis de factores de crecimiento relacionados con heridas crónicas empleando espectrometría de masas

ÁREA : Química Analítica

ASESORA : Dra. Fanny Lys Casado Peña

ALUMNO : Hugo Alberto Vigil Rodríguez

CÓDIGO : 2012.5823.12

FECHA : 07/02/2018


NUMERO : # 218



DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:

Personas con secuelas de heridas superficiales de la piel que se convierten en difíciles de curar ocupan más del 50% de las camas hospitalarias en el Perú generando costos innecesarios si se hubieran tratado oportunamente y un alto riesgo de incapacidad de los pacientes. La curación de heridas, a nivel bioquímico, es un proceso regulado por factores de crecimiento que en su gran mayoría son proteínas. Tienen principalmente la función de promover el crecimiento celular, pero se ha reportado que también cumplen funciones de señalización y diferenciación celular para regular las distintas etapas del proceso de curación. En el caso de heridas crónicas como las de pie diabético, existe evidencia de que la aplicación de factores de crecimiento externos incrementa la probabilidad de cura en base a estudios clínicos aleatorizados. En el caso de adultos mayores, se sabe que el estado nutricional del paciente juega un papel importante para el tratamiento exitoso de las heridas crónicas. Sin embargo, no existe información sobre los niveles referenciales de ninguno de estos factores de crecimiento en la población peruana. El objetivo principal de este estudio es implementar un protocolo basado en espectrometría de masas para medir simultáneamente factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento endotelial, factor de crecimiento endotelial vascular, el factor de crecimiento derivado de plaquetas y la adiponectina. Este estudio se concentrará en el diseño e implementación de una estrategia bioinformática para identificar proteínas a partir de la reconstrucción de péptidos tripticos, separados y detectados mediante cromatografía líquida reversa acoplada con espectrometría de masas. La habilidad de medir de manera robusta estos factores de crecimiento en cada paciente ayudaría a los médicos a tomar mejores decisiones terapéuticas.

Máximo: 100 páginas

FIRMA DEL ASESOR: 

FIRMA DEL COORDINADOR: 



ÍNDICE GENERAL

1. Estado del arte.....	1
1.1. El papel de la hemostasia durante el proceso de cicatrización de heridas de piel	2
1.1.1. Proceso saludable de cicatrización de heridas de piel.....	2
1.1.2. Fundamentos biológicos de las plaquetas	6
1.1.3. Proteínas que regulan la proliferación durante el proceso de cicatrización de heridas	11
1.1.3.1. Factor de crecimiento epidérmico	14
1.1.3.2. Factor de crecimiento derivado de plaquetas	14
1.1.3.3. Adiponectina	15
1.1.4. Matriz extracelular	16
1.2. Técnicas bioanalíticas para identificar proteínas solubles	20
1.2.1. Inmunoensayos.....	22
1.2.2. Espectrometría de masas	24
1.2.2.1. Orbitrap MS	26
1.2.3. Cromatografía líquida	29
1.3. Métodos y Consideraciones para la cuantificación de proteínas.....	32
1.3.1. Metodologías en LC-MS/MS para cuantificar proteínas	32
1.3.2. Monitoreo de reacción selectiva	34
1.3.3. Monitoreo de reacción paralela	36
1.3.4. Criterios para seleccionar péptidos.....	39
1.3.5. Consideraciones para la cuantificación de proteínas por espectrometría de masas	42

1.3.6. Herramientas bioinformáticas para la identificación y cuantificación de proteínas por espectrometría de masas.....	45
2. Justificación	49
3. Objetivos	51
3.1. Objetivo General.....	51
3.2. Objetivos Específicos.....	51
4. Parte experimental	52
4.1. Metodología.....	52
4.2. Equipos y materiales	67
4.3. Resultados.....	70
5. Discusión de Resultados	90
6. Conclusiones	99
Bibliografía	100
Información suplementaria	107

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Cuatro etapas principales del proceso de cicatrización.	6
Figura 2.	Funcionamiento específico por el cual los megacariocitos transfieren un pre-ARNm a las plaquetas.	7
Figura 3.	Partes generales de una plaqueta	8
Figura 4.	Tipos de crecimiento celular	13
Figura 5.	Comparación entre una herida crónica y una herida aguda	19
Figura 6.	Comparación de equipos de alta resolución	27
Figura 7.	Comparación de diámetro interno en columnas	31
Figura 8.	Pasos generales del SRM	36
Figura 9.	Diferencias y similitudes generales entre el funcionamiento de SRM y PRM	37
Figura 10.	Funcionamiento PRM en un equipo q-OT	38
Figura 11.	Funcionamiento del marcaje isotópico en LC-MS	44
Figura 12.	Método de refinación de Skyline para LC-MS	49
Figura 13.	Mecanismo de reacción de DTT e IAA	59
Figura 14.	Resumen de pasos para utilizar las columnas Spin C18	62
Figura 15.	Parámetros necesarios para LC-MS	65
Figura 16.	Ejemplo de curvas de calibración para proteínas	67
Figura 17.	SDS-PAGE para verificar pureza de proteínas	70
Figura 18.	SDS-PAGE para verificar digestión enzimática	72
Figura 19.	Cromatogramas de experimentos de digestión	78

Figura 20.	Cromatogramas de experimentos para optimizar digestión	81
Figura 21.	Arreglo de nodos para el paso de consenso y el paso de procesamiento	83
Figura 22.	Resultado 1 del análisis con Proteome Discoverer.	85
Figura 23.	Resultado 2 del análisis con Proteome Discoverer.	85
Figura 24.	Resultado 1 del análisis con Skyline.	87
Figura 25.	Resultado 2 del análisis con Skyline.	88
Figura 26.	Resultado 3 del análisis con Skyline.	88
Figura 27.	Resultado 4 del análisis con Skyline.	89
Figura 28.	Resultado 5 del análisis con Skyline.	89

ÍNDICE DE TABLAS Y ESQUEMAS

Tabla 1.	Componentes dentro de los orgánulos más importantes de las plaquetas	10
Tabla 2.	Comparación entre una herida crónica y una herida aguda	19
Tabla 3.	Resumen de los espectrómetros de masas más comunes	26
Tabla 4.	Comparación de métodos SWATH-MS, DDA, y SRM o PRM	34
Tabla 5.	Las cuatro formas generales de cuantificar proteínas utilizando MS	42
Tabla 6.	Cantidades iniciales de proteína para experimentos	71
Tabla 7.	Tabla de datos de BSA utilizando MALDI	74
Tabla 8.	Señales de adiponectina digerida utilizando MALDI	75
Tabla 9.	Señales de EGF digerido utilizando MALDI	75
Tabla 10.	Señales de PDGF digerido utilizando MALDI	76
Tabla 11.	Gradiente cromatográfico para todos los experimentos con nano LC	77
Tabla 12.	Señales de BSA utilizando MALDI y nano LC-ESI	79

ABREVIATURAS

A2GL:	Glicoproteína-alfa-2 rica en leucina *
ABC:	Bicarbonato de amonio *
ACN:	Acetonitrilo *
ADP:	Adenosín difosfato
ARN:	Ácido ribonucleico
ARNInc:	Ácido ribonucleico largo no codificante
ARNm:	Ácido ribonucleico mensajero
ARNmi:	Ácido ribonucleico micro
ATP:	Adenosín trifosfato
BcL-3:	Linfoma 3 de células-B *
BSA:	Albumina de suero bovino *
CE:	Electroforesis capilar *
CID:	Disociación por colisión inducida *
CSF:	Factor estimulante de colonias *
DDA:	Adquisición dependiente de datos *
DIA:	Adquisición independiente de datos *
DOC:	Desoxicolato de sodio *
dotP:	Producto escalar
DTT:	Ditiotreitol *
ECM:	Matriz extracelular *
EGF:	Factor de crecimiento epidérmico *
eIF4E:	Factor 4E de iniciación eucariótico *
ETD:	Disociación por transferencia electrónica *
ESI:	Ionización por electrospray *
FA:	Ácido fórmico *

FDR:	Tasa de descubrimiento falso *
FGF:	Factor de crecimiento de fibroblastos *
FT-ICR:	Resonancia de ciclotrón iónico con transformada de Fourier*
GAG:	Glicoaminoglicano *
G-CSF:	Factor estimulante de colonias de granulocitos *
HCD:	Disociación por colisión inducida de alta energía *
HESI:	Ionización por electrospray calentada *
HPLC:	Cromatografía líquida de alto rendimiento *
HRM	Monitoreo de hiper reacción *
HSC:	Célula madre hematopoyética *
IAA:	Yodoacetamida *
IBP:	Proteína unión de factor de crecimiento similar a insulina *
ID:	Diámetro interno *
idotP:	Producto escalar isotópico *
IGF:	Factor de crecimiento similar a insulina *
iRT:	Tiempo de retención de péptidos *
iSRM:	Monitoreo de reacción selectiva inteligente *
IT:	Trampa de iones *
LC:	Cromatografía líquida *
LIT:	Trampa lineal de iones *
MALDI:	Desorción/ionización asistida por matriz *
M-CSF:	Factor estimulante de colonias de macrófagos *
MMP:	Metaloproteinasa de matriz *
MRM:	Monitoreo de reacción múltiple *
MS:	Espectrometría de masas *
mTOR:	Objetivo mecanicista de la rapamicina *
NPLC:	Cromatografía líquida de fase normal *

PDGF:	Factor de crecimiento derivado de plaquetas *
PDGFR:	Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas *
PRM:	Monitoreo de reacción paralela *
PSM:	Coincidencia de péptido con un espectro *
PTM:	Modificación pos-traducción
Q-OT:	Cuadrupolo-Orbitrap *
QQQ:	Triple cuadrupolo *
RPLC:	Cromatografía líquida de fase reversa *
SDS-PAGE:	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico *
SRM:	Monitoreo de reacción selectiva *
SWATH:	Adquisición secuencial de ventanas de todos los espectros teóricos de masas *
TCA:	Ácido tricloroacético *
TFA:	Ácido trifluoroacético *
TGF:	Factor de crecimiento transformante *
TKI:	Inhibidor de tirosina quinasa
tMRM:	Monitoreo de reacción múltiple disparado *
TOF:	Tiempo de vuelo *
UHPLC:	Cromatografía líquida de ultra alto rendimiento *
VEGF:	Factor de crecimiento endotelial vascular *

* Por sus siglas o abreviaciones en inglés

1. Estado del arte

La cicatrización de heridas es un proceso complejo que está altamente regulado por varios componentes que cumplen una función crítica de barrera frente a agentes externos que podrían causar efectos perjudiciales en el organismo debido al rompimiento de la integridad de la piel que representa al órgano humano más extenso. Inmediatamente después de la formación de una herida superficial, se activan los sistemas inmune y hematopoyético que son los encargados de limpiar todo material foráneo y de regresar la estructura de la piel a su normalidad en el sitio donde se presenta la herida. Esto solo se da hasta cierto grado, ya que las heridas se contraen para estimular los procesos celulares. En el mejor de los casos se obtiene un 80% de piel de la condición inicial y 20% como tejido cicatricial al terminar el proceso.

El sistema hematopoyético está compuesto por células de sangre terminalmente diferenciadas que siguen procesos complejos de movilización y maduración a partir de células madre hematopoyéticas (HSC, por sus siglas en inglés) que se encuentran en la médula ósea. Además, las HSC proporcionan células progenitoras necesarias para el desarrollo del sistema inmune en otros órganos y procesos más complejos. El sistema sanguíneo es un buen paradigma para entender el papel de las células madre en tejido tales como su biología e impacto en el envejecimiento, enfermedades y oncogénesis. Debido a que las células sanguíneas maduras tienen corto tiempo de vida, se necesita de HSC para reponer aquellas células maduras a lo largo de la vida o responder ante eventos adversos como trauma, envenenamientos, patologías o sangrado. Así, las HSC se definen por su capacidad de poder reconstituir el sistema sanguíneo de forma completa. El estudio pre-clínico de este sistema suele darse en modelos animales, como el pez cebra o ratones de laboratorio que permiten

simular y estudiar con mucha precisión condiciones humanas específicas y que han llevado al desarrollo de terapias sólidas en humanos como el trasplante de medula ósea o la infusión de plaquetas ¹ utilizadas para tratar diversos desórdenes genéticos y cánceres donde se observan los resultados remarcables en la regeneración de HSC ¹.

1.1. El papel de la hemostasia durante el proceso de cicatrización de heridas de piel

1.1.1. Proceso saludable de cicatrización de heridas de piel

Los procesos que ocurren de manera simultánea durante la cicatrización de una herida suelen dividirse de manera general en cuatro fases: hemostasia, inflamación, proliferación y maduración. Estas requieren del transporte de células inflamatorias de sangre, quimioquinas, citoquinas, moléculas de la matriz extracelular (ECM, por sus siglas en inglés) y nutrientes.

La **hemostasia** es el proceso fisiológico que detiene el sangrado de una herida mientras se mantiene el flujo normal en la circulación sanguínea. La pérdida de sangre se detiene cuando se genera un coágulo debido a la exposición de sangre en contacto con la ECM sub-endotelial. El endotelio, compuesto por una monocapa de células endoteliales, es el que se encarga de cubrir la pared luminal (lumen vascular) de los vasos sanguíneos y de regular la interacción de las células y proteínas circulantes con las células en la pared vascular ². Básicamente, el endotelio es la monocapa de células que está en contacto directo con el flujo sanguíneo y que cumplirá un papel como sensor y transmisor de señales en distintos procesos.

Uno de los procesos físicos del endotelio es el de servir como pared anticoagulante para mantener a la sangre en su estado fluido, esto quiere decir el prevenir que la sangre se coagule. Cuando la pared endotelial se daña, la sangre entra en contacto con la ECM sub-endotelial y varios componentes de esta activan la cascada de señalización de factores de coagulación para los dos procesos principales de la hemostasia que generan el coágulo de sangre, compuesto primariamente de plaquetas (fragmentos citoplasmáticos pequeños sin núcleo) y fibrinógeno (tipo de proteína que sirve como pegamento). Todo el proceso en general está altamente regulado ya que su activación ocurre en segundos y se debe mantener localizado en la zona de daño o herida.

La hemostasia consiste de dos procesos, el primero, denominado hemostasia primaria, consiste en la agregación de plaquetas que formarán el coágulo de la herida sobre células endoteliales dañadas. El segundo proceso es la deposición de una red de fibrina polimerizada que une a las plaquetas y que es el resultado del procesamiento proteolítico de la proteína soluble fibrinógeno por la proteasa trombina que es generada por la cascada de coagulación proteolítica. La fibrina depositada forma una malla entrelazada a lo largo de las plaquetas agregadas que se encarga de atrapar a los componentes de reparación inicial, así como también reforzar y estabilizar la estructura del coágulo sanguíneo. Estos dos procesos ocurren simultáneamente y están entrelazados mecánicamente. En ausencia de una adecuada regulación de la hemostasia se pueden presentar trombosis ³ con un consecuente cuadro isquémico.

Al proceso inmediato de hemostasia, le sigue una **fase inflamatoria**. En esta fase, los daños a los tejidos inician una respuesta celular y vascular para que se limpie la herida de todo tejido debilitado y material foráneo presente, mientras que se da la señal para que comience la cicatrización y regeneración de tejido. De manera más específica, se puede clasificar esta fase

como una serie de eventos que incluyen la vasodilatación, el incremento de la vasopermeabilidad, la infiltración de leucocitos en la zona dañada, y la activación de macrófagos debido a la proliferación celular y síntesis de proteínas. Los dos últimos eventos tienen la función de eliminar patógenos y prevenir infecciones. Visto desde un panorama general, solo se toman en cuenta los pasos de vasodilatación y la infiltración de leucocitos a la herida, que son los de mayor relevancia.

El siguiente paso es la **fase de proliferación**, la cual hace referencia a la proliferación de fibroblastos (tipos de células del tejido conectivo). Los fibroblastos aparecen en la herida luego de dos o tres días y dominan la población celular durante la primera semana. Estos producen una variedad de componentes de la ECM importantes para la cicatrización de heridas, entre ellas se incluyen los glicosaminoglicanos (GAG, por sus siglas en inglés) y colágeno. Los GAG son polisacáridos largos y lineales compuestos por unidades disacáridas repetitivas que tienen una unidad de amino-azúcar y una unidad de urónico-azúcar. Los cuatro principales GAG son el ácido hialurónico, condroitina-4-sulfato, sulfato de dermatán, y el sulfato de heparán. Estos forman un gel amorfo que se le llama sustancia básica (“Ground substance”, en inglés) y que juega un rol importante en la deposición y agregación de fibras de colágeno. El colágeno es producido durante el periodo de proliferación y su nivel de producción aumenta por aproximadamente tres semanas hasta que se alcanza un punto de homeostasia (que es la propiedad metabólica de mantener una condición interna estable regulando cambios externos), en el que la velocidad de degradación de colágeno se iguala a la velocidad de su síntesis. Existen al menos trece tipos de colágeno identificados en humanos; y los más comunes son los cinco primeros, aunque los tres primeros identificados son los responsables por la mayor parte de la fuerza de tensión (“tensile strength”, en inglés) en el cuerpo. El colágeno tipo I se encuentra primariamente en piel, tendones, y huesos y

representa el 90% de colágeno en el cuerpo. El colágeno tipo II se encuentra en cartílago hialino y tejido de los ojos, y tiene una concentración relativamente alta de hidroxilisina. El colágeno tipo III se encuentra en la piel, arterias, y pared intestinal y es alto en hidroxiprolina y bajo en hidroxilisina. En piel saludable, el colágeno tipo I y III se encuentran en una relación aproximadamente de cuatro a uno (4:1).

El último paso es la **fase de maduración** o de remodelamiento. Esta empieza luego de tres semanas de la formación de la herida y puede llegar a durar hasta dos años. Aunque no se presente un incremento neto de colágeno en la herida, lo que se presenta es una reorganización del actual colágeno presente, en la que gran parte del colágeno tipo III pasa a ser colágeno tipo I hasta llegar a una relación de uno a cuatro (1:4), respectivamente. La duración final de esta etapa depende de varios factores como la genética del paciente, edad, localización de la herida en el cuerpo, el tipo de herida, la duración de la inflamación o de enfermedades concomitantes que puedan alterar el proceso saludable en cuanto a cicatrización, como por ejemplo la Diabetes Mellitus, enfermedad vascular periférica o anemia falciforme.

Normalmente, esta serie de procesos no encuentra impedimento que pudiese frenar el funcionamiento saludable de la cicatrización de las heridas, pero hay ocasiones en las que una fase específica del proceso puede experimentar un retraso, y es en este momento cuando se es proclive a un estado de heridas crónicas. En la **Figura 1** se resume de manera general los pasos principales del proceso de cicatrización de heridas.

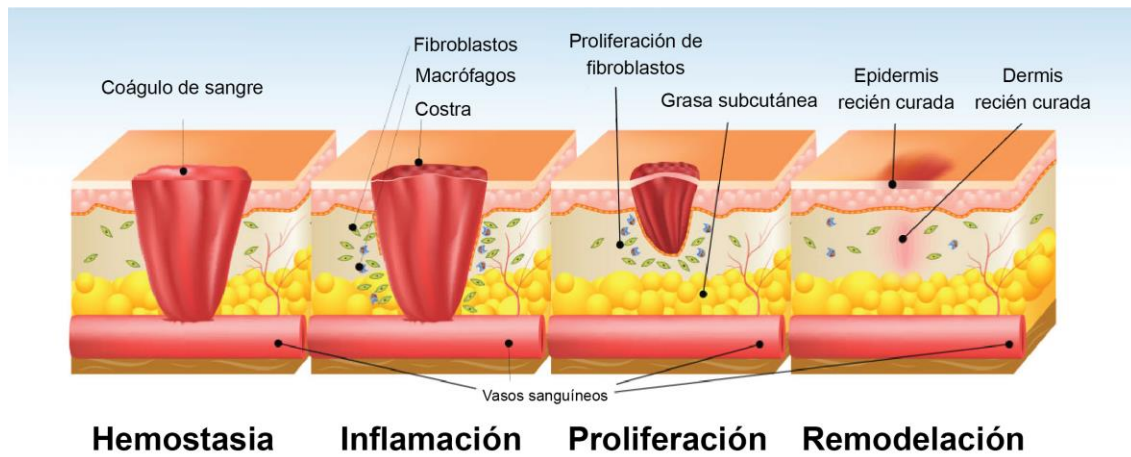


Figura 1. Se muestra las cuatro etapas principales del proceso de cicatrización: hemostasia, inflamación, proliferación y remodelación. En la etapa de hemostasia se forma un coágulo de sangre formado principalmente de fibrina y plaquetas. En la etapa de inflamación los fibroblastos y los macrófagos se localizan a lo largo de la herida para limpiar y eliminar todo material foráneo. En la etapa de proliferación los fibroblastos se encuentran en mayor proporción para la generación de colágeno. En la etapa de remodelación el colágeno se reorganiza hasta una proporción adecuada. Imagen modificada de la bibliografía ⁴.

1.1.2. Fundamentos biológicos de las plaquetas

Las plaquetas ^{5,6} provienen de megacariocitos, los cuales son un tipo de leucocito que inician su diferenciación en la médula ósea derivadas de HSC. Entre las células sanguíneas son las más pequeñas con forma circular u ovalada y con un diámetro de 2 μm . Durante sus estados más tardíos de diferenciación, son fragmentos citoplasmáticos sin núcleo celular, pero que contienen orgánulos como mitocondria, micro-túbulos y gránulos (tipo alfa, beta y lambda). A pesar de no tener un núcleo celular, se ha reportado su capacidad de biosíntesis para ciertas proteínas. Los megacariocitos transfieren precursores de ácido ribonucleico mensajero (pre-ARNm) a las plaquetas de una manera específica. Luego, se activa la maquinaria de “*splicing* alternativo” para producir un ARN maduro que pueda ser traducido en proteínas. Esta última parte de traducción se lleva a cabo gracias al retículo endoplasmático liso dentro de las

plaquetas que es heredado de los megacariocitos. El mecanismo de síntesis de algunas proteínas en las plaquetas requiere de señalización para el proceso de traducción. Tal es el caso del ARNm de linfoma 3 de células-B (BcL-3, por sus siglas en inglés) que requiere de la unión del factor 4E de iniciación eucariótico enlazado a ARNm (eIF4E, por sus siglas en inglés) y de la señalización del objetivo mecanicista de la rapamicina (mTOR, por sus siglas en inglés)⁷. Todo esto se puede apreciar mejor en la **Figura 2**.

Las plaquetas además residen intravascularmente, con alta concentración en el bazo. Tienen una concentración promedio en sangre de 140,000 – 400,000 plaquetas/mm³ que se mantienen en circulación por aproximadamente diez días hasta que los macrófagos las eliminan.

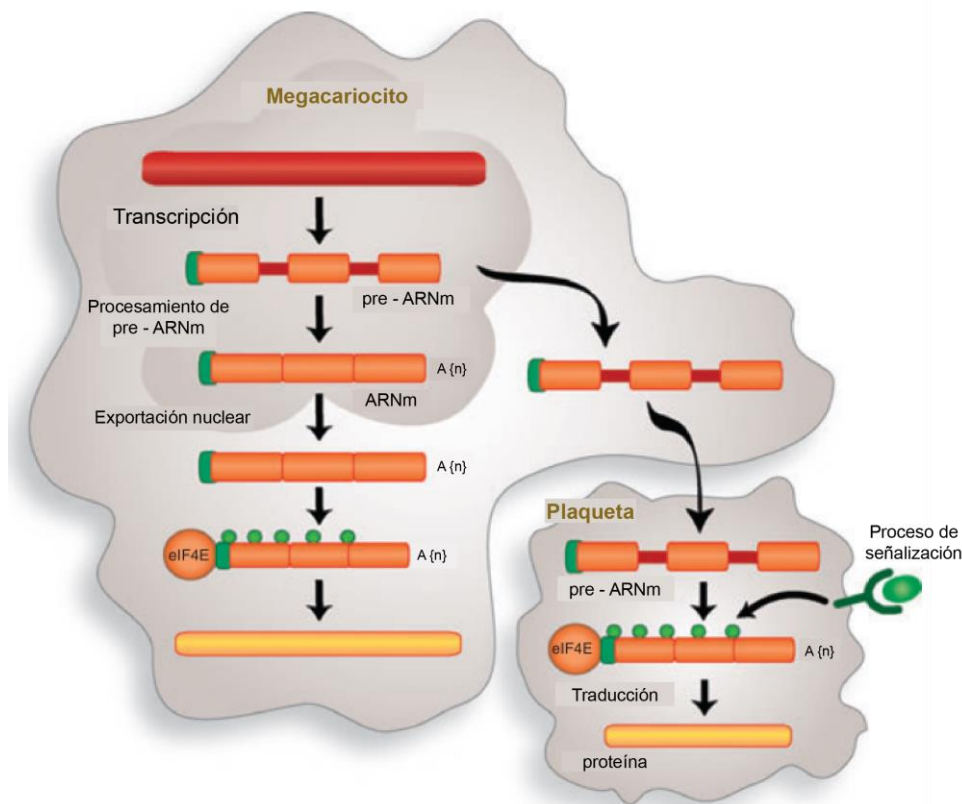


Figura 2. Se muestra el funcionamiento específico por el cual los megacariocitos transfieren un pre-ARNm a las plaquetas. Luego se convierte en un ARN maduro gracias a la maquinaria de “*splicing* alternativo”, que finalmente se traduce en proteína. Imagen modificada de la bibliografía⁷.

Las plaquetas poseen una serie de elementos en su estructura celular, como se puede apreciar mejor en la **Figura 3**. Algunos de estos son comunes en otros tipos de células, como las mitocondrias encargadas de suministrar gran parte de la energía necesaria para la actividad celular o las glicoproteínas de membrana que se encargan de mediar interacciones con el exterior de la célula. En este caso se hará un enfoque detallado a los gránulos densos y los gránulos alfa.

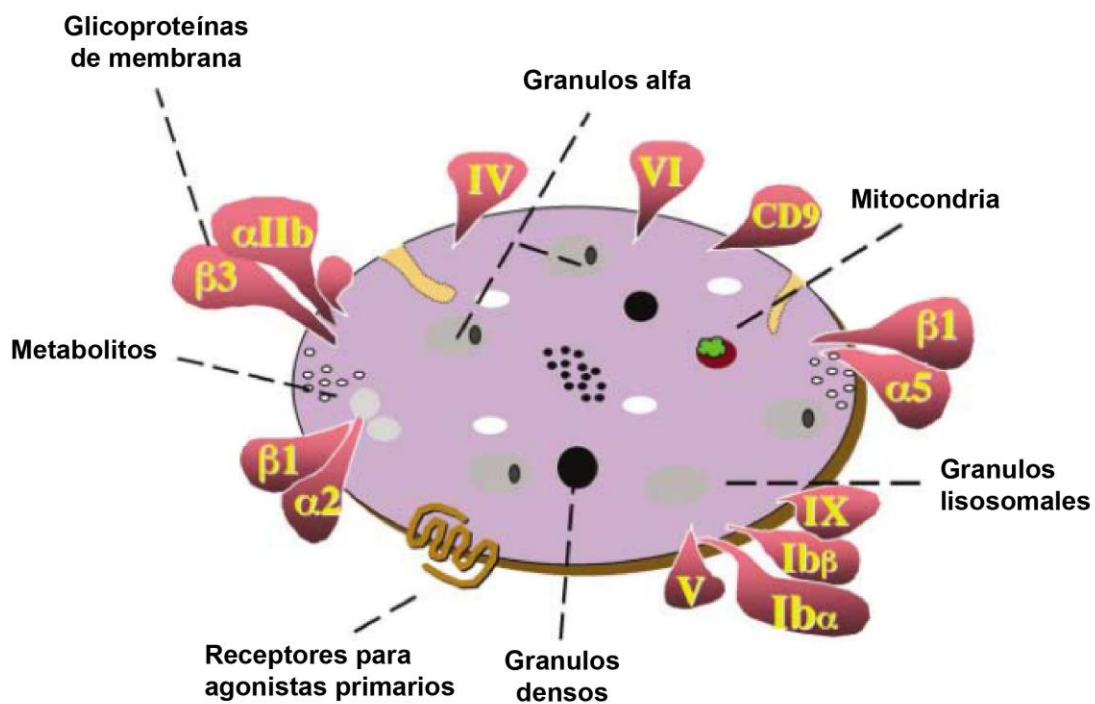


Figura 3. Se muestra las partes generales de una plaqueta: glicoproteínas de membrana, gránulos alfa, mitocondria, gránulos lisosomales, gránulos densos, receptores para agonistas primarios y metabolitos. Esquema modificado de la bibliografía ⁶.

Gránulos densos: Se encargan de almacenar sustancias necesarias para las diferentes actividades celulares. Almacenan ADP que sirve para la agregación plaquetaria, ATP para la respuesta de plaquetas ante la presencia de colágeno en flujo, Ca^{2+} el cual es un cofactor necesario en la agregación plaquetaria y formación de fibrina, Serotonina que ayuda a la

vasoconstricción y aumentar la permeabilidad capilar, histamina que puede tener efectos pro y anti-inflamatorios, etc.

Gránulos alfa: Se encargan de almacenar principalmente un gran número de proteínas necesarias para diferentes actividades celulares, entre estas varias con poderosa influencia en el proceso de cicatrización de heridas. Están las proteínas adhesivas, factores de coagulación, factores fibrinolíticos, proteasas y anti-proteasas, factores de crecimiento, citocinas, quimioquinas, etc. Estas se muestran detalladamente en la **Tabla 1**.

La activación de las plaquetas produce una degranulación de los gránulos alfa, el cual es un proceso en el que estos gránulos se fusionan a la membrana plaquetaria para transformar algunas de las proteínas almacenadas a su estado bioactivo por un mecanismo de adición de histonas y cadenas laterales de carbohidratos. Luego estas proteínas bioactivadas se secretan al medio después de los diez minutos de empezada la coagulación, en la que en un lapso de una hora se secretan alrededor del 95% de los factores de crecimiento previamente almacenados en las plaquetas. Después de esta primera parte, las plaquetas localizadas en el sitio de la herida siguen sintetizando algunas proteínas y secretándolas al medio por su lapso de vida de entre cinco a diez días.

Tabla 1. Se divide algunos de los componentes dentro de los orgánulos más importantes de las plaquetas.

Contenido de la bibliografía ^{6,8}.

	Categoría	Componente	Actividad biológica
Granulos alfa	Proteínas adhesivas	Factor de Von Willebrand + pro-peptido, fibrinogeno, fibronectina, Vitronectina, trombospondina 1, laminina	Interacciones de contacto celular, coagulación y composición de matriz extracelular
	Factores de coagulación y proteínas asociadas	Factor V/Va, Factor XI, multimerin, GAS6, Proteína S, kininogeno de alto peso molecular, antitrombina, inhibidor de la ruta de Factor de tejido (TFPI)	Producción de trombina y su regulación, angiogénesis
	Factores fibrinolíticos y proteínas asociadas	Plasminógeno, Inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1, activador de plasminógeno tipo Uroquinasa (uPA), osteonectina, antiplasmina $\alpha 2$, inhibidor de la fibrinólisis activable por trombina (TAFI), macroglobulina $\alpha 2$	Producción de plasmina y modelado vascular
	Proteasas y anti-proteasas	Inhibidor de tejido de metaloproteasa-4 (TIMP-4), metaloproteasa-4, Inhibidor de plaquetas de FIX, proteasa nexina-2, Inhibidor C1, anti-tripsina $\alpha 1$	Angiogenesis, modelado vascular, regulación de coagulación y regulación del comportamiento
	Factores de crecimiento, citocinas y quimioquinas	PDGF, TGF- $\beta 1$, TGF- $\beta 2$, EGF, IGF-1, VEGF, (a y c), bFGF, FGF-2, factor de crecimiento de hepatocitos, RANTES, IL-8, MIP-1 α , crecimiento regulado de oncogeno α , ENA-78, MCP-3, angiopoietin-1, IL-1 β , IGF BP-3, proteína quimiotáctica de neutrófilos	Quimiotaxis, angiogénesis, diferenciación y proliferación celular
	Proteínas básicas y otros	PF4, Tromboglobulina β , proteína plaquetaria básica, péptido activador de tejido conectivo III, endostatinas, péptido activador de neutrofilos 2	Regulación de angiogénesis, modelado vascular, interacciones celulares
	Proteínas anti-microbianas	Trombocidinas	Propiedades bactericidas y fungicidas
	Otros	Inmunoglobulinas, albumina, Condroitina 4-sulfato	Diverso
	Glicoproteínas de membrana	$\alpha 11b\beta 3$, $\alpha v\beta 3$, Gplb, PECAM-1, mayoría de constituyentes de la membrana plasmática, receptores para agonistas primarios, CD40L, factor de tejido, P-selectina	Agregación y adhesión de plaquetas, endocitosis de proteínas, inflamación, generación de trombina, interacciones de leucocitos-plaquetas
Granulos lisosomales	Proteínas hidrolíticas de polipéptidos	Catepsina D Catepsina E	Reabsorción ósea
	Proteínas hidrolíticas de aminoácidos	Carboxipeptidasa A Carboxipeptidasa B Carboxipeptidasa de prolina	Digestión, modificación post-traducción
	Proteínas hidrolíticas de azúcares	β -N-acetil-D-hexosaminidasa β -D-glucuronidasa β -D-galactosidasa α -D-manosidasa α -L-arabinofuranosidasa α -D-galactosidasa α -L-fucosidasa β -D-fucosidasa β -D-glucosidasa α -D-glucosidasa	Hidrólisis para la generación de azúcares mas pequeñas
	Proteínas fosfatasas	Fosfatasa ácida Ariulfatasa	Homeostasis celular, gluconeogénesis
	Granulos densos	Componentes involucrados en diversas reacciones metabólicas	Serotonina ADP ATP Calcio Pirofosfato

1.1.3. Proteínas que regulan la proliferación durante el proceso de cicatrización de heridas

Algunos factores que afectan la cicatrización de heridas son los llamados factores de crecimiento, que ejecutan tareas de curación, proliferación, crecimiento celular o diferenciación celular. Estos factores suelen ser en su mayor parte proteínas que se caracterizan por tener **respuestas integradas**. Por tal razón, pueden desarrollar un alto potencial sinérgico como se ha demostrado experimentalmente (*in vitro* y en condiciones libres de suero) donde células madres hematopoyéticas multipotentes no sobreviven ante la presencia de G-CSF o M-CSF (factores estimulantes de colonias de granulocitos. G para granulocitos y M para macrófagos). Sin embargo, si estos dos factores se combinan, inducen un desarrollo en la proliferación y diferenciación de tales células que llegan a madurar en neutrófilos post-mitóticos y macrófagos. Aquí se observa un notorio efecto sinérgico, ya que se demuestra que un solo factor, por sí solo, no logra una tarea dada, pero si se le combina con otro si logra realizar cierta tarea. Esto es útil porque concede especificidad al momento de accionar el desarrollo celular.

Además, los factores de crecimiento presentan **multifuncionalidad**, dado que la respuesta definitiva en una célula objetivo no solo se determina por los tipos de factores de crecimiento presentes, sino por el contexto celular en el que se recibe el estímulo, dado que algunos factores son capaces de realizar una variedad de distintas respuestas. Por ejemplo, distintos resultados cualitativos presentan una diferencia de concentración del factor que va a ejercer una respuesta en la célula objetivo. Un caso es en el que se demuestra que bajas concentraciones de FGF-1 (factor de crecimiento de fibroblastos, por sus siglas en inglés) inducen una respuesta quimiotáctica en fibroblastos y altas concentraciones inducen una

respuesta mitogénica. Otro ejemplo es la familia de factores TGF- β (factor de crecimiento transformante beta, por sus siglas en inglés) que aparentemente presentan la mayor versatilidad respecto a funcionalidad, ya que TGF- β es capaz de actuar de manera específica sobre una célula inhibiendo o promoviendo cada uno de los procesos de proliferación, diferenciación y quimiotaxis.

Los factores de crecimiento se relacionan con la **supervivencia de la célula** porque no siempre el retirar un factor de crecimiento va a conllevar a la anulación de la respuesta sobre la célula objetivo, sino que si la célula es dependiente del factor, el retirar tal factor puede activar el programa de auto-destrucción celular o apoptosis. La apoptosis es una característica esencial tanto en el desarrollo embrionario como en la hematopoyesis, la cual puede servir para remover células con el potencial de inhabilitar respuestas proliferativas o autoinmunes.

También existe una **interdependencia entre proliferación y diferenciación**, ya que la coordinación de estos procesos es de vital importancia para el desarrollo y reposición del tejido, aunque el mecanismo de regulación por el cual se da el decrecimiento de proliferación de células diferenciadas aún no es claro. Se plantea que pueden existir dos modos de acción para iniciar el programa: de tipo control primario sobre el proceso de diferenciación (en la que la proliferación se inhibe como consecuencia de una decisión al optar por la diferenciación) y de control primario sobre el proceso de proliferación (en la que la diferenciación ocurre con mayor frecuencia debido a una disminución en el potencial de proliferación).

