



UNIVERSIDAD NACIONAL DE EDUCACIÓN A DISTANCIA
MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA
QUÍMICA

TRABAJO DE FIN DE MÁSTER
MÓDULO DE QUÍMICA ANALÍTICA

SISTEMAS AVANZADOS EN COLUMNA
PARA EL ANÁLISIS PROTEÓMICO

Autora: LIDIA SANTIAGO ACIÉN

Tutor: ANTONIO ZAPARDIEL PALENZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
Febrero 2021

A mi Isake, que sabe lo importante que es para mí todo lo que hago y me apoya siempre de manera incondicional.

ÍNDICE

<i>RESUMEN</i>	6
<i>ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS</i>	7
<i>ÍNDICE DE TABLAS</i>	9
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	10
1 INTRODUCCIÓN	12
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	16
3 DESARROLLO HISTÓRICO DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN PROTEÓMICA.....	17
4 MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS.....	21
4.1 Cromatografía líquida	21
4.1.1 Cromatografía de intercambio iónico	21
4.1.2 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)	22
4.1.3 Cromatografía de fase reversa	24
4.1.4 Cromatografía de interacción hidrofóbica	26
4.1.5 Cromatografía de interacción hidrofílica	26
4.1.6 Cromatografía de afinidad	28
4.1.7 Cromatografía bidimensional.....	31
4.2 Electroforesis Capilar.....	33
4.2.1 Electroforesis capilar de zona.....	35
4.2.2 Electroforesis capilar bidimensional diferencial en gel	36
4.3 Cromatografía de líquidos acoplada a electroforesis capilar	38
5 PARTE EXPERIMENTAL.....	40
5.1 Preparación de la muestra	40
5.2 Análisis de la muestra.....	49
6 PROTEÓMICA Y SARS-CoV-2	62

7 PERSPECTIVAS FUTURAS	64
8 CONCLUSIONES.....	65
9 BIBLIOGRAFÍA	66

RESUMEN

El análisis proteómico actualmente se encuentra en auge, debido a su gran impacto en campos como el medioambiente, la medicina, el sector alimentario, la biología o las ciencias poliméricas.

El objetivo de la proteómica es el poder identificar y cuantificar en un único ensayo el mayor número de proteínas posible, siguiendo dos estrategias: Top-down y Bottom-up.

En la mayoría de los casos, la baja concentración de proteínas endógenas en las muestras suele ser un problema. Es por ello que, en los últimos años se han realizado grandes avances en la mejora de las técnicas existentes, con el fin de hacerlas más sensibles y poder proporcionar datos más fiables, con mayor rapidez y menor coste.

Las técnicas por excelencia para la separación de los péptidos y proteínas presentes en una muestra son la cromatografía de líquidos y la electroforesis capilar. Pero ambas requieren el acoplamiento a un espectrómetro de masas y herramientas bioinformáticas que hagan posible la identificación de los fragmentos.

En el presente trabajo, se han recopilado las investigaciones más recientes del análisis en proteómica.

Tras una pequeña introducción sobre la historia de la proteómica y la evolución de las técnicas analíticas con el paso de los años, el trabajo se centra en exponer los aspectos teóricos más relevantes de las técnicas en columna más utilizadas para el análisis de péptidos y proteínas y remarcar las últimas tendencias en proteómica. Para finalmente dar una idea sobre la línea de investigación para los próximos años.

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

1D	Unidimensional
2D	Bidimensional
2DE	Electroforesis en gel bidimensional
3D	Tridimensional
4D	Tetradimensional (4 dimensiones)
ABC	Bicarbonato de amonio
ADC	Conjugado anticuerpo - fármaco
AFC	Cromatografía de afinidad
ASMS	American Society for Mass Spectrometry
BSA	Albúmina de suero bovino
C-CP	Columnas capilares con canales
CA	Anhidrasa carbónica
CCR	Cáncer colorectal
CCS	Secciones transversales de colisión
CFP	ChipFilter Proteolysis
COVID-19	Enfermedad por Coronavirus 2019
CPE	Extracción en punto de nube
CZE	Electroforesis capilar de zona
DI	Diámetro interno
DIGE	Electroforesis capilar diferencial
DTT	Ditiotreitol
EC	Electroforesis capilar
ERLIC	Cromatografía de interacción hidrofílica de repulsión electrostática
ESI	Electrospray
FAIMS	Movilidad iónica
FASP	Preparación de muestra asistida por filtro
FIA-DIA	Adquisición independiente de datos del análisis de inyección de flujo
FT-ICR	Resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier
GELFrEE	Electroforesis de atrapamiento de fracción líquida eluida en gel
GPC	Cromatografía de permeabilidad sobre gel
HIC	Cromatografía de interacción hidrofóbica
HILIC	Cromatografía de interacción hidrofílica

HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IAM	Iodoacetamida
IEC	Cromatografía de intercambio iónico
IEF	Isoelectroenfoque
IMAC	Cromatografía de afinidad con metales inmovilizados
LC	Cromatografía líquida
LLA	Leucemia linfoblástica aguda
LPA	Poliacrilamida lineal
LPIEF	Enfoque isoeléctrico en fase líquida
MD	Separación multidimensional
M_r	Masa molecular relativa
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
Mud-PIT	Técnica multidimensional de identificación de proteínas
NP	Nanopartículas
ON	Toda la noche
PAGE	Electroforesis capilar en geles de poliacrilamida
pI	Punto isoeléctrico
PTM	Modificación post-translacional
RP	Cromatografía en fase reversa
SARS-CoV-2	Síndrome respiratorio severo causado por Coronavirus 2
SAX	Intercambio aniónico fuerte
SCX	Intercambio catiónico fuerte
SDS	Dodecilsulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño
SPEED	Sample preparation by easy extraction and digestion
sSEC	Cromatografía de exclusión en serie
TFA	Ácido trifluoroacético
U.A.	Unidades arbitrarias
UV/VIS	Ultravioleta/Visible

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Proteínas desconocidas identificadas en tejido epitelial humano ⁴⁵	25
Tabla 2. Características de los estándares de proteínas analizados. Adaptado de Gargano y col ⁵²	27
Tabla 3. Lista de 15 proteínas enriquecidas mediante IMAC para cada uno de los 5 metales estudiados ⁵⁷	30
Tabla 4. Proteínas identificadas por LC-MS/MS tras el análisis DIGE ⁸⁰	37
Tabla 5. Protocolo de proteólisis aplicado a células de mamíferos.....	47
Tabla 6. Protocolo de proteólisis aplicado a extractos de proteínas.....	47
Tabla 7. Resumen del rendimiento que se puede lograr con el sistema de microflujo LC-MS/MS en comparación con una configuración típica de nanoflujo LC-MS/MS.....	50
Tabla 8. Resumen de resultados para el análisis proteómico a gran escala de 11 líneas celulares de cáncer humano utilizando sistemas LC-MS/MS de nanoflujo o microflujo.....	50
Tabla 9. Detalles de las columnas comerciales utilizadas en la segunda dimensión.....	53
Tabla 10. Desarrollo de varios sistemas off-line 3D-LC.....	59
Tabla 11. Desarrollo de varios sistemas on-line 3D-LC.....	59
Tabla 12. Comparativa de la estrategia off-line vs. on-line.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquematización del análisis Bottom-up (arriba) y Top-down (abajo) en el análisis de proteínas.....	14
Figura 2. Las tres principales estrategias en proteómica ¹⁷	15
Figura 3. Evolución de la proteómica: contribuciones importantes a lo largo de la historia para su desarrollo ³²	20
Figura 4. Las moléculas penetran en los poros de la fase estacionaria en distinto grado en función de su tamaño ³⁹	22
Figura 5. Comparativa de las proteoformas detectadas mediante RP vs sSEC-RP.....	23
Figura 6. Representación esquemática de la sSEC/FT-ICR MS ⁴¹	24
Figura 7. Esquema de un proceso de separación de proteínas en HIC ⁵⁰	26
Figura 8. Análisis comparativo de la misma muestra por RP (a) y HILIC (b) ⁵⁴	28
Figura 9. Cromatograma típico de una separación por cromatografía de afinidad ⁵⁷	29
Figura 10. Ilustración esquematizada sobre el uso de la cromatografía de afinidad en el análisis proteómico ⁵⁸	29
Figura 11. Esquematización del sistema Mud-PIT.	32
Figura 12. Representación de los elementos que componen un sistema de EC ⁷⁹	34
Figura 13. Sistema de trabajo en el análisis proteómico top-down utilizando la técnica CZE-MS/MS.	35
Figura 14. Diseño experimental del trabajo.....	39
Figura 15. Estructura general de RapiGest TM	41
Figura 16. Estructura química particular de RapiGest TM	41
Figura 17. Uso del Azo en proteómica.....	41
Figura 18. Reacción de degradación del Azo por UV.	42
Figura 19. (a) Curva de absorbancia del Azo. (b) Curva de degradación del Azo.....	42
Figura 20. Digestión de la mioglobina con diferentes concentraciones de Azo (izquierda). Análisis mediante LC-MS de la mioglobina remanente (derecha).	43

Figura 21. Comparativa directa entre Azo y RapiGest™ (RG) en la digestión de la mioglobina seguido de un análisis por ESI-MS.	44
Figura 22. Digestión de proteínas estándar en presencia de Azo.	44
Figura 23. Comparativa de la digestión enzimática de proteínas extraídas de células HEK293T utilizando Azo o SDS.	45
Figura 24. Diseño del ChipFilter.	46
Figura 25. Configuración automatizada para el CFP acoplado a nanoLC-MS/MS. DTT: Ditiotreitól. IAM: Iodoacetamida. ABC: bicarbonato de amonio.	48
Figura 26. Comparación entre los resultados obtenidos con el método CFP (digestión on-chip) y el método FASP, en el extracto de proteínas.	48
Figura 27. Esquema de preparación de la columna poli(N-fenilacrilamida-co-estireno).	52
Figura 28. Mapa bidimensional de la técnica RPLCxRPLC mediante el uso de diferentes columnas en la segunda dimensión. (a) PP fiber column. (b) ACE Excel Super C18. (c) Zorbax Eclipse Plus C8 (2.1mm). (d) Zorbax Eclipse Plus C8 (3.0mm). (e) Zorbax SB-C8. (f) InfinityLab Poroshell 120 EC-C8. (g) AdvanceBio RP-mAb SB-C8. (h) Chromolith Performance RP-8e.	54
Figura 29. Resumen general de la técnica FIA-DIA para la identificación de proteínas. (A) La muestra digerida se somete a una ionización por electrospray, los iones se separan por movilidad iónica y son fragmentados en el cuadrupolo. Los fragmentos son detectados.	56
Figura 30. Electroferogramas obtenidos tras el análisis por CZE-MS usando una columna capilar de 1.5m (arriba) y 1m (abajo).	57
Figura 31. Análisis de una mezcla de proteínas estándar mediante CZE-MS utilizando 3 volúmenes diferentes de muestra: 0.5µL (arriba), 1µL (medio), 2µL (abajo).	57
Figura 32. Aproximación Top-down para la caracterización de proteínas de membrana endógenas.	61
Figura 33. Resumen de las técnicas basadas en espectrometría de masas propuestas para el estudio de SARS-CoV-2.	63

1 INTRODUCCIÓN

La primera vez que se acuñó el término genoma fue en 1920 por el botánico alemán Hans Winkler, juntando las palabras gen y cromosoma¹, definiéndose como todos los cromosomas y genes en una especie determinada.

En los años 80 hubo una revolución en la biología molecular que permitió conocer el genoma completo de diversos organismos vivos, incluido el del ser humano. Sin embargo, aún no se ha logrado entender la función biológica del gen y el motivo por el cual organismos que comparten un 99% de su genoma son, en realidad, tan diferentes. Del análisis del genoma se ha aprendido que la complejidad en la morfología y la funcionalidad de los seres eucariotas superiores depende de la regulación de la expresión genética y de cómo sus proteínas interactúan entre sí². De ahí el nacimiento de la proteómica, que es la ciencia que se dedica a investigar la estructura y función de todas las proteínas que forman el proteoma³, que es el conjunto de proteínas expresadas por un genoma, una célula o un tejido⁴.

El término proteoma fue descrito por primera vez en 1994 por Marc Wilkins y Keith L. Williams, en el primer meeting de Electroforesis Bidimensional 2D⁵. Se formó la palabra uniendo los términos proteína y genoma, siguiendo la misma analogía que con el concepto de genoma en 1920⁶. Pero hasta un año después no se acuñó el término proteómica como el estudio del proteoma, para describir la identificación y modificación de las proteínas y la interacción proteína-proteína. Las proteínas son las moléculas funcionales de la célula, por lo cual, la elaboración de perfiles de proteoma puede ser de gran utilidad para comprender los procesos involucrados en las células⁷.

A diferencia del análisis de una sola proteína que utiliza técnicas basadas en anticuerpos, como el ensayo por ELISA o la microscopía fluorescente, la proteómica ofrece una valiosa oportunidad para estudiar todas las proteínas presentes en una muestra, con el fin de obtener una imagen más clara de la biología molecular, tanto de células sanas como enfermas⁸.

La secuenciación de los genomas a gran escala y el desarrollo de técnicas de separación y análisis de proteínas fueron los dos factores clave para el desarrollo de la proteómica⁴, que tiene fundamentalmente dos objetivos³:

- Estudiar los cambios globales de la expresión de las proteínas celulares en función del tiempo.
- Determinar la identidad y las funciones de las proteínas producidas por los organismos.

Todo ello mediante dos tipos de aproximaciones completamente diferentes⁹:

- Bottom-up o proteómica ascendente
- Top-down o proteómica descendente

En la aproximación Bottom-up se analizan los péptidos obtenidos tras un proceso de digestión de muestras complejas. Es actualmente el método proteómico más usado, debido a que tanto las herramientas experimentales como computacionales están bien establecidas y desarrolladas¹⁰, pero posee limitaciones para el análisis integral de proteoformas^{11,12}. Por lo general, se utilizan proteasas individuales o mezclas de proteasas para obtener una mezcla de pequeños péptidos (de 6 a 50 residuos de aminoácidos). Se suele recurrir a la digestión con tripsina ya que produce péptidos con una longitud promedio de 14 aminoácidos¹⁰. La digestión de proteínas en pequeños fragmentos de péptidos ofrece múltiples ventajas, como una mayor eficiencia de separación, un número limitado de cargas en cada péptido y una mayor homogeneidad de la muestra. Sin embargo, tiene una limitación clave: cuando las proteínas se digieren en péptidos pequeños se puede perder información sobre la proteoforma que tiene actividad biológica, así como de la ubicación de las modificaciones post-translacionales (PTM), su número y la proteólisis endógena¹³.

En la aproximación Top-down se analizan las proteínas intactas que no han sido digeridas. Esto hace que se puedan detectar de una manera más eficiente las formas biológicamente activas de las proteínas, incluyendo la ubicación e identidad de las PTM⁹. Proporciona una comprensión más profunda de la acción de las proteoformas específicas en vivo¹³, puesto que el objetivo principal de esta estrategia es la caracterización de la secuencia proteica completa¹⁴.

Adicionalmente también se puede hablar de una tercera aproximación, la middle-down, que surge para facilitar el análisis top-down, sobre todo en el caso de proteínas de gran tamaño molecular. En este caso, las proteínas son digeridas a péptidos de tamaño intermedio/largo mediante el uso de proteasas específicas, previo al análisis por espectrometría de masas¹⁴.

En la Figura 1 se muestran de manera esquematizada los dos tipos de aproximaciones existentes¹².

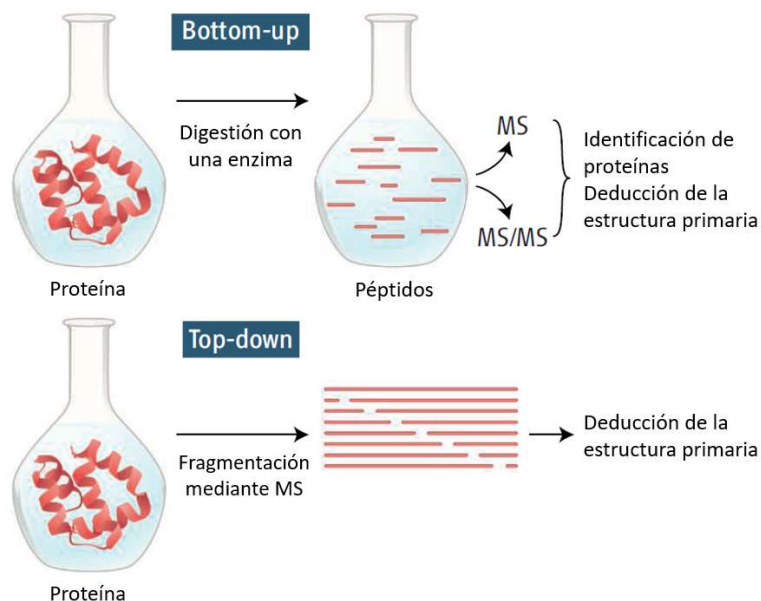


Figura 1. Esquemización del análisis Bottom-up (arriba) y Top-down (abajo) en el análisis de proteínas.

La investigación en el campo de la proteómica pretende separar los péptidos o proteínas presentes en una muestra mediante técnicas de alta resolución, como son la electroforesis capilar bidimensional o la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), acopladas a un detector¹⁵ (**Figura 2**).

Un experimento típico en el análisis proteómico consta mayoritariamente de 4 pasos⁸:

1. La preparación de la muestra, donde las proteínas son extraídas de las células, tejidos o fluidos biológicos.
2. Las proteínas extraídas se resuelven mediante electroforesis en gel.
 - i. Si se realiza una digestión con tripsina como parte de la preparación de la muestra, los péptidos resultantes se separan mediante cromatografía líquida.
 - ii. Para las proteínas separadas mediante electroforesis en gel, se suele usar la digestión con tripsina en gel.
3. Se mide la masa de los péptidos y/o la masa de los fragmentos precursores mediante espectrometría de masas.
4. Los espectros obtenidos se utilizan para la identificación de las proteínas, mediante el uso de base de datos (herramientas bioinformáticas).

El método ideal de preparación de muestra es aquél que reduce su complejidad para aumentar la posibilidad de identificar una mayor cantidad de proteínas sin causar su pérdida o cambiar el estado nativo del proteoma¹⁶.

La proteómica proporciona un conjunto de herramientas muy poderosas para el estudio a gran escala de la función de los genes a nivel de proteína. La aplicación de la proteómica tiene un enorme potencial en el área de la biomedicina para el desarrollo de métodos de diagnóstico y pronóstico de enfermedades y para la búsqueda de dianas que permitan el diseño de nuevos fármacos y vacunas⁴.

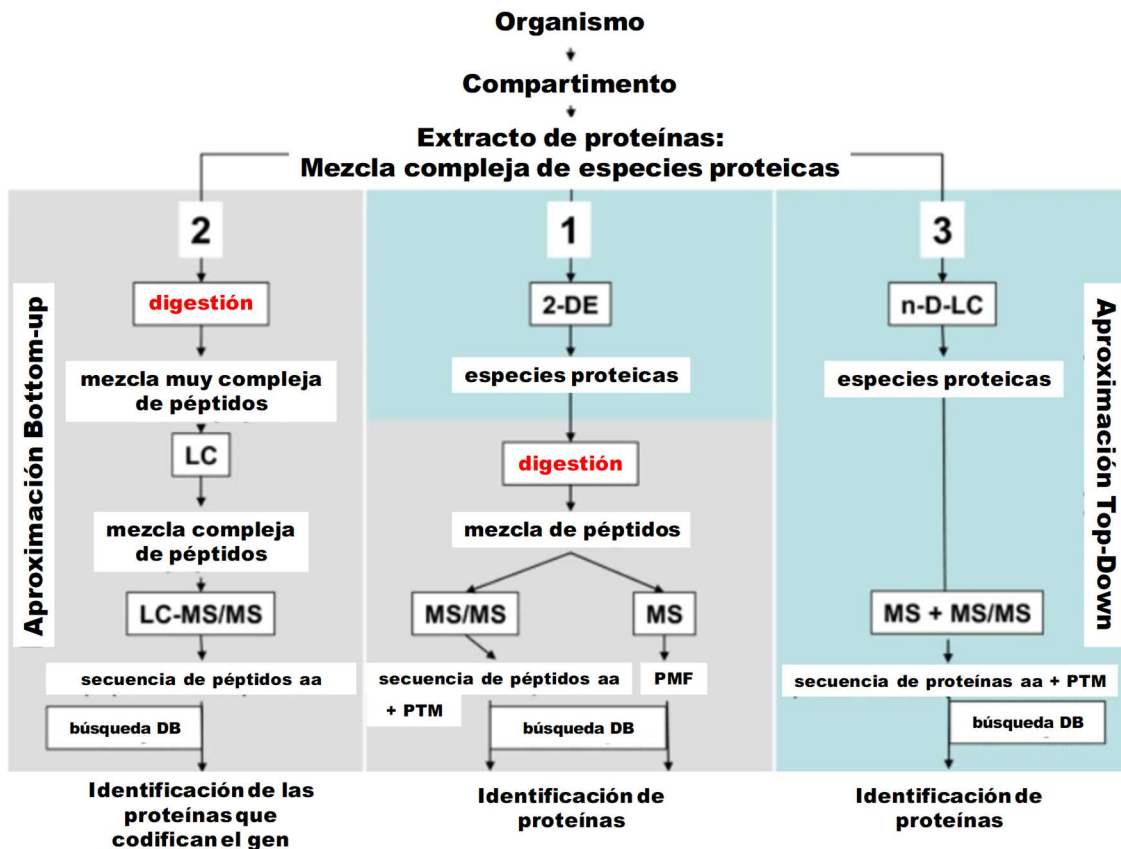


Figura 2. Las tres principales estrategias en proteómica¹⁷.

La proteómica no hubiera sido posible sin los logros de la genómica ni la transcriptómica.

La primera, proporcionó el modelo de los posibles productos genéticos importantes para los estudios en proteómica. Las tareas en el área de la proteómica pueden contrastarse con los enormes desafíos a los que inicialmente se tuvo que enfrentar el estudio del genoma¹⁸. Y la segunda, hizo posible la noción del perfil global de moléculas biológicas que indican la actividad dinámica de las células vivas, en el que el transcriptoma completo puede medirse en un único ensayo¹⁶.

La combinación de los dos enfoques, proteómico y transcriptómico, proporciona información más amplia y más profunda sobre la biología molecular de las células vivas¹⁶.

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El principal objetivo del presente trabajo es el análisis de la información más reciente sobre los sistemas en columna y capilares utilizados en el análisis proteómico.

Para lograr el objetivo principal se pretende:

- ✓ Realizar un estudio exhaustivo sobre qué es la proteómica.
- ✓ Revisar la historia del análisis proteómico, desde el inicio hasta la actualidad.
- ✓ Identificar cuáles son los sistemas en columna y capilares avanzados más utilizados en proteómica, incluyendo las técnicas más novedosas y recientes.
- ✓ Analizar las perspectivas futuras del análisis de proteínas.

Debido a la situación actual de pandemia causada por la enfermedad COVID-19, prácticamente la totalidad de la búsqueda bibliográfica ha sido utilizando recursos en línea. Se han consultado libros y artículos científicos relacionados con el tema en diferentes bases de datos, mayoritariamente en el Buscador de la Biblioteca UNED, aunque también se han consultado otras bases de datos como la *Wiley Online Library* o *ScienceDirect*.

También se ha buscado información en páginas web de asociaciones o departamentos centrados en el análisis proteómico (universidades, entidades públicas y privadas).

Las palabras clave utilizadas en la búsqueda han sido:

- ✓ Proteómica
- ✓ Electroforesis capilar
- ✓ Cromatografía de líquidos

La proteómica es un tema en auge y eso queda reflejado en el número de publicaciones que se realizan al año relacionadas con el tema. Sólo en la base de datos *Wiley Online Library*, en los últimos 20 años se han publicado alrededor de 7000 artículos científicos por año, mientras que el número de publicaciones entre 1990 y 2000 eran de 2000 por año.

3 DESARROLLO HISTÓRICO DE LAS TÉCNICAS UTILIZADAS EN PROTEÓMICA

El creador de la cromatografía fue el botánico ruso Tsvet. Presentó los resultados que dieron origen a esta técnica en 1901 en un congreso en San Petesburgo. La palabra cromatografía fue escrita por primera vez en 1906, respondiendo a la separación de pigmentos en una matriz de carbonato de calcio¹⁹.

Los científicos ingleses Martin y Synge dieron un impulso decisivo para el desarrollo de la cromatografía durante los años 40 y 50. Por ello recibieron el premio Nobel de Química en 1952¹⁹.

La separación de proteínas mediante electroforesis bidimensional (2-DE) empezó en los años 50²⁰. La primera técnica 2-DE se desarrolló por Smithies y Poulik en 1956. Realizaron la separación de proteínas mediante un tampón electroforético utilizando papel de filtro (primera dimensión), para posteriormente separarlas mediante un gel de almidón (segunda dimensión)²¹.

Grabar y Williams desarrollaron otra técnica durante la misma época²², realizando una primera separación en electroforesis con gel de agarosa, seguida de una separación mediante difusión contra un antisuero.

La introducción de la poliacrilamida como matriz (PAGE) fue gracias a Raymond y Weintraub en 1959²³. Este hecho permitió mejorar considerablemente la separación de proteínas mediante electroforesis. Fue también Raymond quien en 1964 utilizó la PAGE para la separación de proteínas mediante 2-DE²⁴.

En 1970 Laemmli introdujo el uso del dodecilsulfato de sodio (SDS) para la separación de proteínas en función de su peso molecular (SDS-PAGE)¹⁹.

En la misma época, J. Klose y P.H. O'Farrell, introdujeron la electroforesis bidimensional, combinando el isoelectroenfoque (IEF), que realiza una primera separación de acuerdo con el punto isoeléctrico (pI), con la SDS-PAGE, que separa las proteínas mediante su masa molecular²⁵.

A mediados de los años 70 se descubrió que la cromatografía líquida en fase reversa también tenía un gran rango de aplicación para la separación, purificación y el análisis de pequeñas moléculas como los péptidos²⁵.