Finalmente cabe mencionar que los factores de crecimiento también cumplen **un papel en tumorigénesis** que se evidencia durante la evolución de un tumor *in vivo*, el cual es un

proceso con una serie de pasos que requiere, primero, que los sistemas interdependientes que controlan la proliferación y la diferenciación se desacoplen y, segundo, que la proliferación se estimule hasta tal punto que resulte en un crecimiento celular anormal ⁹. Esto se puede apreciar en la **Figura 4**.

Tener un panorama amplio acerca de las cualidades específicas de los factores de crecimiento da definitivamente un mejor conocimiento para abordar la problemática que se presenta en los procesos anormales o que sufren deficiencias.

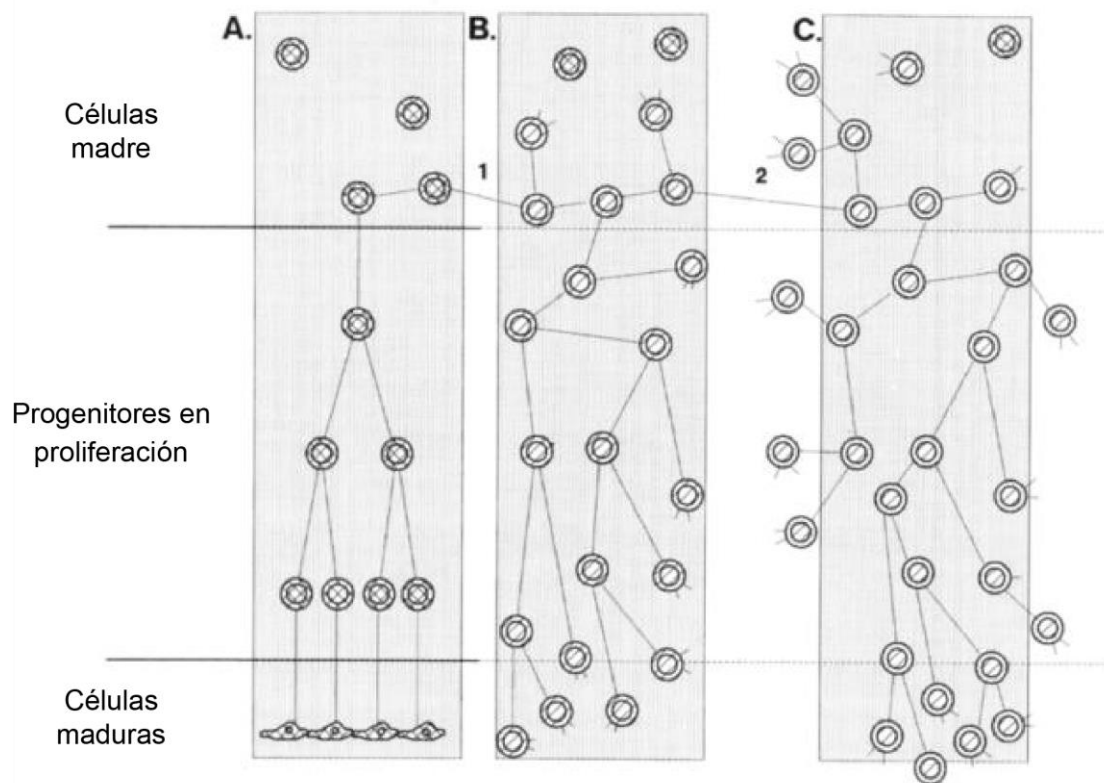


Figura 4. (A) Condiciones saludables en las que proliferación y diferenciación están acoplados y mantienen un orden progresivo que encaja en los límites de un ambiente adecuado. (B) Evento de transformación 1 en el que proliferación y diferenciación se desacoplan. Se pierde el orden progresivo de diferenciación y las células se acumulan, pero la proliferación se mantiene en los límites de un ambiente adecuado. (C) Evento de transformación 2 en el que la proliferación se sale de los límites del ambiente adecuado y resulta en una producción aberrante por parte de las células transformadas. Imagen modificada de la bibliografía ⁹.

1.1.3.1. Factor de crecimiento epidérmico

El factor de crecimiento epidérmico (EGF, por sus siglas en inglés) participa en la cicatrización de heridas dérmicas a través de la estimulación, proliferación y migración de queratinocitos, células endoteliales y fibroblastos, todo esto es requerido para la re-epitelialización.

La expresión de esta proteína se da principalmente en riñones, glándulas salivares, cerebro y próstata.

El EGF tiene un papel en la reparación de tejidos que se divide en tres funciones: la citoprotección, mitogénesis y migración. Esto es de importancia ya que en los tratamientos tópicos para cicatrización de heridas se puede adicionar la utilización de EGF como una estrategia auxiliar para potenciar el proceso de cicatrización ¹⁰.

1.1.3.2. Factor de crecimiento derivado de plaquetas

El factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF, por sus siglas en inglés) activado biológicamente se encuentra como un dímero de dos cadenas de proteínas del PDGF. Para la activación de sus isoformas se conoce el proceso proteolítico que puede ocurrir extracelularmente para el caso de PDGF-C y PDGF-D, o intracelularmente para el caso de PDGF-A, PDGF-B y PDGF-AB. Los PDGF suelen ser secretados por células endoteliales, células epiteliales, macrófagos y plaquetas. Debido a que su forma activa se encuentra como dímero, existen 4 homodímeros que mantienen la misma isoforma, como por ejemplo PDGF-A que también podría ser llamado PDGF-AA; sin embargo, también existe un heterodímero, el único hasta el momento reportado, que es el PDGF-AB.

Respecto a sus receptores, existen dos genes llamados PDGFRA y PDGFRB que expresan los dos tipos de receptores para todas las isoformas del PDGF. Los receptores se encuentran en su forma monomérica previo a la exposición del PDGF, pero tan pronto se exponen al PDGF los receptores también adoptan una forma de dímero para poder enlazarse correctamente. Al igual que las formas de homodímero y heterodímero del PDGF, los 2 tipos de receptores también se dimerizan de las 3 formas posibles: PDGFR α , PDGFR $\alpha\beta$ y PDGFR β .

El PDGF tiene una función en el crecimiento celular, división celular y angiogénesis. Su uso con fines terapéuticos parece estar bastante limitado debido a que incluso cuando un anticuerpo puede reconocer a una isoforma específica e inhibirla, las demás isoformas seguirán activando el mismo receptor. Incluso si se bloquearan todas las isoformas que activan tal receptor, eso no impediría que se active el modo independiente de PDGF (modo de activación del PDGFR sin necesidad del PDGF). Por otro lado, la estrategia de inhibir la acción de PDGF al antagonizar al PDGFR con anticuerpos o inhibidores de tirosina quinasa (TKIs, por sus siglas en inglés) parecen prometedores, pero los datos generados por TKIs son difíciles de procesar porque se suele atacar a diferentes objetivos debido a la concentración necesaria para bloquear la actividad quinasa del PDGFR ¹¹.

1.1.3.3. Adiponectina

La adiponectina es una proteína bastante estudiada por su papel fisiológico en la supresión de gluconeogénesis hepática que disminuye el nivel de glucosa en plasma ¹², el incremento en la beta oxidación en el sistema musculo-esquelético y la supresión de acumulación de lípidos en el hígado ¹³. Asimismo, tiene actividad sobre otros órganos en contextos biológicos muy diversos pero que tienen en común mantener la integridad de células endoteliales y de los

componentes de la ECM al regular el papel expansivo de los factores de crecimiento. Por ejemplo, protege a los podocitos del riñón de la muerte celular por lo que tiene un papel en la protección de los riñones bajo condiciones de diabetes, puede regular el consumo de alimentos a fin de mantener una homeostasis energética controlada por el sistema nervioso central, inhibe la disfunción endotelial y suprime la aterosclerosis y previene la muerte de macrófagos por lo que reduce las lesiones en los vasos sanguíneos. Finalmente tiene una posible función en enfermedades al corazón que está bajo estudio ¹⁴.

La adiponectina es una proteína de 244 aminoácidos y un peso de ~26 KDa. Se presenta como única isoforma conocida hasta el momento. Suele expresarse mayormente en tejido adiposo y funciona como hormona mensajera para comunicar este con el hígado, corazón, riñones, células-beta pancreáticas, entre otros. Posee dos receptores conocidos hasta el momento, el AdipoR1 que se expresa en músculo esquelético e hígado, y el AdipoR2 que se expresa de manera más restrictiva en el hígado.

Se encuentra a niveles de $\mu\text{g/mL}$ en plasma sanguíneo y aparece en 3 tipos de complejos: forma de trímero de bajo peso molecular, forma de hexámero de mediano peso molecular, y forma de doce – dieciocho proteínas acomplejadas (12-18 mero) de alto peso molecular. Esto es importante dado que la distribución de los complejos tiene distintos efectos biológicos ¹⁵.

1.1.4. Matriz extracelular

La ECM es un conjunto de moléculas fuera de la célula que proveen soporte estructural y bioquímico para que la célula interactúe con sus alrededores. En el contexto de cicatrización de heridas hay al menos cuatro clases principales de componentes del ECM: **proteínas**

estructurales como el colágeno y elastina, **glicoproteínas multidominio** adhesivas como fibronectina, vitronectina, y laminina, **glicosaminoglicanos y proteoglicanos**, **proteínas matricelulares** como aquellas que son segregadas con carácter ácido y ricas en cisteínas ¹⁶. Las glicoproteínas llegan a estar presentes en sangre para cumplir una función definida. Además, se conoce que la glicosilación del tipo enlazado a nitrógeno (N-linked, por sus siglas en inglés) afecta la biogénesis y la función de varias proteínas, y que su metabolismo aberrante (biosíntesis/catabolismo) de N-glicanos está implícito en varias enfermedades, incluyendo el cáncer ¹⁷.

La ECM desempeña un papel importante en relación a los factores de crecimiento donde las células deben normalmente estar fijadas a la ECM para que un factor de crecimiento cumpla su función. La angiogénesis es un ejemplo de un proceso que ocurre durante la cicatrización de heridas que requiere de la adhesión de células a la ECM para que estas respondan a los diversos factores de crecimiento. Se ha encontrado que el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés) incrementa la expresión de las integrinas $\alpha_1\beta_1$ y $\alpha_1\beta_2$ (integrinas de unión a colágeno) en la microvasculatura dérmica, y anticuerpos que bloquean las subunidades α_1 y α_2 de las integrinas que llegan a inhibir substancialmente la angiogénesis inducida por VEGF sin afectar la vasculatura pre-existente. Esto indica que tales integrinas son realmente esenciales para la angiogénesis inducida por VEGF. La naturaleza crítica de las integrinas de unión a angiogénesis se refleja en otras situaciones como la embriogénesis, donde la inhibición de integrinas β_1 interfiere con el desarrollo de la vasculatura embrionaria. En oncología, se han propuesto inhibidores de integrinas para limitar la angiogénesis de tumores y evitar su expansión ¹⁶.

En heridas agudas, la interacción ECM-factores de crecimiento progresa sin mayor dificultad con cada fase y se completa de forma adecuada hasta llegar a un cierre estable de la herida. Sin embargo, en heridas crónicas o difíciles de tratar, la interacción ECM-factores de crecimiento se ve perturbada más frecuentemente debido a las anomalías sistemáticas como diabetes, insuficiencia venosa, entre otras. De hecho las heridas crónicas se caracterizan fundamentalmente por estas anomalías bioquímicas que ocurren en la ECM como el incremento de proteasas o elastasas neutrofílicas. Esto último se presenta mejor en la **Figura 5** y en la **Tabla 2** donde se comparan una serie de características y cómo éstas se presentan en una herida crónica en comparación con una herida con sanado saludable.

Los componentes degradados de la matriz contribuyen a una prolongada respuesta inflamatoria. Este concepto va en concordancia con que la fase inflamatoria del proceso crónico de cicatrización de heridas que tiende a ser el estado prolongado o que retrasa el avance saludable debido a un antagonismo perpetuado entre pro- y anti-citoquinas inflamatorias, y un exceso de proteasas y radicales libres de oxígeno. Esta combinación crea un microambiente hostil que mantiene la patología crónica en un estado prolongado de inflamación que no es capaz de proceder a las siguientes etapas del proceso ¹⁸.

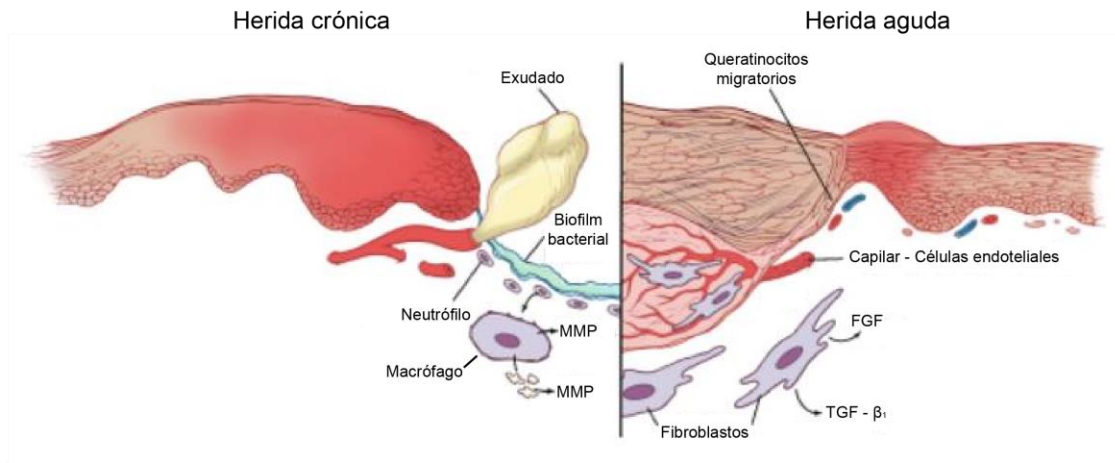


Figura 5. Comparación entre una herida crónica (parte de la izquierda) donde la reparación se ve retirada, y una herida aguda (parte de la derecha) donde el mecanismo de reparación procede de forma ordenada y secuencial. Esquema modificado de la bibliografía ¹⁶.

Tabla 2. Comparación detallada de las diferencias entre una herida crónica y una herida aguda de la **Figura 5**.

Herida crónica (reparación simultánea)	Herida aguda (reparación ordenada y secuencial)
Sin formación de coágulo	Formación de coágulo
Inflamación incrementada o excesiva	Mínima inflamación
Fugas en capilares y formación de fluido en la herida	Capilares migratorios
Defectos en ECM/tejido granular	Sin defectos o mínimos defectos en ECM/tejido granular
<ul style="list-style-type: none"> ECM degradada/defectuosa/dañada Desbalance en inhibidores de proteasas 	<ul style="list-style-type: none"> Síntesis activa de ECM Balance en inhibidores de proteasas
Daño en interacciones entre células y la ECM	Interacciones activas entre células y la ECM
Bordes fibróticos redondos	Bordes planos fibróticos
Daño en migración de queratinocitos	Migración activa de queratinocitos
Exceso en formación cicatricial	Mínima formación cicatricial
Infección/colonización bacteriana	Mínima/Ninguna bacteria
Presencia de biofilm	Ausencia de biofilm

Un buen conocimiento de la ECM es un buen punto para empezar la construcción de un sustituto de piel diseñado por la bioingeniería, básicamente porque la ECM es ensamblada a partir de componentes sintetizados y depositados afuera de la superficie celular que provee de estructura y funcionalidad integrada a los tejidos conectivos y órganos. También puede servir de reservorio o matriz provisional de factores de crecimiento y otras proteínas que son depositadas cuando se causan heridas, y que se originan de células que promueven granulación y de proteínas que se encuentran en la sangre.

Existe abundante literatura científica reportando que se logran resultados notables al aplicar algún factor de crecimiento, proteína u hormona para promover la cicatrización de heridas. Sin embargo, su aplicación clínica es limitada debido al alto costo de producción y almacenamiento de estos factores que restringe o dificulta su acceso ¹⁹.

Una de las mejores aplicaciones que se le pueden dar a los factores de crecimiento es en la manufactura de substitutos de piel gracias a la bioingeniería con el objetivo de regenerar el tejido dañado. Estos substitutos de piel apuntan a lograr ciertas características tales como **ser no inmunogénicos, modular la actividad proteolítica** para regresar la herida a un estado agudo (de poco o ningún riesgo), **proveer de un soporte** reabsorbible que facilite la migración celular y promueva la proliferación celular, **reclutar tipos de célula** que segreguen factores angiogénicos y fibroblastos para la síntesis de tejido granular y **absorber y neutralizar radicales libres** ²⁰. Con estas características básicas, los científicos procuran crear el soporte óptimo para una situación específica al escoger un par de funciones y enfocándose en desarrollar el potencial de aquellas escogidas. Estos substitutos de piel también pueden llegar a diseñarse tomando en cuenta un factor de crecimiento de interés para un efecto más especializado.

1.2. Técnicas bioanalíticas para identificar proteínas solubles

A lo largo de la historia los investigadores se han visto en la necesidad de identificar y cuantificar proteínas para los diferentes contextos de aprendizaje, desarrollo de tecnologías, producción a nivel industrial, diagnóstico clínico, etc.

Entre los años 1950 y 1990 se han reportado una serie de técnicas ^{21,22} para lograr cuantificar proteínas. Se tiene ensayos como el de Folin-Lowry creado en 1951 ²³ y el de ácido

bicinonínico creado en 1985 ²⁴ en los que se acompleja cobre con la proteína para luego de algunos pasos adicionales generar una coloración medible y cuantificable. La desventaja de ambos métodos es que dado que depende del cobre para generar un complejo, algunos otros componentes en solución pueden enlazarse al cobre e interferir con la medición.

El ensayo de Bradford creado en 1976 ²⁵, es un método que utiliza la intensidad de absorbancia de la solución en presencia de un colorante que dependiendo de si este se enlaza a una proteína con carácter ácido o básico presenta un color rojo o azul, respectivamente. La absorbancia se puede medir y cuantificar con la ayuda de curvas de calibración. Las desventajas es que suele utilizarse para detectar proteínas a partir de los 3 kDa y el método es sensible a solo algunos detergentes.

Los ensayos de absorción ultravioleta ²⁶ suelen medir aminoácidos como tirosina y triptófano que suelen absorber luz a 280 nm, mientras que fenilalanina absorbe cerca de los 260 nm. La absorción total se puede relacionar a la concentración de proteína en la muestra. Las desventajas son que las proteínas suelen tener aminoácidos diferentes a solo los 3 utilizados para el método, además de que existen otras sustancias que pueden absorber cerca al rango de los 280 y 260 nm.

Los ensayos de fluorescencia ^{27,28} suelen ser métodos que utilizan un componente específico que se va a enlazar a ciertos aminoácidos de la proteína, por contener una propiedad como hidrofobicidad o carácter ácido. El nuevo enlace generado es capaz de tener fluorescencia. Finalmente, se puede utilizar un fluorímetro para medir las señales específicas. La desventaja en estos métodos suele estar dada por el fluoróforo escogido, dado que existen muchos tipos de componentes que se puedan enlazar a las proteínas para producir fluorescencia, la selección del componente estará principalmente limitada por el método, dado que dependiendo del método se deberá buscar un fluoróforo que presente características deseadas para el contexto del análisis.

La citometría de flujo es una técnica para el análisis de células, que utiliza un haz de láser para producir fluorescencia y de esta manera obtener información sobre alguna característica celular en específico. Las dos grandes ventajas de la citometría de flujo son su capacidad de medir un largo número de parámetros en la misma muestra y su capacidad de recolectar información de millones de células en cuestión de segundos. Los parámetros medibles suelen ser el tamaño celular, conteo celular, ciclo celular, entre otros.

Las potenciales aplicaciones de esta técnica son la detección y medición de la expresión de proteínas, en la célula intacta, incluso aquellas que se encuentran en el núcleo; las modificaciones pos-traducción, que incluye cortes y fosforilaciones; el ARN, que incluye el ARNm, ARNmi y ARNinc; el estado de salud celular, desde viabilidad hasta el estado tardío de apoptosis; y los diferentes estados del ciclo celular como G0, G1, G2 o S ²⁹.

En un estudio ³⁰, se utilizó citometría de flujo y espectrometría de masas como dos métodos distintos y comparables para cuantificar las proteínas transportadoras P-gp y OATP1B1 tanto en la superficie celular como dentro de la célula. Lo que se concluyó fue que la facilidad y rapidez de uso de la citometría de flujo, hacen de esta técnica adecuada para controles de rutina, mientras que la espectrometría de masas, que no suele ser tan adecuada para controles de rutina, se utilizó para validar los resultados y delimitar la aplicabilidad.

1.2.1. Inmunoensayos

Debido al rápido avance de la ciencia, hubo un aumento en la exigencia de técnicas analíticas más potentes. Lo que lleva a que las técnicas actuales para el análisis de proteínas de muestras biológicas o clínicas busquen tener un buen grado de sensibilidad, con alta especificidad y alto rendimiento. Entre ellas, las que actualmente se ajustan mejor a tales necesidades son las pruebas de inmunoensayo con enzimas, microperlas (Luminex) o

inmunotransferencia. Los inmunoensayos ^{31,32} son métodos que se basan en el complejo inmune, el cual es la interacción que tienen los anticuerpos con los antígenos. Lo que suele hacerse es utilizar un componente adicional como marcador para que cuando el anticuerpo atrape al antígeno, el marcador reconozca tal interacción y produzca una señal detectable para los equipos. Estos métodos suelen ser la opción favorita por investigadores y trabajadores de laboratorio para cuantificar proteínas debido a que la especificidad y afinidad de un anticuerpo para un antígeno suele dar resultados robustos, reproducibles, con alta sensibilidad y selectividad. Uno de los tipos de inmunoensayo más conocidos es la prueba de ELISA ^{33,34} en la que el marcador es una enzima. Si bien esta prueba desarrollada de manera correcta puede ser de alta sensibilidad y detectar proteínas presentes en el plasma sanguíneo en el rango de concentraciones de pg/mL a ng/mL, los inmunoensayos para nuevas proteínas generalmente no están disponibles. Esto se debe a que el desarrollo de nuevos inmunoensayos con una cuantificación confiable son caros, con costos de \$50,000-\$100,000 por ensayo de ELISA, y requieren de largo tiempo de estudios, de hasta un año, para llegar a su implementación ³⁵. Otros aspectos negativos de los inmunoensayos es que resultan en un requerimiento múltiple de anticuerpos para múltiples proteínas; consumen largo tiempo para la preparación de la muestra, tomando en cuenta que algunos procedimientos pueden alterar el estado biológico inicial de la proteína; en ocasiones carecen de suficiente sensibilidad dado que existen familias de proteínas y es difícil distinguirlas por este método; y adaptar la técnica para un análisis de tipo “multiplex” (analizar múltiples analitos a la vez) aún es limitado.

Debido al vacío que se genera al no poder cumplir con ciertos requisitos, es que la espectrometría de masas surge como una opción atractiva para satisfacer algunas de las necesidades. Sin embargo, también se conoce las limitaciones de la técnica con respecto a la exactitud y rendimiento que puede alcanzar ^{35,36}.

1.2.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que permite identificar compuestos de diversa naturaleza midiendo la relación de masa y carga de las señales. Se generan espectros con un eje que mide la intensidad de la señal (eje Y) y el otro eje que mide la relación m/z de la señal (eje X).

La espectrometría de masas es aplicable en diversos campos de estudio como la **proteómica** para la caracterización de proteínas y complejos proteicos, secuenciar péptidos, e identificar modificaciones pos-traducción (PTM). En **metabolómica** se emplea para la detección y diagnóstico de cáncer, el descubrimiento y perfil de biomarcadores, el perfil de desórdenes metabólicos. En **análisis ambiental**, su uso es popular para la detección y cuantificación de pesticidas, el monitoreo de contaminación por dióxido de carbono y para pruebas en agua potable. En **análisis farmacéutico** se utiliza para estudiar el metabolismo, absorción, distribución, eliminación y descubrimiento de drogas, así como para análisis cinéticos y termodinámicos. En **análisis forense**, se emplea para el análisis de trazas en evidencia, confirmar el abuso de drogas e identificación de residuos de explosivos. Existen además **aplicaciones clínicas** para el desarrollo de drogas, estudios de seguridad de fármacos nuevos en fase cero, detección de enfermedades e identificación de agentes infecciosos³⁷.

Antes de la revolución de la genómica, la manera de demostrar la estructura covalente de una proteína única y en estado puro era a través de métodos químicos o enzimáticos como la degradación de Edman. Gradualmente, con el paso de los años, la necesidad de métodos con mayor rendimiento y versatilidad para satisfacer la complejidad de estudios biológicos dio paso a la creación de una variedad de espectrómetros de masas y técnicas para estos. La complejidad de estudios en proteínas viene dado principalmente por la multiplicidad de

proteínas que puede generar un mismo gen como resultado del empalme alternativo, la presencia de secuencias de polimorfismos y las PTM.

La MS solía estar restringida a compuestos pequeños y termoestables, pero con el invento de la ionización por electrospray (ESI, por sus siglas en inglés) y la ionización/desorción por láser asistida por una matriz (MALDI, por sus siglas en inglés), el panorama de analitos se amplió hasta el análisis de polipéptidos. Algunas creaciones que vinieron son el analizador de **tiempo de vuelo** (ToF, por sus siglas en inglés), que mide el tiempo de vuelo del analito dentro de un tubo a condiciones de vacío, y convierte ello a una señal de m/z. La **trampa de iones** (IT, por sus siglas en inglés), es un analizador en el cual los iones se atrapan y se acumulan a lo largo del tiempo dentro de un aparato. Esta tecnología se caracteriza por su capacidad para implementar MS/MS, la modalidad en tándem en la que se realiza una fragmentación de ciertos iones seleccionados -también existe el término MSⁿ cuando se realizan múltiples fragmentaciones- ya que así se obtiene una alta sensibilidad y adquisición de datos. La **trampa lineal de iones** (LIT, por sus siglas en inglés) es un analizador que se basa en lo mismo que la IT, pero con capacidades aumentadas para atrapar iones, un mayor rango dinámico, y además que la sensibilidad de los analizadores LIT ha reemplazado a los clásicos analizadores cuadrupolo. **La resonancia de ciclotrón iónico con transformada de Fourier** (FT-ICR, por sus siglas en inglés) son un tipo de espectrómetros de masas con fuentes de ionización externas que representaron un progreso en términos de poder de resolución y precisión para medir masas. Logra mediciones en el rango de ppm y su alta resolución no solo consigue mejor calidad de datos, sino que incrementa la definición de los picos y así consigue mayor detección de señales que los demás instrumentos. El analizador de masas *Orbitrap* tiene un principio físico diferente a los demás pues está basado en la separación de iones por un campo eléctrico oscilante. Posee características similares al FT-

ICR en cuestión de resolución y precisión para medir masas, pero sin el costo extra de mantener un magneto con superconducción ³⁸. Un resumen de los espectrómetros se puede observar en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Resumen de los espectrómetros de masas más comunes. La marca de verificado indica su disponibilidad, las marcas de verificado en paréntesis indica que es opcional. Los signos +, ++, +++ indican posible o moderado, bueno o alto, y excelente y muy alto, respectivamente. Sec. Significa secuencial. Traducido de la bibliografía ³⁸.

	IT-LIT	Q-Q-ToF	ToF-ToF	FT-ICR	Q-Q-Q	QQ-LIT
Precisión para medir masas	Bajo	Bueno	Bueno	Excelente	Medio	Medio
Poder de resolución	Bajo	Bueno	Alto	Muy alto	Bajo	Bajo
Sensitividad (LOD)	Bueno		Alto	Medio	Alto	Alto
Rango dinámico	Bajo	Medio	Medio	Medio	Alto	Alto
ESI	✓	✓		✓	✓	✓
MALDI	(✓)	(✓)	✓			
Capacidad de MS/MS	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Capacidades adicionales	Sec. MS/MS			Análisis de Precursor, pérdida neutral, MRM		
Identificación	++	++	++	+++	+	+
Cuantificación	+	+++	++	++	+++	+++
Rendimiento	+++	++	+++	++	++	++
Detección de modificaciones	+	+	+	+		+++

1.2.2.1. Orbitrap MS

En las últimas décadas la tecnología de FT-ICR ha sido prometedora por su capacidad de medir masas con una precisión relativa al nivel de $<10^{-7} - 10^{-6}$, que junto con técnicas como ESI y MALDI han llamado la atención para el desarrollo de metodologías de análisis para muestras biológicas y matrices complejas. Debido al interés, también se originó una iniciativa por mejorar los analizadores de masas existentes y crear nuevos analizadores más eficientes. Todo ello creó un ambiente adecuado para la aparición del analizador Orbitrap. Este miembro de la familia de analizadores basados en transformación de Fourier, tuvo su primera aparición como curiosidad científica en una conferencia de la Sociedad Americana de Espectrometría de Masas en 1999, para lo que rápidamente hizo su debut en 2005 como un detector de masas

preciso y compacto. Este analizador heredó características como el principio de detección de imagen actual del FT-ICR, el atrapar iones en una estructura de electrodos precisa de la trampa de iones de radiofrecuencia, y la inyección pulsada y uso de campos electroestáticos del TOF. Adicionalmente, también pudo pasar las limitaciones de sus antecesores como la necesidad de un magneto superconductor en el FT-ICR, limitaciones en el espacio de carga en la trampa de iones de radiofrecuencia, o el rango dinámico de detección en el TOF. En la **Figura 6** se puede observar las similitudes y diferencias del Orbitrap con los analizadores FT-ICR y TOF.

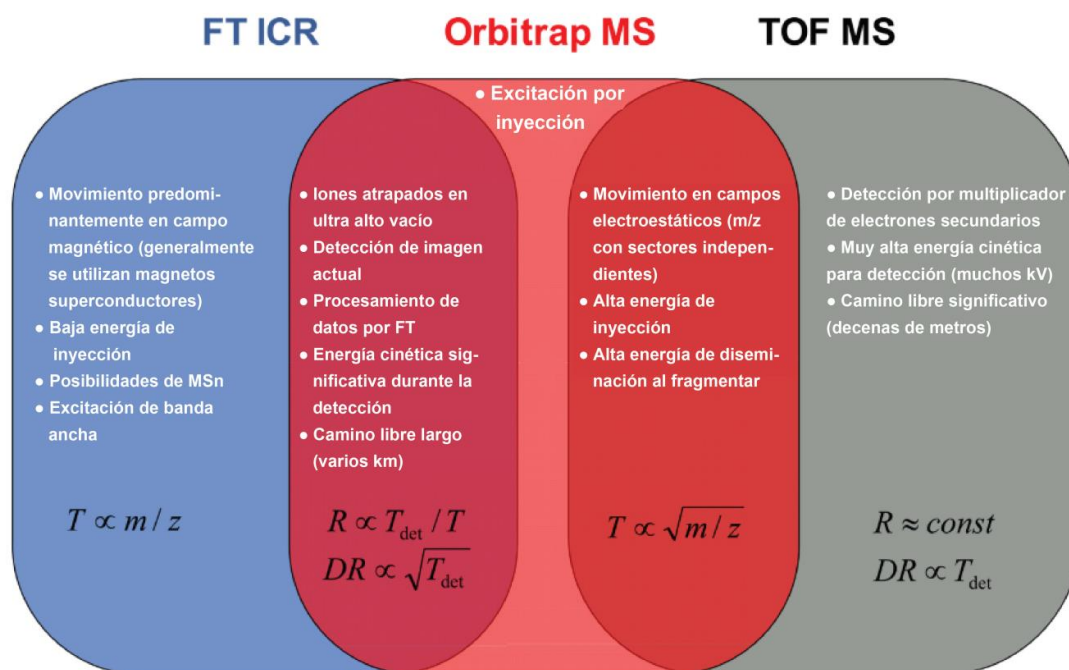


Figura 6. Comparación de las características físicas y analíticas para equipos de alta resolución en espectrometría de masas. T es el periodo de oscilación, R es el poder de resolución, DR es el rango dinámico del espectro, T_{det} es la duración de detección por un espectro. Imagen traducida de la bibliografía ³⁹.

El analizador Orbitrap está compuesto principalmente de tres electrodos, dos electrodos externos en forma de copas, y un electrodo central interno que sostiene la trampa junta. Cuando se aplica un voltaje entre los electrodos externos y el electrodo central, el campo

eléctrico resultante es estrictamente lineal a lo largo del eje, y de esta manera las oscilaciones en el eje son puramente armónicas. Al mismo tiempo, el componente radial del campo atrae a los iones al electrodo central. Con la correcta selección de parámetros, los iones permanecen en un movimiento circular espiral dentro de la trampa, similar a un planeta en el sistema solar. La imagen actual, en este caso los movimientos de los iones, se digitaliza en el dominio del tiempo para transformarse con Fourier al dominio de frecuencia para luego obtener un espectro m/z .

A lo largo de los años se han desarrollado equipos como el LTQ Orbitrap Classic en 2005; el LTQ Orbitrap XL en 2007, que agregó una celda de colisión posterior a la C-trap; el LTQ Orbitrap Velos en 2009 que agregó un anillo apilado guía de iones por radiofrecuencia, también llamado lentes-S (S-lens, por su nombre en inglés); el Orbitrap Elite en 2011, que incrementó su poder de resolución; a la par, se desarrolló el Exactive en 2008, el cual es un Orbitrap autónomo en el que la fuente de ionización está conectada directamente a la C-trap. Hasta que en 2011 una combinación de este aparato con un cuadrupolo se lanzó con el nombre de Q Exactive, que se volvió popular en el campo de la proteómica, y para la selección de alto rendimiento. Lo que lleva a que este último equipo sea favorablemente utilizado en este trabajo de tesis.

Si bien este tipo de tecnología tendrá sus limitaciones físicas a futuro, que confinará su uso a ciertas áreas analíticas, actualmente aún es posible mejorar ciertas características como la velocidad de análisis, el poder de resolución, el límite de detección y el rango dinámico ³⁹.

1.2.3. Cromatografía líquida

La cromatografía líquida (LC, por sus siglas en inglés) es una de las técnicas analíticas de separación más usadas debido a su sensibilidad, su adaptabilidad para determinaciones cuantitativas precisas, su sencillez de automatizar, por ser adecuada para separar especies no volátiles o termosensibles, y sobre todo por su utilidad en muchas sustancias que son de interés académico e industrial. Algunos ejemplos incluyen proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos, drogas y pesticidas.

Existen ciertas reglas generales para la selección del tipo de cromatografía y tipo de columnas cromatográficas en las que se consideran la masa o el tamaño de los analitos, el tipo de solubilidad que tengan (soluble en agua o en compuestos orgánicos), la polaridad, y el carácter ácido ⁴⁰. Entre las cromatografías más comunes se encuentran: la LC de fase normal, LC de fase reversa, LC de fluido supercrítico, LC de exclusión por tamaño o molecular, LC de intercambio iónico, y LC de afinidad. Adicionalmente se podría hablar de electroforesis capilar, el cual sigue un principio físico diferente para la separación de analitos ^{41,42}.

En este estudio se ha elegido utilizar la cromatografía líquida de fase reversa (RPLC, por sus siglas en inglés) debido a su facilidad y robustez para el desarrollo de métodos. Esto lleva a que, en sus diferentes formas, esta técnica represente más del 80% de las aplicaciones de LC. Se utiliza una fase estacionaria apolar y una fase móvil polar para separar compuestas polares, medianamente polares e ionogénicos de acuerdo a su hidrofobicidad. La mayor parte de fases estacionarias se basan en sílica químicamente modificada con octadecil (C18), octil (C8) o fenil. Adicionalmente también es posible utilizar una modificación de cianopropil en la sílica.

La fuerza de elución de la fase móvil incrementa de acuerdo a la hidrofobicidad del constituyente: agua < metanol < acetonitrilo < etanol < isopropanol < tetrahidrofurano. Combinaciones de estos últimos suelen usarse para diseñar fases móviles.

Antiguamente se utilizaba buffer volátiles para neutralizar a los analitos, debido a que los iones tienen baja retención en RPLC, y para bloquear actividad no deseada en la fase estacionaria. Actualmente ya no es necesario debido a que las fases estacionarias han aumentado su grado inerte y esto da mayor versatilidad para utilizar buffer volátiles según el análisis. Esto último se puede tomar como una regla útil, ya que es una opción recomendable empezar utilizando buffer volátiles para el diseño de métodos y eventualmente utilizar buffer no-volátil si el primero no es suficiente.

Niveles de cromatografía líquida

También, se puede hablar de diferentes niveles de LC, como la cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC, por sus siglas en inglés), la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC, por sus siglas en inglés) y la nano-cromatografía líquida (nano-LC, por sus siglas en inglés). Todas estas se distinguen generalmente por aspectos que definen el rendimiento como el diámetro interno (ID, por sus siglas en inglés) de la columna, el tamaño de partículas con las que se empaquetan las columnas, la velocidad de flujo y la cantidad de muestra inyectada.