En 1978, Erni y Frei²⁶ introdujeron lo que llamaron técnica de cromatografía de líquidos bidimensional, donde acoplaron la cromatografía de permeación en gel con cromatografía en fase reversa, para poder obtener una mejor separación en mezclas complejas. Técnica que fue mejorada años después por Bushey and Jorgenson²⁷.

En los años 80 se empezó a utilizar la secuenciación Edman para conseguir información sobre la secuencia de proteínas mediante electroforesis capilar bidimensional, consiguiendo separar proteínas por tamaño y carga⁵. Aunque se consiguió mejorar la secuenciación de proteínas por la degradación de Edman, convirtiéndose en un método fiable y automatizado, su sensibilidad era relativamente mala y era un proceso muy lento. Por ello, se debieron buscar otras alternativas. El objetivo en aquella época era el desarrollo de métodos cada vez más sensibles y fiables que permitieran la secuenciación de proteínas²⁸.

En 1982 se presentó un plan para catalogar las proteínas producidas por el cuerpo humano que se llamó *The Human Protein Index*²⁰.

Desde mediados de los 80, el uso de la cromatografía en fase reversa para la separación de proteínas fue en aumento.

El descubrimiento del electrospray en 1989 por Fenn y colaboradores, fue clave para la proteómica. Presentó los primeros espectros de masas por electrospray y baja resolución de tres proteínas enteras: el citocromo, la mioglobina y la albumina. Además, mostró en coordinación con los laboratorios de McLaferty y Hunts, los espectros de alta resolución de mioglobina y citocromo C adquiridos en un espectrómetro FT-ICR (Resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier)¹⁴.

En los años 90, Pappin, Cottrell y Henzel propusieron utilizar la espectrometría de masas para identificar un subconjunto de péptidos a partir de la digestión de una proteína pura⁷ y fue por esta época cuando se extendió el uso de la técnica MALDI-TOF para el análisis de proteínas¹⁴.

En 1997, Jorgenson y colaboradores describieron un nuevo sistema bidimensional en cromatografía de líquidos, donde combinaron el intercambio catiónico con la cromatografía en fase reversa²⁹. Años después, Greibrokk y col. presentaron la combinación de la cromatografía de intercambio aniónico (mediante el uso de un amplio rango de gradiente de pH) con la cromatografía en fase reversa³⁰.

En esta época se mejoraron notablemente las técnicas de secuenciación del genoma y se empezaron a construir de manera rápida bases de datos. La espectrometría de masas también permitió que la proteómica avanzara rápidamente debido a su gran sensibilidad para la identificación de proteínas (siempre y cuando éstas se encuentren en las bases de datos).

La aparición del analizador Orbitrap, desarrollado por Zubarev y Makarov en 2013 revolucionó la proteómica en general, y ha contribuido en gran medida a la expansión de la técnica top-down¹⁴. Tanto los logros conseguidos en la secuenciación del genoma como la espectrometría de masas fueron primordiales para permitir que los estudios en proteómica fueran eficaces⁵.

La investigación en proteómica³¹ se pudo desarrollar debido a varios estudios realizados en paralelo en cuatro campos diferentes:

- La electroforesis en gel bidimensional utilizando geles de poliacrilamida (2D-PAGE) evolucionando hacia un método robusto para separar rápidamente proteínas contenidas en muestras biológicas de matriz compleja.
- El desarrollo continuo de métodos de espectrometría de masas para un análisis preciso de la masa y la estructura química.
- La investigación a gran escala del genoma y el gran número de péptidos y proteínas catalogados en las bases de datos.
- El desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas para simplificar el análisis de grandes volúmenes de datos de MS, con el objetivo de identificar proteínas intactas y sus PTM, ya sean funcionales y patológicas.

En la Figura 3 se muestra, de manera esquematizada, una imagen resumen sobre la evolución de la proteómica a lo largo de los años.

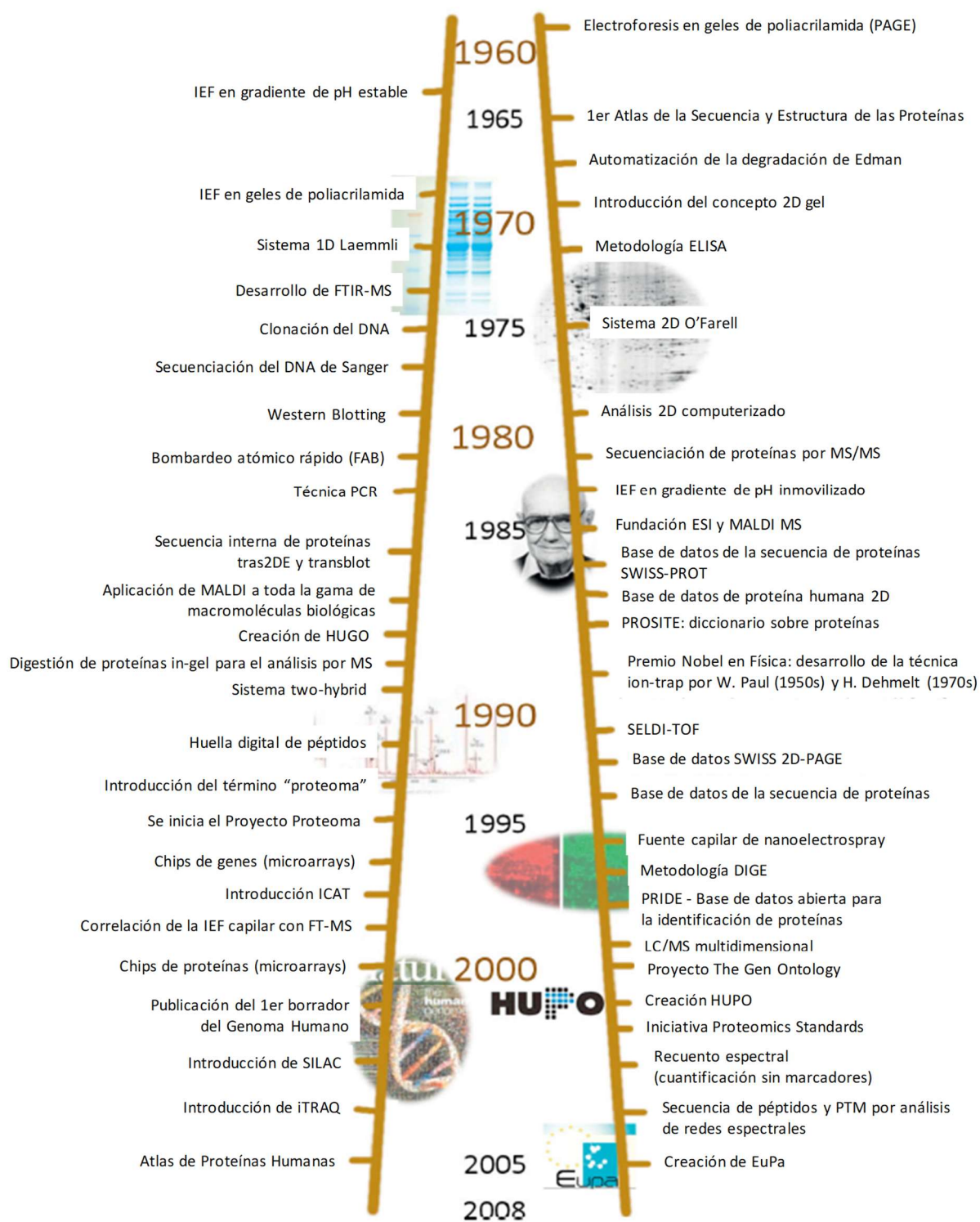


Figura 3. Evolución de la proteómica: contribuciones importantes a lo largo de la historia para su desarrollo³².

4 MÉTODOS GENERALES DE ANÁLISIS

4.1 Cromatografía líquida

La cromatografía líquida de alta resolución es el tipo de cromatografía por elución más versátil y utilizado. Sirve para separar y determinar especies tanto en matrices orgánicas, como inorgánicas y biológicas. En la cromatografía líquida, la fase móvil es un disolvente líquido que contiene a la muestra en la forma de una mezcla de solutos y la fase estacionaria es un sólido contenido en una columna³³.

Para conseguir separaciones más eficientes, recientemente se ha implementado la cromatografía líquida de ultra alto rendimiento (UHPLC), permitiendo trabajar a presiones mucho más elevadas que con la cromatografía de líquidos convencional³⁴.

En el análisis y separación de péptidos y proteínas, las técnicas más utilizadas hasta el momento son la cromatografía de intercambio iónico, de exclusión por tamaño, de fase reversa, de interacción hidrofóbica, de interacción hidrofílica y de afinidad.

4.1.1 Cromatografía de intercambio iónico

En la cromatografía de intercambio iónico (IEC) los grupos funcionales presentes en la fase estacionaria se encuentran cargados positiva o negativamente. La separación se da por la interacción de los compuestos de la mezcla con la carga opuesta de la fase estacionaria³⁵.

De acuerdo con la carga de la fase estacionaria se puede hablar de:

- Intercambio aniónico: la matriz está cargada positivamente e intercambia aniones.
- Intercambio catiónico: la matriz está cargada negativamente e intercambia cationes.

En proteómica, la cromatografía de intercambio catiónico se utiliza muy frecuentemente para la separación de péptidos. A pH ácido (2-3) la gran mayoría de los péptidos se encuentran cargados positivamente, por lo que este tipo de cromatografía es muy útil.

Los parámetros más importantes que intervienen en la separación de las proteínas por medio de este tipo de cromatografía son la matriz (catiónica o aniónica), el pH y la temperatura.

Giese y colaboradores³⁶ han realizado un análisis exploratorio y han desarrollado un modelo predictivo basado en la retención de péptidos a través de cromatografía de intercambio aniónico, que permite la identificación de péptidos con una exactitud del 68%.

Muneeeruddin y colaboradores³⁷ han presentado un método IXC/ESI-MS en línea, en el cual la fuente ESI se opera en condiciones no desnaturalizantes (ESI nativo). Esto permite evaluar no sólo la estructura primaria, sino además la conformación y la estructura cuaternaria. Se centraron inicialmente en el análisis de proteínas de tamaño relativamente pequeño (<25kDa), aunque se cree que esta técnica puede funcionar de manera satisfactoria también para el análisis de grandes sistemas, incluidos los conjugados anticuerpo-fármaco (ADC) y conjuntos de proteínas de múltiples unidades.

4.1.2 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

La cromatografía de exclusión por tamaño se aplica particularmente a especies de alto peso molecular³⁸.

Su principal aplicación es la separación de las moléculas en función de su tamaño para estudiar el peso molecular y su distribución.

Las principales características de este tipo de cromatografía son:

- La fase estacionaria es inerte.
- La muestra no interacciona ni con la fase estacionaria ni con la fase móvil.
- Los solutos son generalmente sustancias de peso molecular elevado. En función de su tamaño, quedan retenidos o eluyen a través de la columna (Figura 4).
- La elución siempre ha de ser isocrática.

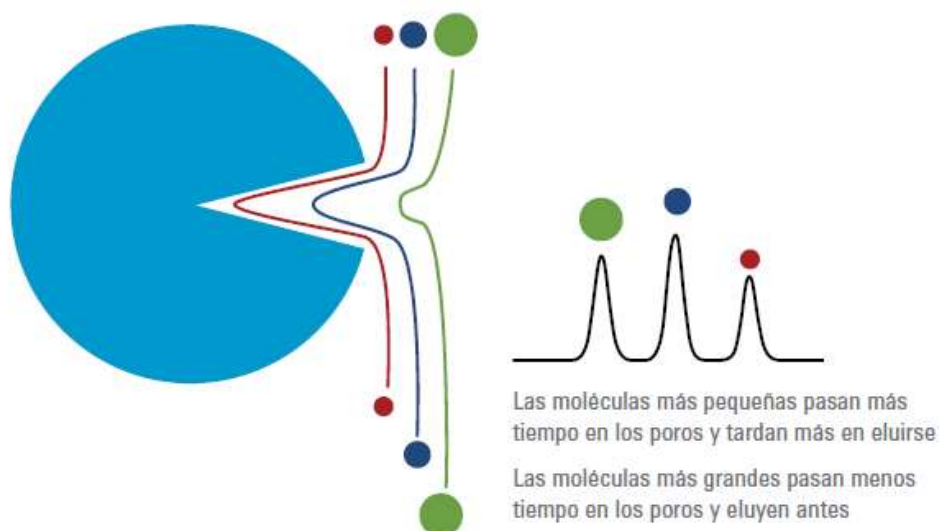


Figura 4. Las moléculas penetran en los poros de la fase estacionaria en distinto grado en función de su tamaño³⁹.

El principal problema de la SEC es que generalmente no tiene una buena resolución. Cai y colaboradores⁴⁰ desarrollaron la cromatografía de exclusión en serie (sSEC), combinando columnas SEC con diferente tamaño de poro, para obtener una separación de proteínas intactas (dentro del rango de 10 a 223kDa) con una alta resolución a partir de muestras complejas. Las fracciones obtenidas, pueden ser posteriormente separadas por cromatografía de fase reversa (RP). En la Figura 5 se puede observar el resultado obtenido utilizando esta técnica (sSEC-RP) vs cromatografía en fase reversa.

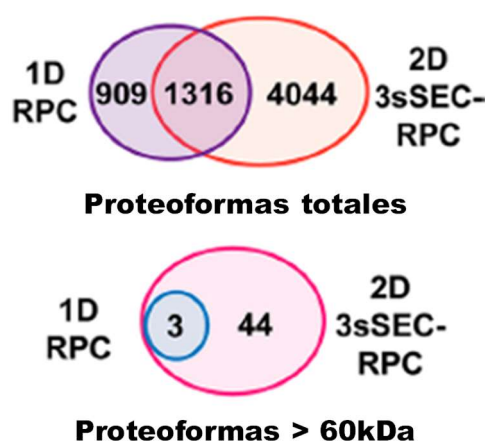


Figura 5. Comparativa de las proteoformas detectadas mediante RP vs sSEC-RP.

Mediante la sSEC se detectaron un total de 5360 proteoformas (1316 en común con los dos métodos). Pero la gran ventaja es que, mientras que por RP sólo se detectaron 3 proteoformas de más de 60kDa, mediante la sSEC se consiguieron identificar 47 (incluyendo las 3 identificadas por RP).

Trisha y colaboradores⁴¹ usaron una estrategia similar de sSEC, pero acoplándola directamente a un espectrómetro de masas por resonancia de ciclotrón iónica por transformada de Fourier (FT-ICR). Un esquema de la técnica usada se puede ver en la Figura 6.

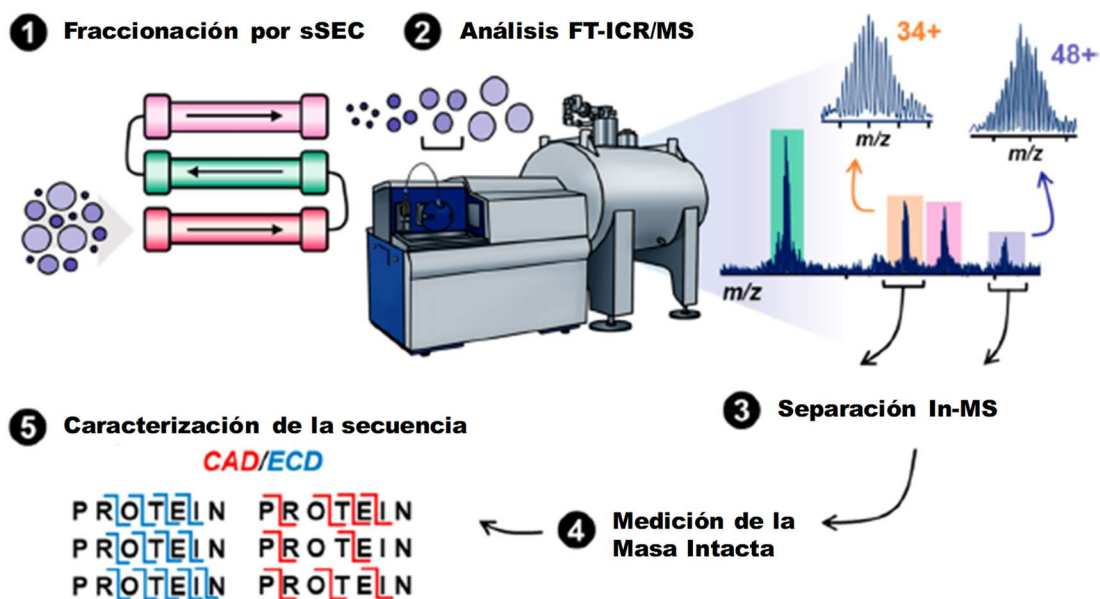


Figura 6. Representación esquemática de la sSEC/FT-ICR MS⁴¹.

Consiguieron analizar 31 proteoformas distintas (de entre 30 y 50kDa) de un simple espectro.

4.1.3 Cromatografía de fase reversa

La cromatografía en fase reversa (RP) es una de las técnicas analíticas más utilizadas y versátiles que existen⁴². En RP se combinan una fase móvil polar (generalmente una mezcla de agua o una disolución reguladora con eluyentes polares) y una fase estacionaria no polar (hidrocarburos de cadena larga unidos a un soporte de sílice o híbrido)⁴³.

Las moléculas que poseen algún carácter hidrofóbico, como son las proteínas y los péptidos, pueden ser separados con una excelente resolución mediante la RP⁴⁴.

Kawashima y colaboradores⁴⁵ han desarrollado un nuevo sistema nanoLC-MS para el análisis de proteínas utilizando una columna en fase reversa no porosa. Aunque las partículas no porosas tienen una baja capacidad de unión debido a la baja densidad de grupos funcionales, demostraron que el uso de partículas C30 compensó esa desventaja, exhibiendo un rendimiento superior en comparación con el uso de columnas que poseían partículas C18 porosas.

Huang y colaboradores⁴⁶ han demostrado que se puede realizar una separación SEC utilizando una columna RP. Los resultados han mostrado que altas concentraciones de acetonitrilo (>65%), usando ácido trifluoroacético como modificador, eliminan las interacciones entre las proteínas y la fase estacionaria y permiten que la columna de RP actúe como una columna SEC para separar proteínas en función de su peso molecular. Se usaron columnas C4 o C18 de tamaño de partícula 300Å. Las ventajas de esta técnica respecto de la SEC convencional es que el precio de una columna RP es inferior que una columna SEC, sirve tanto como técnica preparativa como técnica de análisis y se puede acoplar directamente a un espectrómetro de masas.

Hwang y colaboradores⁴⁷ también han hecho uso de la cromatografía en fase reversa para la identificación de proteínas desconocidas hasta el momento en tejido epitelial nasal. Se consiguió identificar a 5 proteínas no conocidas sin falsos positivos (P0C7M7, P46721, P59826, Q658L1, and Q8N434). La secuencia peptídica y su función biológica puede verse en la Tabla 1.

Tabla 1. Proteínas desconocidas identificadas en tejido epitelial humano⁴⁷.

Número Uniprot	Secuencia peptídica	Nombre de la proteína	Función biológica
P0C7M7	NFNFAADVLDQWSQKEK TGERPANPALWWWNGKGDEVK HCLTGGEPLNPEVLEQWR	Acetilcoenzima A ACSM4 sintetasa mitocondrial	Actividad de CoA ligasa con amplia especificidad de sustrato
P46721	STVLKDDDELKTKL YGITKDFLPPFMK	Miembro de la familia de transportadores de aniones orgánicos portadores de solutos 1A2	Media el transporte independiente de Na ⁺ de aniones orgánicos
P59826	IDKDELGKAIQNSLVGEPILQNVLGSVTAVNR AIQNSLVGEPILQNVLGSVTAVNR GTPESLFELNSVMTVR	Miembro 3 de la familia B que contiene pliegues de BPI	Posee la capacidad de reconocer y unirse a clases específicas de odorantes
Q658L1	VTQNALFEGSTEFRESFQPWEIPPPEVK SSVPFDDVTMYSVEYTPK	Estabilizador de microtúbulos axonemales 2	Unión de microtúbulos
Q8N434	KLSLGTAEPPQVKEPK ALGMGTSGSLCR	Transportador putativo SVOPL	Actividad de transporte transmembrana

Sun y colaboradores⁴⁸ han conseguido identificar un total de 11558 proteínas mediante el uso de cromatografía en fase reversa. El objetivo de su estudio era identificar proteínas desconocidas usando tres tipos diferentes de proteasas (trypsin, Lys-C y Glu-C) combinadas con una separación mediante RP. Para el estudio se utilizó una columna C18 (300Å, 1.7µm, 1x150mm de Waters) en un sistema HPLC Dionex Ultimate 3000.

4.1.4 Cromatografía de interacción hidrofóbica

En la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC), la fase estacionaria posee ligandos hidrofóbicos inmovilizados. Las proteínas se unen de manera reversible a estos ligandos y posteriormente se eluyen disminuyendo la fuerza iónica de la fase móvil (Figura 7). La HIC es una de las principales técnicas empleadas para la separación y purificación de proteínas⁴⁹.

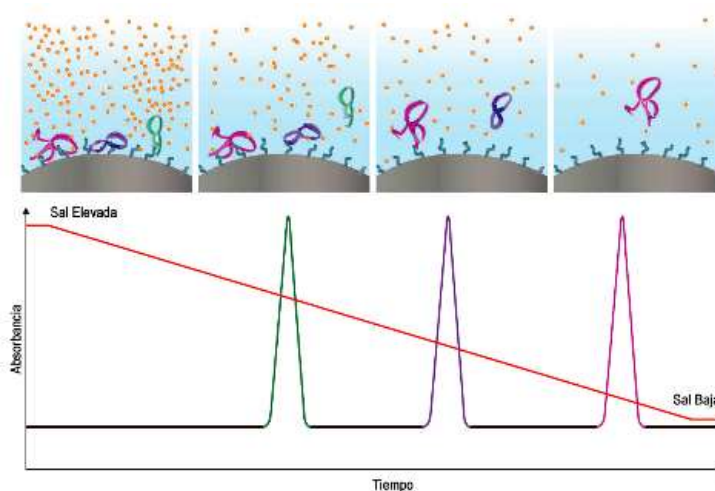


Figura 7. Esquema de un proceso de separación de proteínas en HIC⁵⁰.

La HIC proporciona una alta resolución en la separación de proteínas bajo condiciones no desnaturizantes, pero requiere altas concentraciones de sales no volátiles. Chen y colaboradores⁵¹ introdujeron una serie de compuestos hidrofóbicos (polientil A, polihexil A y poliheptil A) capaces de retener las proteínas, utilizando concentraciones de acetato de amonio compatibles con el MS, permitiendo tanto el análisis cualitativo como cuantitativo. La sal de la fase móvil, más que ayudar a retener las proteínas, minimiza que éstas se desnaturalicen.

4.1.5 Cromatografía de interacción hidrofílica

La cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC) es una variante de la cromatografía de fase normal. En la HILIC la fase estacionaria es polar y la fase móvil es un disolvente relativamente hidrofóbico⁵². Este tipo de cromatografía ha mostrado buenos resultados en la determinación de compuestos muy polares en matrices complicadas. Por este motivo, en los últimos años se ha empezado a utilizar con frecuencia en el análisis y purificación de péptidos y proteínas⁵³.

La HILIC ha mostrado un gran potencial en la caracterización de glicofomas de proteínas intactas, tal y como queda recogido en el artículo escrito por Gargano y colaboradores⁵⁴. En su estudio, se muestra un nuevo enfoque de HILIC-MS destinado a minimizar los problemas derivados con la supresión de la ionización por ácido trifluoroacético (TFA). Se demostró que la HILIC puede separar una gran gama de proteínas, proporcionando una selectividad ortogonal a la RP, pero con volúmenes de inyección limitados. Para solventar este último problema, se utilizaron columnas de RP trampa en línea para cargar e inyectar la muestra en la columna HILIC. Finalmente, se evaluó la aplicabilidad del método mediante el análisis de una mezcla de proteínas (Tabla 2).

Tabla 2. Características de los estándares de proteínas analizados. Adaptado de Gargano y col⁵⁴.

Proteína	Número Uniprot	Orden de elución RP	Orden de elución HILIC	Peso molecular M _w (Da) ^a	pI ^b
Ribonucleasa B ^C	P61824	1	11	13681	8.64
Ribonucleasa A ^C	P61823	2	9	13681	8.64
Ubiquitina ^C	RS27A	3/4	1	8564	6.56
Citocromo C ^{e*}	P00004	3/4	3	11701	9.59
Lisozima ^d	P00698	5	4	14313	9.32
Tripsinogeno ^C	P00760	6	8	23993	8.23
AGP ^C	Q3SZR3	7	14	21253	5.67
Transferrin ^{f*}	Q06AH7	8	10	75091	6.84
BSA ^C	P02769	9	7	66432	5.60
Mioglobina ^{e*}	P0CG53	10	2	16951	7.36
Fetuin ^C	Q58D62	11	12/13	40845	5.59
Anhidrasa carbónica ^C	P00921	12	6	28693	6.40
Ovalbúmina ^d	P01012	13	5	42881	5.19
Thioglobulina ^{C**}	P01267	14	12/13	301219 ^{**}	5.50

^aPeso molecular calculado de la secuencia de aminoácidos (no se consideran las proteoformas). ^bTeórico. ^cbovino. ^dHuevo de pollo. ^eEquino. ^fHumano. * Proteína hemo.

**Thioglobulina como tetrámero de 165kDa. El peso molecular reportado se deduce de la estructura primaria de 2769 aminoácidos.

Además, tal y como puede verse en la Figura 8 (además de en la Tabla 2) los órdenes de elución de proteínas en RP y HILIC son claramente diferentes y no parecen correlacionarse con parámetros físico-químicos, como el pI. El orden de elución en HILIC tampoco es exactamente opuesto a RP, lo que sugiere que los diferentes dominios polares y apolares de

la proteína son los responsables de la interacción con las fases estacionarias y, como tal, los dos métodos tienen selectividad ortogonal. Por lo tanto, la HILIC podría ser utilizada como un método de pre-fraccionamiento para reducir la complejidad de la muestra, dada su selectividad alternativa y alta capacidad de pico, si se compara con RP.