Las principales ventajas que se obtienen de utilizar nano-LC son su alta sensibilidad y la poca cantidad de muestra que se necesita para el análisis. La **alta sensibilidad** es debido a la dilución radial reducida de las bandas cromatográficas por un ID más estrecho (ver **Figura 7**). Sin embargo hay que notar que existen malentendidos al pensar que siempre un ID más estrecho lleva directamente a mayores eficiencias y resoluciones en los picos

cromatográficos, ya que la relación contempla otros factores como el tipo de empaquetado de columna que se usa. Por ejemplo, las columnas de UHPLC tienen un buen desempeño con ID estrechos porque los gradientes de temperatura radial que dañan la resolución -debido a efectos de fricción por la contrapresión- son menos prominentes. Las columnas monolíticas tienen buen desempeño en formatos nano-LC debido a su más sencilla polimerización dentro de la columna. Las partículas de tipo “*core shell*” son difíciles de empaquetar en ID estrechos y muestran mejor desempeño en formatos clásicos de LC.

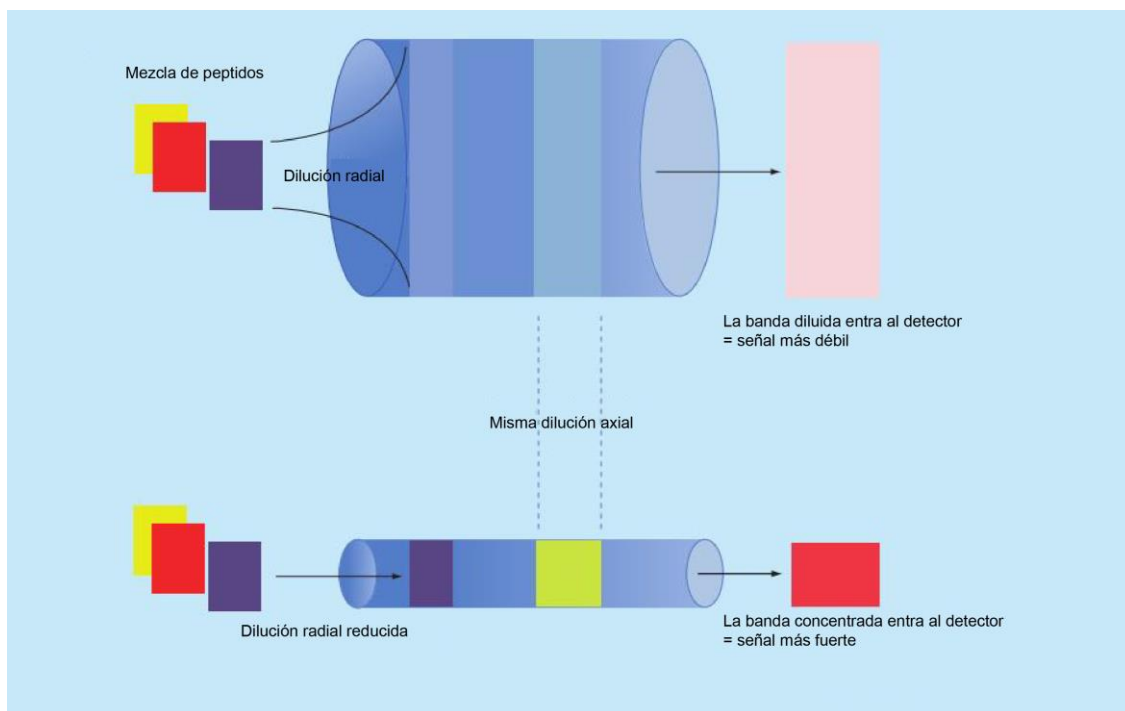


Figura 7. En el color amarillo, rojo y morado de la izquierda se muestra una mezcla de péptidos. El cilindro de la parte superior muestra una columna con un ID ancho y el cilindro de la parte inferior un ID estrecho. La banda más amplia y rosada de la derecha da como resultado una señal más débil cuando entra al sistema ESI-MS y la banda roja más compactada de la parte inferior derecha da como resultado un señal más concentrada cuando entra al mismo sistema. Esquema modificado de la bibliografía ⁴³.

La **poca cantidad de muestra** que se necesita viene dado principalmente porque se utiliza un ID estrecho combinado con una velocidad de flujo muy baja que da como resultado el

necesitar solo una gota de sangre para un análisis en comparación con decenas de mililitros de sangre.

Nano-LC combinado con ESI-MS es uno de los análisis más comunes utilizados en proteómica para detectar péptidos. Generalmente, se utiliza la modalidad “*bottom-up*” en que se realiza una digestión enzimática de la proteína y los péptidos resultantes se separan por nano-LC hasta llegar al ESI-MS. Los tiempos de separación pueden ir desde 30 minutos para muestras simples, hasta decenas de horas para maximizar la calidad de los datos resultantes de muestras con matrices complejas, como de un organismo ⁴³.

1.3. Métodos y Consideraciones para la cuantificación de proteínas

1.3.1. Metodologías en LC-MS/MS para cuantificar proteínas

En el área de proteómica cuando se utilizan MS es común digerir la proteína para obtener una serie de péptidos, debido a que analizar la proteína completa resulta en complicaciones de detección y no se obtiene suficiente información. Además, debido a la complejidad de la muestra, al tener una mezcla de péptidos, es común utilizar una separación por LC previa a la inyección en un sistema MS para facilitar el análisis de datos. Por lo que metodologías que acoplan LC y MS en tándem es común en este ámbito. Entre los métodos más comunes destacan tres principales para cuantificar los péptidos de las proteínas utilizando LC-MS/MS.

La adquisición dependiente de datos (DDA, por sus siglas en inglés) es un método estándar en la mayoría de espectrómetros de masas que se basa primero en realizar un escaneo exploratorio MS1 de los péptidos que eluyen para monitorear las mayores intensidades e identificar potenciales candidatos a fragmentar. Después, se aísla a cada precursor, en este caso a uno de los péptidos cargados, para fragmentarlo y producir un segundo set de datos, el

MS2. De esta manera, del MS1 exploratorio se escogen cerca de diez de las señales más intensas para realizar un MS2 de cada una. Este proceso es de carácter estocástico dado que el comportamiento del MS1 puede variar entre replicas y experimentos, por lo que luego los MS2 producidos dependerán totalmente del MS1 tomado en ese momento, de aquí que venga el nombre de adquisición dependiente de datos.

El monitoreo de reacción selectiva (SRM, por sus siglas en inglés) o el monitoreo de reacción paralela (PRM, por sus siglas en inglés) son dos métodos muy similares que se basan en buscar y optimizar la selección de un grupo de precursores y fragmentaciones para cuantificar de forma altamente confiable y absoluta. De esto se hablará más adelante, dado que este es el método seleccionado para el estudio.

La adquisición independiente de datos (DIA, por sus siglas en inglés) es un método que se basa en fragmentar de manera sistemática e imparcial todos los compuestos ionizados que estén dentro de un rango m/z específico. Si bien este método por si solo suena poco útil para cuantificar un proteoma, en 2012 Gillet *et al*⁴⁴. propuso un método de adquisición secuencial de ventanas de todos los espectros teóricos de masas (SWATH, por sus siglas en inglés) en el que inicialmente se basaba en aislar treinta y dos ventanas con un rango de 25 m/z cada una para fragmentar todo lo que hubiese, y para lidiar con la complejidad del análisis de datos, también utilizó una estrategia de puntuación centrada en péptidos, cuyo fundamento es el utilizar coordenadas de búsqueda cromatográficas y espectrométricas de masas para proteínas y péptidos de interés. Este método ha ganado interés en los últimos años⁴⁵, ya que es idealmente adecuado para proyectos que implique cuantificar de manera reproducible y precisa gran parte del proteoma o peptidoma en muchas muestras. Tales casos pueden ser estudios de biomarcadores, asociación genética, drogas clínicas o investigación de

exploración básica. Aunque una gran desventaja de SWATH-MS comparado con SRM o PRM para la cuantificación de péptidos es que SWATH-MS sigue siendo de tres a diez veces menos sensible. Por lo que es recomendable utilizar métodos focalizados para estudios de cuantificación de proteínas de baja abundancia o de detección precisa de péptidos. Adicionalmente, es necesario saber que se utiliza un espectrómetro de alta resolución para esta modalidad, y que en el mercado el término SWATH es una marca registrada de SCIEX para el contexto de instrumentación Q-TOF, por lo que la marca Biognosys llamó monitoreo de hiper reacción (HRM, por sus siglas en inglés) para el modo análogo de adquisición de datos utilizando un analizador Orbitrap.

Una comparación de los tres métodos se puede apreciar en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Comparación de métodos SWATH-MS, DDA, y SRM o PRM. Basado en la bibliografía ⁴⁵.

	Adquisición independiente de datos (DIA) basada en SWATH-MS	Adquisición dependiente de datos (DDA)	Adquisición objetiva (SRM o PRM)
Facilidad de adquisición de datos	Fácil, requiere definir un rango de m/z para cubrir, un ancho de ventana de aislamiento del precursor, y un número de escaneos MS2 por ciclo	Muy fácil, función por defecto en la mayoría de espectrómetros de masas, requiere definir el umbral de activación de MS2, y el tiempo de exclusión dinámico	Muy difícil, requiere generar y optimizar ensayos para péptidos objetivos para la adquisición de datos
Facilidad de análisis de datos	Muy difícil, requiere parámetros de búsqueda de péptidos, herramientas sofisticadas de <i>software</i> , y grandes recursos informáticos	Muy fácil, existe una multitud de arquitecturas en <i>pipeline</i> disponibles	Fácil, existe bastantes herramientas de <i>software</i> desarrolladas para el análisis de manera manual o automático
Amplitud de detección de proteínas o péptidos (<i>Multiplexing</i>)	Capacidad de cuantificar 10,000 s de péptidos por inyección MS	Capacidad de cuantificar 10,000 s de péptidos por inyección MS	Capacidad de cuantificar 10 - 100 s de péptidos por inyección MS
Selectividad/sensibilidad/rango dinámico de cuantificación	4 órdenes de magnitud por inyección MS	4 órdenes de magnitud por inyección MS	4 - 5 órdenes de magnitud por inyección MS
Reproducibilidad/consistencia de datos	Alta, debido al análisis por puntuación centrada en péptidos	Baja, debido al muestreo estocástico de DDA	Alta, debido a la adquisición de datos objetiva
Focalización retrospectiva (utilizando extracción de cromatograma)	Posible a nivel de MS1 o MS2	Posible a nivel de MS1	No es posible debido a la adquisición de datos objetiva

1.3.2. Monitoreo de reacción selectiva

Para el análisis de proteínas utilizando espectrometría de masas, se creó un método específico llamado monitoreo de reacción selectiva (SRM, por sus siglas en inglés) ^{46,47}. El SRM o el monitoreo de reacción múltiple (MRM, por sus siglas en inglés) son dos distintos nombres que se le da a la misma serie de pasos. Este método se basa en seleccionar un analito de

interés y seleccionar específicamente un set de transiciones (fragmentos iónicos del analito que se obtienen como resultado del proceso en tándem MS/MS). En este estudio el analito de interés son proteínas, con lo que luego se selecciona cuidadosamente de 3 a 5 péptidos producidos por la digestión enzimática de esa proteína, y se selecciona de 4 a 6 transiciones por péptido. La selección adecuada de los péptidos y transiciones suele darse por resultado de una serie de iteraciones y optimizaciones con ayuda de software (ver **punto 1.3.5**) para datos generados o datos provenientes de bases de datos. Además, dependiendo el contexto en que se trabaje, se puede realizar lo anteriormente mencionado para varias proteínas y obtener una gran cantidad de transiciones totales.

Los análisis de SRM suelen llevarse a cabo por cromatografía líquida, como paso previo para separar correctamente los péptidos. Luego, en un espectrómetro de masas basado en un triple cuadrupolo (QQQ) en el que el primer cuadrupolo (Q1) sirve como un filtro para seleccionar iones predefinidos, el segundo cuadrupolo (Q2) sirve como una celda de colisión para fragmentar los iones seleccionados, y finalmente el tercer cuadrupolo (Q3) sirve nuevamente como filtro para seleccionar transiciones predefinidas generadas en el Q2 que pasarán al detector. Gracias a las dos veces que se realiza un filtrado de masas, gran parte de las interferencias que podrían co-eluir con los analitos se excluyen de manera exitosa proporcionándole a esta técnica gran sensibilidad. Sin embargo, el bajo poder de resolución de los Q1 y Q3 no les permite separar iones isobáricos (iones con masa idéntica a otros con composición atómica diferente, ejemplo: CO₂, N₂, C₂H₄ todos con m/z = 28) que puedan co-eluir con el analito⁴⁸. La serie de pasos se pueden observar en la **Figura 8**.

Como regla general, es mejor monitorear el mayor número de péptidos y transiciones para obtener suficiente información comparable que se pueda ratificar para una cuantificación absoluta. Esto en parte es un aspecto negativo de la técnica, dado que depende mucho de que

tan bien se seleccionen los mejores péptidos y transiciones para obtener una cuantificación fidedigna.

Si bien esta serie de pasos no es nueva dado que se ha hecho por muchos años con moléculas pequeñas, sí es reciente para la aplicación en proteínas. Esta técnica tiene fuerte potencial como una herramienta útil y poderosa para la identificación y cuantificación de biomoléculas en el diagnóstico clínico.

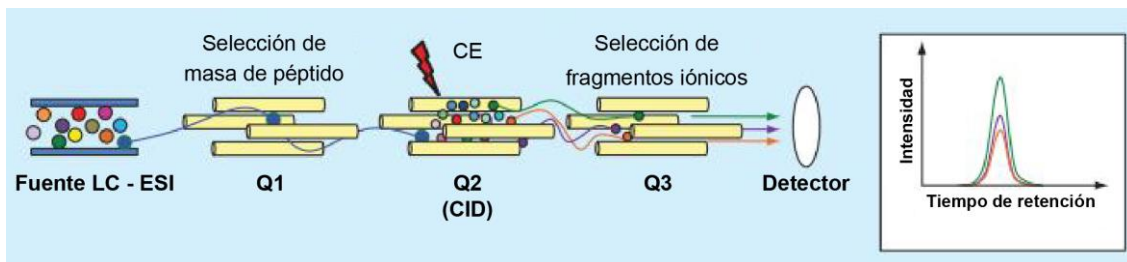


Figura 8. Se empieza por un sistema LC de donde provienen todos los péptidos separados y estos se ionizan por el sistema ESI. En el Q1 se realiza la selección de ciertos péptidos, en el Q2 se fragmentan los péptidos seleccionados, y en el Q3 se selecciona ciertas transiciones que pasarán al detector. Finalmente se obtiene una serie de señales monitoreadas en un lapso de tiempo, debido a las diferentes transiciones predefinidas. Imagen modificada de la bibliografía ⁴⁷.

CE: energía de colisión, CID: Disociación por colisión inducida.

1.3.3. Monitoreo de reacción paralela

El monitoreo de reacción paralela (PRM, por sus siglas en inglés) es una variación del SRM en que se utilizan espectrómetros de masas híbridos como el caso del q-OT (cuadrupolo-*Orbitrap*). Se suele cambiar el Q3 del equipo QQQ por un *Orbitrap*, lo cual ofrece mayores ventajas como hacer un escaneo completo de todas las transiciones por ion precursor, a diferencia de SRM que realiza el escaneo a una transición por vez. De ahí viene el nombre del método de realizar un análisis en paralelo de todos los fragmentos o transiciones del ion

precursor, que para el tema de estudio serían péptidos cargados. Otra ventaja reside en tener mejor precisión que el método de SRM al momento de medir las señales de m/z y así poder llegar al nivel de ppm, lo cual puede eliminar la interferencia de fondo, eliminar mejor los falsos positivos y mejorar el límite de detección y sensibilidad en trasfondos complejos con mucho ruido o interferencias. Finalmente, posee un rango lineal más amplio de cinco a seis órdenes de magnitud⁴⁹. La diferencia del funcionamiento entre SRM y PRM se observa en la

Figura 9.

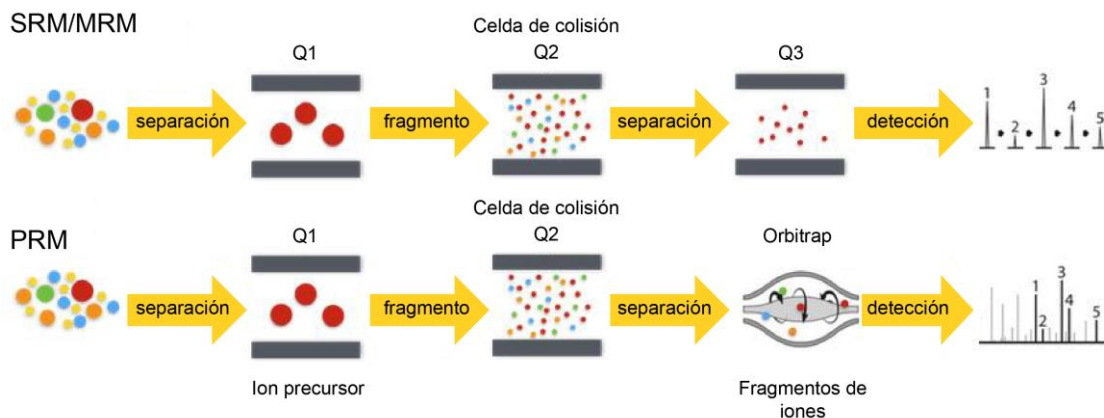


Figura 9. Diferencias y similitudes generales entre el funcionamiento de SRM y PRM. En ambos casos se comparte similitudes como utilizar un Q1 para separar masas, un Q2 como celda de colisión (en el q-OT esto cambia un poco). La diferencia está en que en SRM se utiliza un tercer cuadrupolo para analizar las transiciones, y en PRM se utiliza un *Orbitrap*. Otra diferencia es que en SRM se analizan las transiciones una por una y en PRM todas a la vez por ion precursor, por eso se esquematizan los espectros obtenidos de diferente forma. Imagen modificada de la bibliografía⁴⁹.

El funcionamiento más a detalle del PRM, que se realiza en un q-OT, resulta en utilizar el cuadrupolo como filtro de iones precursores predefinidos que se transfieren, a través de la trampa C (*C-trap*, por su nombre en inglés) a la celda de disociación por colisión inducida de alta energía (HCD, por sus siglas en inglés) para fragmentarse. Luego, los fragmentos iónicos son transferidos de la celda HCD de vuelta a la *C-trap* para que después pasen al analizador

Orbitrap. La HCD es un tipo de tecnología similar a la que se usa en equipos como QQQ o q-TOF que utilizan disociación por colisión inducida (CID, por sus siglas en inglés) para fragmentar iones. La serie de pasos se pueden visualizar mejor en la **Figura 10**.

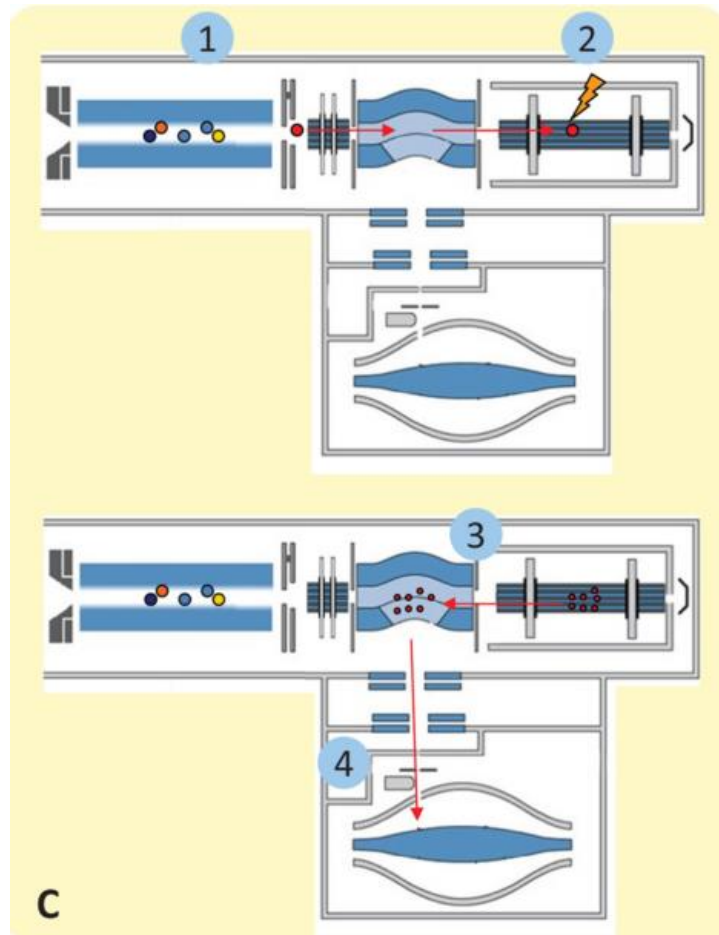


Figura 10. Funcionamiento PRM en un equipo q-OT. En el paso 1) se observa como el Q1 selecciona ciertos iones precursores predefinidos. En el paso 2) los iones precursores pasan a la celda HCD, a través de la C-trap, para que se fragmenten. En el paso 3) los fragmentos vuelven a la C-trap. En el paso 4) los fragmentos pasan de la C-trap al analizador Orbitrap. Fragmento de imagen tomada de la bibliografía ⁵⁰.

1.3.3.1 Aplicaciones de PRM para análisis de modificaciones pos-traducción

Existe una serie de modificaciones que se realizan sobre diferentes proteínas para que manden un tipo de señal específica a nivel celular. Es útil en ocasiones tener esto en cuenta, dado que cierta abundancia de la proteína a analizarse puede estar modificada y tal vez no se llegue a detectar o cuantificar como es debido.

Las glicosilaciones de glicoproteínas de suero son modificaciones que están asociadas con el cáncer y otras enfermedades. La técnica de PRM puede ser usada como un método reproducible y de alto rendimiento para cuantificar estas modificaciones ⁴⁸.

PRM también es útil para estudiar por ejemplo el daño de inflamación aguda ocasionada por diabetes, un estudio ⁵¹ utilizó PRM para cuantificar los niveles de nitración en α -oxoglutarato deshidrogenasa aislada de tejido miocárdial de ratones diabéticos y saludables. Otro ejemplo es otro estudio ⁵² que utilizó PRM para cuantificar los niveles de ubiquitinación de ubiquitina-prolina- β -galactosa (Ub-P- β gal), el cual es un sustrato en la ruta metabólica de la degradación por fusión de ubiquitina. Demostraron que cadenas de ubiquitina unidas por la posición K29 están unidas a Ub-P- β gal.

Si bien no es sencillo detectar cambios precisos en la frecuencia con que se da un tipo de PTM, es muy útil a nivel clínico detectar estas variaciones en proteínas dada su relevancia a nivel de diagnóstico. PRM aparece como una técnica para responder tales necesidades.

1.3.4. Criterios para seleccionar péptidos

Ya sea que se utilice SRM o PRM, existen ciertas condiciones que se tienen que tomar en cuenta antes de escoger un péptido. Como se mencionó brevemente en el **punto 1.3.1**, una buena cuantificación depende de qué tan bien se escojan los péptidos que serán

representantes de la abundancia de la proteína. Los péptidos que siempre suelen observarse por análisis de MS se conocen como péptidos proteotípicos (*proteotypic peptides*, en inglés), dado que por diferentes motivos existen otros péptidos que son más difíciles de observar. Adicionalmente los péptidos proteotípicos deben ser únicos de la proteína de donde vinieron. Esto último se puede verificar fácilmente utilizando BLAST con una base de datos del proteoma humano (si es que se trabaja con humanos), o también ir directo a bases de datos de proteínas donde haya información ya recopilada de la existencia de péptidos proteotípicos para la proteína de interés. Además, si los péptidos proteotípicos son adecuados para una cuantificación, se les llama ahora péptidos cuantotípicos. Por ello, todo péptido proteotípico no necesariamente es cuantotípico, pero sí todo péptido cuantotípico es proteotípico. La clave de llegar a tener péptidos cuantotípicos es que la abundancia medida de estos se pueda correlacionar con la de la proteína.

Algunos criterios para seleccionar péptidos cuantotípicos son ⁴⁸.

- **Longitud del péptido:** Dado que la m/z debe estar dentro del rango de masa del instrumento, se sugiere elegir péptidos entre 8-25 aminoácidos.
- **Particularidad:** Elegir péptidos que sean cuantotípicos con herramientas como BLAST o bases de datos especializadas.
- **Carencia de corte:** Cuando se usa tripsina, se deben seleccionar los péptidos trípticos completos, que son los péptidos que se generan por la acción enzimática de la tripsina. Sin embargo, existen casos como una prolina unida al lado carboxílico de una arginina o lisina, que resulta en un enlace resistente a tripsina. Sin embargo, este efecto es reproducible y se puede continuar sin mucho problema con el proceso de cuantificación.

Se debe evitar terminaciones confusas con series de arginina y lisina como KK, KR, RK, RR.

- **Tipo de modificaciones:** Las modificaciones en aminoácidos pueden alterar el corte efectivo realizado por la enzima. Por ello se debe evitar péptidos que tengan aminoácidos susceptibles a modificaciones químicas durante la preparación de muestra tales como metionina y triptófano que se pueden oxidar; asparagina y glutamina pueden sufrir una de-amidación; glutamato y glutamina se pueden ciclar para convertirse en piroglutamato. También, se debe evitar péptidos con sitios de PTM (fosforilación, N-glicosilación, acetilación). En el caso de que no se pueda evitar, las modificaciones se pueden considerar para el modelo de cuantificación siempre que las modificaciones sean reproducibles y consistentes a lo largo de distintas muestras. Un ejemplo son los péptidos que contienen cisteína, la cual es sensible a la reducción y alquilación, lo cual es tan común que en los estudios proteómicos se analiza como parte del procedimiento estándar.
- **Carga del precursor:** Se debe seleccionar la carga del péptido que se fragmente mejor y consiga mediciones con alta sensibilidad. Conviene precursores con carga 2+ o 3+.

Se debe tener en cuenta que la carga del péptido puede diferir cuando se encuentra en una matriz compleja cuando se encuentra puro.

Se debe evitar la histidina porque confiere múltiples cargas a los precursores y transiciones por ser sensible al pH.
- **Pico cromatográfico:** La forma de los picos debe ser simétrica y estrecha. Si hay opción de seleccionar múltiples péptidos, es conveniente que tengan tiempos de retención distintos.
- **Intensidad de señal:** El péptido se debe ionizar eficientemente y tener una intensidad estable

1.3.5. Consideraciones para la cuantificación de proteínas por espectrometría de masas

A lo largo de toda la bibliografía científica, concerniente a la cuantificación de proteínas utilizando MS, existen distintos diseños de protocolos de cuantificación debido a la variedad de contextos de estudio. Es importante considerar factores como **1)** el origen, manipulación y tratamiento de muestras, **2)** cantidad de proteínas que se requiere analizar para el estudio y **3)** precisión con la que se desea cuantificar las proteínas, para entender los diferentes contextos en los cuales se hace necesario cuantificar.

A pesar de toda la diversidad, se logra sistematizar todos los métodos en cuatro formas generales de cuantificación, dependiendo si se desea cuantificar de manera relativa o absoluta y si se usa marcaje isotópico o sin marcaje (ver **Tabla 5**).

Tabla 5. Resumen de las 4 formas generales de cuantificar proteínas utilizando MS.

Técnicas de cuantificación de proteínas		
	Relativa	Absoluta
Sin marcaje isotópico ("label-free")	Comparación directa entre 2 muestras en las que se mide la intensidad de la o las señales	Se utiliza una curva de calibración (estándar) por proteína o proteoma TopN IBAQ APEX NSAF SCAMPI
Con marcaje isotópico ("label-based")	1) Marcaje metabólico SILAC 15N-Labeling	Se introducen estándares marcados 1) Péptidos sintéticos AQUA
	2) Etiquetar por reacciones químicas Dimethyl-labeling iCAT TMT iTRAQ	2) Péptidos concatenados QconCAT
	3) Introducir estándares marcados Péptidos sintéticos Estándares de proteínas	3) Proteínas marcadas PSAQ

Las cuantificaciones relativas se caracterizan por utilizar dos o más muestras para compararlas entre sí, y de tal manera obtener una conclusión sobre el contexto en el que se trabaja. Por ejemplo, si se tiene una muestra de un paciente enfermo (muestra problema) y otra muestra control, ambas se analizarían y se compararía la intensidad de las señales de ambas para sacar una proporción. Cuando no se utiliza marcaje isotópico, la comparación es directa. Cuando se utiliza marcaje isotópico, se facilita la detección del analito de interés en la muestra control dado que usualmente se introduce el analito marcado y se compara la intensidad de las señales entre el analito marcado y no marcado. Luego, se realiza lo mismo para una muestra problema o de un paciente enfermo, y se compara las relaciones entre control y enfermo. El analito marcado se debe introducir en igual proporción en la muestra control y la muestra problema.

Las cuantificaciones absolutas se caracterizan por utilizar una muestra o más, y también el uso de estándares de algún tipo para asegurar la correcta cuantificación. En el caso de las cuantificaciones sin marcaje, lo que se suele hacer es preparar una curva de calibración de referencia por proteína o proteoma. Para el caso de cuantificación con marcaje se realiza lo mismo que se mencionó en el ejemplo de cuantificación relativa con marcaje, pero esta vez conociendo la concentración del analito marcado. Esto último se puede apreciar mejor en la

Figura 11.

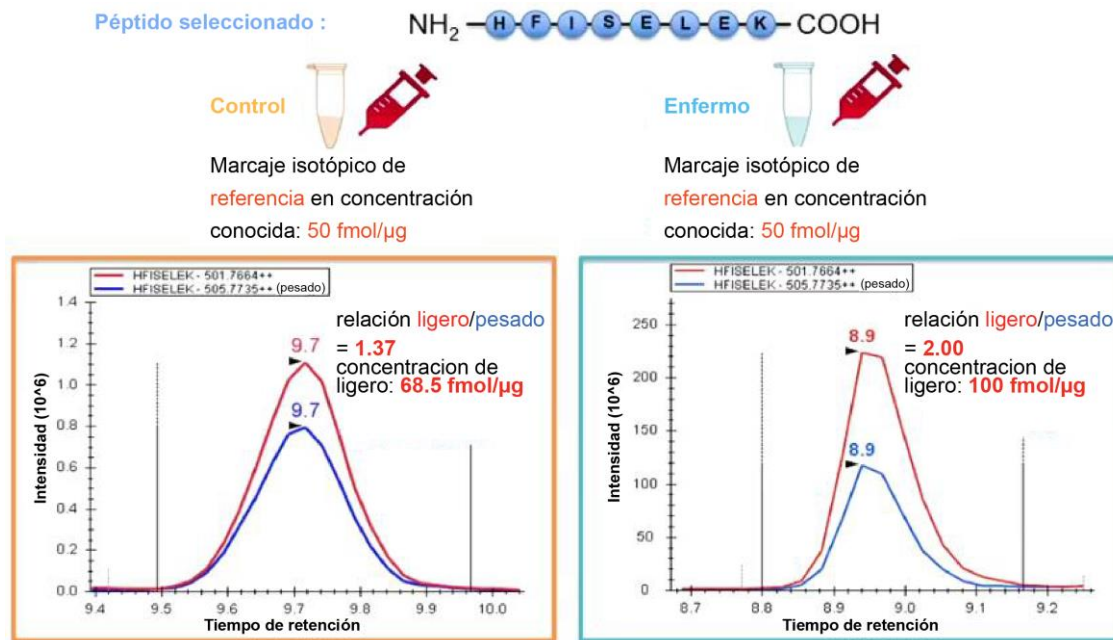


Figura 11. En este caso se escoge un péptido en específico el cual se va a marcar y se va a agregar en igual cantidad a la muestra control (naranja) y a la muestra del paciente enfermo (celeste). Al comparar la intensidad del péptido de origen endógeno (rojo) con el péptido marcado (azul), se obtiene una relación que luego se puede transformar en concentración. Imagen modificada de la charla de Tina Ludwig⁵³.

Todo aquel que desee realizar una cuantificación absoluta debe tener en cuenta que utilizar péptidos marcados es en efecto más preciso que utilizar métodos sin marcaje, pero que el costo del proyecto asciende por péptido que se requiera comprar. Lo cual limita el alcance si por ejemplo se deseara analizar 100 proteínas en un mismo experimento.

Las cuantificaciones absolutas con marcaje se suelen utilizar 1) si se desea descubrir o desarrollar un biomarcador, 2) si se tiene relaciones estequiométricas complejas entre diferentes proteínas, 3) en la industria farmacéutica para el control de calidad, análisis terapéuticos, seguridad de alimentos, exámenes de drogas en deportes.

Las cuantificaciones absolutas sin marcaje se suelen utilizar 1) para el modelado matemático de constantes de velocidad o flujos cinéticos, 2) comparación cruzada de datos como inter-experimental, inter-laboratorio, inter-organismo, inter-plataforma, entre otros⁵³.

1.3.6. Herramientas bioinformáticas para la identificación y cuantificación de proteínas por espectrometría de masas

El análisis de datos producidos por metodologías basadas en MRM o PRM es complejo y toma tiempo si es que se realiza de forma manual, por lo que diferentes empresas y entidades han creado paquetes informáticos ⁵⁴ para facilitar el trabajo de identificación y procesamiento de los resultados.

MRMPilot es un software comercial desarrollado por AB Sciex capaz de diseñar ensayos a partir de espectros existentes o a partir de predicción de espectros basados en propiedades químicas de péptidos. Los ensayos son capaces de medir modificaciones químicas, PTM o marcaje isotópico.

Puede desarrollar ensayos iterativos que utilizan los resultados experimentales en los que también se guarda y organiza tal información.

MRMaid es un software virtual que utiliza espectros de la base de datos de EBI's PRIDE y la información proteómica de UniProt para sugerir un ensayo para una proteína en específico. Los resultados de las bases de datos pueden ser filtrados por tipo de instrumento, aminoácido, valor de transición, máximo número de péptidos por proteína y máximo número de transiciones por péptido. No está diseñado para la creación de ensayos con PTM.

Pinpoint es un software desarrollado por ThermoScientific que simplifica la creación de ensayos cuantitativos focalizados a través de su sistema de monitoreo de reacción selectiva inteligente (iSRM, por sus siglas en inglés). Los ensayos de iSRM permiten coleccionar un primer set de transiciones para la cuantificación e instantáneamente desencadenar un segundo

set de transiciones para asegurar la identificación del péptido, a un corto tiempo de permanencia sin incrementar notoriamente los ciclos de análisis. El desarrollo del método es de carácter iterativo ya que la información recopilada se utiliza luego para refinar el método, similar a MRMPilot.

ATAQS es un software que funciona a través de módulos para diseñar, administrar, analizar y validar un ensayo MRM. El diseño modular permite que los usuarios tengan mayor control y que además puedan agregar complementos informáticos para personalizar sus algoritmos de análisis. Permite a múltiples usuarios trabajar en un proyecto a la vez conectados por la Web. Utiliza servicios Web como PeptideAtlas, TIQAM, PIPE2 y PABST para la selección de espectros, transiciones y optimizaciones. Adicionalmente utiliza mProphet para validar las transiciones seleccionadas para asegurar la correcta identificación de la proteína de interés.

MassHunter Optimizer es un software comercial diseñado por Agilent para un sistema de triple cuadrupolo LC-MS, que permite identificación rápida y sensitiva a través de su sistema de monitoreo de reacción múltiple disparado (tMRM, por sus siglas en inglés). El tMRM es una forma más sensitiva que el MRM convencional debido a que solo el primer cuadrupolo está establecido para monitorear un péptido deseado hasta su detección, después de lo cual se activa el monitoreo de las transiciones.

También permite optimizar la energía de colisión y optimizar la selección de las mejores transiciones acorde a los datos empíricos generados.

TargetLynx™ Application Manager es un software de la corporación Waters que automatiza la adquisición de datos de muestras, el procesamiento y presentación de resultados cuantitativos.

Puede marcar picos que superan cierto límite, dentro de una ventana de m/z. También puede marcar datos que no satisfacen criterios de control de calidad.

Proteome Discoverer es un software desarrollado por ThermoFisher que provee de una selección de algoritmos como SEQUEST: Mascot, MS Amanda, Byonic, ProSightPD, que se pueden combinar para maximizar una validación cruzada de resultados. Tiene soporte para distintas técnicas de disociación como CID, HCD y la disociación por transferencia electrónica (ETD, por sus siglas en inglés) para mayor cobertura e identificación correcta de PTM. Tiene soporte para técnicas de marcaje isotópico como también para técnicas de cuantificación libres de marcaje isotópico. Incorpora un sistema de validación de proteínas y péptidos basada en la determinación de la tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés)⁵⁵.

Skyline (<https://skyline.ms/project/home/begin.view>) es un software gratuito creado especialmente para facilitar el trabajo de la proteómica focalizada (*Targeted proteomics*, en inglés), la cual realiza estudios sobre proteínas de las cuales ya se conoce cierta información, y lo que se desea es desarrollar o mejorar métodos de cuantificación, monitoreo e interacción. Funciona para realizar métodos de SRM, PRM o DIA/SWATH. En los cuales sirve para crear datos de entrada del espectrómetro de masas y facilitar la comprensión de los datos de salida. Un ejemplo es utilizar este software para generar la lista de péptidos resultantes después de cortar enzimáticamente a la proteína con tripsina, después realizar una serie de experimentos para generar información de los resultados e importar esta información que salió del instrumento nuevamente a Skyline para seleccionar, refinar u optimizar los parámetros del experimento para así generar un método de cuantificación robusto. Este tipo de parámetros

podrían ser aquellos que se mencionaron en el **punto 1.3.3** para escoger a los mejores péptidos proteotípicos para representar a la proteína de interés.