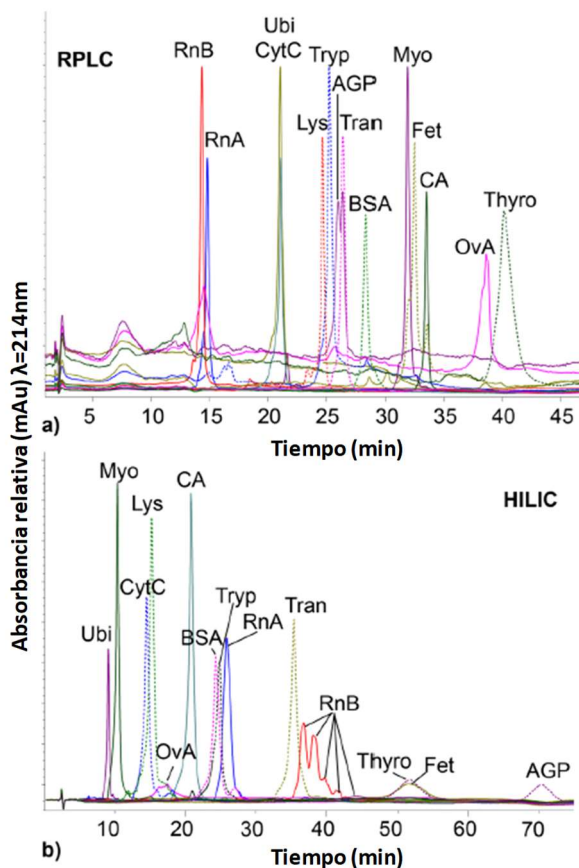


Figura 8. Análisis comparativo de la misma muestra por RP (a) y HILIC (b)⁵⁴.

4.1.6 Cromatografía de afinidad

En la cromatografía de afinidad (AFC), un reactivo llamado ligando de afinidad se encuentra unido de manera covalente a un soporte sólido. Este ligando hace que las moléculas de interés se unan a él de manera reversible y selectiva, reteniéndolas en la columna. Tras la detección de los compuestos no deseados, los analitos deseados se eluyen cambiando las condiciones de la fase móvil (Figura 9)^{33,55,56}.

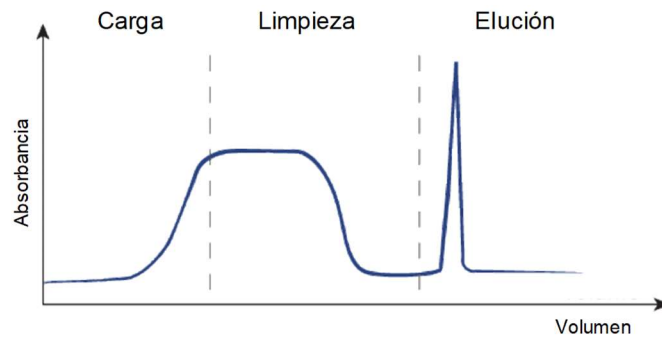


Figura 9. Cromatograma típico de una separación por cromatografía de afinidad⁵⁷.

En la Figura 10 se muestra, de manera esquematizada, el proceso de identificación de compuestos proteicos mediante el uso de la cromatografía de afinidad.

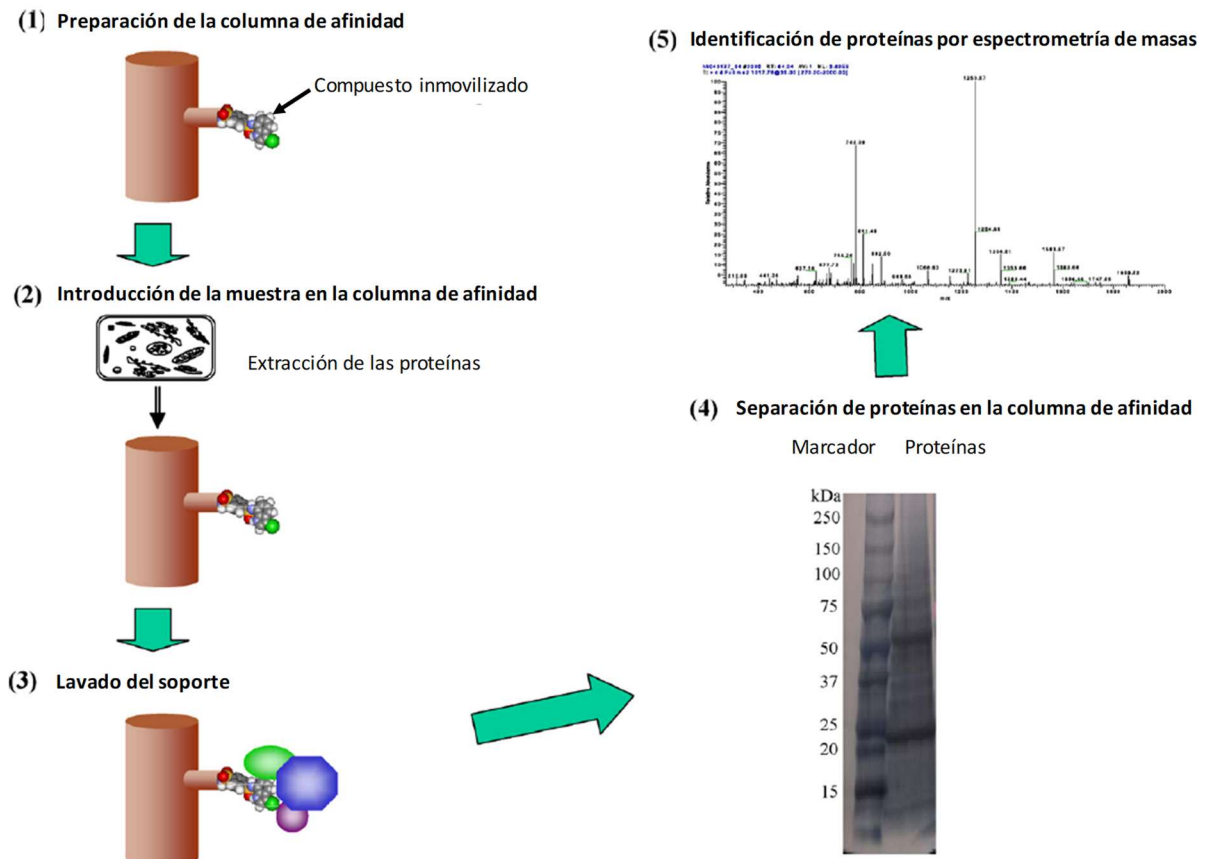


Figura 10. Ilustración esquematizada sobre el uso de la cromatografía de afinidad en el análisis proteómico⁵⁸.

Wang y colaboradores⁵⁹ han utilizado la cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (IMAC) para enriquecer una fracción de proteínas de suero humano mediante el uso de columnas inmovilizadas cargadas con cadmio, níquel, zinc, cobre o plomo en solución salina bis-Tris y estas proteínas se identificaron mediante LC-MS/MS.

Este estudio es importante puesto que las proteínas que se unen a metales tienen un papel fundamental tanto en personas sanas como enfermas.

Tabla 3. Lista de 15 proteínas enriquecidas mediante IMAC para cada uno de los 5 metales estudiados⁵⁹.

Proteína	Suero	Blanco	Ni ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺	Cd ²⁺	Pb ²⁺
Complemento C3 (fragmento)	54 (1)	6 (20) ^{***}	100 (1) ^{##**}	68 (1) ^{##***}	107 (1) ^{##***}	67 (2) ^{#*}	0 (60) ^{***}
Alpha-2-macroglobulina	49 (4)	28 (3)	64 (2) ^{##**}	43 (2) [*]	83 (2) ^{##***}	114 (1) ^{##***}	68 (1) [#]
Isoforma 1 de seroalbúmina	42 (5)	23 (6) [*]	44 (4) [*]	43 (3)	33 (8) ^{***}	34 (3)	15 (5) ^{***}
Apolipoproteína B-100	36 (6)	1 (60) ^{***}	33 (8)	18 (9) ^{**}	55 (4) ^{##*}	18 (11) [*]	0 (nd) ^{***}
Complemento componente 4B preproteína	30 (9)	0 (nd) ^{***}	63 (3) ^{##***}	42 (4) ^{##***}	76 (3) ^{##***}	31 (5)	0 (nd) ^{***}
Apolipoproteína A-1	28 (11)	1 (51) ^{***}	35 (6) ^{##**}	33 (5) ^{#*}	25 (12)	13 (15) ^{***}	1 (31) ^{***}
Serotransferrina	27 (13)	12 (12)	41 (5) ^{##***}	27 (6)	46 (5) ^{##***}	25 (7)	12 (7) [*]
Isoform 1 de alfa-1-antitripsina	24 (14)	2 (34) ^{***}	32 (9) ^{##***}	23 (8)	32 (9) ^{##***}	9 (22) ^{***}	0 (63) ^{***}
Ceruloplasmin	17 (18)	7 (15)	35 (7) ^{##***}	26 (7) ^{##***}	41 (7) ^{##***}	24 (8) ^{#*}	1 (40) ^{**}
Proteína 47kDa	14 (20)	7 (16)	21 (13) ^{##***}	15 (13)	22 (14) ^{##***}	16 (12)	6 (15) [*]
Proteína no caracterizada DKFZp696P15220	14 (21)	0 (nd) ^{***}	0 (nd) ^{***}	17 (10) ^{##***}	19 (16) ^{##**}	15 (13) [*]	0 (nd) ^{***}
Transthyretina	10 (24)	2 (37) ^{***}	16 (17) ^{##***}	13 (16) [#]	11 (27)	2 (68) ^{***}	0 (nd) ^{***}
Hemopexina	9 (26)	1 (75) ^{***}	17 (16) ^{##***}	10 (19)	20 (15) ^{##***}	12 (16) ^{##**}	0 (56) ^{***}
Inhibidor de cadena larga Inter-alpha-trypsin	8 (31)	0 (nd) ^{***}	20 (14) ^{##***}	17 (11) ^{##***}	24 (13) ^{##***}	1 (79) ^{***}	0 (nd) ^{***}
Glicoproteína rica en Histidina	5 (42)	1 (45) ^{***}	14 (18) ^{##***}	9 (22) ^{##***}	17 (18) ^{##***}	24 (9) ^{##***}	6 (14) [#]

() Los números entre paréntesis indican el rango de abundancia de la proteína. #Indica un conteo superior al 20% de abundancia comparado con el suero. ##Significa un 50% superior. Test-t * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$.

Mediante la IMAC, consiguieron identificar decenas de proteínas. La Tabla 3 muestra la comparación de 15 proteínas diferentes que se enriquecieron en este estudio o que se conocen en la literatura como proteínas de unión a metales. En el estudio se vio que la mayoría de las proteínas tenían una especificidad variable para la unión de metales.

4.1.7 Cromatografía bidimensional

Por sus características, la LC posee un alto poder de resolución, elevada sensibilidad y se puede acoplar fácilmente a un espectrómetro de masas. Por ello, es una técnica versátil y fundamental en el análisis proteómico. Sin embargo, la complejidad de las muestras tras la digestión enzimática a menudo excede la capacidad de las técnicas unidimensionales (1D), requiriendo por tanto, un enfoque multidimensional⁶⁰.

La cromatografía de líquidos bidimensional (2D LC) se ha utilizado con mucho éxito durante más de una década en el ámbito de la proteómica, combinando de manera ortogonal diferentes técnicas de LC, permitiendo separar los compuestos de una muestra en función de sus diferentes propiedades moleculares⁶¹. Las separaciones 2D ofrecen el potencial de un poder de resolución (separación) sustancialmente mayor que sus homólogos 1D convencionales⁶².

La 2D LC puede operar en dos modos⁶⁰:

- Off-line: las fracciones eluidas de la primera dimensión (1D) se recogen, se separan del disolvente por evaporación, se vuelven a disolver y se vuelven a inyectar en la segunda dimensión (2D). Este enfoque es sencillo de realizar y ofrece una gran variedad de modos de separación, fases móviles y tampones, aunque se puede ver afectado por una baja reproducibilidad analítica y una posible pérdida de muestra.
- On-line: la transferencia entre las dos dimensiones está completamente automatizada, generalmente por medio de válvulas de conmutación controladas electrónicamente. Las técnicas en línea son más convenientes cuando se trata de cantidades de muestra limitadas, pero son más difíciles de realizar y requieren instrumentación y software específico.

Las combinaciones más populares son la IEC-RP, como primera y segunda dimensión respectivamente^{63,64}. Aunque la SEC-RP^{65,66}, la AFC-RP⁶⁷ y la HILIC-RP⁶⁸ también han sido técnicas propuestas para el análisis de proteínas. Además, para el análisis de péptidos también se ha propuesto el uso de RP en las dos dimensiones^{64,69,70}.

Dowel y colaboradores⁶⁴ realizaron un estudio comparando los resultados obtenidos utilizando RP-RP o SCX-RP. Observando que mientras que con la primera técnica se consiguieron identificar 281 proteínas, mediante la segunda sólo se identificaron 81.

En otro estudio, Cassidy y colaboradores⁷¹ han combinado dos tipos de RP para conseguir una mejor separación. En una primera dimensión, utilizaron la cromatografía en RP a pH 10, mientras que, en la segunda dimensión, el pH fue 2.

Como ya se ha comentado anteriormente, la IEC se ha utilizado durante mucho tiempo para el análisis de proteínas y péptidos y, a menudo, se utiliza como primera dimensión en las separaciones 2D LC⁷².

La combinación IEC-RPLC posee las siguientes características⁷²:

1. La IEC ofrece una alta capacidad
2. Tanto la IEC como la RP ofrecen una alta resolución
3. La mayoría de los sistemas 2D LC utilizan RP como segunda dimensión debido a su compatibilidad con ESI-MS
4. Ambos modos cromatográficos proporcionan una alta eficiencia de separación

Mud-PIT (técnica multidimensional de identificación de proteínas) es otro método ampliamente utilizado en la separación de proteínas y puede acoplarse directamente al espectrómetro de masas⁷³. La **Figura 11** muestra de manera esquematizada en qué consiste esta técnica⁷², donde puede verse la columna híbrida que contiene una zona de intercambio iónico y otra zona de RP.

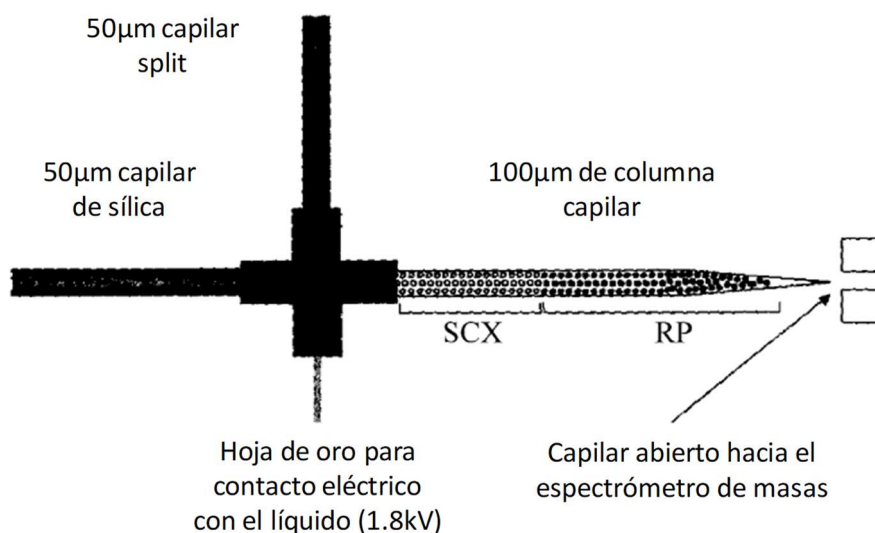


Figura 11. Esquematización del sistema Mud-PIT.

La AFC es una técnica efectiva y reproducible para aislar proteínas y péptidos de baja concentración. La IMAC, por ejemplo, es muy efectiva para la identificación de fosfopéptidos, mediante el uso de iones inmovilizados de Fe(III) o Ga(III)⁷².

Las ventajas de la IMAC-RP son⁷²:

- Estabilidad de los ligandos
- Alta capacidad de carga de muestra
- Condiciones de elución suaves
- Regeneración simple
- Alta aplicabilidad bajo condiciones desnaturalizantes
- Bajo coste

La SEC se utiliza ocasionalmente en la primera dimensión en separaciones 2D LC. Las ventajas de esta técnica es su alta reproducibilidad, estabilidad y tiempo de análisis relativamente corto⁷².

4.2 Electroforesis Capilar

La electroforesis es la migración de partículas o iones que se encuentran en solución cuando se les aplica un campo eléctrico⁷⁴.

La electroforesis capilar (EC) es una técnica sencilla, selectiva, proporciona una gran eficiencia de separación y posee un elevado grado de independencia respecto de la matriz utilizada⁷⁵. Otra ventaja de la EC es que el volumen de muestra necesario para obtener una alta resolución analítica es muy pequeño⁹.

Pero posee también ciertas desventajas, como la sensibilidad a bajas concentraciones, aunque se puede resolver con éxito mediante la aplicación de varias técnicas de concentración en línea⁷⁶.

La electroforesis bidimensional es la técnica central de la proteómica⁷⁷. Sus aplicaciones incluyen el análisis de proteomas, la señalización y la detección de marcadores de enfermedades y cáncer.

En la 2D-PAGE se realiza una primera separación de las proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI) utilizando un gradiente de pH (IEF) y, posteriormente, se realiza una segunda separación de acuerdo a su peso molecular mediante el uso de un gel desnaturalizante de

poliacrilamida (SDS-PAGE)⁷⁸. Esto permite el análisis de miles de proteínas en un único ensayo.

El sistema EC, tal y como se muestra en Figura 12, se compone de los siguientes elementos⁷⁹:

- Un capilar de sílice fundida recubierto de poliamida, donde se realiza la separación.
- Reservorios con solución amortiguadora, donde quedan sumergidos los electrodos y el capilar.
- Reservorios que contienen las muestras.
- Una fuente de alto voltaje que genera el campo eléctrico.
- Un sistema de inyección de muestra (hidrodinámica y electrocinética).
- Un sistema de control de la temperatura.
- Detector conectado a un sistema de adquisición de datos.

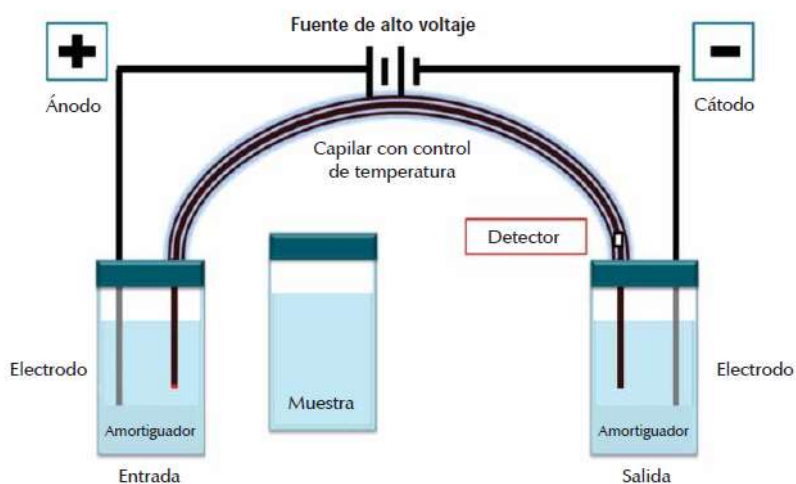


Figura 12. Representación de los elementos que componen un sistema de EC⁷⁹.

Un avance prometedor en la electroforesis capilar es la adición de modificadores en las paredes de los capilares. Los modificadores más prometedores son las nanopartículas (NP), que debido a su química de superficie única, forman suspensiones estables con el electrolito de fondo y son compatibles tanto con disolventes orgánicos como con la detección por MS.

4.2.1 Electroforesis capilar de zona

Shen y colaboradores⁸⁰ realizaron una revisión del progreso más reciente en electroforesis capilar de zona (CZE) acoplada a un espectrómetro de masas, técnica con gran potencial para el análisis de proteínas siguiendo la estrategia top-down (Figura 13).

Los temas que se han tratado en su revisión han sido:

- La mejora en la técnica de CZE-MS para el análisis top-down con respecto a la CE-MS.
- El acoplamiento, tanto en línea como off-line, de otros sistemas de separación en fase líquida con la técnica CZE-MS.
- La descripción de varios métodos de fragmentación en fase gaseosa basados en CZE-MS.
- El uso de CZE-MS en la proteómica nativa.

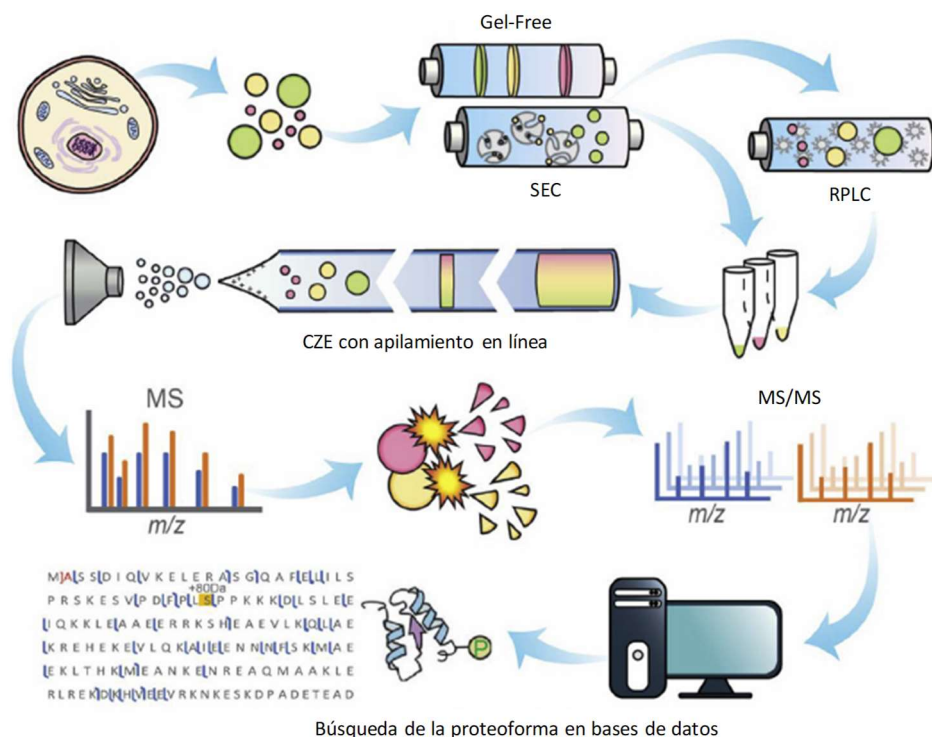


Figura 13. Sistema de trabajo en el análisis proteómico top-down utilizando la técnica CZE-MS/MS.

El método de ionización más utilizado para la CZE-MS es el ESI. El desarrollo de nuevas interfaces con una mayor sensibilidad y estabilidad es uno de los grandes retos en el campo de la electroforesis capilar acoplada al espectrómetro de masas.

4.2.2 Electroforesis capilar bidimensional diferencial en gel

El principio fundamental de la electroforesis capilar diferencial (DIGE) es el de etiquetar las proteínas antes de su separación por 2DE⁸¹.

Lim y colaboradores⁸² utilizaron la técnica 2D-DIGE para la identificación y validación de potenciales biomarcadores proteicos en el suero de pacientes con cáncer colorectal (CCR). La 2D-DIGE facilita el análisis de expresión de proteínas al marcar poblaciones de proteínas de diferentes orígenes con tintes fluorescentes⁷⁷.

Tras el análisis DIGE, se procedió a identificar las proteínas encontradas por LC-MS/MS. Los resultados obtenidos pueden verse en la Tabla 4. Se detectaron 2419 manchas mediante la técnica 2D-DIGE, de las cuales 23 proteínas (derivadas de 33 manchas) se expresaron de manera significativamente diferencial entre los grupos de estudio ($p \leq 0.05$). Estas proteínas están involucradas en la proteólisis celular, transporte de proteínas, apoptosis, reacciones de fase aguda, factores de coagulación, proliferación y diferenciación celular, proteínas estructurales y vías de transducción de señales.

Tabla 4. Proteínas identificadas por LC-MS/MS tras el análisis DIGE⁸².

No.	Número UniProt	Nombre de la proteína	Cobertura de la secuencia (%)	Peso molecular (kDa)	pI	CRC temprano vs. Control normal	CRC tardío vs. Control normal	Proceso biológico / Función molecular
1	Q15113	Potenciador de procolágeno C endopeptidasa 1	19.4	47.9	7.3	Up	Down*	Proteolisis
2	Q53RT3	Proteasa retroviral humana 1	9.3	37.0	5.1	Up	Up*	Proteolisis
3	Q9P173	PRO2275 humana	21.7	13.1	9.6	Up	Up*	Proteolisis
4	P68871	Subunidad beta de la hemoglobina	73.5	16.0	6.9	Up	Up*	Transporte de proteínas
5	Q363Q5	Fragmento de beta globina	72.5	4.5	10.0	Up*	Down*	Transporte de proteínas
6	P02768	Albúmina	12.9	45.1	5.7	Up*	Up	Transporte de proteínas
7	P02649	Apolipoproteína E	42.1	19.9	8.7	Up	Up*	Transporte de proteínas
8	P02647	Apolipoproteína A1	31.1	30.8	5.4	Up*	Up*	Transporte de proteínas
9	P47929	Galectina-7	52.2	15.1	7.6	Down*	Up	Apoptosis
10	C9JSK2	Proteína humana no caracterizada CFH	51.2	43.9	7.3	Up	Up*	Proteína de fase aguda
11	P08603	Complemento de factor H	32.1	31.0	7.7	Down	Down	Proteína de fase aguda
12	P0C0L4	Complemento C4A	11.5	19.3	6.6	Up*	Up	Proteína de fase aguda
13	Q14624	Inhibidor de cadena larga H4 inter alfa tripsina	5.1	103.3	6.5	Up	Up*	Proteína de fase aguda
14	P01009	Anti-tripsina alfa 1	11.1	34.7	4.9	Up	Up*	Proteína de fase aguda
15	P02735	Amiloide humano	20.2	25.4	6.1	Up	Up*	Proteína de fase aguda
16	P04070	Vitamina K dependiente de proteína C humana	21.7	52.0	5.8	Up	Up*	Factores de coagulación
17	P00734	Protombina humana	10.0	70.0	5.5	Up*	Up*	Factores de coagulación
18	Q9GZN7	Proteína rogdi	12.0	32.2	8.3	Up*	Up*	Proliferación y diferenciación celular
19	Q70YC5	Isoforma humana 6 de la proteína ZNF 365	43.1	5.7	11.0	Down*	Down*	Proliferación y diferenciación celular
20	Q5SSB9	Fibrinógeno de colágeno que contiene proteína hakata	39.4	11.4	4.6	Up*	Up	Transducción de señales
21	O15056	Synatojanin-2	17.4	10.0	4.7	Up*	Up*	Transducción de señales
22	P04262	Keratin				Down	Down*	Proteína estructural
23		Proteína humana no caracterizada LOC 134121	9.5	17.0	7.5	Up	Up*	Desconocido

* Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) cuando se comparan entre diferentes grupos de estudio.