Se podría resumir el uso de Skyline como una herramienta bioinformática de uso cíclico en la que se reciben datos constantemente para generar nuevas propuestas en la optimización de un método de cuantificación. Como se observa en la **Figura 12**, primero se empieza por la detección de una variedad de proteínas, péptidos y transiciones, en la cual se realizaron una serie de métodos para encontrar las condiciones óptimas de los parámetros en el sistema LC y MS, como también seleccionar los mejores candidatos resultantes de una serie de procesos de refinamiento. Segundo, viene un análisis diferencial en que se realiza una serie de repeticiones para probar la reproducibilidad del método. En este paso también se pueden volver a seleccionar nuevos mejores candidatos y eliminar otros que no se ajustan con las condiciones. Finalmente, viene el paso de validación en que se obtiene un método lo suficientemente robusto para realizar la investigación de interés.

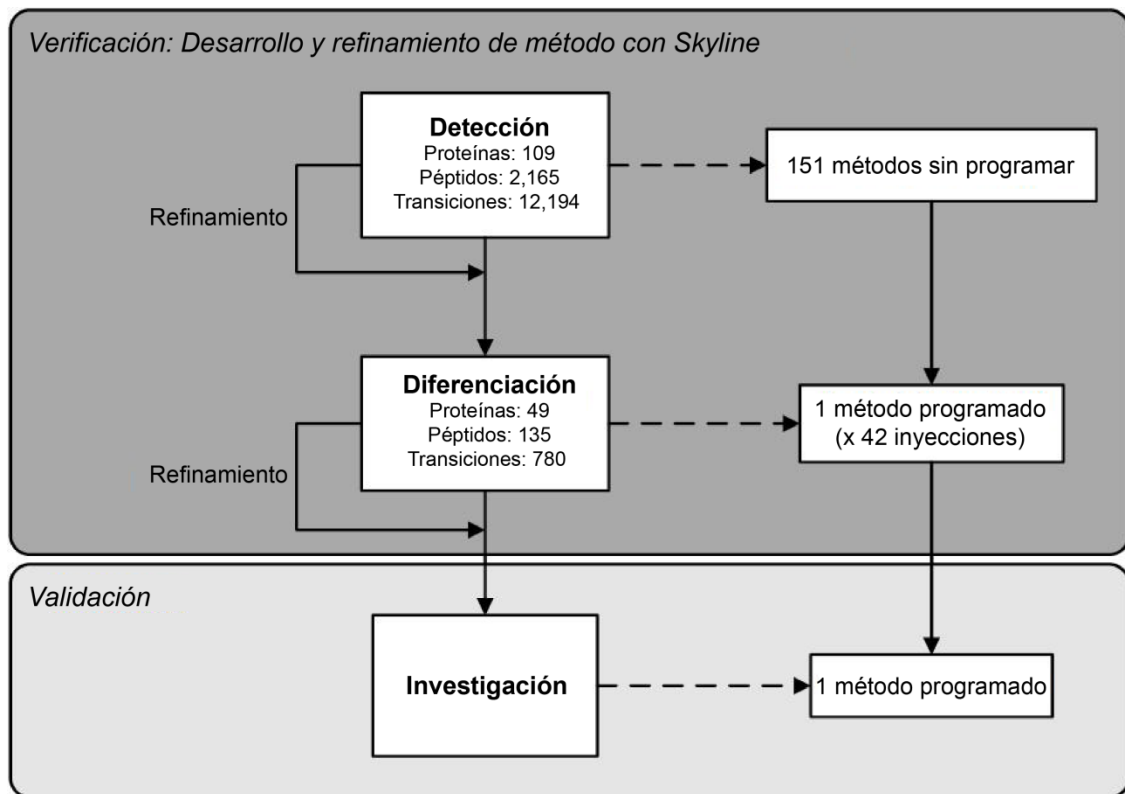


Figura 12. Diagrama que explica la secuencia cíclica para obtener un método de investigación. Se comienza por la detección de una variedad de proteínas, péptidos y transiciones. Luego se pasa al análisis diferencial de los mejores candidatos y finalmente se llega a la investigación. Imagen modificada de los tutoriales virtuales de Skyline.

2. Justificación

A nivel global el tratamiento de heridas y en especial el de heridas crónicas lleva a grandes costos por parte del sistema clínico. Se ha estimado que una simple úlcera diabética puede llegar a costar US\$50,000 en su tratamiento, mientras que el tratamiento de las heridas crónicas en general llega a escalar a los US\$25 billones por año, con un aumento progresivo de pacientes de actualmente 6.5 millones cada año. Este incremento se debe en gran proporción al aumento de la prevalencia de enfermedades crónicas que afectan los procesos de cicatrización saludables^{19,56}.

En los últimos años, el Perú ha sufrido una transición epidemiológica en cuanto a los perfiles de mortalidad, de manera que si en 1996 las causas predominantes de mortalidad se atribuían a enfermedades infecciosas, después del año 2000 se ha incrementado la contribución de enfermedades no contagiosas y heridas ⁵⁷. Existe una amplia oferta y desarrollo tecnológico ⁵⁸ de apósitos cutáneos que, si bien tienen ventajas cuando se trata de heridas profundas o complicadas por altos riesgos de infección, su esfuerzo por cubrir y mantener la esterilidad de la herida por largos periodos dificulta los procesos naturales de cicatrización de heridas superficiales que solamente comprometen las primeras capas de piel de personas inmunocompetentes. Los apósitos y procedimientos existentes en el mercado para el manejo de heridas superficiales, ya sea por quemaduras, lesión por accidentes de tránsito o heridas crónicas de origen con o sin compromiso vascular, basan su acción fundamentalmente en la cobertura y no discriminan según la gravedad de la herida o el estado del paciente.

Personas con secuelas de heridas superficiales de la piel que se convierten en difíciles de curar ocupan más del 50% de las camas hospitalarias, lo que se traduce en costos y costes hospitalarios innecesarios si se hubieran tratado rápidamente. Además, dado el tiempo de cicatrización de estas heridas ocurre una baja laboral e incapacidad que puede resultar en un proceso tedioso para el paciente. Los procedimientos actuales para tratar heridas de difícil resolución pueden ser largos, inefectivos, e innecesariamente costosos, cruentos y dolorosos. Por ejemplo, para tratar heridas recalcitrantes de pie diabético, el tiempo de hospitalización oscila entre 7 y 45 días, y pueden haber 1 ó 2 reingresos por la misma lesión con probabilidades de cura definitiva muy baja, en contraste con heridas superficiales.

Toda la problemática en tratamientos y costos mencionada, lleva a proponer en este trabajo un protocolo de análisis por espectrometría de masas que pudiese ayudar en la detección rápida y confiable de los niveles de factores de crecimiento en plasma sanguíneo. Como se explicó detalladamente en el **punto 1.1.3.** del Estado del Arte, los factores de crecimiento son

agentes importantes en la regulación de los procesos de cicatrización, y se asume que su adecuada concentración en sangre es importante para mantener un proceso saludable de cicatrización con la respectiva sucesión de pasos sin impedimento. Los resultados de este trabajo permitirán que se generen datos que indiquen los valores referenciales de algunos factores de crecimiento en población saludable y con morbilidad, de manera rápida y robusta.

3. Objetivos

3.1. Objetivo General

Diseñar e implementar un protocolo basado en cromatografía líquida y espectrometría de masas para medir proteínas de interés para la medicina regenerativa tales como el Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas, Factor de Crecimiento Epidérmico y Adiponectina.

3.2. Objetivos Específicos

- Caracterización *in silico* de los patrones de fragmentación tróptica de péptidos de las proteínas: EGF, PDGF y Adiponectina.
- Caracterización de los parámetros de análisis instrumental de un primer método de identificación de las proteínas.
- Caracterización de los parámetros de análisis instrumental de un segundo método de cuantificación de las proteínas.
- Validación del método elaborado para muestras sin matriz.

4. Parte experimental

4.1. Metodología

En este estudio se ha escogido utilizar una estrategia de cuantificación absoluta sin marcaje isotópico. Se utilizarán estándares de las proteínas seleccionadas, se digerirán, y a partir de esto se realizará una curva de calibración por proteína.

Para la selección de proteínas en este estudio se toma en cuenta poseer la mayor cantidad de información posible de estas en las bases de datos y que tengan cierta importancia clínica relacionada al proceso de cicatrización de heridas.

Las proteínas escogidas para el estudio son EGF, PDGF y Adiponectina. Adicionalmente se utiliza dos estándares de Albumina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés), un estándar de la proteína completa para digerirla, y un estándar comercial de la proteína ya digerida. Esto se hace debido a que digerir BSA es relativamente sencillo de digerir y se puede comparar la digestión propuesta en este estudio con una digestión hecha a nivel comercial para LC-MS.

Control de calidad de pureza de las proteínas por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico

Para asegurar que las proteínas estén altamente puras y sin degradación, se utiliza la electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés). El SDS-PAGE es un método electroforético en gel que consiste en separar a las proteínas de acuerdo a su movilidad iónica en una diferencia de voltaje. Debido a que las

proteínas poseen un punto isoelectrico distinto, se utiliza SDS para desnaturalizar estructuras terciarias y concederle carga negativa a la proteína proporcionalmente a su tamaño. De esta manera, la separación se puede estimar que sea en relación al tamaño.

El gel de poliacrilamida se divide en una parte superior llamada gel de apilamiento, que consiste en ~16% de todo el gel, y una parte inferior llamada gel de resolución, que consiste en ~84% de todo el gel. El gel de apilamiento sirve para colocar a todas las proteínas a un mismo nivel y de esta manera poder asegurar que al momento de la corrida todas comiencen a una misma altura. El gel de resolución por otro lado sirve para la separación misma de las proteínas debido a una diferencia de voltaje aplicada de extremo a extremo de la cámara electroforética.

Preparación de gel de resolución (18% de acrilamida)

Preparación de Stock de 5 mL (utilizable solo para 1 gel):

- 600 µL de agua Milli-Q
- 3 mL de 30% acrilamida
- 1.3 mL de Tris pH 8.8
- 50 µL de 10% SDS
- 50 µL de 10% APS
- 2 µL de TEMED (agregado al último y al instante que se va a preparar el gel)

Preparación de gel de apilamiento (5% de acrilamida)

Preparación de Stock de 1 mL (utilizable para solo 1 gel):

- 680 µL de agua Milli-Q
- 170 µL de 30% acrilamida

- 130 μ L de Tris pH 6.8
- 10 μ L de 10% SDS
- 10 μ L de 10% APS
- 1 μ L de TEMED (agregado al último y al instante que se va a preparar el gel)

∴ La solución de acrilamida para el gel de resolución y apilamiento es una relación 29:1 de acrilamida / bisacrilamida.

Preparación de buffer de muestra

Preparación de Stock 5X:

- 250 mM Tris-HCl pH 6.8
- 200 mM DTT
- 10% w/v SDS
- 50% v/v glicerol
- 0.5% w/v azul de bromofenol

Preparación de buffer de corrida

Preparación de Stock 10X a pH 8.3:

- 3% w/v Tris-HCl
- 1% w/v SDS
- 14.4% w/v glicerol

∴ El stock 10X se guarda a temperatura ambiente, y al momento de su uso se diluye hasta 1X.

Preparación de muestras

Preparación de muestras en pozos de 25 mL:

- Se utiliza 20 μ L de muestra de proteína + 5 μ L de buffer de muestra

Proceso de electroforesis

Preparación de la cámara electroforética vertical para solo un gel:

- a) Primero se debe ajustar las dos placas de vidrio y asegurarse que no tiene fugas.
- b) Se coloca los 5 mL del gel de apilamiento.
- c) Se cubre la superficie con un poco de isopropanol y agua para evitar la entrada de aire.
- d) Se deja por diez a veinte minutos que polimerice la acrilamida.
- e) Se retira el isopropanol y agua.
- f) Se agrega 1 mL del gel de apilamiento.
- g) Se cubre la superficie con un peine para crear los pozos en el gel.
- h) Se deja por diez a veinte minutos que polimerice la acrilamida.
- i) Se quita el peine para utilizar el gel. En caso se desee guardar el gel, se debe guardar con un poco de agua y con el peine puesto por un máximo de dos semanas.
- j) Se agrega el buffer de corrida hasta donde indique las especificaciones de la cámara para un gel.

Parámetros de la corrida electroforética:

- a) Para pozos de 25 mL, se coloca una muestra por pozo y adicionalmente se coloca entre 5 a 10 mL de estándar en uno de los pozos.
- b) Se conecta la cámara a la fuente de voltaje.
- c) Se apilan todas las proteínas por unos veinte minutos a 60 V constante.

- d) Se separan las proteínas por dos a tres horas a 120 V constante.

Procedimiento para teñir el gel

Preparación de Stock de 1 L:

- 500 mL metanol
- 100 mL ácido acético glacial
- 400 mL agua Milli-Q
- 1.25 g de azul de Coomassie

Procedimiento para desteñir el gel:

- a) Se coloca el gel en un contenedor y se vierte solución para teñir hasta cubrir el gel por completo.
- b) Se deja el contenedor en un agitador y se deja sobrenoché
- c) Al día siguiente se descarta la solución y se procede a desteñir.

Procedimiento para desteñir el gel

Preparación de Stock de 1 L:

- 100 mL metanol
- 100 mL ácido acético glacial
- 800 mL agua Milli-Q

Procedimiento para desteñir el gel:

- a) Se coloca el gel en un contenedor y se vierte solución para desteñir hasta cubrir el gel por completo.
- b) Se calienta el contenedor en el microondas por 45 segundos a una potencia estándar de 100 W.
- c) Se coloca el contenedor en un agitador por 10 minutos
- d) Se repite el paso b) y c) por tres a cuatro veces hasta observar que las bandas en el gel se visualicen claramente. Si se desea, después de tres repeticiones, se puede remover la solución para desteñir y colocar nueva.
- e) Se descarta la solución para desteñir y se vierte agua Milli-Q.
- f) El gel se debe guardar en solución para evitar que se seque y se deteriore. Se puede guardar en agua Milli-Q o en algún buffer adecuado.

∴ En caso no se use microondas, se deberá realizar agitación constante por más tiempo hasta observar un desteñido claro del gel.

Etapas para establecer un protocolo de tratamiento de muestra

1. Desnaturalización, reducción y alquilación de proteínas para su digestión

Primero, las proteínas se desnaturalizan para parcialmente eliminar las estructuras terciarias y cuaternarias. Los agentes comunes de desnaturalización suelen ser el calor, urea o detergentes como el dodecil sulfato de sodio. En este estudio se utiliza desoxicolato de sodio (DOC, por sus siglas en inglés) en solución como detergente desnaturalizante dado que parece tener

mejores resultados en protocolos de digestión ⁵⁹. Además, se procura evitar situaciones como la degradación de urea en cianato de amonio debido al calor, que lleva a la carbamilación de aminas primarias en las proteínas, y que el dodecil sulfato de sodio suele tener problemas para removerse de las columnas cromatográficas de fase reversa.

Segundo, las proteínas se reducen en solución usando ditioneitol (DTT, por sus siglas en inglés) para la reducción de los puentes disulfuro.

Tercero, los grupos sulfhídricos libres de los residuos de cisteína se alquilan con yodoacetamida (IAA, por sus siglas en inglés) como manera definitiva para prevenir que se vuelvan a formar los puentes disulfuro, los cuales suelen darle una sólida estructura terciaria a las proteínas ⁶⁰.

El mecanismo de reducción por DTT y alquilación por IAA se pueden ver en la **Figura 13**.

El análisis de proteínas se facilita y se vuelve más certero si se realiza sobre péptidos que provienen de tales proteínas. Por esto, se suelen realizar diversos procesos de digestión, en los cuales se utilizan endoproteasas que poseen distintos niveles de especificidad. Muchas proteínas suelen ser resistentes a la proteólisis enzimática si es que se trabaja bajo condiciones no desnaturalizadas o también tienden a no ser solubles en agua ⁶¹. En este estudio se planea utilizar tripsina, la cual trabaja óptimamente a un pH de 8, y temperatura de 37°C, y la cual corta específicamente en el extremo carboxilo de los aminoácidos lisina (K) y arginina (R).

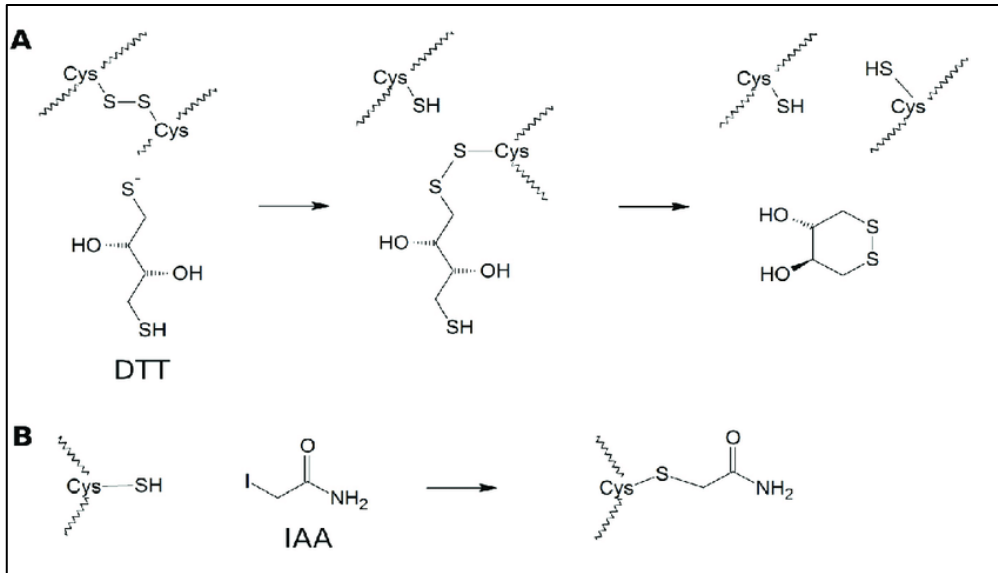


Figura 13. En la parte A se muestra la reacción del DTT sobre un enlace sulfhídrico de dos cisteínas. En la parte B se muestra la reacción del IAA sobre la cisteína reducida. Imagen de la bibliografía ⁶².

Se desea la siguiente concentración de los reactivos durante cada etapa específica de sus reacciones:

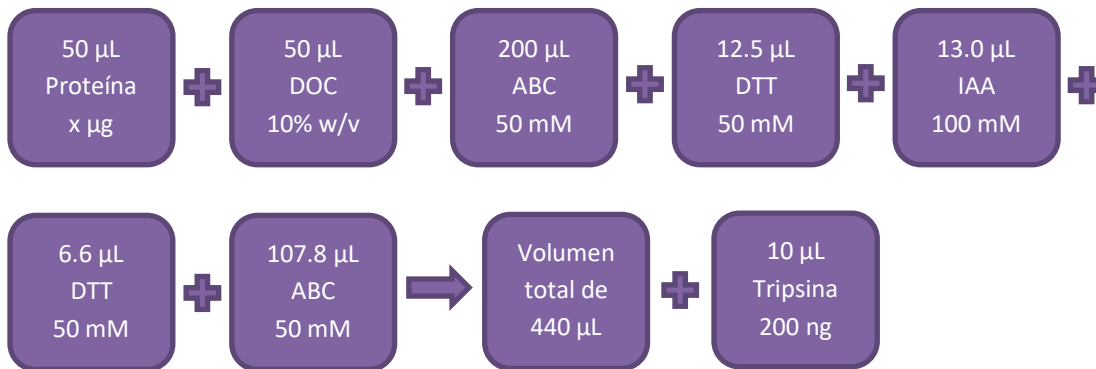
DOC: 5% w/v (desnaturalización)

DTT: 20 mM (reducción)

IAA: 40 mM (alquilación)

DTT: 10 mM (cese de reacción o “*quenching*”)

El protocolo utilizado es el siguiente:



- Se agrega 50 µL de DOC 10% w/v al vial que contiene 50 µl con x µg de proteína, ver la **tabla 6**. Se agita a 250 RPM a 25°C por 10 minutos.
- Se agrega 200 µL de ABC 50 mM. Se agita a 250 RPM a 25°C por 5 minutos.
- Se agrega 12.5 µL de DTT 50 mM. Se agita a 250 RPM a 60°C por 60 minutos.
- Se trabaja a oscuras y se agrega 13.0 µL de IAA 100 mM. Se agita a 250 RPM a 25°C por 30 minutos.
- Se agrega 6.6 µL de DTT 50 mM. Se agita a 250 RPM a 25°C por 5 minutos.
- Se agrega 107.8 µL de ABC 50 mM. Se agita a 250 RPM a 25°C por 5 minutos.
- Se agrega 10 µL con 200 ng de tripsina. Se agita a 250 RPM a 37°C por 16 horas.

2. Limpieza de péptidos

Cuando la digestión se completa óptimamente, la muestra tiene los péptidos deseados, pero la solución aún sigue teniendo muchas sustancias que pueden interferir al momento de realizar la medición. Por ello, la muestra se limpia para separar los péptidos de los diferentes componentes con métodos como precipitación de péptidos, separación en dos fases, columnas de desalinización, columnas de fase sólida, entre otras técnicas disponibles en el mercado. En

este trabajo se planea utilizar columnas C18 de ThermoScientific para la limpieza específica de péptidos.

Se realiza una limpieza de la muestra previamente a la inyección del nanoLC con columnas Spin C18 según la guía de uso de tales columnas ⁶³. Un resumen de los pasos se puede apreciar en la **Figura 14**.

A. Activación de la columna

1. Dar un pequeño golpe a la columna para asentar la resina. Quitar la tapa superior e inferior. Colocar la columna en un tubo Eppendorf de 2 mL.
2. Añadir 200 μ L de la solución de activación para humedecer la resina.
3. Centrifugar a 1500 x g por 1 minuto. Descartar el flujo.
4. Repetir el paso 2 y 3.

B. Equilibrar la columna

1. Añadir 200 μ L de solución de equilibrio
2. Centrifugar a 1500 x g por 1 minuto. Descartar el flujo.
3. Repetir el paso 1 y 2.

C. Enlazar la muestra

1. Cargar de 10-150 μ L de muestra encima de la resina.
2. Centrifugar a 1500 x g por 1 minuto.
3. Para asegurar que se enlace correctamente la muestra a la resina, recuperar el flujo y repetir el paso 1 y 2.

D. Lavar

1. Añadir 200 μL de solución de lavado.
2. Centrifugar a 1500 x g por 1 minuto. Descartar el flujo.
3. Repetir el paso 1 y 2.

E. Eluir

1. Colocar la columna en un nuevo tubo Eppendorf.
2. Añadir 20 μL de buffer de elución.
3. Centrifugar a 1500 x g por 1 minuto.
4. Repetir el paso 2 y 3.
5. Gentilmente se seca en un concentrador a vacío por 10 minutos a 30°C.
6. Se redissuelve la muestra con 500 μL de agua con 0.1% de FA.

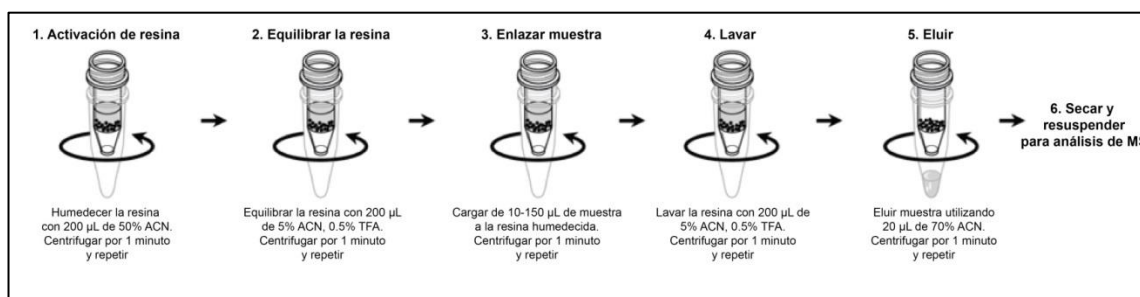


Figura 14. Resumen de pasos para utilizar las columnas Spin C18. Modificado de la bibliografía ⁶³.

Etapas para establecer un protocolo instrumental

Inicialmente se puede inyectar la muestra digerida y limpia directamente al espectrómetro de masas por la fuente de ionización de electro spray calentado (HESI, por sus siglas en inglés) para optimizar los parámetros instrumentales de adquisición del espectrómetro para la matriz

de la muestra, y para observar de manera rápida si se obtuvo digestión, sin importar el rendimiento de digestión.

Luego se propone realizar como primer acercamiento un DDA (ver **punto 1.3.1.**) para hacer una visualización general de todo lo que se va a obtener a partir de la muestra (identificación rápida). Esta modalidad consiste en separar los péptidos a través de LC y luego analizar las señales más resaltantes por MS/MS (ver **punto 1.3.5.**).

1. Análisis con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) para verificar la digestión de BSA.

Las muestras para análisis con MALDI se prepararon de la siguiente manera:

- 1) Se diluyó cada muestra en una proporción de 1:10 con 50%/50% Agua/ACN.
- 2) Se tomó 5 μL de tal dilución y se mezcló con 5 μL de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico.
- 3) Se tomó 1 μL de la mezcla del paso 2) y se coloca sobre la placa metálica para MALDI.
- 4) Para acelerar la cristalización en la placa, se aplica ligeramente nitrógeno gaseoso puro.
- 5) El análisis se realiza por 1 minuto aproximadamente.

Finalmente, cuando ya se tenga mayor conocimiento de las señales esperadas se puede realizar una cuantificación por PRM para cuantificar los péptidos de interés.

Esta última parte debe ser refinada con ayuda de Proteome Discoverer y Skyline (ver **punto 1.3.6.**) para obtener un método adecuado a las necesidades del estudio.

2. Análisis por nano-cromatografía líquida

Las siguientes condiciones se han descrito para la elución de péptidos en un cromatógrafo Easy nLC-1200 con una columna C18 100 Å, 2 µm, 150 mm x 75 µm.

Se utilizará una fase móvil A (MPA) de agua con 0.1% de ácido fórmico (FA, por sus siglas en inglés) y una fase móvil B (MPB) de 90% acetonitrilo (ACN, por sus siglas en inglés). Adicionalmente, se revisa el funcionamiento del equipo con parámetros como purgar el solvente; la revisión del flujo de aire; el equilibrio de columna analítica, que es importante para que se cree un correcto flujo laminar, como también para que el eluyente limpie todo posible material residual y formación de burbujas; revisión del flujo isocrático; y el acondicionamiento de la columna.

3. Análisis por espectrometría de masas

Las siguientes condiciones se han descrito para un espectrómetro Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap.

Cuando se desee realizar una cuantificación por el método de PRM se van a necesitar ciertos parámetros conocidos para indicarle al espectrómetro de masas qué buscar. En la **Figura 15**, se pueden observar algunos de ellos. En rojo, se marca el código que identifica a cada proteína; en morado se escribe la secuencia completa del péptido tríptico; en verde se

especifica el m/z del precursor y de cada fragmento del precursor, las cargas del precursor y de cada fragmento, el tipo de ion que va a ser el fragmento, y la intensidad de tal fragmento; en naranja se tiene el tiempo de permanencia (“*dwell time*” en inglés), el cual es el tiempo que el espectrómetro de masas va a analizar un fragmento en específico, y la energía de colisión que es la necesaria para fragmentar al péptido; finalmente en azul está el tiempo de retención normalizado del péptido, el cual es un tiempo normalizado para todo instrumento que se utiliza para comparar los resultados de un experimento, con los resultados de otro en otras condiciones (dado que cada columna cromatográfica y las condiciones que se le den al equipo afectan al tiempo de retención).

Una vez que se tengan identificados todos los parámetros de los péptidos de interés, los resultados se pueden comparar con las bases de datos para corroborar que se obtuvo lo que se buscaba.

Péptidos		Parámetros operacionales del espectrómetro de masas								
Proteína	Secuencia de péptido	Precursor m/z	Fragmento m/z	Carga de precursor	Carga de fragmento	Tipo de fragmento iónico	Intensidad de fragmento %	Tiempo de permanencia ms	Energía de colisión	Tiempo normalizado de retención de péptido
Q0045	SVIYNKAPDFVESNTIFNLNTVK	871.7902	948.5513	3	1	y8	100	40	28.5	88.2
Q0045	SVIYNKAPDFVESNTIFNLNTVK	871.7902	835.4672	3	1	y7	83	40	28.5	88.2
Q0045	SVIYNKAPDFVESNTIFNLNTVK	871.7902	776.4330	3	1	b7	62	40	28.5	88.2
Q0045	SVIYNKAPDFVESNTIFNLNTVK	871.7902	1135.5782	3	1	b10	58	40	28.5	88.2
Q0140	IGPAGNIINNK	499.2749	414.2221	2	2	y8	100	40	22.1	-13.8
Q0140	IGPAGNIINNK	499.2749	730.3842	2	1	y7	77	40	22.1	-13.8
Q0140	IGPAGNIINNK	499.2749	442.7329	2	2	y9	12	40	22.1	-13.8
Q0140	IGPAGNIINNK	499.2749	659.3471	2	1	y6	55	40	22.1	-13.8
Q0140	LLNMILSMMNK	654.3478	723.3528	2	1	y6	98	40	24.7	33.5
Q0140	LLNMILSMMNK	654.3478	1081.5203	2	1	y9	100	40	24.7	33.5
Q0140	LLNMILSMMNK	654.3478	836.4369	2	1	y7	14	40	24.7	33.5
Q0140	LLNMILSMMNK	654.3478	523.2367	2	1	y4	55	40	24.7	33.5

Proteínas

Diseño espectrométrico

Tiempo de retención de péptidos (IRT)

- Precursor m/z
- Fragmento m/z
- Información adicional sobre precursores y fragmentos

Figura 15. Cuadro que resume los parámetros necesarios y opcionales que recibe el espectrómetro de masas para un experimento del tipo SRM o PRM. En rojo está el código de la proteína, en morado la secuencia del péptido, en verde y naranja los parámetros MS (ambos necesarios), y en azul el tiempo normalizado de retención de cada péptido. Imagen modificada de la charla de Christina Ludwig⁶⁴.

4. Preparación de curvas de calibración

Una vez se complete y optimice el protocolo de tratamiento de muestra y el protocolo instrumental, lo siguiente es preparar una curva de calibración por proteína. Esto se hace debido a que este método experimental de cuantificación absoluta sin marcaje isotópico en específico lo requiere, no en todos los métodos es necesario preparar curvas de calibración. Generalmente estas curvas se realizan variando la concentración inicial de la proteína durante el tratamiento de muestra o durante la elución en el sistema LC al indicarle que disminuya la concentración de la muestra. Al variar la concentración, se crean puntos que se pueden medir en dos dimensiones graficando intensidad de la señal (eje vertical) y la concentración (eje horizontal), como se observa en la **Figura 16**, las cuales son curvas de calibración sacadas de la bibliografía. Para lograr armar la curva por proteína, se tendrá que armar curvas de calibración para cada péptido elegido de esa proteína. Además, se debe tener en cuenta que el rango lineal y la concentración de cada péptido va a variar por diferentes razones: eficiencia de digestión enzimática, recuperación durante la preparación de muestra, ionización del péptido, efectos de matriz y propiedades específicas de la detección por MS.

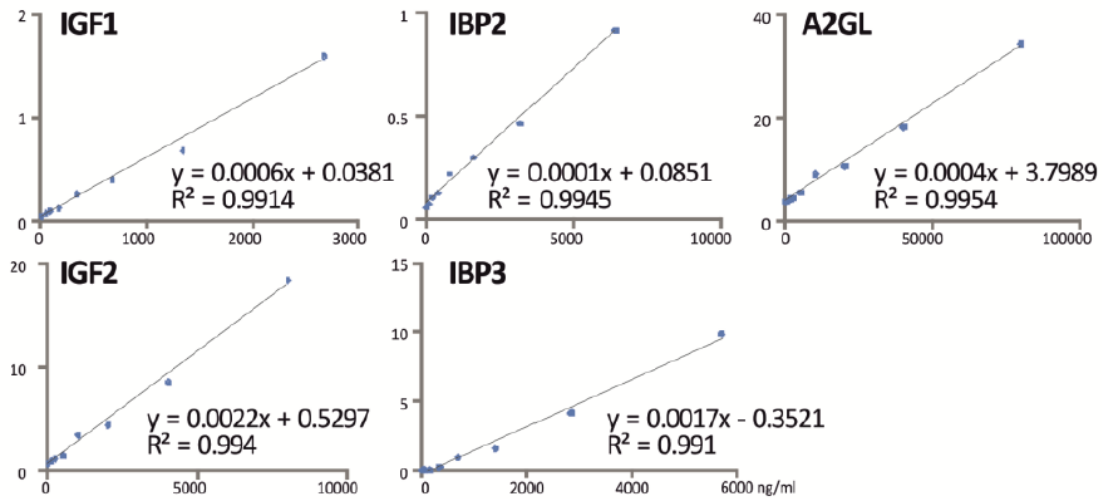


Figura 16. Se muestra a manera de ejemplo una curva de calibración para cada proteína. Imagen de la información suplementaria de la bibliografía ³⁶.

4.2. Equipos y materiales

4.2.1. Equipos y materiales

- Q Exactive HF Hybrid Quadrupole-Orbitrap.
- Cromatógrafo Easy nLC-1200.
- Columna Acclaim PepMap C18 100 Å, 2 µm, 150 mm x 75 µm de Thermo Scientific.
- ThermoShaker 24 x 1.5 mL, Biometra.
- Centrifuga de mesa, Prism.
- Micropipetas en el rango de 0.1 – 1000 µL, Eppendorf.
- LP Vortex mixer de 0 – 3000 rpm, ThermoFisher.
- Columnas Spin C18 x 25, ThermoFisher.
- Cámara fotográfica Canon T6-1300D.
- Kit para ensamblaje de geles de poliacrilamida, Protean, BioRad

- Cámara para geles SDS-PAGE, BioRad

4.2.2. Reactivos para LC-MS

- Estándar de BSA digerido con tripsina para uso con MS 500 pmol, BioLabs. Lote: 10007450.
- BSA en polvo liofilizado $\geq 96\%$ 100 g, Sigma-Aldrich.
- EGF 50 μg , proteína humana recombinante, Applied Biosystems. Lote: LCL11MC3011.
- PDGF 10 μg , proteína humana recombinante, INVITROGEN.
- Adiponectina, abcam. Lote: GR248897-5.
- Tripsina proteasa grado MS 20 μg x 5, ThermoFisher.
- Ditiotreititol 7.7 mg x 48, ThermoFisher.
- Yodoacetamida 9.3 mg x 24, ThermoFisher.
- Bicarbonato de amonio $\geq 99\%$ 25 g, Sigma-Aldrich.
- Deoxicolato de sodio $\geq 99\%$ 25 g, Sigma-Aldrich.
- Ácido tricloroacético $\geq 99\%$ 500 g, Fisher Scientific.
- Ácido trifluoroacético para espectroscopia 100 mL, Merck.
- Acetonitrilo grado LC-MS 1L, Fisher Scientific.
- Ácido fórmico grado LC-MS 50 mL, Fisher Scientific.
- Metanol grado LC-MS 4L, J.T.Baker.

4.2.3. Reactivos para SDS-PAGE

- OmniPur TEMED 25 mL, Merck.
- Precision Plus Protein All blue Standards 500 μ L, Bio-Rad.
- Cleaver CSL-PPL Prestained, Cleaver Scientific.
- Persulfato de amonio $\geq 98\%$ 100 g, Sigma-Aldrich.
- Acrilamida/Bisacrilamida 29:1 1L, Merck.
- Dodecilsulfato sódico $\geq 97\%$ 1 Kg, Roche.
- Clorhidrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl) $\geq 99\%$ 100 g, Merck.
- Ditiotreititol $\geq 99\%$ 25 g, Merck.
- Glicerol $\geq 99\%$ 100 mL, Sigma-Aldrich.
- Azul de bromofenol 25 g, Merck.

4.3. Resultados

4.3.1 Control de calidad de pureza de proteínas con SDS-PAGE

Se realizó este análisis para verificar pureza y posibles degradaciones de las proteínas de interés.

Se realizó una corrida de las proteínas BSA (66.5 kDa), PDGF (25.5 kDa), EGF (6.3 kDa), Adiponectina (26.4 kDa) y Tripsina (23.3 kDa).