Otro estudio interesante utilizando esta técnica ha sido el desarrollado en Colombia por Calderón-Rodríguez y colaboradores⁸³. Se centraron en estudiar el proteoma plasmático de niños diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda (LLA) tipo B, causante de más del 40% de las muertes por cáncer en menores de edad. En esta enfermedad, el diagnóstico temprano es uno de los factores que más afecta el éxito del tratamiento. Se realizó una primera separación por 2DE-DIGE para posteriormente realizar una segunda separación por LC-MS/MS. Se encontraron ocho proteínas con expresión diferencial en plasma de pacientes con LLA-B (posibles biomarcadores para un diagnóstico temprano de la enfermedad), entre las cuales resaltan la serotransferrina, la alfa-1-antitripsina, la haptoglobina, la alfa-2-glicoproteína de zinc y el complemento C3. Sin embargo, se requerirá de una etapa posterior de validación de la técnica para poder ser usada para detectar y diagnosticar de manera temprana la LLA-B.

4.3 Cromatografía de líquidos acoplada a electroforesis capilar

La cromatografía líquida bidimensional como la electroforesis capilar de zona son técnicas que se utilizan habitualmente en el análisis proteómico, siguiendo la estrategia bottom-up. Las dos técnicas son ortogonales entre sí en la separación de péptidos. Sin embargo, el número de proteínas que se pueden identificar mediante el uso CZE en muestras complejas sigue siendo muy inferior que la encontradas utilizando LC. Es por ello que recientemente, Chen y colaboradores⁸⁴ han establecido por primera vez una plataforma SCX-RP-CZE-MS/MS para el análisis proteómico. Consiguieron mediante esta técnica la identificación de 8200 grupos de proteínas y 65000 péptidos de una muestra de proteoma de cerebro de ratón en 70 horas. La **Figura 14** muestra el diseño experimental del trabajo.

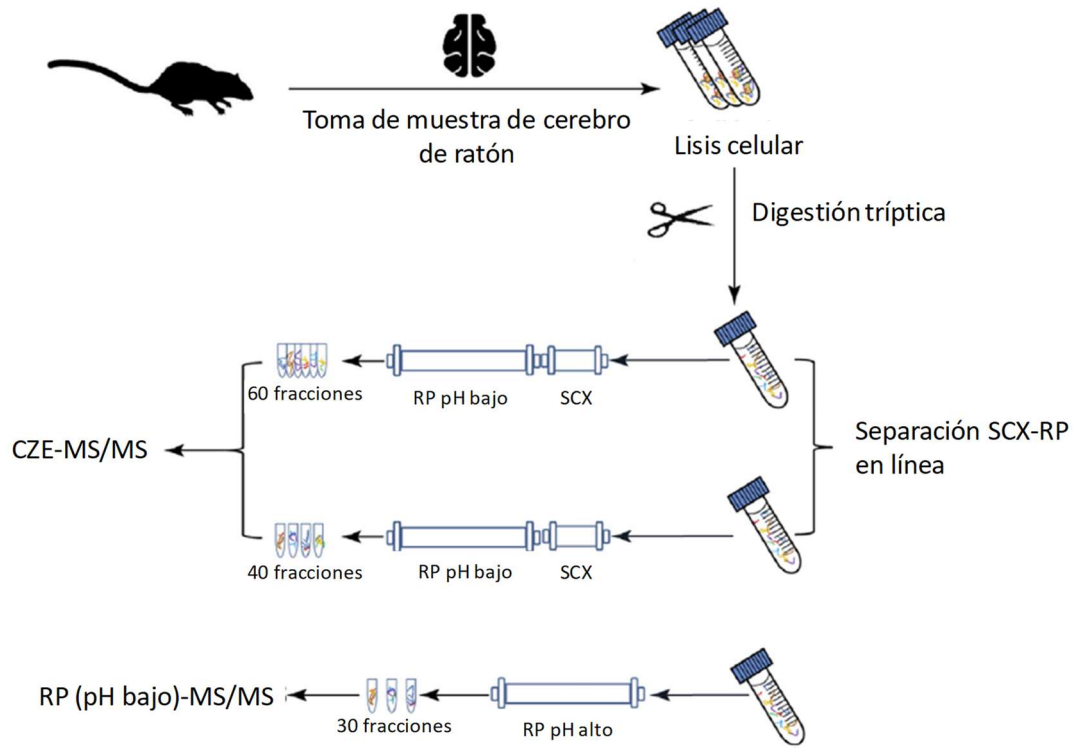


Figura 14. Diseño experimental del trabajo.

5 PARTE EXPERIMENTAL

En esta sección del trabajo se han seleccionado los artículos y publicaciones científicas más recientes relacionadas con el análisis de péptidos y proteínas mediante el uso de sistemas capilares, y se ha analizado tanto la preparación de muestra como el análisis. En todos los casos, el sistema de detección utilizado ha sido el MS o MS/MS.

5.1 Preparación de la muestra

Tal y como se ha descrito en varios artículos durante los últimos años^{85,86,87}, la preparación de la muestra en análisis proteómico continúa siendo un cuello de botella para la obtención de datos de alta calidad, tanto si se sigue la estrategia botom-up como la estrategia top-down.

Brown y colaboradores⁸⁸ han publicado recientemente un artículo sobre el desarrollo de un nuevo método compatible con MS para el análisis de proteínas, siguiendo la estrategia bottom-up.

Los surfactantes convencionales que se utilizan para solubilizar las proteínas, como por ejemplo el SDS, generalmente no son compatibles con el análisis por espectrometría de masas y se deben retirar antes, repercutiendo no sólo en un consumo en tiempo sino en la pérdida y degradación de las proteínas presentes en la muestra^{89,90,91}. Para evitar este problema, se desarrollaron los tensioactivos iónicos lábiles a los ácidos (compatibles con MS), como RapiGestTM (conocido también como RG o ALS)^{92,93}, ProteaseMaxTM⁹⁴ (ácido decilfuranilsulfónico) y MaSDeS⁹⁵, que mejoran de manera significativa la solubilidad de las proteínas y facilitan su digestión. Sin embargo, estos tensioactivos necesitan condiciones muy ácidas para su degradación tras la digestión y requieren un paso de limpieza fuera de línea, lo que excluye la automatización. Además, esta degradación ácida puede provocar la pérdida de importantes PTMs que son inestables en condiciones ácidas (fosforilaciones o glicosilaciones lábiles a los ácidos) y no es compatible con el análisis directo de proteínas intactas (aproximación top-down).

La estructura general de RapiGestTM puede verse en la Figura 15⁸⁴, donde:

- p pueden ser 0, 1 o 2 sustituyentes
- R es un alquil
- R1 y R2 pueden ser, independientemente, hidrógeno y metil

- R3 puede ser $-\text{OSO}_3^-$, $-\text{R}_4\text{OSO}_3^-$, $-\text{R}_4\text{OR}_5\text{SO}_3^-$ y $-\text{OR}_5\text{SO}_3^-$
- R4 y R5 son alquiles

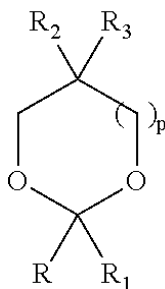


Figura 15. Estructura general de RapiGest™.

En la **Figura 16** puede verse una estructura química particular posible para el RapiGest™⁸⁴.

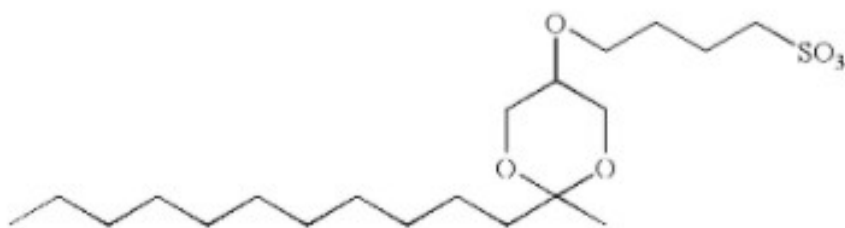


Figura 16. Estructura química particular de RapiGest™.

El objetivo de Brown y col. fue demostrar que el surfactante 4-hexilfenilazosulfonato (Azo) es compatible con MS y sirve tanto para la aproximación top-down como bottom-up (Figura 17).

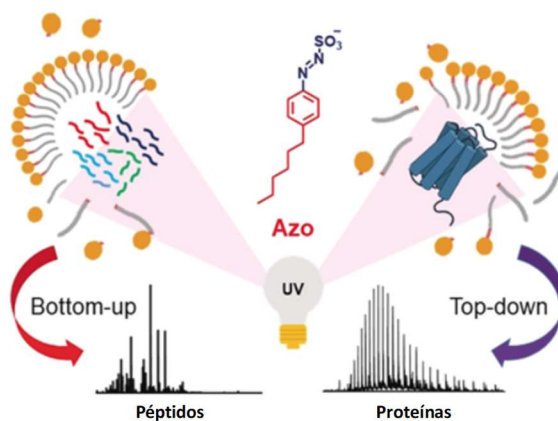


Figura 17. Uso del Azo en proteómica.

El Azo es un reactivo fácil de sintetizar (que sólo requiere de dos pasos) y fácil de purificar. Además, solubiliza las proteínas de manera efectiva y se puede degradar fácilmente antes del análisis por MS (Figura 18).

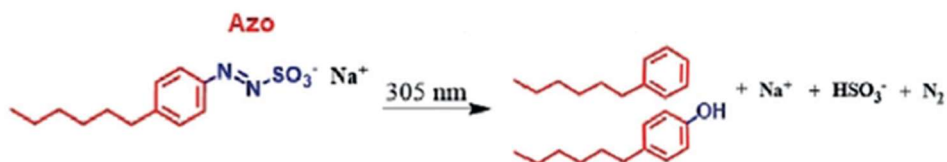


Figura 18. Reacción de degradación del Azo por UV.

El surfactante tiene su máxima absorbancia a 305nm (Figura 19a), por lo tanto, su degradación puede llevarse a cabo mediante espectroscopía UV/VIS usando una lámpara de mercurio en menos de 5 minutos (Figura 19b).

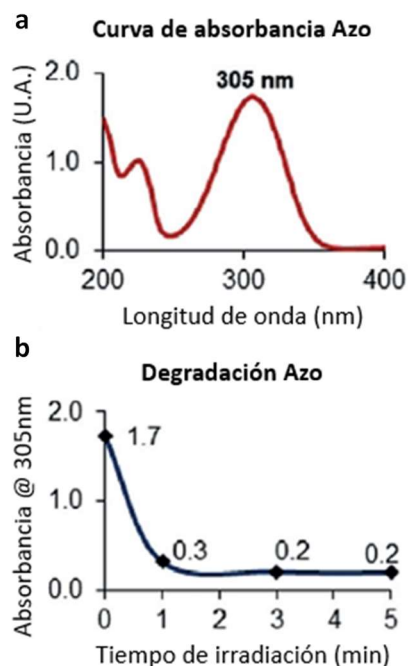


Figura 19. (a) Curva de absorbancia del Azo. (b) Curva de degradación del Azo.

Se evaluó el poder del Azo en la digestión de la mioglobina (proteína resistente a la tripsina), utilizando una solución control (0% de Azo) y tres soluciones adicionales al 0.05%, 0.1% y 0.2% de Azo. La eficiencia de la digestión se hizo mediante la visualización de la mioglobina

intacta remanente mediante SDS-PAGE y el análisis por LC-MS (Figura 20). Tras 0.5 y 1h de digestión, los resultados fueron los siguientes:

- 0% Azo: se observó una banda de proteína intacta a 17kDa. Por lo tanto, la eficiencia de la digestión fue mala.
- 0.05% Azo: se observó una leve banda de proteína intacta.
- 0.1% - 0.2% Azo: no se observó ninguna banda. Esto indica que el Azo mejoró la eficiencia de la digestión.

Brown y col. han demostrado con este experimento que el Azo facilita la desnaturalización de la proteína, proporcionando una digestión eficiente.