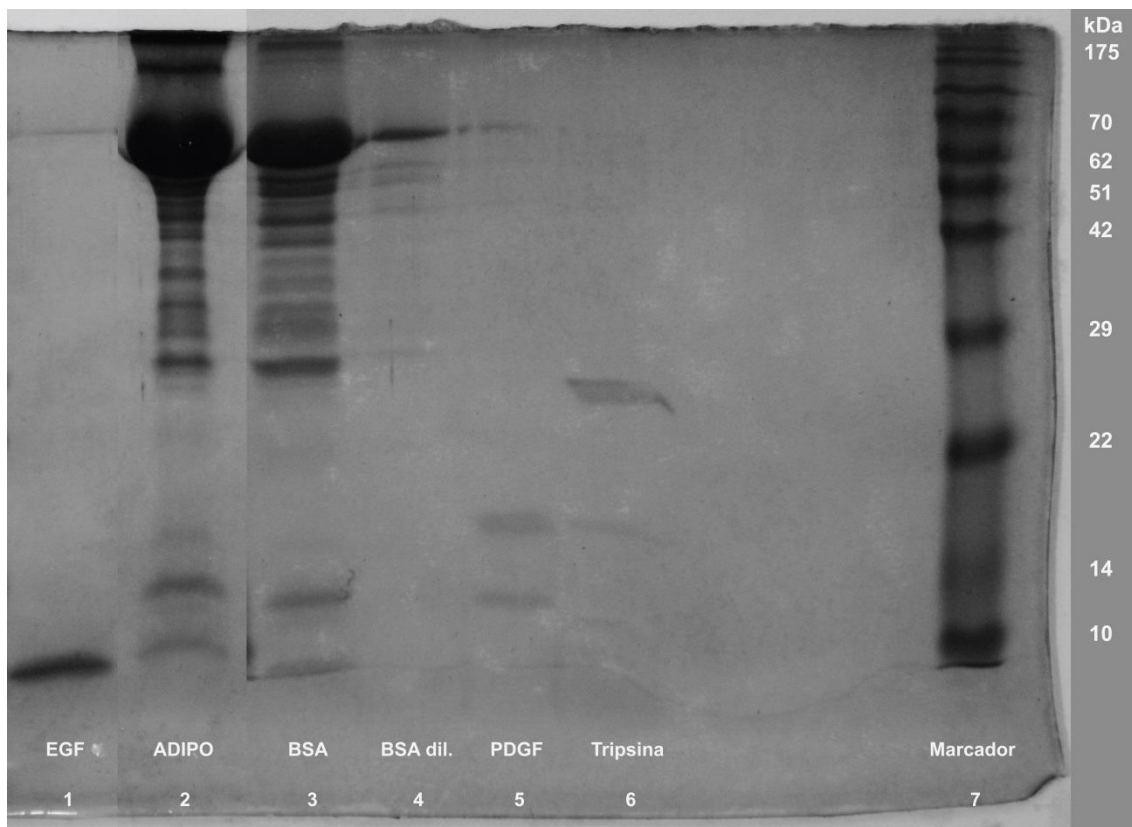


Figura 17. Imagen del gel de SDS-PAGE para observar la pureza de las proteínas utilizadas en este estudio.

En la **Figura 17** se puede apreciar en orden de izquierda a derecha las proteínas puras a las siguientes concentraciones.

Columna 1: 25 μ L con 800 ng de EGF.

Columna 2: 25 μ L con 10 ng de Adiponectina.

Columna 3: 25 μ L con 20 μ g de BSA.

Columna 4: 25 μ L con 400 ng de BSA.

Columna 5: 25 μ L con 160 ng de PDGF.

Columna 6: 25 μ L con 1 μ g de Tripsina.

Columna 7: 15 μ L de marcador proteico en el rango de 10-175 kD.

4.3.2. Control de método de digestión para proteínas.

Para verificar el funcionamiento de los reactivos, se hizo un compendio de distintos métodos reportados de digestión enzimática ^{36,59,65,66} y se propuso un prototipo ante la falta de algún método de este tipo en el laboratorio de trabajo y ante la falta de métodos específicos para las proteínas de interés en la bibliografía. Este prototipo ha sido utilizado para las tres proteínas de interés y para una proteína sencilla de digerir como BSA.

Tabla 6. Cantidades iniciales de cada proteína para los distintos experimentos de digestión.

Cantidades de proteína inicial	
Proteína	Concentración
BSA	50 μ g
EGF	400 ng
PDGF	400 ng
Adiponectina	2.5 ng

4.3.3. Análisis con SDS-PAGE para verificar la digestión de BSA, EGF y Adiponectina.

Se realizó una corrida de las proteínas BSA, EGF y Adiponectina para observar posible digestión enzimática debido a la ausencia de bandas donde deben aparecer las proteínas enteras.

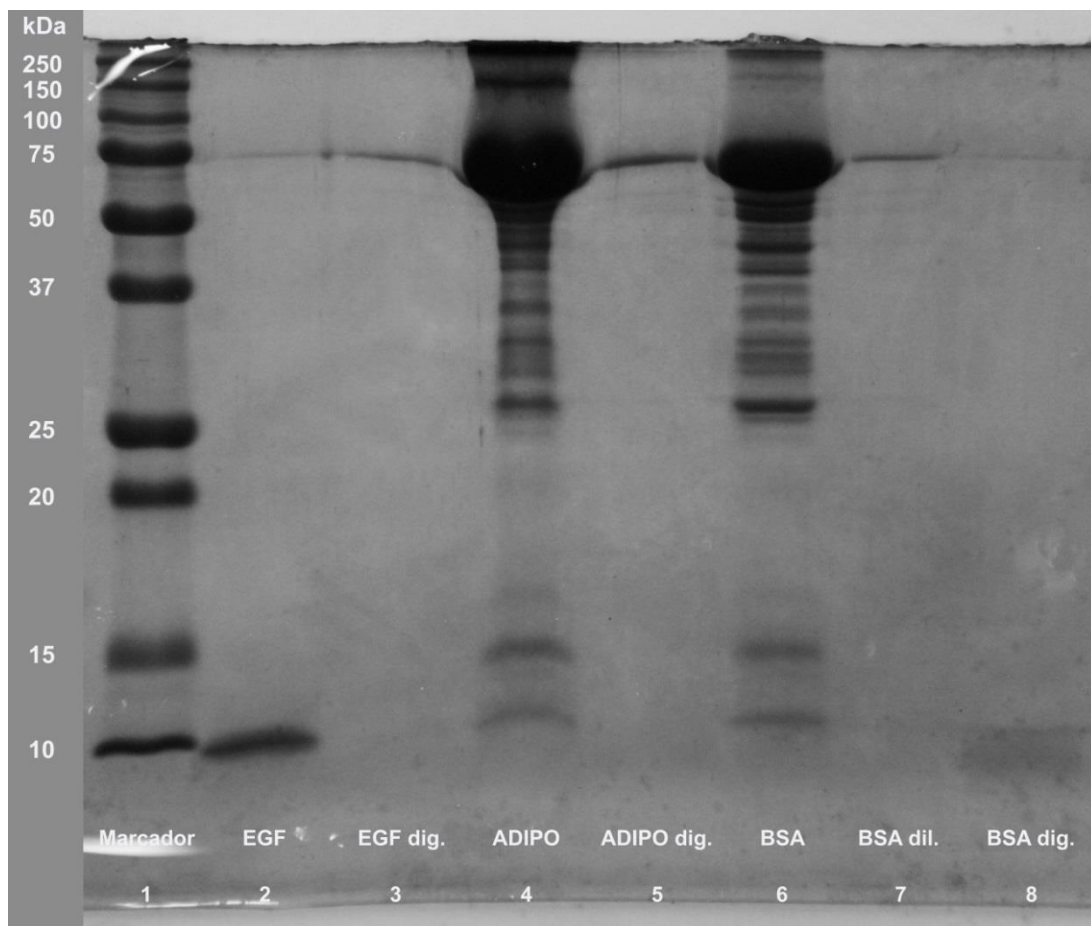


Figura 18. Imagen del gel de SDS-PAGE para observar la posible falta de proteína entera debido a la digestión enzimática.

En la **Figura 18** se puede apreciar en orden de izquierda a derecha tres proteínas digeridas con el método descrito en la metodología a las siguientes concentraciones.

Columna 1: 15 μ L de marcador proteico en el rango de 10-250 kD.

Columna 2: 25 μ L con 800 ng de EGF.

Columna 3: 25 μ L con 22.2 ng de EGF digerido.

Columna 4: 25 μ L con 10 ng de Adiponectina.

Columna 5: 25 μ L con 140 pg de Adiponectina digerida.

Columna 6: 25 μ L con 20 μ g de BSA.

Columna 7: 25 μ L con 400 ng de BSA.

Columna 8: 25 μ L con 2.8 μ g de BSA digerido.

4.3.4. Análisis con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) para verificar la digestión de BSA.

Se utilizaron los siguientes parámetros de adquisición por MS:

- Rango de medición: 300 – 4500 m/z
- Resolución: 60,000
- Tiempo máximo de inyección: 200
- Cantidad de iones en la trampa: 1,000,000

Tabla 7. Señales reportadas para los péptidos de BSA digerido por tripsina. 1) Digestión *in silico* de ExPASy, 2) señales reportadas para el estándar de BSA digerido por BioLabs, 3) señales obtenidas del estándar de BioLabs utilizando MALDI, 4) señales obtenidas para el BSA digerido con el método propuesto utilizando MALDI. En la información suplementaria, en las **Figuras A1-A9**, se encuentran los espectros de cada señal.

Señales reportadas para la digestión de BSA				
	ExPASy	BioLabs (Lote 0021306)	Muestra estándar (Lote 10007450)	Muestra experimental
Señales m/z de tipo [M+H] ⁺	689.3729	688	689.36931	689.36801
	927.4934	927	927.48962	927.48695
	1163.6306	1163	1163.62575	1163.63953
	1283.7106	1283	1283.70546	1283.11000
	1479.7954	1479	1479.78837	1479.78579
	1724.8346	1724	1724.82600	1724.82430
	1749.6625	1749	1749.65782	-
	1880.9211	1881	1880.91148	1880.90673

4.3.5. Análisis con desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI, por sus siglas en inglés) para verificar la digestión de PDGF, EGF y Adiponectina.

Tabla 8. Señales reportadas para los péptidos de Adiponectina digerida por tripsina. 1) Digestión *in silico* de ExPASy, 2) señales obtenidas con el método propuesto de digestión y utilizando MALDI.

Señales reportadas para la digestión de Adiponectina		
	ExPASy	Muestra experimental
Señales m/z de tipo [M+H] ⁺	593.3657	593.32249
	703.3257	703.36750
	790.3703	790.41505
	831.4471	831.30869
	853.4777	853.29085
	918.4917	918.44741
	1114.6116	1114.25124
	1197.5534	1197.84519
	1411.6811	1411.88820
	1498.7257	No encontrado
	1550.8788	No encontrado
	1637.9234	No encontrado
	1771.8034	No encontrado
	2095.0892	No encontrado
	2100.9602	No encontrado
	2157.9817	No encontrado
	2362.0941	No encontrado
	2480.1930	No encontrado
2537.2144	No encontrado	
2607.1270	No encontrado	
4701.2201	No detectable	

Tabla 9. Señales reportadas para los péptidos de EGF digerido por tripsina. 1) Digestión *in silico* de ExPASy, 2) señales obtenidas con el método propuesto de digestión y utilizando MALDI.

Señales reportadas para la digestión de EGF		
	ExPASy	Muestra experimental
Señales m/z de tipo [M+H] ⁺	569.2500	No encontrado
	626.2715	No encontrado
	789.4042	789.40991
	1446.6504	No encontrado
	1560.6933	No encontrado
	3114.2947	No encontrado
	3285.3591	No encontrado

Tabla 10. Señales reportadas para los péptidos de PDGF digerido por tripsina. 1) Digestión *in silico* de ExPASy, 2) señales obtenidas con el método propuesto de digestión y utilizando MALDI.

Señales reportadas para la digestión de PDGF		
	ExPASy	Muestra experimental
Señales m/z de tipo [M+H] ⁺	516.3140	No encontrado
	548.3052	No encontrado
	557.3769	No encontrado
	590.2715	No encontrado
	630.3569	No encontrado
	632.4130	No encontrado
	647.2930	No encontrado
	665.3617	No encontrado
	856.2859	No encontrado
	959.4541	No encontrado
	980.5047	No encontrado
	990.5618	No encontrado
	1027.3502	1027.37205
	1102.4326	No encontrado
	1117.5670	No encontrado
	1174.5884	No encontrado
	1228.6354	No encontrado
	1273.4970	1273.58231
	1276.6275	No encontrado
	1285.6569	No encontrado
	1333.6490	No encontrado
	1864.9217	No encontrado
	1872.9425	No encontrado
	1921.9431	1922.19988
	1929.9639	No encontrado
	2021.1185	No encontrado
	2078.1400	No encontrado
	2164.9637	No encontrado
	2230.1212	No encontrado
	2279.0067	2278.96530
2287.1427	No encontrado	

4.3.6. Análisis con nano-cromatografía líquida e ionización por electrospray (nanoLC-ESI) para verificar la digestión de BSA y Adiponectina.

Se utilizaron los siguientes parámetros de adquisición por MS:

- Rango de medición: 150 – 2000 m/z
- Resolución: 30,000
- Tiempo máximo de inyección: 50
- Cantidad de iones en la trampa: 1,000,000

Se utilizaron las siguientes condiciones cromatográficas:

Tabla 11. Gradiente cromatográfico para todos los experimentos con nano LC.

Gradiente cromatográfico del nano LC			
Tiempo (min)	Duración (min)	Flujo (nL/min)	%B
0	0	100	5
5	5	300	5
50	45	300	40
55	5	300	90
60	5	300	90

Pruebas cromatográficas de BSA dig. y Adiponectina dig.

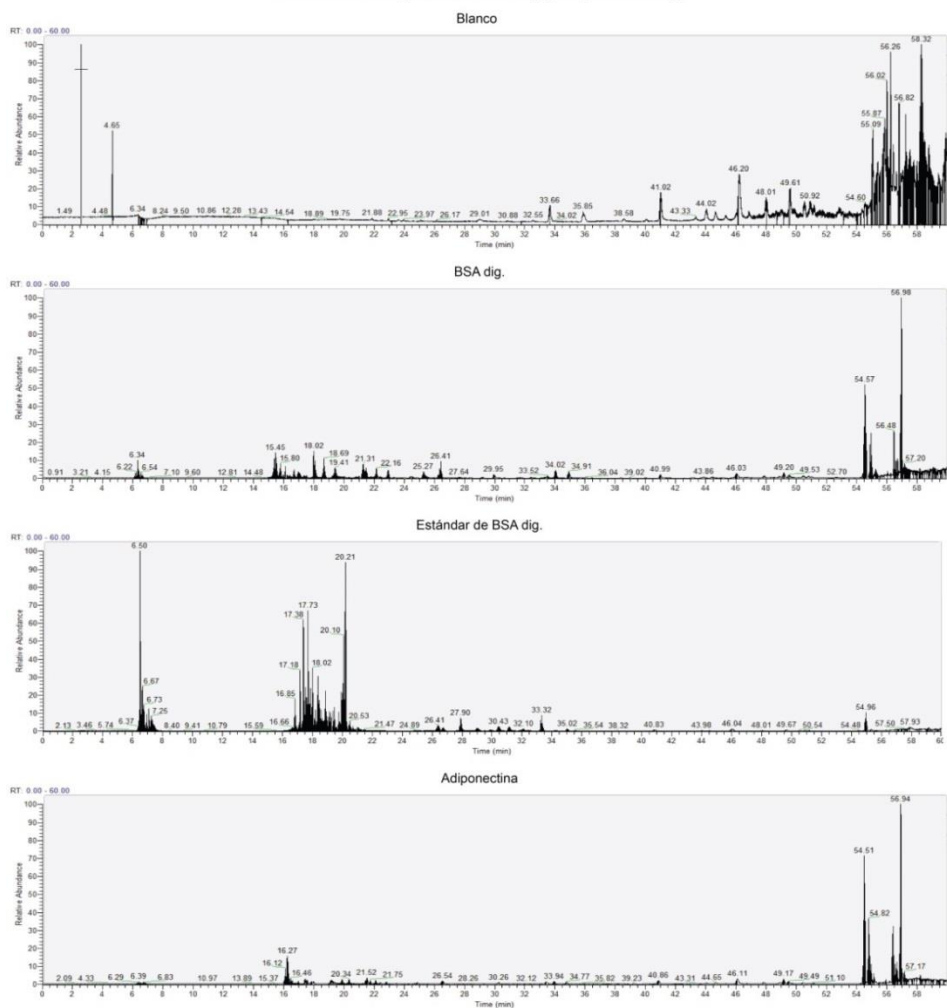


Figura 19. Cromatogramas de 1) Blanco de 50%/50% agua/ACN con 0.1% FA, 2) Adiponectina digerida, 3) BSA digerido, y 4) Estándar de BSA digerido. En la información suplementaria, **Figuras A10-A14**, se pueden observar acercamientos de lo cromatogramas.

4.3.7. Comparación de análisis MALDI y nano LC-ESI para el estándar de BSA digerido.

Se realizó una comparación de las señales reportadas con las obtenidas en cada análisis para observar posibles diferencias. Se utiliza los datos del **punto 4.3.5** para MALDI, y los parámetros del **punto 4.3.6** para nano LC-ESI.

Tabla 12. Comparación de las señales reportadas por ExPASy y BioLabs, con los análisis hechos con MALDI y nano LC-ESI para el estándar de BSA digerido. Se reporta la intensidad de señal para cada análisis y adicionalmente el tiempo de retención para el análisis por nano LC. En la información suplementaria, **Figuras A15-A20**, se pueden observar los espectros de las señales detectadas.

Señales reportadas para el estándar de BSA digerido							
	ExPASy	BioLabs (Lote 0021306)	Muestra estándar (Lote 10007450) por MALDI	Intensidad de la señal	Muestra estándar (Lote 10007450) por nano LC-ESI	tiempo de retención (min)	Intensidad de la señal
Señales m/z de tipo [M+H] ⁺	689.3729	688	689.36931	2.59 E4	689.32715	17.33	3.05 E7
	927.4934	927	927.48962	1.20 E5	927.41772	20.10	1.58 E8
	1163.6306	1163	1163.62575	3.05 E4	1163.62646	20.21	1.92 E7
	1283.7106	1283	1283.70546	5.07 E4	1283.70618	19.93	7.50 E5
	1479.7954	1479	1479.78837	7.56 E3	1479.70984	20.18	1.04 E5
	1724.8346	1724	1724.82600	1.52 E4	-	-	-
	1749.6625	1749	1749.65782	2.25 E4	1749.66101	17.75	5.17 E5
	1880.9211	1881	1880.91148	2.32 E2	-	-	-

4.3.8. Optimización del proceso de digestión y limpieza de muestra

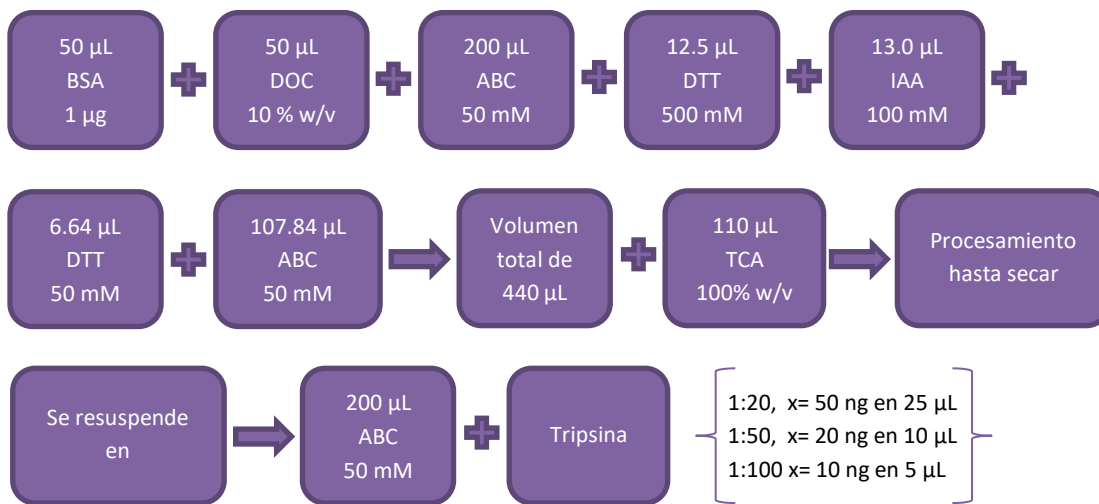
Se trataron de modificar algunas variables del proceso de digestión para establecer la robustez del método.

Experimento al variar la concentración de tripsina y utilizar un agente precipitante como TCA.

En este experimento, se varió la concentración de tripsina utilizada en una relación de proteína:tripsina de 20:1, 50:1 y 100:1. Adicionalmente se utiliza el mismo set de tres

experimentos pero utilizando TCA para precipitar la proteína antes de entrar en contacto con tripsina.

Para ambos set de experimentos se utilizaron los pasos de limpieza y los parámetros cromatográficos descritos en la metodología. Se utilizó el proceso de digestión detallado en la metodología para los tres experimentos sin TCA. Para los tres experimentos con TCA se utilizó una versión modificada tal como se muestra a continuación:



El procedimiento es idéntico hasta obtener un volumen total de 440 µL. Luego se procedió con los siguientes pasos:

1. Se agregaron 100 µL de TCA 100% w/v (una relación de muestra:TCA de 4:1).
2. Se incubó por 10 minutos a 4°C.
3. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos.
4. Se observó la formación de un precipitado con consistencia de gel y de color blanco, por lo que se debió remover el sobrenadante con cuidado.
5. Se lavó el precipitado con 200 µL de acetona fría.
6. Se centrifugó a 14,000 rpm por 5 minutos.
7. Se repitieron los pasos 4-6 para un total de 2 lavados con acetona.
8. Se secó el precipitado por 10 minutos a 95°C.

Pruebas cromatográficas de BSA dig. variando tripsina y TCA

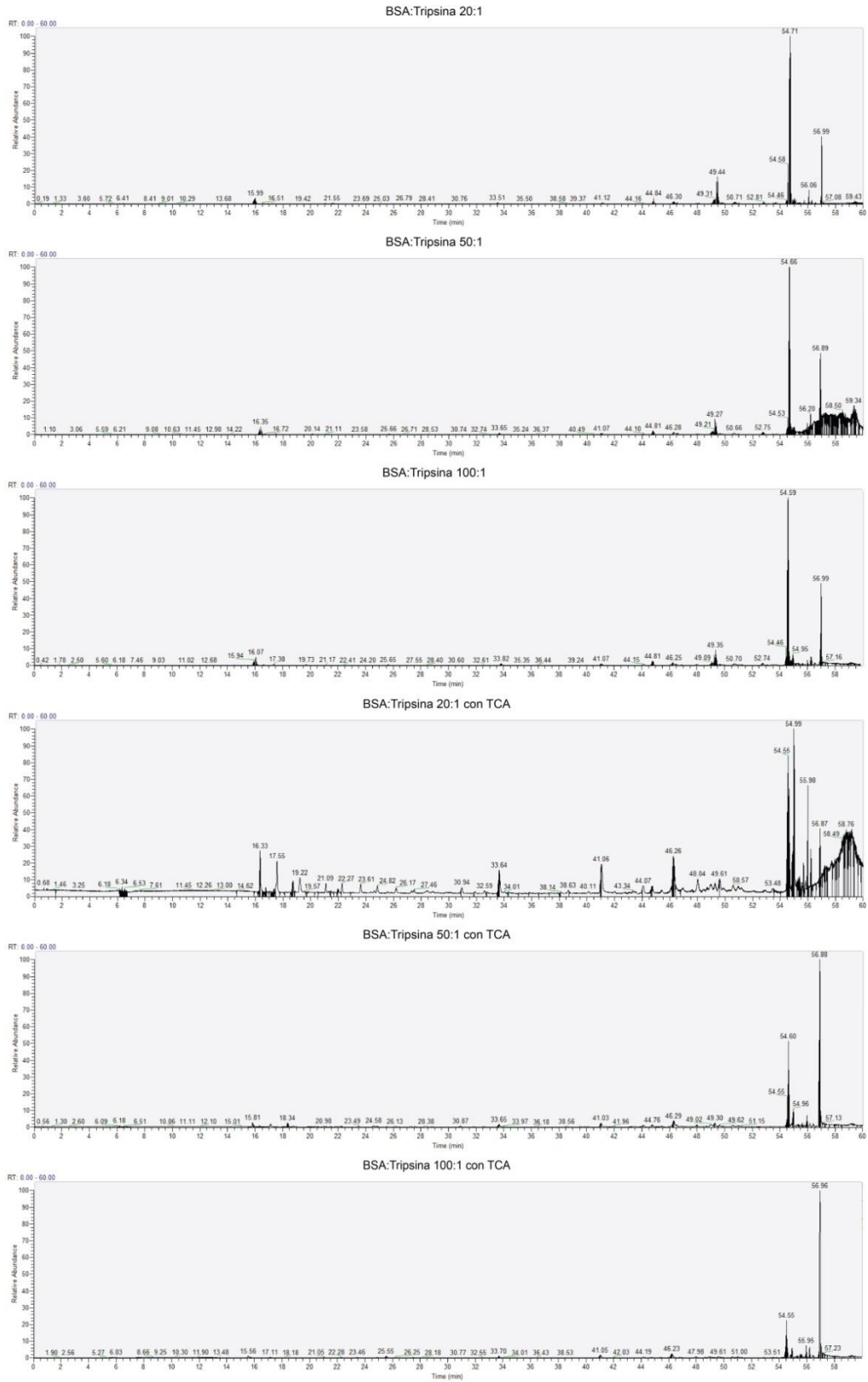


Figura 20. Cromatogramas de experimentos a distinta concentración de tripsina y un duplicado de los mismos utilizando adicionalmente TCA.

4.3.9. Procesamiento bioinformático del estándar de BSA

4.3.9.1. Procesamiento con Proteome Discoverer 2.2

Se utilizó este software con los parámetros que se mencionan en la información suplementaria **punto A6.2** para realizar una identificación de los péptidos. El software utiliza ciertos parámetros propios para hacer los diferentes análisis de datos requeridos. Algunos de estos parámetros importantes son la característica (*feature*, por su nombre en inglés), que en este estudio se le nombrará como CPD (característica del Proteome Discoverer) para evitar confusión; la coincidencia de péptido con un espectro (PSM, por sus siglas en inglés); y la tasa de descubrimiento falso (FDR, por sus siglas en inglés).

La CPD, es un parámetro genérico que se refiere a una particularidad que se pueda utilizar para comparar, medir o corroborar en un cierto grupo de datos. Por ejemplo si se estuviera analizando el tiempo de retención, existen ciertas características propias, ya sean espectrales, informáticas o estadísticas, que se pueden utilizar para identificar a un péptido o comparar diferentes repeticiones de una misma muestra.

La PSM es un valor numérico dado por una función de puntuación para expresar la probabilidad de que un péptido de secuencia conocida pertenezca realmente a cierto patrón de fragmentación obtenido por espectrometría de masas.

La FDR es una proporción esperada de los errores tipo I, o falsos positivos, en los que se rechaza una hipótesis que es verdadera. En otras palabras es una proporción esperada de la cantidad de falsos positivos que se puedan dar.

Adicionalmente, el Proteome Discoverer funciona en base a un sistema de nodos. El arreglo utilizado fue el siguiente:

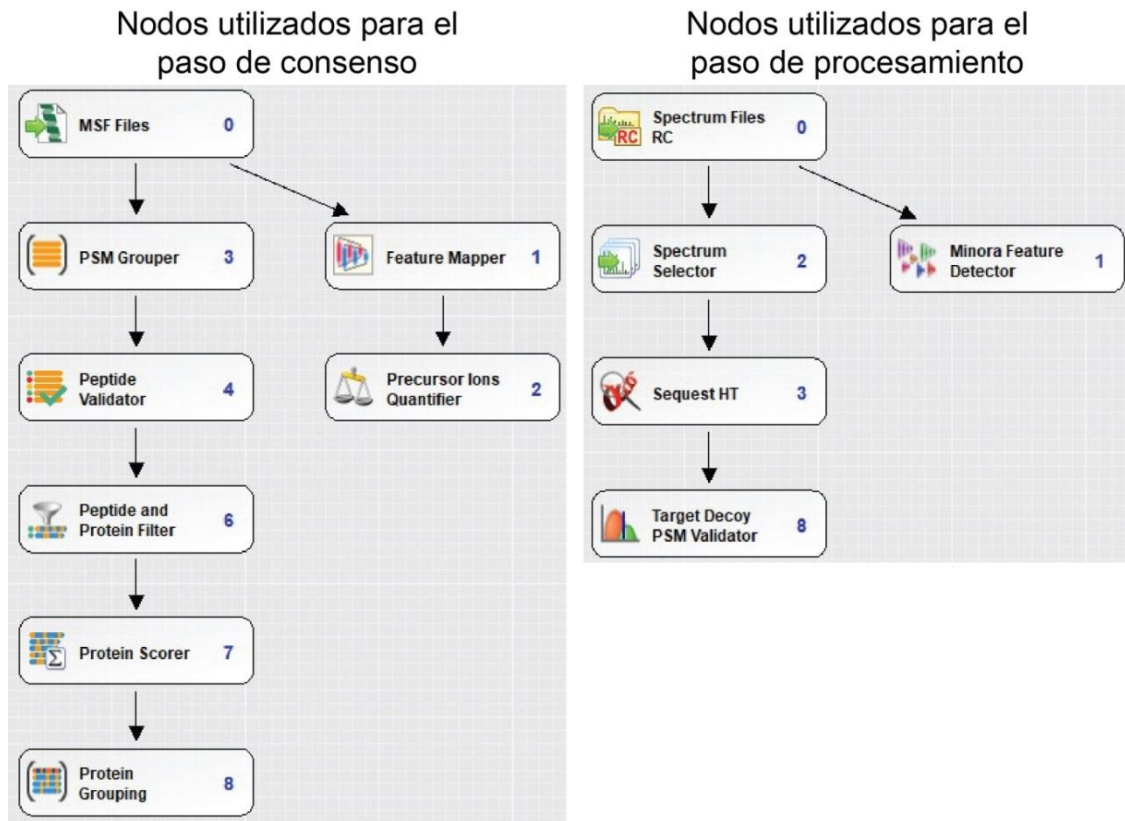


Figura 21. Arreglo de nodos para el paso de consenso y el paso de procesamiento. En la información suplementaria, **Figuras A25-A26**, se pueden observar los parámetros de cada nodo.

Nodos del paso de consenso

- MSF Files: Convertidor de los resultados a un formato .msf.
- Feature Mapper: Realiza una vinculación de los péptidos con las características PD para hacer un mapeo a lo largo de los archivos.
- Precursor Ions Quantifier: Calcula proporciones para las PSM, péptidos y proteínas basado en la cuantificación de los precursores.
- PSM Grouper: Agrupa las PSM identificadas de manera redundante a grupos de péptidos.
- Peptide Validator: Calcula la confianza para las PSM y péptidos basándose en FDR específicos.

- Peptide and Protein Filter: Filtra péptidos y proteínas de acuerdo a los parámetros especificados en el nodo mismo.
- Protein Scorer: Utiliza la lista filtrada para calcular una puntuación final de cada proteína analizada.
- Protein Grouping: Agrupa las proteínas en grupos que compartan los mismos péptidos identificados.

Nodos del paso de procesamiento

- Spectrum Files RC: Selecciona los archivos de los espectros a ser procesados y recalibra la masa de los precursores.
- Minora Feature Detector: Detecta los picos cromatográficos y las características PD de acuerdo al método utilizado.
- Spectrum Selector: Selecciona y recupera los espectros para mayor procesamiento.
- Sequest HT: Realiza una búsqueda en la base de datos espectral
- Target Decoy PSM Validator: Realiza una validación de las PSM basado en límites definidos en los nodos de búsqueda.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

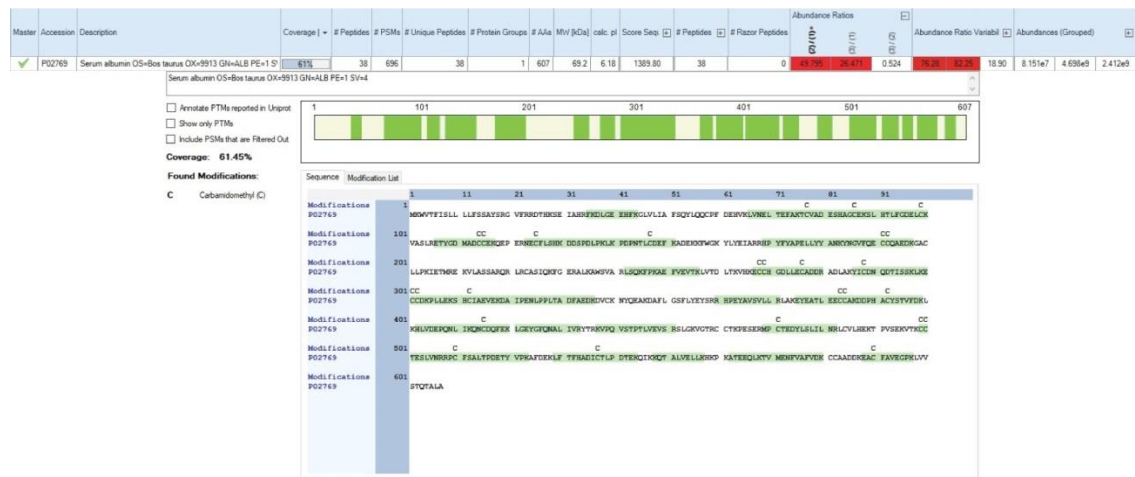


Figura 22. Resultado del procesamiento para la identificación de los péptidos provenientes del estándar de BSA digerido. Se presenta el porcentaje de la proteína cubierta.

Confidence	Sequence	Modifications	# Protein Groups	# Proteins	# PSMs	Master Protein Accessions	# Missed Cleavages	Theo. MH+ [Da]	Abundance Ratios	Abundance Ratio Variabil	Abundances (Grouped)	Quan Info	Confidence				
High	LTFTHADCTLPTDEK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	6	P02769	0	1907.93078	100.000	0.420	0.00	2.395e6	3.079e6	High			
High	QKCCGFEK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	5	P02769	0	1068.44148	100.000	0.548	0.00	1.131e5	3.521e7	High			
High	LKECCDKPLEK	2xCarbamidomethyl [C, CS]	1	1	2	P02769	1	1532.78111	100.000	0.485	0.00	1.255e6	5.578e6	High			
High	LGEYGFNALVIR		1	1	3	P02769	0	1479.79544	100.000	1.369	0.00	4.000e5	5.479e6	High			
High	YICNDGDTSSK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	15	P02769	0	1443.64033	100.000	0.572	0.00	1.478e6	3.041e8	1.740e8	High		
High	SHCIAEVEK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	4	P02769	0	1072.50917	100.000	1.607	0.00	1.814e5	1.247e8	2.003e8	High		
High	HPEYAVSVLLR		1	1	16	P02769	0	1283.71065	100.000	28.221	0.281	0.00	1.381e6	1.385e8	3.898e7	High	
High	NECFLSHK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	7	P02769	0	1034.47239	100.000	0.317	0.00	0.00	5.636e7	1.788e7	High		
High	ETYGSHADCCCK	2xCarbamidomethyl [C, C1]	1	1	37	P02769	0	1478.92324	100.000	0.320	0.00	0.00	4.411e5	2.729e7	9.672e7	High	
High	FADLQGEHFK		1	1	1	P02769	1	1249.82116	100.000	0.808	0.00	0.00	2.806e5	0.00	High		
High	ECCDKPLEK	2xCarbamidomethyl [C, C1]	1	1	21	P02769	0	1291.60208	100.000	1.122	0.00	0.00	3.950e3	1.431e8	1.612e8	High	
High	DLGEEHFK		1	1	4	P02769	0	974.48779	100.000	0.983	0.00	0.00	1.870e6	2.956e8	2.911e8	High	
High	DOSPDLFK		1	1	4	P02769	0	886.41525	100.000	0.803	0.00	0.00	3.952e3	2.941e8	2.366e8	High	
High	TVMENVAFVDEK		1	1	15	P02769	0	1399.69261	100.000	0.988	0.00	0.00	2.268e7	2.241e7	High		
High	DAIFENPLPLTADFAEDK		1	1	33	P02769	0	1955.95966	100.000	1.250	0.00	0.00	7.949e6	1.001e7	High		
High	VFQVSTPLVEVSR		1	1	24	P02769	0	1911.84278	100.000	28.916	0.284	0.00	2.815e6	2.163e8	5.705e7	High	
High	ATEEGIK		1	1	29	P02769	0	918.42542	100.000	43.849	0.00	0.00	1.319e5	9.614e7	5.731e6	High	
High	TCVADESHAGDEK	2xCarbamidomethyl [C, C1]	1	1	29	P02769	0	1463.93895	100.000	28.655	0.290	0.00	4.308e6	8.316e8	1.695e8	High	
High	MPCTEDVLSLNR	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	5	P02769	0	1724.83460	100.000	0.422	0.00	0.00	1.009e6	4.260e5	High		
High	LVNELTEFAK		1	1	29	P02769	0	1163.63067	10.694	22.966	0.308	0.00	0.00	6.649e6	4.451e8	1.371e8	High
High	RHPEYAVSVLLR		1	1	12	P02769	1	1439.91176	63.938	33.263	0.524	0.00	0.00	2.070e5	1.311e7	6.074e6	High
High	KQTALVELLK		1	1	3	P02769	1	1142.71434	91.911	33.943	0.652	0.00	0.00	2.192e5	1.139e7	7.421e6	High
High	EYEATLECCAK	2xCarbamidomethyl [C, C1]	1	1	15	P02769	0	1902.61377	47.789	13.677	0.296	0.00	0.00	2.910e6	1.399e8	3.980e7	High
High	LKDPFHTLQDFK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	23	P02769	0	1976.76797	44.136	11.369	0.393	0.00	0.00	1.405e6	6.201e7	2.439e7	High
High	EACFAVDEPK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	19	P02769	0	1107.51392	89.080	24.655	0.050	0.00	0.00	2.926e5	1.095e8	6.818e7	High
High	NECFLSKDDSDPLPK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	4	P02769	1	1901.86380	98.379	9.585	0.290	0.00	0.00	6.095e4	2.333e6	5.844e5	High
High	HVDEPDLK		1	1	37	P02769	0	1305.71613	19.933	24.628	0.732	0.00	0.00	6.374e5	1.163e8	1.983e8	High
High	YNGVQECQGADEK	2xCarbamidomethyl [C, C1]	1	1	7	P02769	0	1747.70505	52.079	14.039	0.453	0.00	0.00	1.888e6	9.991e7	2.718e7	High
High	CCTESLVNR	2xCarbamidomethyl [C, C2]	1	1	7	P02769	0	1138.49795	31.928	5.389	0.169	0.00	0.00	1.023e6	3.261e7	5.513e6	High
High	RPCFSLTPDETYPK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	9	P02769	0	1880.92111	31.361	9.936	0.316	0.00	0.00	2.942e5	1.972e6	2.515e6	High
High	KVPQVSTPLVEVSR		1	1	68	P02769	1	1639.93775	98.039	33.417	1.113	0.00	0.00	2.854e6	8.571e7	9.936e7	High
High	DQFHACTYTFVK	1xCarbamidomethyl [C]	1	1	11	P02769	0	1904.65293	21.899	19.944	0.642	0.00	0.00	2.199e6	6.349e7	4.078e7	High
High	SILHTFDDELK	1xCarbamidomethyl [C1]	1	1	64	P02769	0	1419.69399	99.980	19.665	0.031	0.00	0.00	5.936e5	1.998e8	1.026e8	High
High	AEFVEYTK		1	1	12	P02769	0	922.48802	92.999	5.721	0.294	0.00	0.00	2.171e7	4.896e8	1.242e8	High
High	ECCSDLECCADR	3xCarbamidomethyl [C, C1, C2]	1	1	112	P02769	0	1749.66253	11.079	6.657	0.560	0.00	0.00	9.962e6	1.170e8	6.955e7	High
High	QATALVELLK		1	1	9	P02769	0	1014.61937	11.069	4.744	0.410	0.00	0.00	4.113e6	4.795e7	1.951e7	High
High	HPFYFAPELLYYAK		1	1	1	P02769	0	1888.92685	100.000	100.000	0.00	0.00	0.00	2.912e4	High		
High	LSQKPFK		1	1	1	P02769	1	847.90361						No Quan Value	High		

Figura 23. Resultado de la comparación de las tres repeticiones del estándar de BSA digerido.

4.3.9.2. Procesamiento con Skyline 19.1

Se utilizó este software con los parámetros que se mencionan en la información suplementaria **punto A6.3** para también realizar una identificación de los péptidos.

Skyline utiliza un sistema de valoración de péptidos basado en producto escalar (dotp, por sus siglas en ingles), que se utiliza para las transiciones y producto escalar isotópico (idotp, por sus siglas en ingles), que se utiliza para la distribución isotópica de los precursores. Por definición, un producto escalar es una operación algebraica que toma dos secuencias de números de igual longitud para generar un simple número. En este caso la aplicación se utiliza para comparar un espectro de masas y un cromatograma, que vendrían a ser las variables, y dar como resultado un valor que se encuentra entre 0 y 1. El valor de 0 quiere decir que no existe ninguna relación entre ambas variables y el valor de 1 que la relación es perfecta. Por regla general, se dice que un valor de dotp > 0.9 representa una confianza aceptable para identificar un péptido, pero este criterio puede depender mucho del contexto del estudio.

Este software permite visualizar de manera más meticulosa cada señal y hacer un refinamiento de datos de forma manual o automática. Permite también visualizar de forma dinámica variaciones en el tiempo de retención, área de pico y errores de m/z entre replicados o muestras, como se presenta a continuación:

Comparación en la valoración de péptidos al utilizar transiciones como parámetro

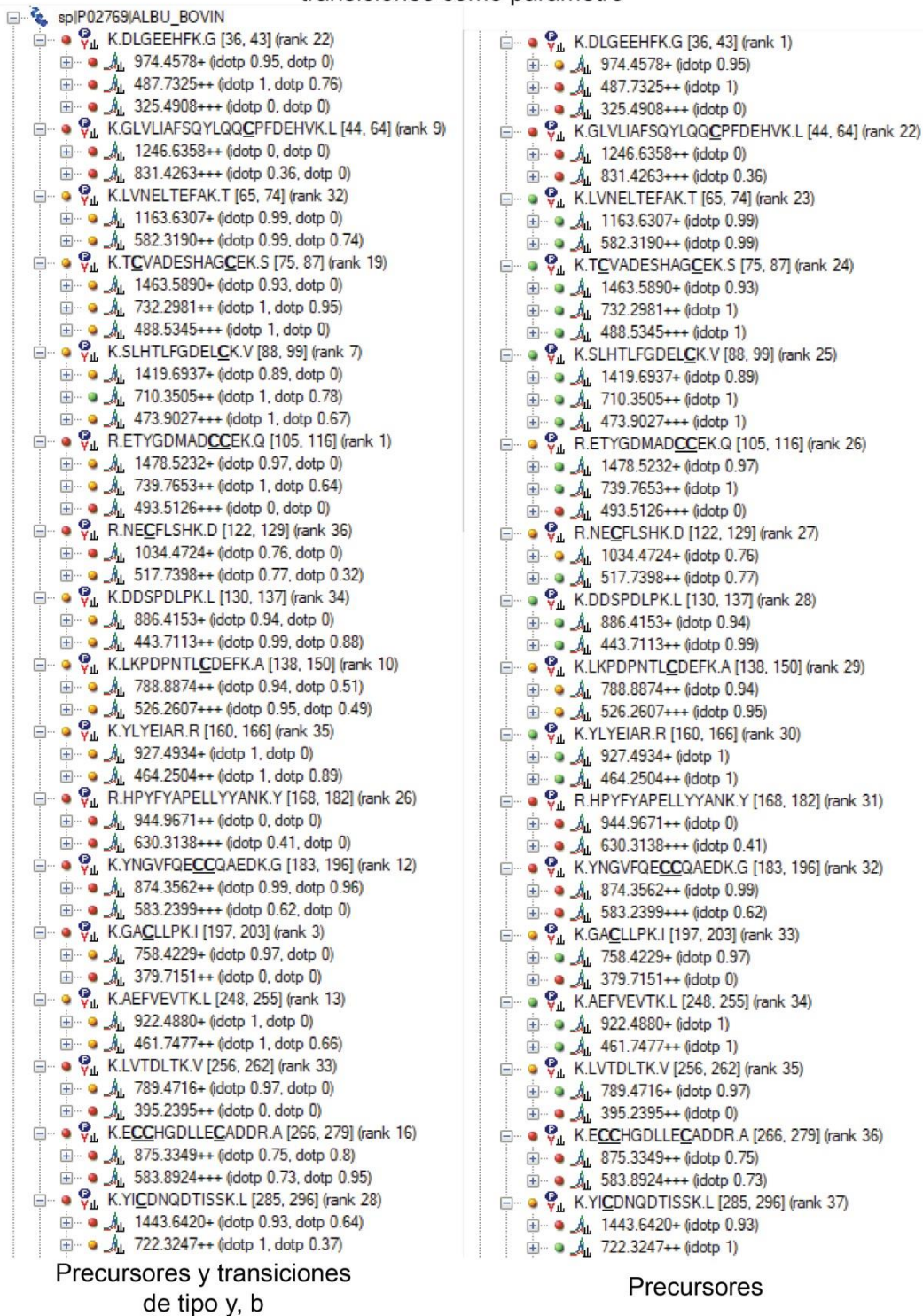


Figura 24. Comparación en la valoración de un mismo grupo de péptidos del BSA utilizando señales de precursores y transiciones tipo y, b (en la columna de la izquierda), y utilizando solo precursores (en la columna de la derecha).

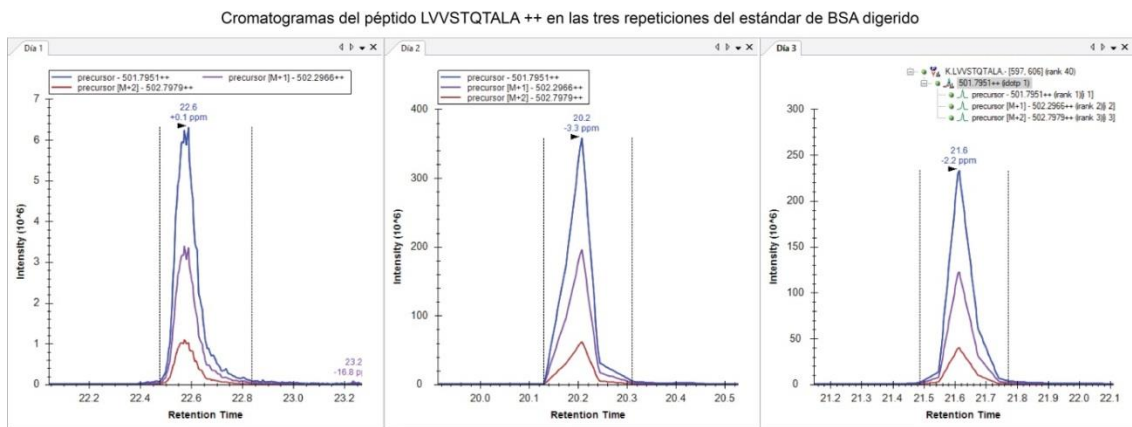


Figura 25. Cromatogramas de las tres repeticiones del estándar de BSA digerido. Enfoque en el péptido LVVSTQTALA⁺⁺.

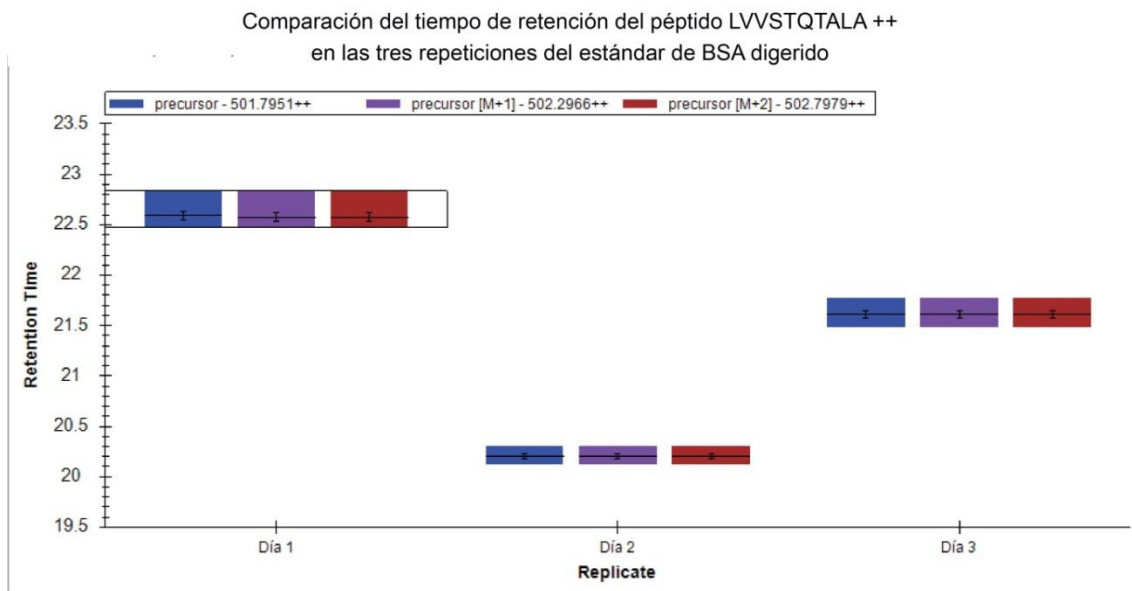


Figura 26. Comparación de los tiempos de retención en los tres tipos de precursores para el péptido LVVSTQTALA⁺⁺ en las tres repeticiones.

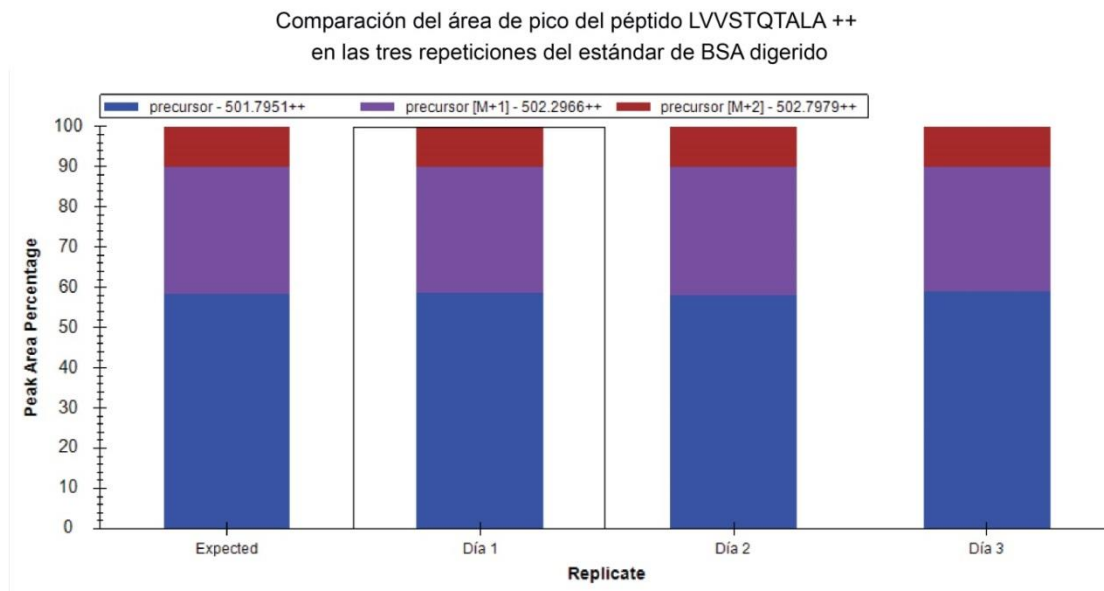


Figura 27. Comparación de la distribución de las áreas esperadas en los tres tipos de precursores para el péptido LVVSTQTALA++ en las tres repeticiones.

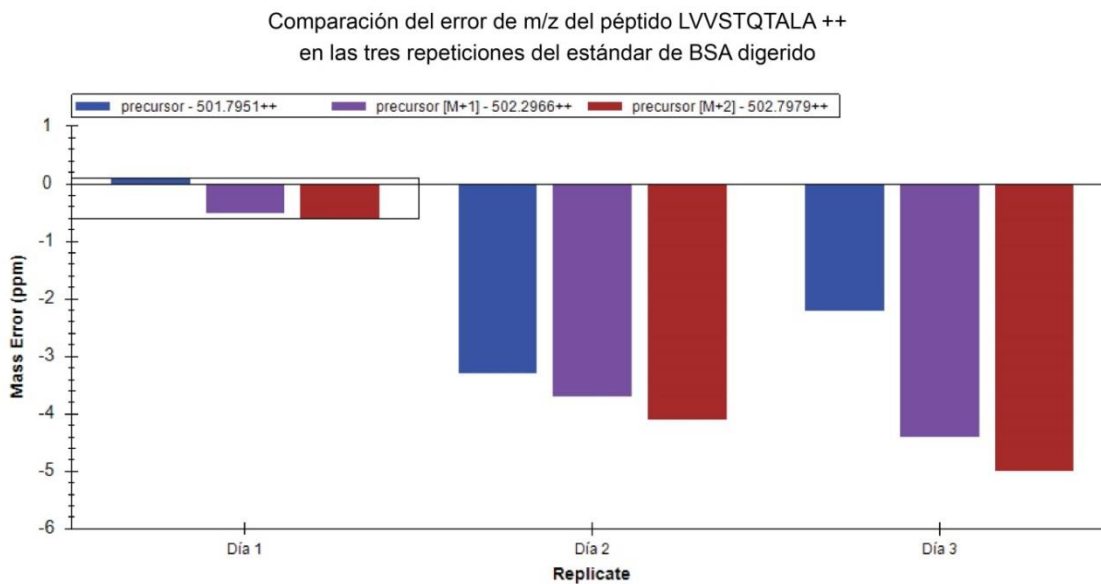


Figura 28. Comparación del error de m/z en los tres tipos de precursores para el péptido LVVSTQTALA++ en las tres repeticiones.

5. Discusión de Resultados

Para la revisión de pureza de proteínas se decidió utilizar un método de SDS –PAGE basado en glicina y con un porcentaje de acrilamida de 18%, por el cual se pudiera apreciar visualmente bandas de proteínas aisladas, dado que eran estándares puros. Todas las proteínas se encontraban en un rango de 6-70 kDa por lo que se tuvo que elegir un método de corrida que cumpliera con ello. Cuando se utiliza porcentajes bajos de acrilamida, como 8 - 16%, para la preparación del gel de corrida, se forman menos redes del polímero por lo que facilitará el paso de proteínas de cualquier tamaño y la resolución del gel se dará a una escala de mayor tamaño en una zona de 6-250 kDa. En cambio, cuando se utiliza porcentajes altos de acrilamida, como 18 - 27 %, se forman mayor cantidad de redes del polímero y se obtiene una mejor resolución en una zona de menor tamaño, de 2-200 kDa aproximadamente. Las redes del polímero se forman gracias a que la acrilamida polimeriza junto con la bisacrilamida, que funciona como *cross-linker*. Adicionalmente, se debe considerar evitar la interacción con el aire durante la polimerización, debido a que esto ralentiza o cancela el proceso, por lo que siempre se agrega un poco de alcohol isopropílico encima a manera de sello.

Debido al bajo peso molecular del fragmento comercialmente disponible de EGF, se recomienda que en el futuro se estudie su comportamiento en SDS-PAGE basado en tricina debido a que se reportan mejores resultados de separación para proteínas de bajo peso molecular ⁶⁷.

Lo que se puede observar del resultado obtenido en la **Figura 16**, es que el EGF y el BSA tienen una alta pureza y no tienen degradaciones. Las múltiples bandas que se muestran en el BSA pueden ser atribuidas a una alta concentración de la proteína. En efecto, en la banda 4 se puede observar que al reducir la concentración de BSA, se puede observar una banda más

fina y clara. Para el caso de PDGF, parece haber cierto grado de degradación debido a que se observan dos bandas de igual intensidad. La tripsina se observó con alta pureza. El caso de la adiponectina es algo desconcertante, dado que se esperaba observar una banda a la misma altura que la tripsina, pero por el resultado parece estar en un mismo peso molecular que el BSA. Además, la intensidad de la señal no va en relación con la cantidad de proteína colocada. Estos resultados podrían ser explicados debido a la cantidad de residuos de prolina, dado que se discute que la cantidad de este aminoácido afecta negativamente a la migración de la proteína debido a que su nitrógeno se encuentra en forma de amina secundaria, en comparación de la mayoría de aminoácidos que se encuentran en forma de amina primaria, y al tener menos hidrógenos se ve afectado menos por interacciones eléctricas y por ende migra menos. El BSA contiene 28 prolinas en su cadena de 607 aminoácidos (4,6%), y la adiponectina contiene 17 prolinas en su cadena de 244 aminoácidos (7,0%), por lo que nuestras observaciones se pueden atribuir a la mayor densidad de prolinas en la adiponectina.

En este punto se realizó una serie de experimentos para digerir todas las proteínas bajo las mismas condiciones y analizar la respuesta frente a ello por SDS-PAGE, MALDI y nano LC-ESI.

El SDS-PAGE fue utilizado de tal forma que, si en la muestra digerida ya no se observaba la banda de la proteína entera, es posible que algo le haya pasado a la proteína para ya no aparecer. Lo cual se asumió que fue la digestión enzimática esperada. En la **Figura 17**, se observó que las muestras digeridas de EGF, adiponectina y BSA ya no presentan bandas aparentes. Además, se colocó 20 µg de BSA intacto en la columna 6 y 400 ng en la columna 7, mientras que la muestra digerida tenía una cantidad de 2.8 µg. Con esto se demuestra que la banda de BSA desapareció y no es debido a una baja concentración no observable.

También, se puede observar que para la muestra digerida de BSA hay una banda difuminada por debajo de los 10 kDa que podría pertenecer a todos los péptidos aglomerados.

Como se ha podido observar en ambos geles, de control de calidad de pureza y este de análisis, el comportamiento no lineal en la separación de tamaños y el rango de error de ~10% de este método, hacen vital el empleo del estándar o marcador de pesos moleculares para los análisis con esta técnica.

Se utilizó análisis por MALDI debido a que este método es robusto frente a sales y detergentes, también es de ionización suave como ESI y es más rápido para identificar de manera general que al correr una cromatografía.

En la **Tabla 7**, se presenta una primera columna de señales producidas de manera *in silico* por ExPASy, software gratuito de manera online; una segunda columna de señales reportadas en la ficha técnica del estándar de BSA digerido para análisis con MALDI; una tercera columna de señales obtenidas con el MALDI utilizado en este estudio para el estándar de BSA digerido; y una última columna para BSA digerido por el método propuesto de digestión utilizando MALDI. Se puede notar que existe un alto grado de similitud entre todos los datos reportados, por lo que se concluye que las condiciones de la digestión enzimática fueron óptimas. Adicionalmente, se observaron los espectros m/z indicados en el **punto A1** de la información suplementaria. Para el caso de la adiponectina, EGF y PDGF digeridos con el mismo método, presentados en la **Tabla 8**, **Tabla 9** y **Tabla 10** respectivamente, no se obtuvo suficiente evidencia para concluir que la digestión enzimática fue exitosa por lo que se recomienda una mayor optimización del método en caso de que a futuro este se quiera implementar para el análisis rutinario o usar técnicas de análisis de péptidos alternativas.

Se utilizó análisis por nano LC-ESI debido a que es una de las mejores técnicas basadas en MS para identificar y cuantificar péptidos.

En la **Figura 19**, se presenta una comparación del blanco, Adiponectina digerida, BSA digerido, y estándar de BSA digerido. En el estándar, se observó con claridad que existe detección y separación de señales, que no se observó para la adiponectina y BSA digerido. Las señales que aparecen a un tiempo de 54.7 y 56.9 minutos se atribuyen a un posible sangrado de la columna, y mientras que para el estándar esos dos tiempos presentan una señal de baja intensidad, en la adiponectina y BSA digerido presentan una señal de alta intensidad, por lo que se concluye que no hubo detección para las muestras digeridas con el método propuesto. Adicionalmente, se observaron pequeñas señales en el rango de 14 - 34 minutos para ambas muestras digeridas que se atribuyen al ruido instrumental. Las ampliaciones de los cromatogramas se presentan en el **punto A2** de la información suplementaria.

Se postuló que el método no esté optimizado para nano LC o que el método de limpieza con Spin C18 haya fallado. Para descartar estas opciones, se realizaron experimentos para observar posibles cambios en los cromatogramas.

Se presenta la **Tabla 12** para comparar los resultados del estándar de BSA digerido analizado por MALDI y por nano LC-ESI. Se puede observar que existen ligeras desviaciones en los decimales de las masas reportadas que bien pueden atribuirse a desviaciones naturales de carácter instrumental o bien pueden ser debido a las diferencias propias de los métodos de ionización empleados.

Los mecanismos de ionización para ESI y MALDI varían en que para el primero los dos mecanismos principalmente propuestos son: (1) proceso de evaporación iónica y (2) proceso de residuos cargados que están basados en dos tipos diferentes de desolvatación⁶⁸. Mientras que para MALDI los dos mecanismos principalmente propuestos son (1) el sobreviviente

afortunado, que postula que el analito cristalizado en la matriz conserva su carga desde la solución, y no se vea eventualmente neutralizado por absorción foto-electrónica o por electrones de las superficies metálicas debido a un proceso meramente estadístico. El segundo mecanismo es (2) el modelo de protonación en fase gaseosa, que se refiere a colisiones en fase gaseosa de analitos neutros e iones de matriz protonada o desprotonada para que se dé una transferencia de protones y de esta manera concederle carga a los analitos

69 .

En el conjunto de experimentos de la **Figura 20**, se utilizó BSA y se digirió variando la concentración de proteína:tripsina en 20:1, 50:1 y 100:1, y además se utilizó un mismo set como el mencionado, pero agregando un paso de precipitación con TCA previa a digestión. Es posible que la digestión se esté viendo dificultada debido a todas las impurezas que están en solución y no haya suficiente interacción entre proteína y enzima. Por ello, se decidió precipitar la proteína modificada con yodoacetamida para remover la solución con impurezas y redissolver la proteína en un nuevo buffer. Hay que mencionar también, que si se utiliza un cantidad muy grande de tripsina respecto a la cantidad de proteína, la digestión enzimática deja de ser selectiva; y si se utiliza muy poca cantidad de tripsina no habría un buen porcentaje de digestión.

En la **Figura 20**, se presentan los cromatogramas de los seis experimentos. Al no detectarse señales en ninguno de los experimentos, se concluyó que el método de limpieza con Spin C18 no fue exitoso y se recomienda evaluar otros métodos para eliminar sales y detergentes.

El TCA no limpiaba lo suficiente dado que dejaba residuos de detergente y además había un gran porcentaje de la muestra que se perdía con cada lavada. Adicionalmente, se consideró como alternativa de solución utilizar TCA como método de limpieza final para precipitar péptidos, pero no existe bibliografía disponible en la que se mencione que esto funcione.

Basados en esta experiencia, se recomienda emplear el método de precipitación por TCA cuando se tiene gran cantidad de proteína disponible.

Para el procesamiento de datos y obtener una correcta identificación del estándar digerido de BSA por medio de sus péptidos, se empleó Proteome Discover y Skyline para tres mediciones hechas en distintos días de tal estándar. En los anteriores puntos, se han hecho análisis manuales al tratar de identificar y comparar algunas de las señales más notorias que presentan las proteínas, pero una verdadera y correcta identificación es un proceso más complejo que requiere comparar cromatogramas y espectros de masas de tipo MS/MS a un nivel más profundo que solo se podría hacer con paquetes informáticos.

El Proteome Discoverer permitió identificar el porcentaje de la proteína que se pudo cubrir, como se observa en la **Figura 22**, y también comparar las 3 réplicas del estándar de BSA digerido, como se observa en la **Figura 23**.

El arreglo de nodos seleccionado es uno recomendado por la guía de usuario del mismo software para análisis de cuantificación absoluta sin marcaje isotópico.

Para el caso del porcentaje de proteína cubierto, se puede observar que a pesar de ser un estándar puro el porcentaje es de 61.45%, debido a que ciertos péptidos, por razones instrumentales, no son identificables. De todas maneras la confianza de identificación es alta.

Para la comparación de las tres replicas, se muestra una columna de proporciones de abundancia para cada péptido, donde se utiliza el color rojo para identificar cuando hay una gran diferencia entre muestras, hasta un azul oscuro para representar que no existe casi diferencia. Los números exactos se pueden apreciar en la **Figura 23** y el orden de comparación de muestras es de día 2/día 1, día 3/día 1 y día 3/día 2 de izquierda a derecha.

El Skyline permitió analizar de manera más meticulosa cada péptido de cada réplica y compararlos entre sí.

En la **Figura 24**, se presenta una comparación para un grupo de péptidos de una de las réplicas del estándar de BSA digerido al utilizar en la columna de la izquierda las transiciones de tipo y, b y la distribución isotópica de los precursores, y en la columna de la derecha solo los precursores. Se observó que la valoración general por colores, rojo es una valoración negativa, amarilla es una valoración intermedia y verde es una valoración buena, mejora cuando se quitan las transiciones. Esto se debe a que el método utilizado de DDA sin optimizar la energía de colisión por péptido, no está obteniendo señales similares a las esperadas. Esto es lo normal debido a que el método no se ha refinado y solo se están midiendo las señales más intensas de fragmentación. Se recomienda que al refinar este método se podrá emplear el método de reacción selectivo paralelo.

Además de la valoración por colores, se puede observar una valoración por puntaje con dotp para las transiciones, y con idotp para los precursores. Se puede ver que los puntajes de dotp son bastante bajos, por las razones que ya se explicaron líneas arriba, mientras que los puntajes de idotp concuerdan con lo que se esperaría para un estándar puro.

En la **Figura 25**, se presentan los cromatogramas de las réplicas para un péptido en específico. Se puede visualizar el comportamiento de cada pico y optimizar las condiciones cromatográficas si fuese necesario.

En la **Figura 26**, se compararon los tiempos de retención para los precursores de las tres réplicas y se observó la desviación que tienen unos de otros. Esto es útil como método inicial porque se puede medir el rango de variabilidad que tendrá cada péptido y poder seleccionar una ventana donde se sepa que siempre va a aparecer ese péptido en específico.

En la **Figura 27**, se pudo comparar el área de la señal de cada precursor y su distribución porcentual para las tres réplicas con un porcentaje esperado por las bases de datos. Esto es

útil porque es un buen dato para corroborar que las réplicas se comporten de manera esperada y así poder analizar posibles desviaciones o variaciones.

En la **Figura 28**, se pudo comparar el error m/z que tuvo cada señal respecto al esperado. Esto también es útil para refinar un método y encasillar o medir el rango de variabilidad que tendrá cada péptido

Estos cuatro análisis en conjunto pueden ser usados como parámetros para medir e identificar péptidos en una muestra. Luego de establecer límites, el proceso se puede automatizar con el mismo software para una serie de muestras.

Al comparar ambos métodos de análisis se puede observar que el Proteome Discoverer es un software que permite procesar todo de manera más automática, pero que requiere que se especifiquen bastantes parámetros con anticipación. En cambio, Skyline es un software más flexible que requiere que uno busque sus propias bases de datos, y especifique ciertos parámetros con anticipación, pero que permite visualizar de manera más dinámica detalles en diferentes aspectos del cromatograma o espectro de masas. En la experiencia del autor de este trabajo, para usuarios que recién empiezan a trabajar con temas de proteómica, Skyline es más útil para guiar y sentar las bases de conocimiento necesarias para entender cómo funciona el proceso general de análisis y procesamiento. Mientras que el Proteome Discoverer resulta ser de mayor utilidad en aplicaciones para el análisis de muestras bien caracterizadas y con parámetros óptimos. Además, se recomienda para usuarios experimentados en especificar ciertas funciones para potenciar, acelerar y automatizar procesos de manera más eficiente.

Respecto a la situación actual en el tema de herramientas disponibles para el análisis y tratamiento de heridas crónicas, se puede decir que el panorama se orienta a la búsqueda y

desarrollo de tecnologías con expectativas de cumplir con análisis más rápidos, robustos y certeros. Mientras que los tratamientos se esperan sean más rápidos, que causen menos padecimiento durante el periodo de tratamiento y que sean terapias más especializadas para cada persona. Las herramientas actuales de análisis de proteínas como citometría de flujo e inmunoensayos cumplen bastante bien como ensayos rápidos y robustos de carácter rutinario para identificación y cuantificación, pero no ofrecen suficiente información sobre posibles modificaciones a nivel atómico de las proteínas a analizarse. Explorar este factor puede ser de gran ayuda para el desarrollo de terapias especializadas, para lo cual la espectrometría de masas acoplada con la cromatografía líquida se presenta como una herramienta con gran potencial para lograr ofrecer ese tipo de información de reconocer y cuantificar posibles modificaciones en proteínas de interés. Las barreras más importantes en este tipo de avance tecnológico son la falta de recursos humanos clínicos especializados y un requerimiento alto de experiencia y conocimiento de la técnica analítica para interpretar la información obtenida de manera que pueda ser útil en la práctica clínica. En la opinión del autor, la mejor estrategia para la implementación de técnicas analíticas como la espectrometría de masas debe integrar una combinación de educación en el personal de salud junto con el desarrollo de protocolos más amigables y robustos para los usuarios finales.

6. Conclusiones

Los parámetros de digestión enzimática con tripsina que funcionan para BSA deben ser optimizados para ser empleados en aplicaciones con las proteínas EGF, PDGF y adiponectina.

MALDI y nano LC-ESI son opciones viables para el análisis de péptidos. MALDI presenta la ventaja de ser más rápido y tolerante a impurezas presentes en la matriz como sales y detergentes, mientras que nano LC-ESI hace posible una identificación y cuantificación de péptidos más específica.

Proteome Discoverer y Skyline posibilitan el análisis de resultados de espectrometría de masas. Mientras que Proteome Discoverer permite reducir tiempos de análisis, Skyline otorga flexibilidad que puede ser aprovechada durante el desarrollo y optimización de métodos.

Pese a los avances de la espectrometría de masas para aplicaciones clínicas y alto detalle informativo que proporciona, la curva de aprendizaje es alta, requiere un alto grado de especialización de los analistas y su optimización es muy específica para el procesamiento de muestra. Por lo tanto, se recomienda que su uso vaya acompañado de técnicas más robustas como las basadas en interacción inmune para cuantificar con fines diagnósticos, y que su empleo se optimice para detectar diferencias cualitativas como por ejemplo, modificaciones pos-traducción.

Bibliografía

- (1) Orkin, S. H.; Zon, L. I.; Ye, L.; Huang, H.; He, X.; Tong, W. G.; Ross, J.; Haug, J.; Johnson, T.; Feng, J. Q.; et al. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell* **2008**, *132* (4), 631–644. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.01.025>.
- (2) Badimón, L.; Martínez-González, J. Disfunción Endotelial. *Rev. Española Cardiol.* **2006**, *6* (Supl.A), 21–30. <https://doi.org/10.1157/13087918>.
- (3) Gale, A. J. Continuing Education Course #2: Current Understanding of Hemostasis. *Toxicol. Pathol.* **2011**, *39* (1), 273–280. <https://doi.org/10.1177/0192623310389474>.
- (4) What are the Stages of Wound Healing? | Biodermis.com <https://www.biodermis.com/what-are-the-stages-of-wound-healing-s/221.htm> (accessed May 11, 2019).
- (5) Pietrzak, W. S.; Eppley, B. L. Platelet Rich Plasma: Biology and New Technology. *J. Craniofac. Surg.* **2005**, *16* (6), 1043–1054.
- (6) Anitua, E.; Andia, I.; Ardanza, B.; Nurden, P.; Nurden, A. T. Autologous Platelets as a Source of Proteins for Healing and Tissue Regeneration. *Thromb. Haemost.* **2003**, *91* (1), 4–15. <https://doi.org/10.1160/TH03-07-0440>.
- (7) WEYRICH, A. S.; SCHWERTZ, H.; KRAISS, L. W.; ZIMMERMAN, G. A. Protein Synthesis by Platelets: Historical and New Perspectives. *J. Thromb. Haemost.* **2009**, *7* (2), 241–246. <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.03211.x>.
- (8) McNicol, A.; Israels, S. J. Platelet Dense Granules: Structure, Function and Implications for Haemostasis. *Thromb. Res.* **1999**, *95* (1), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0049-3848\(99\)00015-8](https://doi.org/10.1016/S0049-3848(99)00015-8).
- (9) Cross, M.; Dexter, T. M.; Hu, X.; Goldfarb, M.; Stewart, C. .; Gearing, D. .; Wagner, E. .; Metcalf, D.; Nicola, N. .; Gough, N.; et al. Growth Factors in Development, Transformation, and Tumorigenesis. *Cell* **1991**, *64* (2), 271–280. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90638-F](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90638-F).
- (10) Bodnar, R. J. Epidermal Growth Factor and Epidermal Growth Factor Receptor: The Yin and Yang in the Treatment of Cutaneous Wounds and Cancer. *Adv. Wound Care* **2013**, *2* (1), 24–

29. <https://doi.org/10.1089/wound.2011.0326>.
- (11) Kazlauskas, A. PDGFs and Their Receptors. *Gene* **2017**, *614*, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/J.GENE.2017.03.003>.
- (12) Pajvani, U. B.; Du, X.; Combs, T. P.; Berg, A. H.; Rajala, M. W.; Schulthess, T.; Engel, J.; Brownlee, M.; Scherer, P. E. Structure-Function Studies of the Adipocyte-Secreted Hormone Acrp30/Adiponectin. Implications for Metabolic Regulation and Bioactivity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (11), 9073–9085. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207198200>.
- (13) Yamauchi, T.; Kamon, J.; Minokoshi, Y.; Ito, Y.; Waki, H.; Uchida, S.; Yamashita, S.; Noda, M.; Kita, S.; Ueki, K.; et al. Adiponectin Stimulates Glucose Utilization and Fatty-Acid Oxidation by Activating AMP-Activated Protein Kinase. *Nat. Med.* **2002**, *8* (11), 1288–1295.
<https://doi.org/10.1038/nm788>.
- (14) V., W. Z.; E., S. P. Adiponectin, Cardiovascular Function, and Hypertension. *Hypertension* **2008**, *51* (1), 8–14. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.099424>.
- (15) Wang, Z. V.; Scherer, P. E. Adiponectin, the Past Two Decades. *J. Mol. Cell Biol.* **2016**, *8* (2), 93–100. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjw011>.
- (16) Schultz, G. S.; Wysocki, A. Interactions between Extracellular Matrix and Growth Factors in Wound Healing. *Wound Repair Regen.* **2009**, *17* (2), 153–162. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x>.
- (17) *Chemical Biology of Glycoproteins*; Tan, Z., Wang, L.-X., Eds.; Royal Society of Chemistry: Cambridge, 2017. <https://doi.org/10.1039/9781782623823>.
- (18) Dickinson, L. E.; Gerecht, S. Engineered Biopolymeric Scaffolds for Chronic Wound Healing. *Front. Physiol.* **2016**, *7*, Art. 341. <https://doi.org/10.3389/fphys.2016.00341>.
- (19) Han, G.; Ceilley, R. Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Adv. Ther.* **2017**, *34* (3), 599–610. <https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>.
- (20) Gould, L. J. Topical Collagen-Based Biomaterials for Chronic Wounds: Rationale and Clinical Application. *Adv. Wound Care* **2016**, *5* (1), 19–31. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0595>.
- (21) Overview of Protein Assays Methods - PE.
- (22) Chemistry of Protein Assays - PE <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life->

- science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/chemistry-protein-assays.html (accessed Feb 5, 2019).
- (23) LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193* (1), 265–275.
- (24) Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Anal. Biochem.* **1985**, *150* (1), 76–85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7).
- (25) Bradford, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72* (1–2), 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- (26) Olson, B. J. S. C.; Markwell, J. Assays for Determination of Protein Concentration. *Curr. Protoc. protein Sci.* **2007**, *Chapter 3*, Unit 3.4. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps0304s48>.
- (27) Noble, J. E.; Knight, A. E.; Reason, A. J.; Di Matola, A.; Bailey, M. J. A. A Comparison of Protein Quantitation Assays for Biopharmaceutical Applications. *Mol. Biotechnol.* **2007**, *37* (2), 99–111.
- (28) Kirschbaum, B. CBQCA Assay of Primary Amine Losses during Hemodialysis. *Clin. Chim. Acta* **2001**, *308* (1–2), 147–153. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(01\)00483-1](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(01)00483-1).
- (29) How a Flow Cytometer Works - PE <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html> (accessed Jun 1, 2019).
- (30) Hogg, K.; Thomas, J.; Ashford, D.; Cartwright, J.; Coldwell, R.; Weston, D. J.; Pillmoor, J.; Surry, D.; O’Toole, P. Quantification of Proteins by Flow Cytometry: Quantification of Human Hepatic Transporter P-Gp and OATP1B1 Using Flow Cytometry and Mass Spectrometry. *Methods* **2015**, *82*, 38–46. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.030>.
- (31) Dunbar, P. R.; Harrison, A.; Corkill, M. M.; Neale, T. J. Immunoassay of Platelet-Derived Growth Factor in the Plasma of Patients with Scleroderma. *Br. J. Rheumatol.* **1993**, *32* (11),

- 966–971.
- (32) Harrison, A. A.; Dunbar, P. R.; Neale, T. J. Immunoassay of Platelet-Derived Growth Factor in the Blood of Patients with Diabetes Mellitus. *Diabetologia* **1994**, *37* (11), 1142–1146.
- (33) Khosravi, M. J.; Diamandi, A.; Mistry, J.; Lee, P. D. Noncompetitive ELISA for Human Serum Insulin-like Growth Factor-I. *Clin. Chem.* **1996**, *42* (8 Pt 1), 1147–1154.
- (34) del Valle, R.; González, E. C.; Melchor, A.; Pérez, P. L.; González, I.; Carr, A.; León, K. An Enzyme Immunoassay for Determining Epidermal Growth Factor (EGF) in Human Serum Samples Using an Ultramicroanalytical System. *J. Immunoass. Immunochem.* **2017**, *38* (2), 190–201. <https://doi.org/10.1080/15321819.2016.1236729>.
- (35) Shi, T.; Su, D.; Liu, T.; Tang, K.; Camp, D. G.; Qian, W.-J.; Smith, R. D. Advancing the Sensitivity of Selected Reaction Monitoring-Based Targeted Quantitative Proteomics. *Proteomics* **2012**, *12* (8), 1074–1092. <https://doi.org/10.1002/pmic.201100436>.
- (36) Such-Sanmartín, G.; Bache, N.; Callesen, A. K.; Rogowska-Wrzesinska, A.; Jensen, O. N. Targeted Mass Spectrometry Analysis of the Proteins IGF1, IGF2, IBP2, IBP3 and A2GL by Blood Protein Precipitation. *J. Proteomics* **2015**, *113*, 29–37. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.09.013>.
- (37) Mass Spectrometry Applications Areas. <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/industrial/mass-spectrometry/mass-spectrometry-learning-center/mass-spectrometry-applications-area.html>. Fecha de consulta: 06/04/18.
- (38) Domon, B.; Aebersold, R. Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science* **2006**, *312* (5771), 212–217. <https://doi.org/10.1126/science.1124619>.
- (39) Zubarev, R. A.; Makarov, A. Orbitrap Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (11), 5288–5296. <https://doi.org/10.1021/ac4001223>.
- (40) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*, Sixth Ed.
- (41) Ramautar, R.; Somsen, G. W.; de Jong, G. J. CE-MS for Metabolomics: Developments and Applications in the Period 2014-2016. *Electrophoresis* **2017**, *38* (1), 190–202. <https://doi.org/10.1002/elps.201600370>.
- (42) Schappler, J.; González-Ruiz, V.; Rudaz, S. CE-MS in Drug Analysis and Bioanalysis. In

- Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry (CE-MS): Principles and Applications*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2016; pp 129–157.
<https://doi.org/10.1002/9783527693801.ch6>.
- (43) Wilson, S. R.; Vehus, T.; Berg, H. S.; Lundanes, E. Nano-LC in Proteomics: Recent Advances and Approaches. *Bioanalysis* **2015**, *7* (14), 1799–1815. <https://doi.org/10.4155/bio.15.92>.
- (44) Gillet, L. C.; Navarro, P.; Tate, S.; Röst, H.; Selevsek, N.; Reiter, L.; Bonner, R.; Aebersold, R. Targeted Data Extraction of the MS/MS Spectra Generated by Data-Independent Acquisition: A New Concept for Consistent and Accurate Proteome Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (6), O111.016717. <https://doi.org/10.1074/mcp.O111.016717>.
- (45) Ludwig, C.; Gillet, L.; Rosenberger, G.; Amon, S.; Collins, B. C.; Aebersold, R. Data-Independent Acquisition-Based SWATH-MS for Quantitative Proteomics: A Tutorial. *Mol. Syst. Biol.* **2018**, *14* (8), e8126. <https://doi.org/10.15252/msb.20178126>.
- (46) Steen, H.; Mann, M. The Abc's (and Xyz's) of Peptide Sequencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2004**, *5* (9), 699–711. <https://doi.org/10.1038/nrm1468>.
- (47) Gianazza, E.; Tremoli, E.; Banfi, C. The Selected Reaction Monitoring/Multiple Reaction Monitoring-Based Mass Spectrometry Approach for the Accurate Quantitation of Proteins: Clinical Applications in the Cardiovascular Diseases. *Expert Rev. Proteomics* **2014**, *11* (6), 771–788. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.947966>.
- (48) Rauniyar, N.; Navin. Parallel Reaction Monitoring: A Targeted Experiment Performed Using High Resolution and High Mass Accuracy Mass Spectrometry. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (12), 28566–28581. <https://doi.org/10.3390/ijms161226120>.
- (49) Parallel Reaction Monitoring (PRM) - Creative Proteomics <https://www.creative-proteomics.com/services/parallel-reaction-monitoring-prm.htm> (accessed Apr 9, 2018).
- (50) Gallien, S.; Duriez, E.; Crone, C.; Kellmann, M.; Moehring, T.; Domon, B. Targeted Proteomic Quantification on Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer. *Mol. Cell. Proteomics* **2012**, *11* (12), 1709–1723. <https://doi.org/10.1074/mcp.O112.019802>.
- (51) Yu, Q.; Liu, B.; Ruan, D.; Niu, C.; Shen, J.; Ni, M.; Cong, W.; Lu, X.; Jin, L. A Novel Targeted Proteomics Method for Identification and Relative Quantitation of Difference in

- Nitration Degree of OGDH between Healthy and Diabetic Mouse. *Proteomics* **2014**, *14* (21–22), 2417–2426. <https://doi.org/10.1002/pmic.201400274>.
- (52) Tsuchiya, H.; Tanaka, K.; Saeki, Y. The Parallel Reaction Monitoring Method Contributes to a Highly Sensitive Polyubiquitin Chain Quantification. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2013**, *436* (2), 223–229. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.080>.
- (53) General Principles of Quantitative Proteomics - Tina Ludwig - DIA/SWATH Course 2017 - ETH Zurich <https://www.youtube.com/watch?v=YJVgIDp6q2U&t=233s> (accessed Apr 13, 2018).
- (54) Colangelo, C. M.; Chung, L.; Bruce, C.; Cheung, K.-H. Review of Software Tools for Design and Analysis of Large Scale MRM Proteomic Datasets. *Methods* **2013**, *61* (3), 287–298. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2013.05.004>.
- (55) Proteome Discoverer™ Software <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/OPTON-30795> (accessed Jul 16, 2019).
- (56) Stadelmann, W. K.; Digenis, A. G.; Tobin, G. R. Physiology and Healing Dynamics of Chronic Cutaneous Wounds. *Am. J. Surg.* **1998**, *176* (2A Suppl), 26S-38S.
- (57) Huicho, L.; Trelles, M.; Gonzales, F.; Mendoza, W.; Miranda, J. Mortality Profiles in a Country Facing Epidemiological Transition: An Analysis of Registered Data. *BMC Public Health* **2009**, *9*:47 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-47>.
- (58) Gwak, J. H.; Sohn, S. Y.; Roberts, M.; Stewart, B.; Storer, A.; Tingley, D. Identifying the Trends in Wound-Healing Patents for Successful Investment Strategies. *PLoS One* **2017**, *12* (3), e0174203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174203>.
- (59) Proc, J. L.; Kuzyk, M. A.; Hardie, D. B.; Yang, J.; Smith, D. S.; Jackson, A. M.; Parker, C. E.; Borchers, C. H. A Quantitative Study of the Effects of Chaotropic Agents, Surfactants, and Solvents on the Digestion Efficiency of Human Plasma Proteins by Trypsin. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (10), 5422–5437. <https://doi.org/10.1021/pr100656u>.
- (60) Sample Preparation for Mass Spectrometry | Protein Biology Resource Library. <https://www.thermofisher.com/pe/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning>. Fecha de consulta: 20/06/17.

- (61) Riviere, L. R.; Tempst, P. Enzymatic Digestion of Proteins in Solution. In *Current Protocols in Protein Science*; John Wiley & Sons, Inc.: Hoboken, NJ, USA, 1995; Vol. Chapter 11. <https://doi.org/10.1002/0471140864.ps1101s00>.
- (62) Fremout, W. Tryptic Cleavage of Proteinaceous Paint: A High-Performance Protein Binder Analytical Technique, 2014. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4021.9362>.
- (63) ThermoFisher. Pierce™ C18 Spin Columns https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011495_Pierce_C18_SpinCol_UG.pdf.
- (64) The ABC of SRM - Christina Ludwig - Targeted Proteomics Course - ETHZ 2015 <https://www.youtube.com/watch?v=xq0Q99tbKIY> (accessed Apr 15, 2018).
- (65) León, I. R.; Schwämmle, V.; Jensen, O. N.; Sprenger, R. R. Quantitative Assessment of In-Solution Digestion Efficiency Identifies Optimal Protocols for Unbiased Protein Analysis. *Mol. Cell. Proteomics* **2013**, *12* (10), 2992–3005. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.025585>.
- (66) Juri Rappsilber, †; Yasushi Ishihama, †, A.; Mann*, M. Stop and Go Extraction Tips for Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Nanoelectrospray, and LC/MS Sample Pretreatment in Proteomics. **2002**. <https://doi.org/10.1021/AC026117I>.
- (67) Schägger, H. Tricine–SDS-PAGE. *Nat. Protoc.* **2006**, *1* (1), 16–22. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.4>.
- (68) Wilm, M. Principles of Electrospray Ionization. *Mol. Cell. Proteomics* **2011**, *10* (7), M111.009407. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.009407>.
- (69) Jaskolla, T. W.; Karas, M. Compelling Evidence for Lucky Survivor and Gas Phase Protonation: The Unified MALDI Analyte Protonation Mechanism. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, *22* (6), 976–988. <https://doi.org/10.1007/s13361-011-0093-0>.

Anexo

A1. Analisis por MALDI

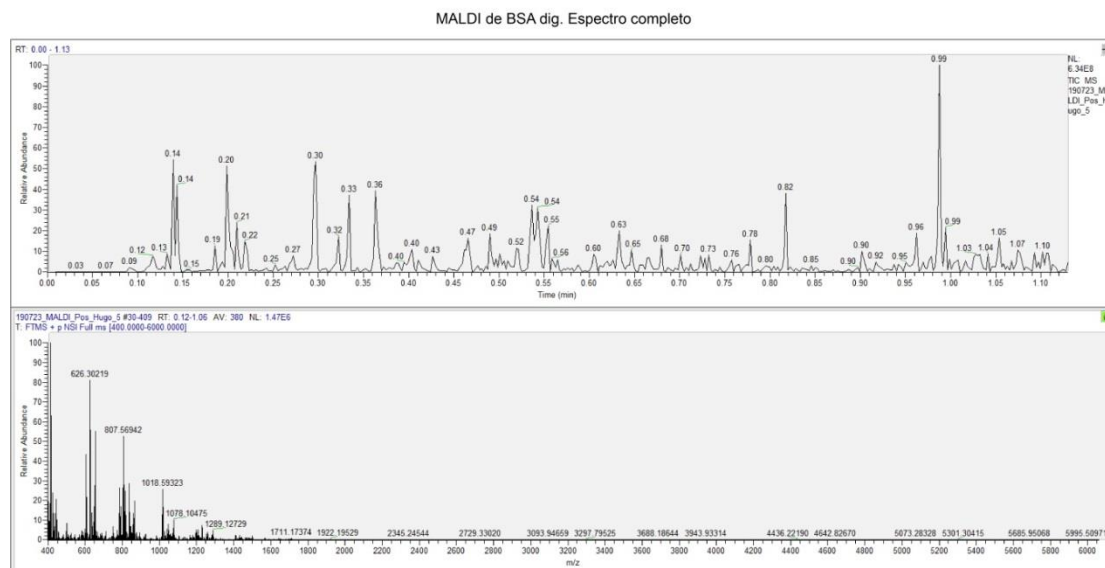


Figura A1. Análisis por MALDI de la muestra de BSA digerida según el protocolo del punto 4.2.2.1. En la parte superior se presenta el tiempo de análisis y en la parte inferior se presenta el espectro m/z completo.

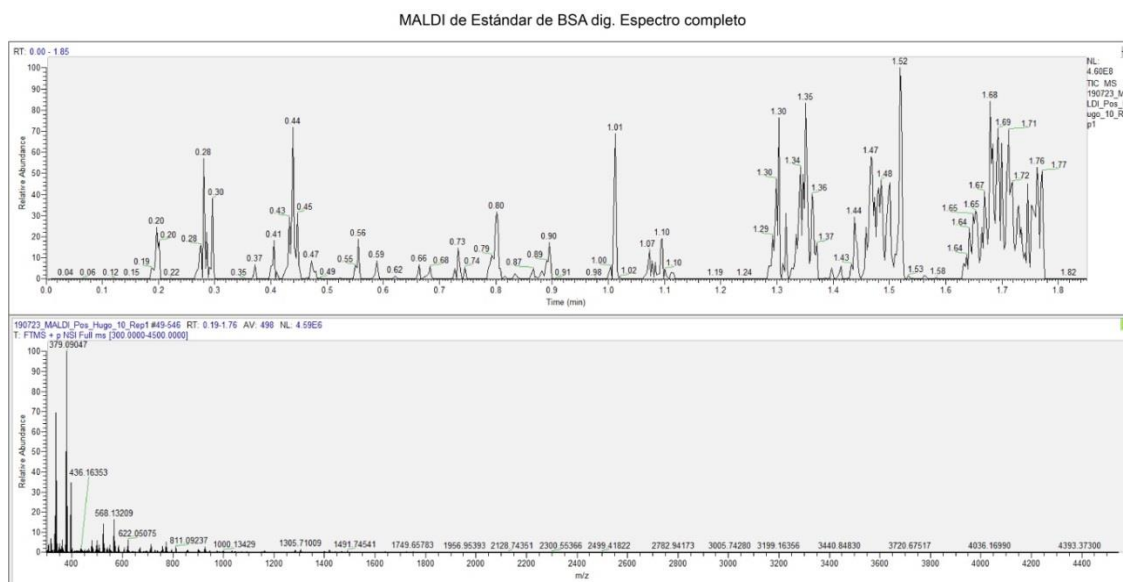


Figura A2. Análisis por MALDI del estándar de BSA digerido. En la parte superior se presenta el tiempo de análisis y en la parte inferior se presenta el espectro m/z completo.

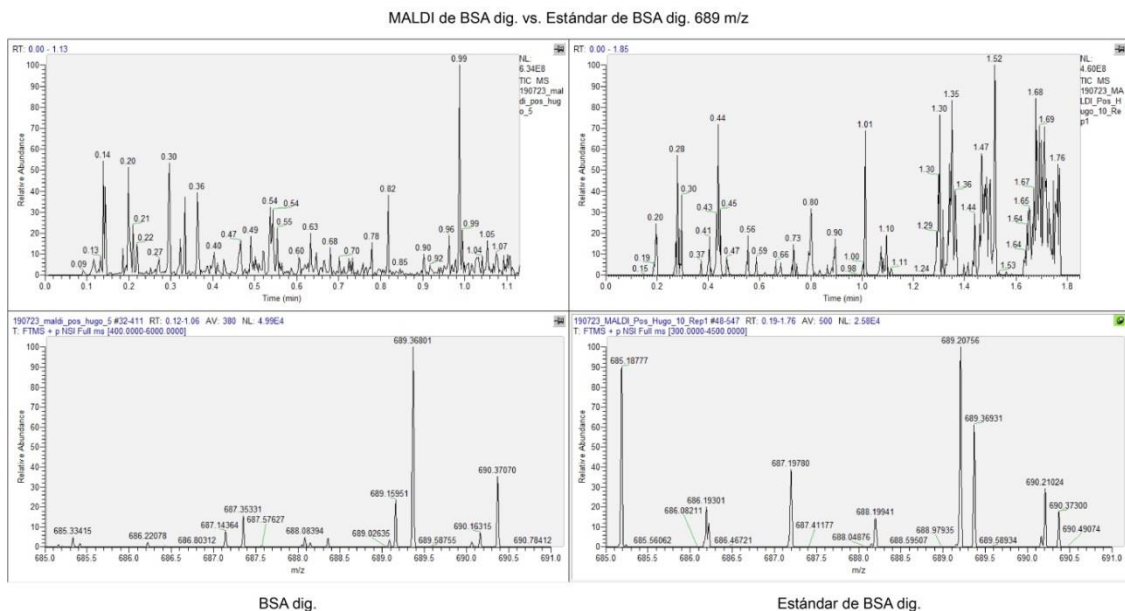


Figura A3. Comparación del análisis por MALDI para la señal de 689 m/z de la muestra de BSA digerida según el protocolo del **punto 4.2.2.1** (parte izquierda) vs. el estándar de BSA digerido (parte derecha). En la parte superior se presentan los tiempos de análisis y en la parte inferior se presentan los espectros m/z de cada muestra.

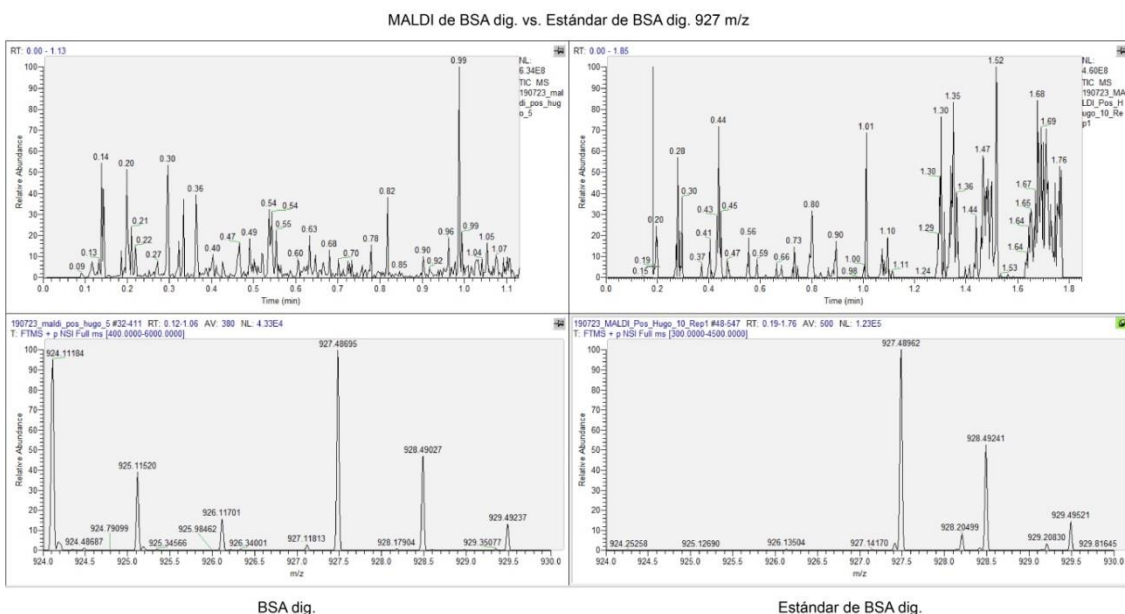


Figura A4. Comparación del análisis por MALDI para la señal de 927 m/z de la muestra de BSA digerida según el protocolo del **punto 4.2.2.1** (parte izquierda) vs. el estándar de BSA digerido (parte derecha). En la parte superior se presentan los tiempos de análisis y en la parte inferior se presentan los espectros m/z de cada muestra.

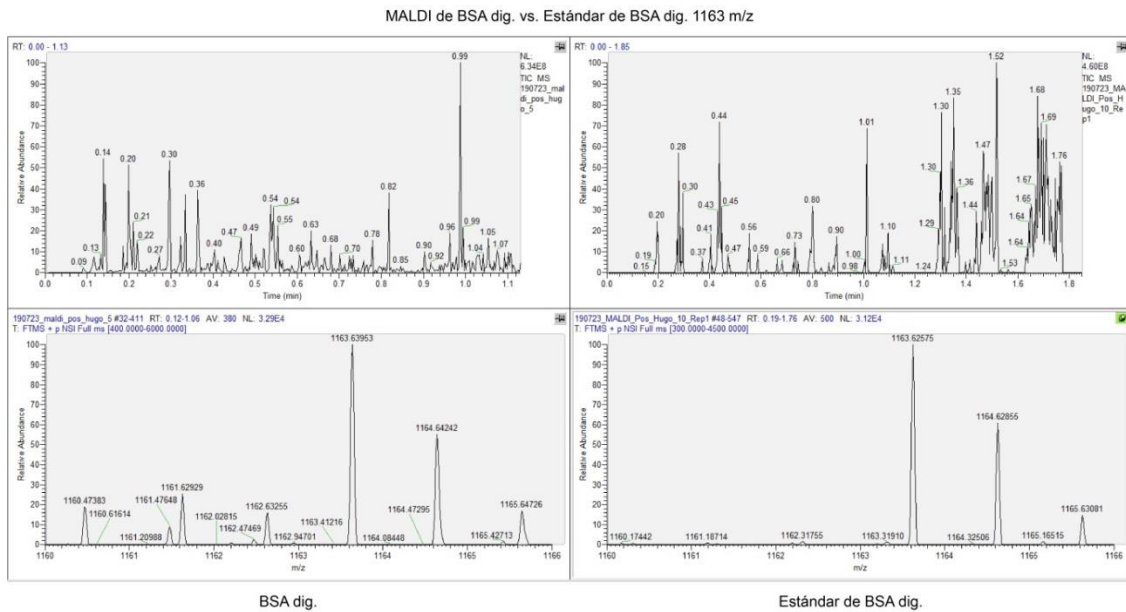


Figura A5. Comparación del análisis por MALDI para la señal de 1163 m/z de la muestra de BSA digerida según el protocolo del **punto 4.2.2.1** (parte izquierda) vs. el estándar de BSA digerido (parte derecha). En la parte superior se presentan los tiempos de análisis y en la parte inferior se presentan los espectros m/z de cada muestra.

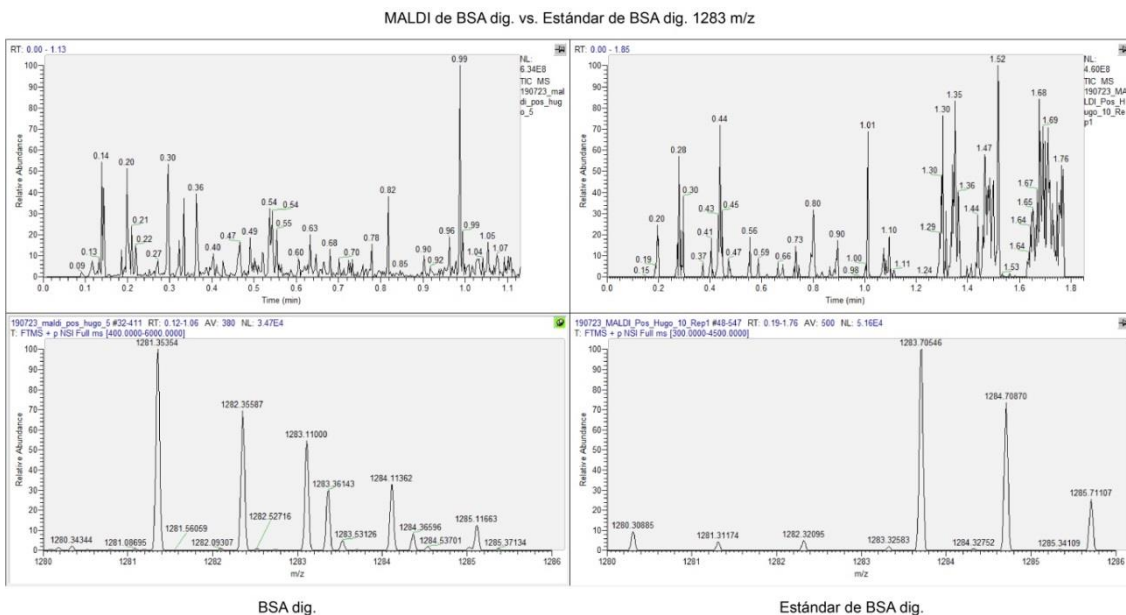


Figura A6. Comparación del análisis por MALDI para la señal de 1283 m/z de la muestra de BSA digerida según el protocolo del **punto 4.2.2.1** (parte izquierda) vs. el estándar de BSA digerido (parte derecha). En la parte superior se presentan los tiempos de análisis y en la parte inferior se presentan los espectros m/z de cada muestra.

MALDI de BSA dig. vs. Estándar de BSA dig. 1479 m/z

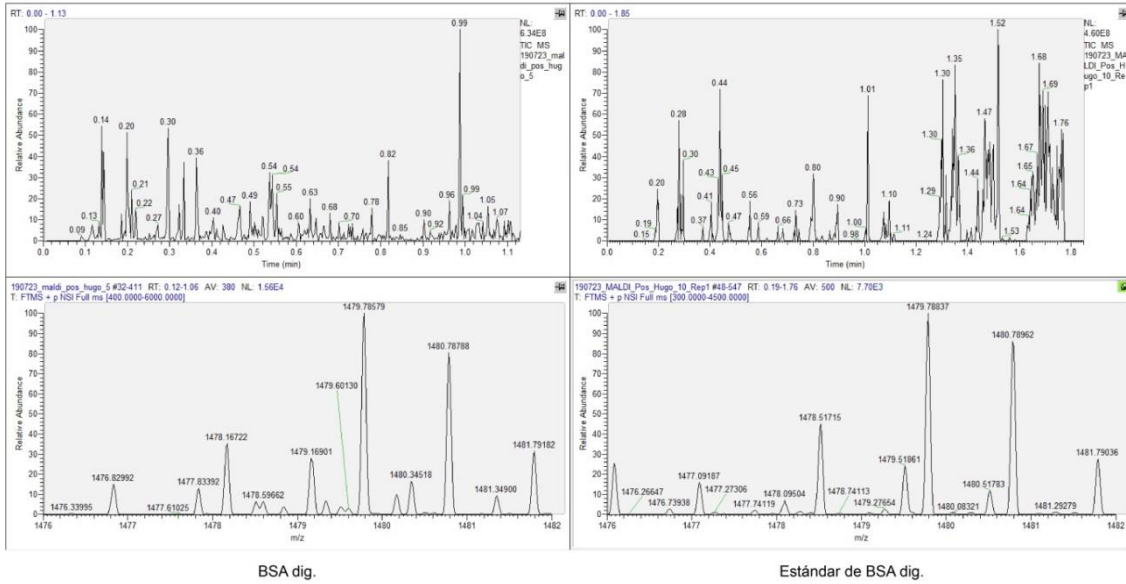


Figura A7. Comparación del análisis por MALDI para la señal de 1479 m/z de la muestra de BSA digerida según el protocolo del **punto 4.2.2.1** (parte izquierda) vs. el estándar de BSA digerido (parte derecha). En la parte superior se presentan los tiempos de análisis y en la parte inferior se presentan los espectros m/z de cada muestra.

MALDI de BSA dig. vs. Estándar de BSA dig. 1724 m/z

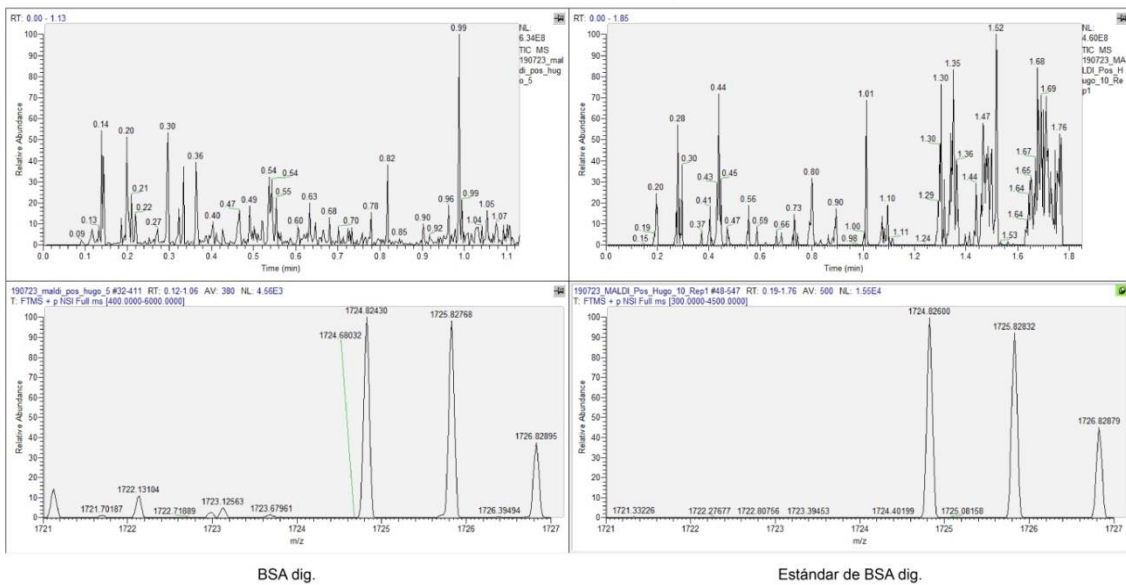


Figura A8. Comparación del análisis por MALDI para la señal de 1724 m/z de la muestra de BSA digerida según el protocolo del **punto 4.2.2.1** (parte izquierda) vs. el estándar de BSA digerido (parte derecha). En la

parte superior se presentan los tiempos de análisis y en la parte inferior se presentan los espectros m/z de cada muestra.

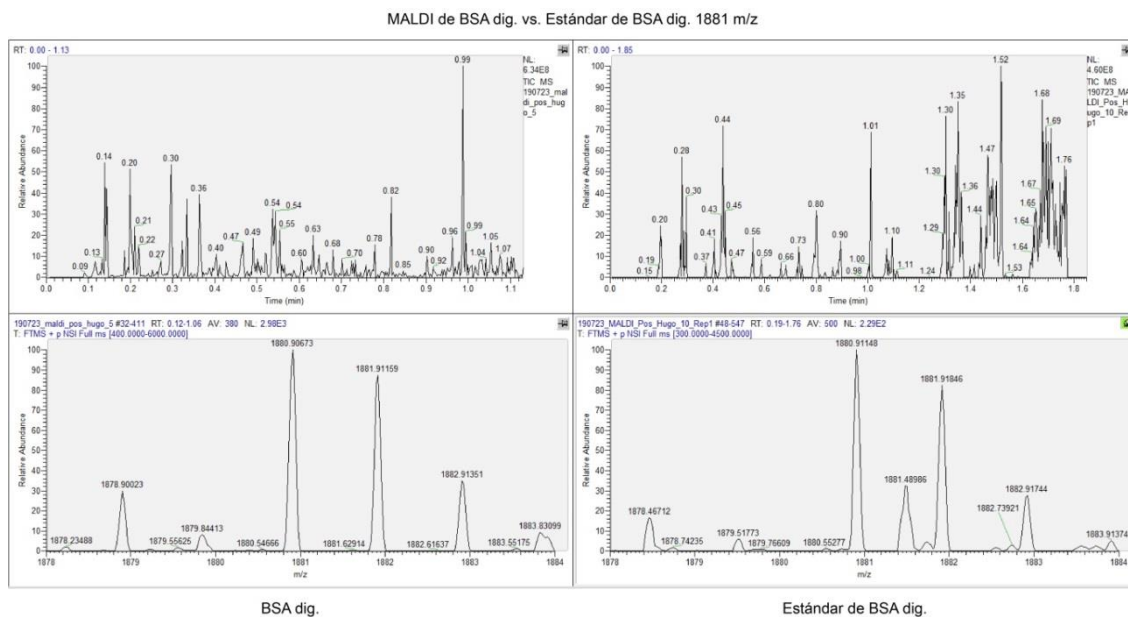


Figura A9. Comparación del análisis por MALDI para la señal de 1881 m/z de la muestra de BSA digerida según el protocolo del **punto 4.2.2.1** (parte izquierda) vs. el estándar de BSA digerido (parte derecha). En la parte superior se presentan los tiempos de análisis y en la parte inferior se presentan los espectros m/z de cada muestra.

A2. Analisis por nano LC-ESI

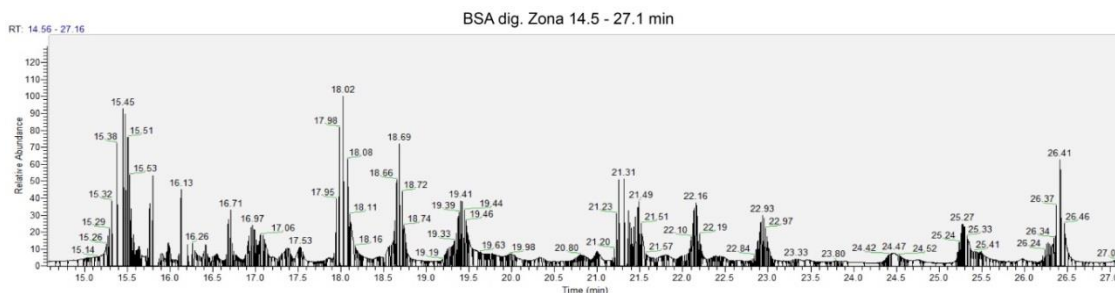


Figura A10. Cromatograma del análisis por nanoLC-ESI para BSA digerido según el protocolo del **punto 4.2.2.1**. Acercamiento del cromatograma 3) de la **Figura 19** en la zona de 14.5 - 27.1 minutos.

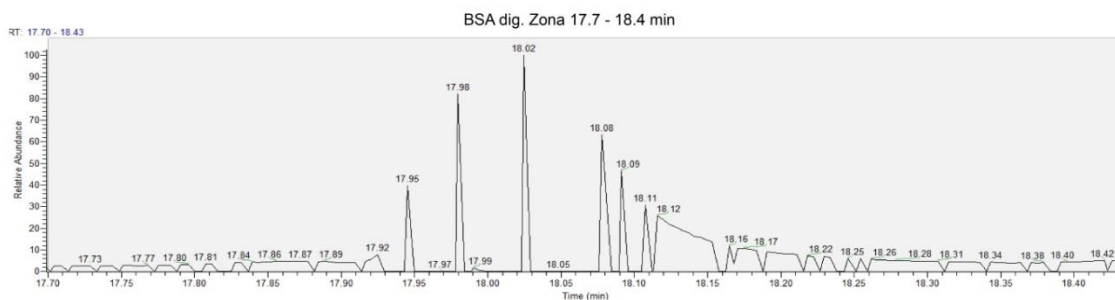


Figura A11. Cromatograma del análisis por nanoLC-ESI para BSA digerido según el protocolo del **punto 4.2.2.1.** Acercamiento del cromatograma 3) de la **Figura 19** en la zona de 17.7 - 18.4 minutos.

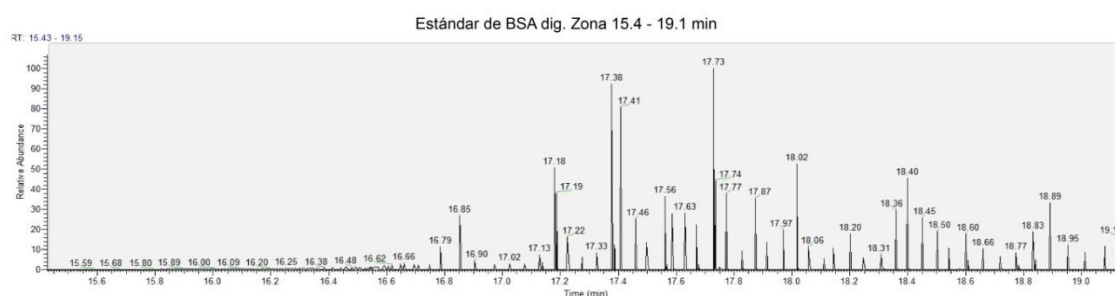


Figura A12. Cromatograma del análisis por nanoLC-ESI para el estándar de BSA digerido. Acercamiento del cromatograma 4) de la **Figura 19** en la zona de 15.4 - 19.1 minutos.



Figura A13. Cromatograma del análisis por nanoLC-ESI para el estándar de BSA digerido. Acercamiento del cromatograma 4) de la **Figura 19** en la zona de 16.4 - 16.8 minutos.

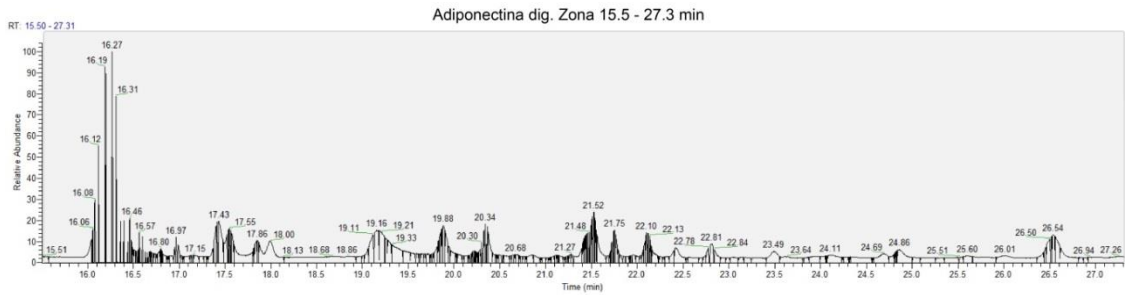


Figura A14. Cromatograma del análisis por nanoLC-ESI para Adiponectina digerida según el protocolo del punto 4.2.2.1. Acercamiento del cromatograma 2) de la **Figura 19** en la zona de 15.5 - 27.3 minutos.

A3. Comparación de análisis por MALDI y por nano LC-ESI para el estándar de BSA digerido.

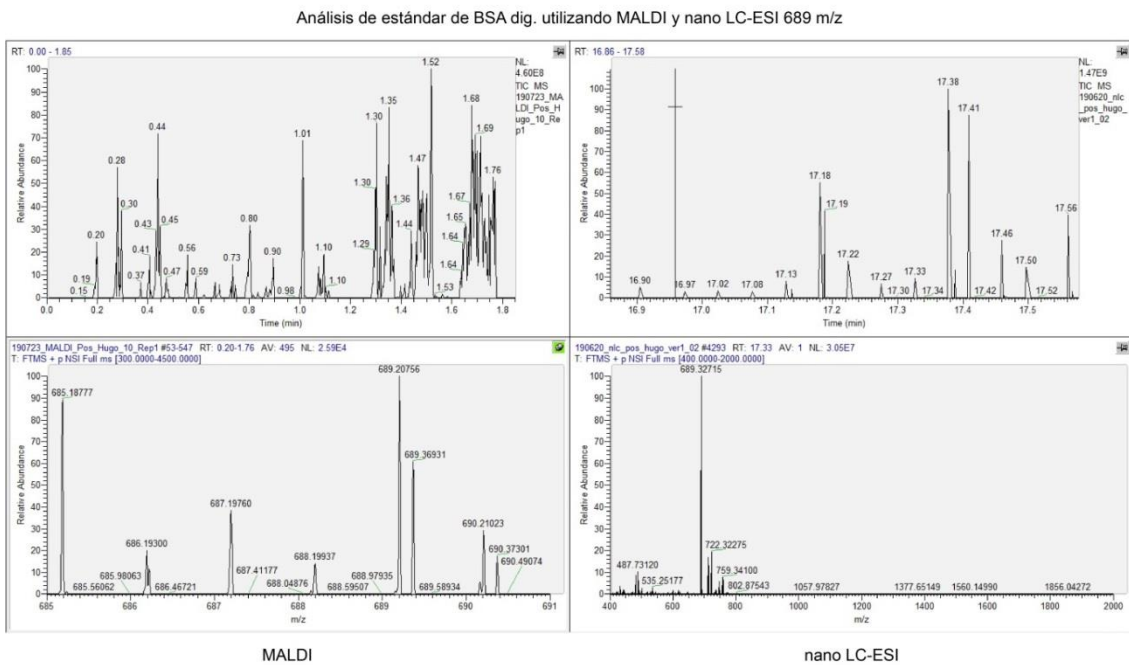


Figura A15. Datos utilizados para la **Tabla 11** del punto 4.2.2.6. Comparación del análisis por MALDI y nanoLC-ESI para el estándar de BSA digerido para la señal de 689 m/z.

Análisis de estándar de BSA dig. utilizando MALDI y nano LC-ESI 927 m/z

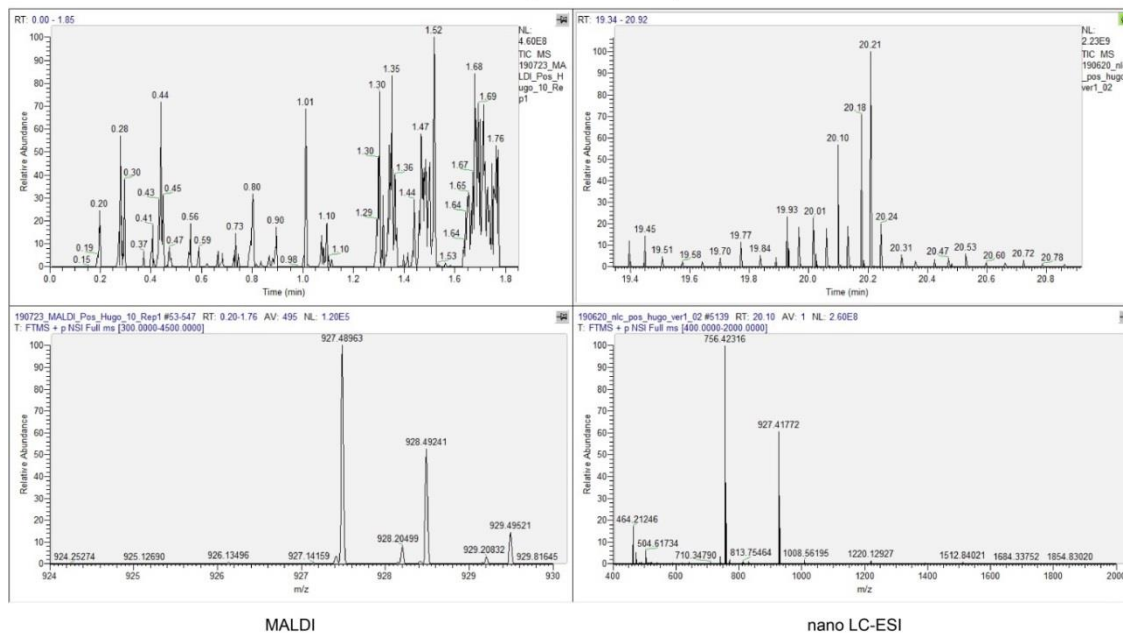


Figura A16. Datos utilizados para la Tabla 11 del punto 4.2.2.6. Comparación del análisis por MALDI y nanoLC-ESI para el estándar de BSA digerido para la señal de 927 m/z.

Análisis de estándar de BSA dig. utilizando MALDI y nano LC-ESI 1163 m/z

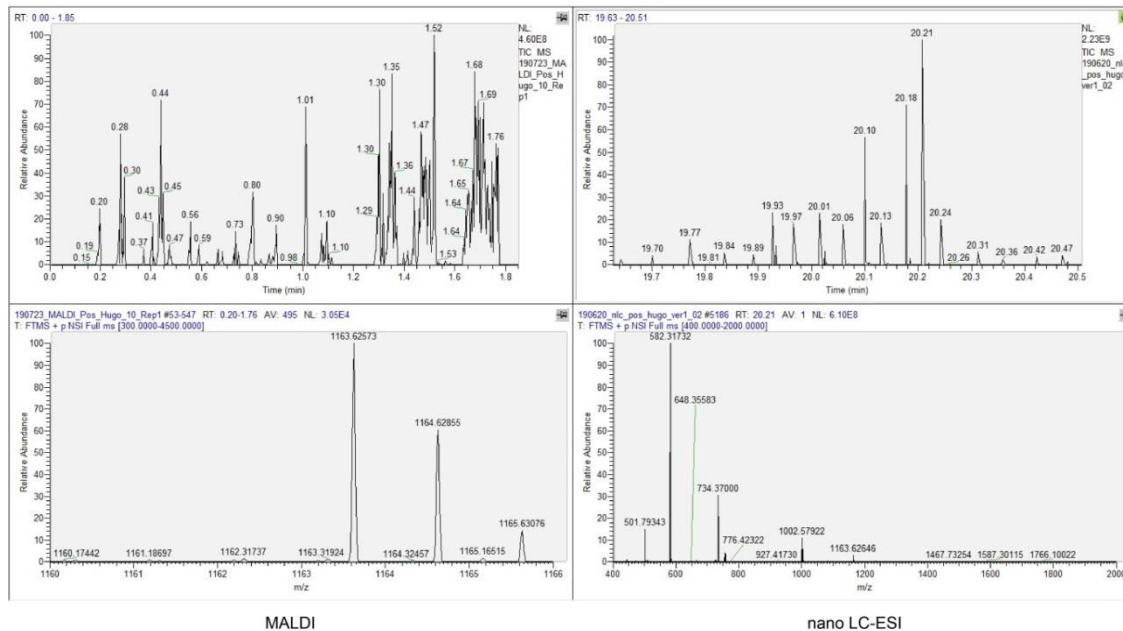


Figura A17. Datos utilizados para la Tabla 11 del punto 4.2.2.6. Comparación del análisis por MALDI y nanoLC-ESI para el estándar de BSA digerido para la señal de 1163 m/z.

Análisis de estándar de BSA dig. utilizando MALDI y nano LC-ESI 1283 m/z

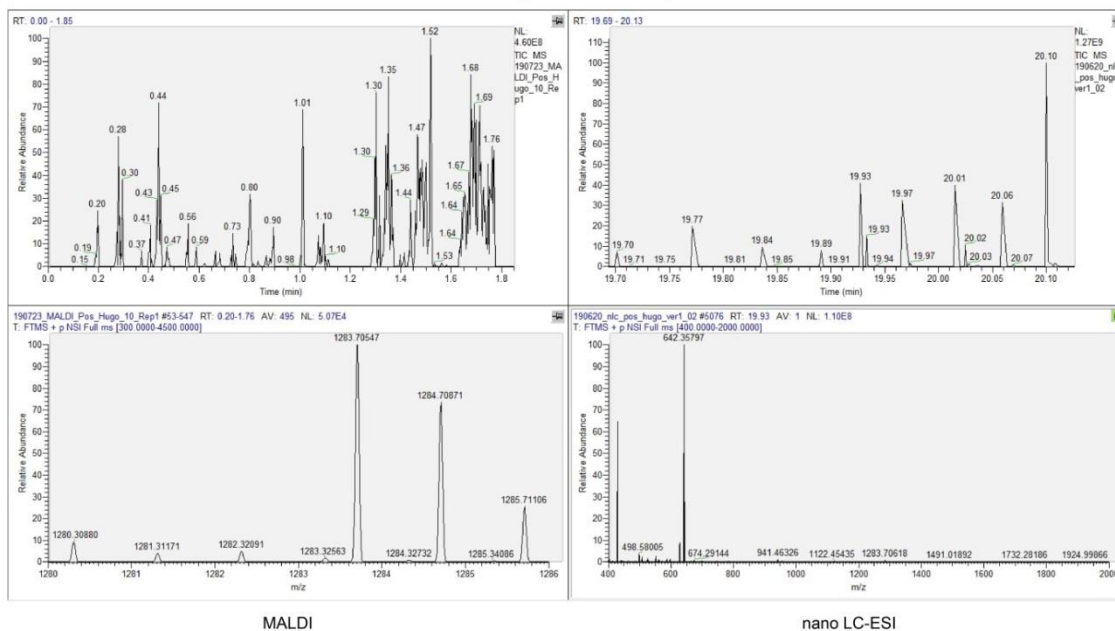


Figura A18. Datos utilizados para la **Tabla 11** del punto 4.2.2.6. Comparación del análisis por MALDI y nanoLC-ESI para el estándar de BSA digerido para la señal de 1283 m/z.

Análisis de estándar de BSA dig. utilizando MALDI y nano LC-ESI 1479 m/z

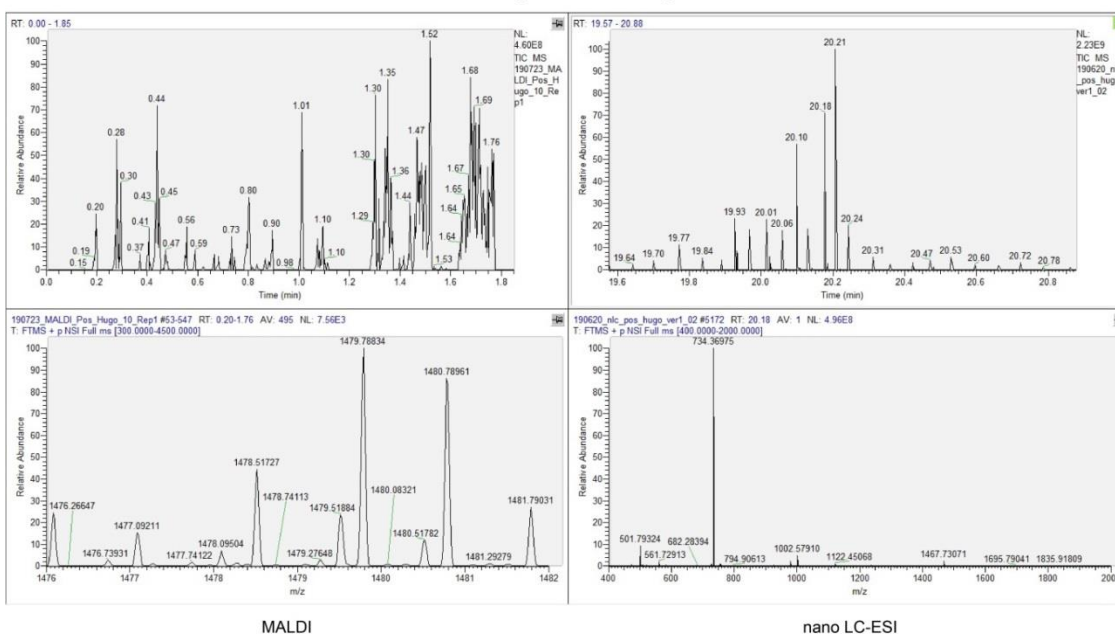


Figura A19. Datos utilizados para la **Tabla 11** del punto 4.2.2.6. Comparación del análisis por MALDI y nanoLC-ESI para el estándar de BSA digerido para la señal de 1479 m/z.

Análisis de estándar de BSA dig. utilizando MALDI y nano LC-ESI 1749 m/z

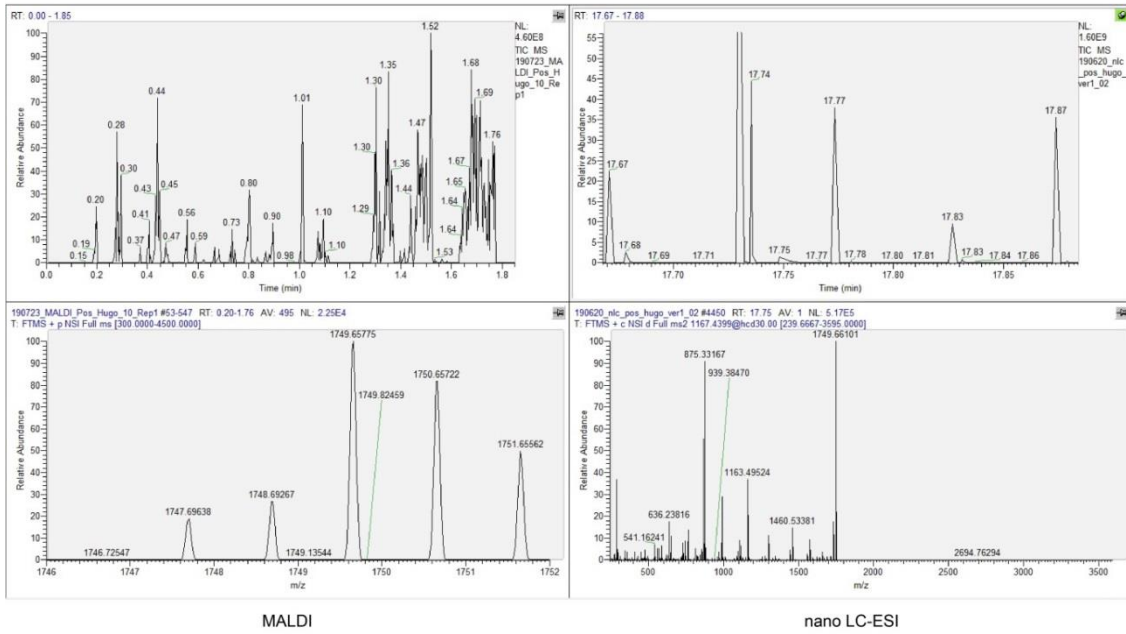


Figura A20. Datos utilizados para la **Tabla 11** del **punto 4.2.2.6**. Comparación del análisis por MALDI y nanoLC-ESI para el estándar de BSA digerido para la señal de 1749 m/z.

A4. Parámetros instrumentales para el análisis por nano LC-ESI

Parámetros de las corridas cromatográficas del nano LC

Sample pickup and loading | Gradient | Pre-column and Analytical column | Autosampler

Sample pickup

Volume: μl (Max. is "loop size - 2 μl ")

Flow: $\mu\text{l}/\text{min}$

Sample loading

Volume: μl

Flow: $\mu\text{l}/\text{min}$

Max. pressure: Bar

Solvents: A: water B: acetonitrile 90%

< Back Next >

Sample pickup and loading | Gradient | Pre-column and Analytical column | Autosampler

Gradient

Time	Duration	Flow [nl/min]	%B
00:00	00:00	100	5
05:00	05:00	300	5
50:00	45:00	300	40
55:00	05:00	300	90
60:00	05:00	300	90

Flow [nl/min] AB mixture [%B]

Time [min]

Add Del Up Down

Solvents: A: water B: acetonitrile 90%
Acetonitrile concentrations over 95% shorten the lifetime of system components.

< Back Next >

Sample pickup and loading | Gradient | Pre-column and Analytical column | Autosampler

Pre-column equilibration

Volume: μl

Flow: $\mu\text{l}/\text{min}$

Max. pressure: Bar

Analytical column equilibration

Volume: μl

Flow: $\mu\text{l}/\text{min}$

Max. pressure: Bar

Solvents: A: water B: acetonitrile 90%

< Back Next >

Sample pickup and loading | Gradient | Pre-column and Analytical column | Autosampler

Auto-sampler wash

Standard

Flush volume: μl

Custom

Step	Source	Volume [μl]	Cycles
------	--------	--------------------------	--------

Add Del Up Down

Note: Max. vol. is "loop size + 8 μl ". Wash bottle is no. 4.

Solvents: A: water B: acetonitrile 90%

< Back Next >

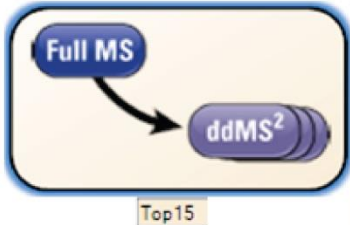
Figura A21. Parámetros del nano cromatógrafo líquido para la elución de muestras.

Parámetros de adquisición para MS utilizando nano LC

Properties of the method

Use lock masses: best
Chrom. peak width: 15 s
Time
Method duration: 60.00 min

Method duration
Duration of the method



Properties of Full MS / dd-MS² (

General	
Runtime	0 to 60 min
Polarity	positive
Default charge state	2
Inclusion	—
Exclusion	—
Tags	—
Full MS	
Resolution	60,000
AGC target	3e6
Maximum IT	75 ms
Scan range	400 to 2000 m/z
dd-MS² / dd-SIM	
Resolution	15,000
AGC target	1e5
Maximum IT	250 ms
Loop count	15
TopN	15
Isolation window	4.0 m/z
Fixed first mass	—
(N)CE / stepped nce	30
Spectrum data type	Centroid
dd Settings	
Minimum AGC target	8.00e3
Intensity threshold	3.2e4
Apex trigger	—
Charge exclusion	unassigned; 1
Peptide match	preferred
Exclude isotopes	on
Dynamic exclusion	15.0 s

Figura A22. Parámetros de adquisición en el espectrómetro de masas para la elución de muestras.

A5. Secuencia de proteínas

- **BSA (UniProtKB, P02769, ALBU_BOVIN):**

MKWVTFISLLLLFSSAYSRGVFRRDTHKSEIAHRFKDLGEEHFKGLVLIAFSQYLQQCPF
DEHVKLVNELTEFAKTCVADESHAGCEKSLHTLFGDELCKVASLRETYGDMADCCEKQEP
ERNECFLSHKDDSPDLPKLPDPNTLCDEFKADEKKFWGKLYEIIARRHPYFYAPELLYY
ANKYNGVFQECCQAEDKGACLLPKIETMREKVLASSARQLRCASIQKFGERALKAWSVA
RLSQKFPKAEFVEVTKLVTDLTKVHKECCHGDLLECADDRADLAKYICDNQDTISSKLKE
CCDKPLLEKSHCIAEVEKDAIPENLPPLTADFAEDKDVCNKYQEAKDAFLGSFLYEYSRR
HPEYAVSVLLRLAKEYEATLEECCAADDPHACYSTVFDKCLKHLVDEPQNLIKQNCQFEK
LGEYGFQNALIVRYTRKVPQVSTPTLVEVSRSLGKVGTRCCTKPESERMPCTEDYLSLIL
NRLCVLHEKTPVSEKVTCCTESLVNRRPCFSALTPDETYVPKAFDEKLFTFHADICTLP
DTEKQIKKQTALVELLKHKPKATEEQLKTMENFVAFVDKCCAADDKEACFAVEGPKLVV
STQTALA

- **PDGF (ficha técnica del producto):**

Cadena alfa: MSIEEAVPAV CKTRTVIYEI PRSQVDPTSA NFLIWPPCVE VKRCTGCCNT
SSVKCQPSRV HHRSVKVAKV
EYVRKKPKLK EVQVRLEEHL ECACATTSLN PDYREEDTGR PRESGKKRKR KRLKPT

Cadena beta: MSLGSLTIAE PAMIAECKTR TEVFEISRRL IDRTNANFLV WPPCVEVQRC
SGCCNNRNVQ CRPTQVQLRP VQVRKIGIVR
KKPIFKKATV TLGDHLACKC ETVAAARPVT

- **EGF (ficha técnica del producto):**

NSDSECPLSH DGYCLHDGVC MYIEALDKYA CNCVVGYIGE RCQYRDLKWW ELR

- **Adiponectina (neXtProt, NX_Q15848, ADIPOQ):**

MLLLGAVLLLLALPGHDQETTTQGGVLLPLPKGACTGWMAGIPGHPGHNGAPGRDGRDG
TPGEKGEKGDPLIGPKGDIGETGVPGAEGPRGFPGIQGRKGEPGEGAYVYRSAFSVGLE
TYVTIPNMPIRFTKIFYNQNNHYDGGSTGKFHCNIPGLYYFAYHITVYMKDVKVSLFKKDK
AMLFTYDQYQENNVDAQSGSVLLHLEVDQVWLQVYGEGERNGLYADNDNDSTFTGFLLY
HDTN

A6. Parámetros bioinformáticos

A6.1. Parámetros de búsqueda por ExPASy

The peptide masses are
with cysteines treated with:
 with acrylamide adducts
 with methionines oxidized
 [M+H]⁺ or [M] or [M-H]⁻ or [M+2H]²⁺ or [M+3H]³⁺
 average or monoisotopic.

Select an enzyme:

Allow for missed cleavages.
Display the peptides with a mass bigger than and smaller than Dalton

sorted by peptide masses or in chronological order in the protein.

For UniProtKB (Swiss-Prot/TrEMBL) entries only:
For each peptide display
 all known post-translational modifications,
 all database conflicts,
 all variants (polymorphisms),
 all mRNA variants (due to alternative splicing, initiation or promoter usage).

Figura A23. Parámetros utilizados para la digestión *in silico* de las proteínas de interés en el estudio.

A6.2. Parámetros de búsqueda y análisis por Proteome Discoverer 2.2

Factor de estudio

Days		Edit X
		1
		2
		3

Figura A24. Factor de estudio del *Proteome Discoverer*: días. Utilizado para la comparación de las mediciones en distintos días del estándar de BSA digerido.

Parámetros de los nodos del paso de consenso

The image displays a series of parameter configuration windows for different nodes in the Proteome Discoverer 2.2 software. The nodes shown are:

- Parameters of 'MSF Files'**:
 - 1. **Storage Settings**: Spectra to Store: Identified or Quantified; Feature Traces to SI: All.
 - 2. **Merging of Identified Peptide and Proteins**: Merge Mode: Globally by Search Engine Type.
 - 3. **FASTA Title Line Display**: Reported FASTA Title: Best match.
 - 4. **PSM Filters**: Maximum Delta Mass: 0 ppm.

1. Score	
1. Threshold	0
2. Score	
2. Threshold	0
3. Score	
3. Threshold	0
4. Score	
4. Threshold	0
5. Score	
5. Threshold	0
- Parameters of 'PSM Grouper'**:
 - 1. **Peptide Group Modifications**: Site Probability Threshold: 75.
- Parameters of 'Peptide Validator'**:
 - 1. **General Validation Settings**: Validation Mode: Automatic (Control peptide level error); Target FDR (Strict): 0.01; Target FDR (Relax): 0.05.
 - 2. **Specific Validator Settings**: Use Concatenated: False; Reset Confidences: False.
- Parameters of 'Peptide and Protein Filter'**:
 - 1. **Peptide Filters**: Peptide Confidence: High; Keep Lower Confidence: False; Minimum Peptide Length: 6; Remove Peptides With: False.
 - 2. **Protein Filters**: Minimum Number of: 1; Count Only Rank 1: False; Count Peptides Only: False.
- Parameters of 'Protein Grouping'**:
 - 1. **Protein Grouping**: Apply strict parsimon: True.
- Parameters of 'Feature Mapper'**:
 - 1. **Chromatographic Alignment**: Perform RT Alignment: True; Maximum RT Shift: 10.
 - 2. **Feature Linking Mapping**: Min. S/N Threshold: 5.
- Parameters of 'Precursor Ions Quantifier'**:
 - 1. **General Quantification Settings**: Peptides to Use: Unique + Razor; Consider Protein Group: True; Reject Quantification Results: False.
 - 2. **Precursor Quantification**: Precursor Abundance Intensity; Min. # Replicate: 0.
 - 3. **Normalization and Scaling**: Normalization Mode: None; Proteins For Normalization: None; Scaling Mode: None.
 - 4. **Exclude Peptides from Protein Quantification**:

1. Excluded Peptide	None
2. Excluded Peptide	None
3. Excluded Peptide	None
N-Terminal Excluded	None
 - 5. **Quantification Hypothesis Testing**: Ratio Calculation: Pairwise Ratio Based; Maximum Allowed Fold: 100; Imputation Mode: None; Hypothesis Test: ANOVA (Background Based).
 - 6. **Quantification Ratio Distributions**:

1st Fold Change Threshold	2
2nd Fold Change Threshold	4
3rd Fold Change Threshold	6
4th Fold Change Threshold	8
5th Fold Change Threshold	10

Figura A25. Parámetros del *Proteome Discoverer*, utilizados en los nodos del paso de consenso previo al análisis de los datos.

Parámetros de los nodos del paso de procesamiento

Parameters of 'Spectrum Files RC'	Parameters of 'Sequest HT'
Show Advanced Parameters	Show Advanced Parameters
<ul style="list-style-type: none"> 1. Search Settings <ul style="list-style-type: none"> Protein Database BSA_Fasta.fasta Enzyme Name Trypsin (Full) 1. Dynamic Modifica None Static Peptide N-Ter None <ul style="list-style-type: none"> 1. Static Modificator Carbamidomethyl / +57.021 Da (C) 	<ul style="list-style-type: none"> 1. Input Data <ul style="list-style-type: none"> Protein Database BSA_Fasta.fasta Enzyme Name Trypsin (Full) Max. Missed Cleava 2 Min. Peptide Length 6 Max. Peptide Length 150 2. Tolerances <ul style="list-style-type: none"> Precursor Mass Tole 10 ppm Fragment Mass Tole 0.6 Da Use Average Precur False Use Average Fragm False 3. Spectrum Matching <ul style="list-style-type: none"> Use Neutral Loss a l True Use Neutral Loss b l True Use Neutral Loss y l True Use Flanking Ions True Weight of a Ions 0 Weight of b Ions 1 Weight of c Ions 0 Weight of x Ions 0 Weight of y Ions 1 Weight of z Ions 0 4. Dynamic Modifications <ul style="list-style-type: none"> Max. Equal Modifica 3 1. Dynamic Modifica None 2. Dynamic Modifica None 3. Dynamic Modifica None 4. Dynamic Modifica None 5. Dynamic Modifica None 6. Dynamic Modifica None 5. Dynamic Modifications (peptide terminus) <ul style="list-style-type: none"> 1. N-Terminal Modifi None 2. N-Terminal Modifi None 3. N-Terminal Modifi None 1. C-Terminal Modifi None 2. C-Terminal Modifi None 3. C-Terminal Modifi None 6. Dynamic Modifications (protein terminus) <ul style="list-style-type: none"> 1. N-Terminal Modifi None 2. N-Terminal Modifi None 3. N-Terminal Modifi None 1. C-Terminal Modifi None 2. C-Terminal Modifi None 3. C-Terminal Modifi None 7. Static Modifications <ul style="list-style-type: none"> Peptide N-Terminus None Peptide C-Terminus None 1. Static Modificator Carbamidomethyl / +57.021 Da (C) 2. Static Modificator None 3. Static Modificator None 4. Static Modificator None 5. Static Modificator None 6. Static Modificator None
Parameters of 'Spectrum Selector'	
Show Advanced Parameters	
<ul style="list-style-type: none"> 1. General Settings <ul style="list-style-type: none"> Precursor Selection Use MS1 Precursor 2. Spectrum Properties Filter <ul style="list-style-type: none"> Lower RT Limit 0 Upper RT Limit 0 First Scan 0 Last Scan 0 Ignore Specified Sc Lowest Charge Stat 0 Highest Charge Stat 0 Min. Precursor Mass 350 Da Max. Precursor Mas: 5000 Da Total Intensity Thres 0 Minimum Peak Cour: 1 3. Scan Event Filters <ul style="list-style-type: none"> Mass Analyzer (Not specified) MS Order Is Not MS1 Activation Type (Not specified) Min. Collision Energy 0 Max. Collision Energ 1000 Scan Type Is Full Polarity Mode (Not specified) 4. Peak Filters <ul style="list-style-type: none"> S/N Threshold (FT< 1.5 5. Replacements for Unrecognized Properties <ul style="list-style-type: none"> Unrecognized Charg Automatic Unrecognized Mass ITMS Unrecognized MS O MS2 Unrecognized Activ: CID Unrecognized Polari + Unrecognized MS R 60000 Unrecognized MSn l 30000 	
Parameters of 'Target Decoy PSM Validator'	
Show Advanced Parameters	
<ul style="list-style-type: none"> 1. Input Data <ul style="list-style-type: none"> Maximum Delta Cn 0.05 Maximum Rank 0 2. Decoy Database Search <ul style="list-style-type: none"> Target FDR (Strict) 0.01 Target FDR (Relaxe 0.05 Concatenated FDR False 	

Figura A26. Parámetros del *Proteome Discoverer*, utilizados en los nodos del paso de procesamiento de datos.

A6.3. Parámetros de búsqueda y análisis por Skyline 19.1

A6.3.1 Búsqueda de librería espectral para BSA

Base de datos de NIST para BSA, utilizando trampa iónica.

(<https://chemdata.nist.gov/dokuwiki/doku.php?id=peptidew:cdownload>)

Std	BSA	Ion Trap	B. taurus	04-01-2011	725	336
-----	-----	----------	-----------	------------	-----	-----

Figura A27. Biblioteca espectral utilizada para el análisis del estándar de BSA por Skyline.

A6.3.2 Parámetros de análisis por Skyline

Ajuste de parámetros de péptidos

Digestion Prediction Filter Library Modifications Quantification

Enzyme: Trypsin [KR|P]

Max missed cleavages: 0

Background proteome: None

Enforce peptide uniqueness by: None

Digestion Prediction Filter Library Modifications Quantification

Retention time predictor: None

Use measured retention times when present

Time window: 2 min

Ion mobility predictor: None

Use spectral library ion mobility values when present

Resolving power:

Linear peak width

Digestion Prediction Filter Library Modifications Quantification

Min length: 5 Max length: 35

Exclude N-terminal AAs: 25

Exclude potential ragged ends

Exclude peptides containing:

Cys Met His NXT/NXS RP/KP

Auto-select all matching peptides

Digestion Prediction Filter Library Modifications Quantification

Libraries:

Human others BSA Human plasma non-glyco Human HCD

Pick peptides matching: Library

Rank peptides by:

Limit peptides per protein

Peptides

Digestion Prediction Filter Library Modifications Quantification

Structural modifications:

Carbamidomethyl (C) Phospho (ST) Oxidation (M) Carbamidomethyl Cysteine Phospho (Y) Phospho (S,T)

Max variable mods: 3 Max neutral losses: 1

Isotope label type: heavy

Isotope modifications:

Internal standard type: heavy

Figura A28. Parámetros de los péptidos para el análisis por Skyline.

Ajuste de parámetros de transiciones

The figure displays five panels for adjusting transition parameters in Skyline:

- Panel 1 (Top Left):**
 - Precursor mass:
 - Product ion mass:
 - Collision energy:
 - Declustering potential:
 - Optimization library:
 - Compensation voltage:
 - Use optimization values when present
- Panel 2 (Top Middle):**
 - Peptides:
 - Precursor charges:
 - Ion charges:
 - Ion types:
 - Product ion selection:
 - From:
 - To:
 - Special ions:
 - N-terminal to Proline
 - C-terminal to Glu or Asp
 - iTRAQ-114
 - iTRAQ-115
 - iTRAQ-116
 - iTRAQ-117
 - Precursor m/z exclusion window: m/z
 - Auto-select all matching transitions
- Panel 3 (Top Right):**
 - Ion match tolerance: m/z
 - If a library spectrum is available, pick its most intense ions
 - Pick:
 - product ions
 - minimum product ions
 - From filtered ion charges and types
 - From filtered ion charges and types plus filtered product ions
 - From filtered product ions
- Panel 4 (Bottom Left):**
 - Min m/z: m/z
 - Max m/z: m/z
 - Dynamic min product m/z
 - Method match tolerance m/z: m/z
 - Firmware transition limit:
 - Firmware inclusion limit:
 - Min time: min
 - Max time: min
- Panel 5 (Bottom Right):**
 - MS1 filtering:
 - Isotope peaks included:
 - Precursor mass analyzer:
 - Peaks:
 - Resolving power:
 - At: m/z
 - Isotope labeling enrichment:
 - MS/MS filtering:
 - Acquisition method:
 - Product mass analyzer:
 - Isolation scheme:
 - Resolving power:
 - At: m/z
 - Use high-selectivity extraction
 - Retention time filtering:
 - Use only scans within minutes of MS/MS IDs
 - Use only scans within minutes of predicted RT
 - Include all matching scans

Figura A29. Parámetros de las transiciones para el análisis por Skyline.