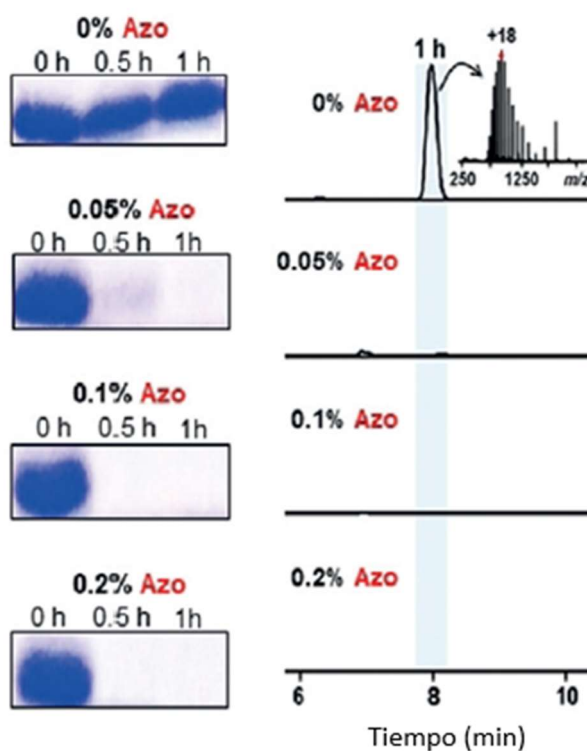


Figura 20. Digestión de la mioglobina con diferentes concentraciones de Azo (izquierda). Análisis mediante LC-MS de la mioglobina remanente (derecha).

Se realizó una comparativa directa entre Azo y RapiGest™ en la digestión de mioglobina, usando soluciones al 0.1% en ambos casos, observando una señal de péptido más baja para la muestra con RG que con Azo, tal y como puede verse en la Figura 21.

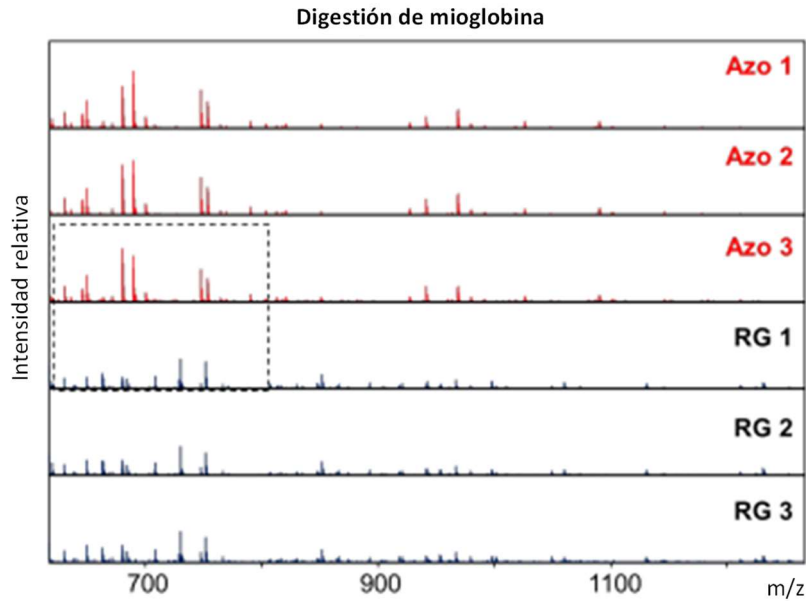


Figura 21. Comparativa directa entre Azo y RapiGest™ (RG) en la digestión de la mioglobina seguido de un análisis por ESI-MS.

Brown y col. también probaron el poder del Azo en la digestión de una mezcla estándar de insulina, mioglobina y anhidrasa carbónica (CA). Nuevamente, se observó que el Azo mejora la digestión (Figura 22).

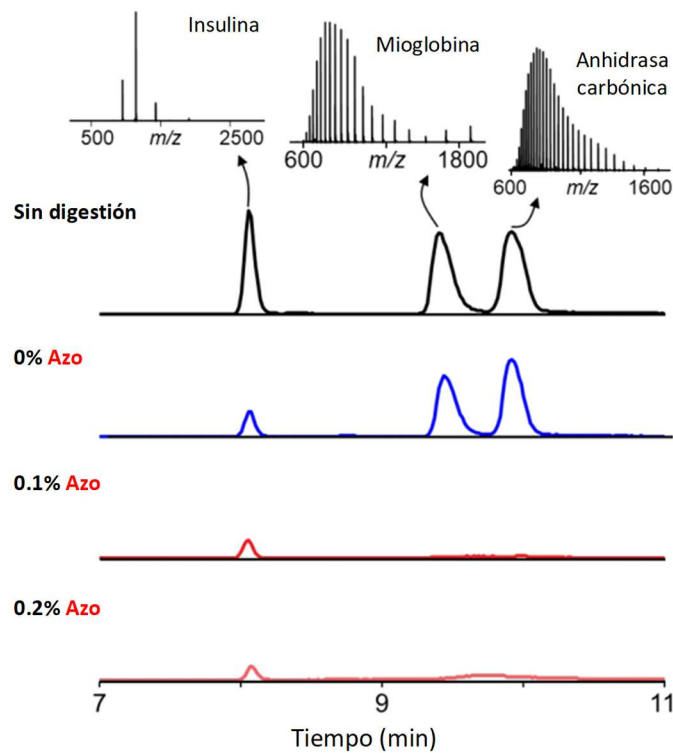


Figura 22. Digestión de proteínas estándar en presencia de Azo.

Los resultados obtenidos indicaron que las proteínas (incluso las resistentes a la digestión con tripsina) se pueden digerir rápida y eficazmente utilizando Azo.

Finalmente, Brown y col. investigaron el poder del Azo en la digestión en un solo paso de una muestra compleja utilizando células de riñón de embrión humano 293T (HEK293T) y se comparó con un protocolo estándar mediante el uso de SDS-FASP (preparación de muestra asistida por filtro) desarrollado por Mann y colaboradores⁹⁶. Los resultados se muestran en la Figura 23.

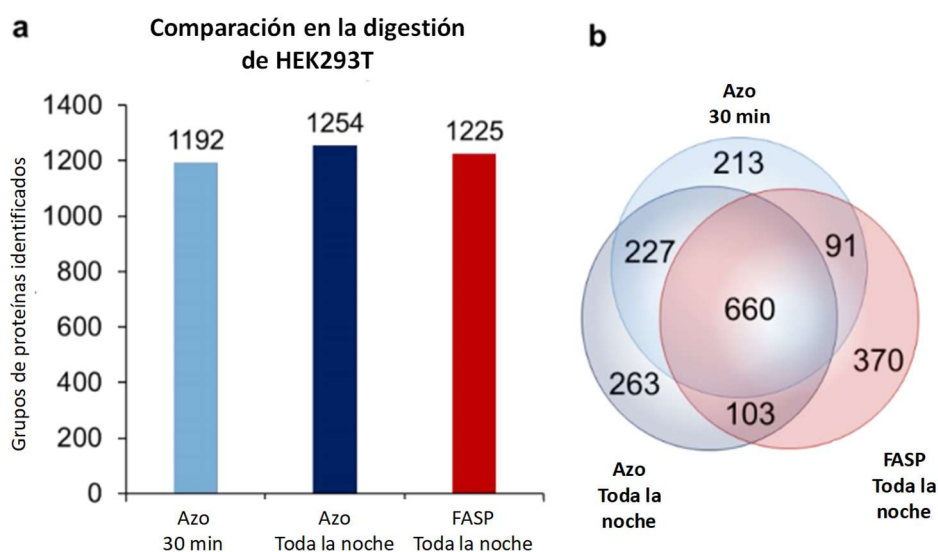


Figura 23. Comparativa de la digestión enzimática de proteínas extraídas de células HEK293T utilizando Azo o SDS.

Después del análisis por LC-MS/MS y el procesamiento MaxQuant, se observó que el mayor número de identificaciones se consiguió utilizando Azo con una digestión durante toda la noche (1254), seguido de la digestión con FASP durante toda la noche (1225). Utilizando el Azo y una digestión de 30 minutos, se detectaron sólo 33 proteínas menos que respecto del SDS durante toda la noche. Esto demostró que el Azo es un reactivo que proporciona datos robustos y reproducibles reduciendo significativamente el tiempo de preparación de muestra.

Otro estudio reciente que también pretende sustituir al FASP como técnica de preparación de muestra es el desarrollado por Massamba y colaboradores⁹⁷. Han propuesto un dispositivo llamado *ChipFilter Proteolysis* (CFP) que posee dos cámaras de reacción de 0.6µL de volumen cada una (diámetro interno 4mm, altura 50µm), separadas por una membrana de filtración de proteínas (diámetro 4.3mm) en celulosa regenerada (corte de 10kD). Ver Figura

24. En estas dos cámaras se concentran o retienen los polipéptidos grandes y se liberan las moléculas pequeñas. El microchip permite la lisis celular, la concentración de proteínas y su tratamiento químico y enzimático.

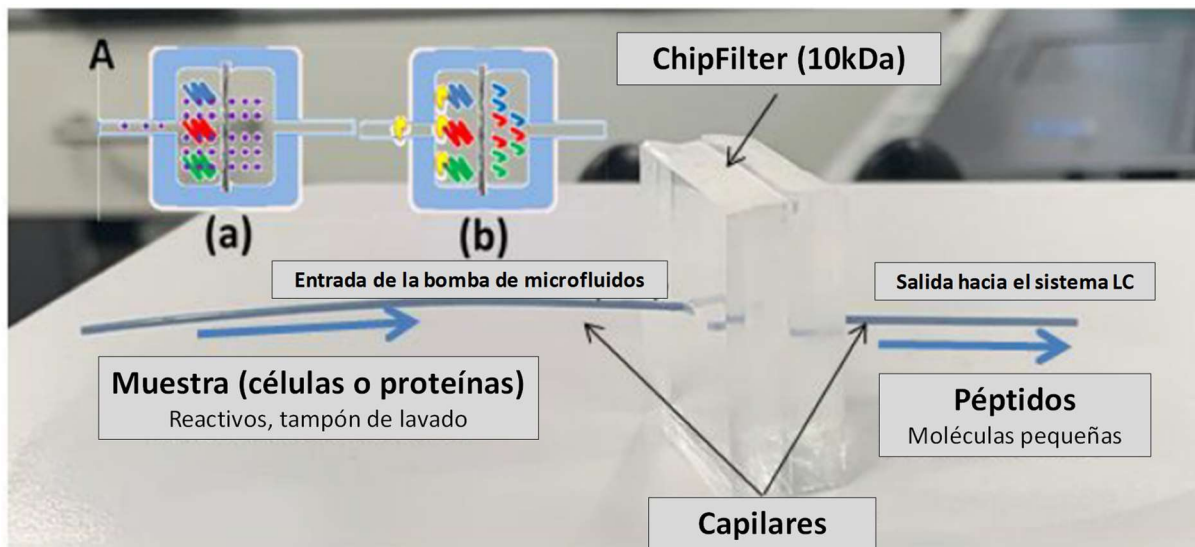


Figura 24. Diseño del ChipFilter.

El transporte de fluido y el flujo dentro del microchip se pueden controlar mediante una bomba externa y un controlador de fluido. El sistema permite usar de forma fiable un caudal máximo de 3 μ L/min y una presión máxima de 500mbar.

El protocolo de trabajo utilizado con células de mamíferos o con extracto de proteínas se compone de varios pasos, que se muestran en la Tabla 5 y en la Tabla 6, en función del tipo de muestra que se utilice.

Tabla 5. Protocolo de proteólisis aplicado a células de mamíferos.

Paso	Descripción	Flujo (μL/min)	Volumen (μL)	Tiempo (min)
1	Carga de la célula	Carga de la célula en el ChipFilter	2	Volumen de muestra En función del volumen de muestra
2	Lavado de la célula	Lavado de la célula con ácido tricloroacético al 10%	2	40
3	Lisis celular y reducción de puentes disulfido	0.1M ditioneitol en tampón de lisis	2	40
			1	10
4	Alquilación	50mM iodoacetamida en tampón de lisis	2	40
			1	10
5	Lavado	Bicarbonato de amonio 50mM	2	30
6	Carga de tripsina	Solución de tripsina 0.1μg/μL en ácido trifluoroacético al 0.1%	2	10
7	Activación de la tripsina	Bicarbonato de amonio 50mM	2	20
8	Digestión y elución	Bicarbonato de amonio 50mM	0.4	24
			2	15

Tabla 6. Protocolo de proteólisis aplicado a extractos de proteínas.

Paso	Descripción	Flujo (μL/min)	Volumen (μL)	Tiempo (min)
1	Carga de la muestra	Carga del extracto de proteínas en el ChipFilter	2	Volumen de muestra En función del volumen de muestra
2	Reducción de puentes disulfido	20mM ditioneitol en bicarbonato de amonio 50mM	2	40
			1	10
3	Alquilación	50mM iodoacetamida en bicarbonato de amonio 50mM	2	40
			1	10
4	Lavado	Bicarbonato de amonio 50mM	2	30
5	Carga de tripsina	Solución de tripsina 0.1μg/μL en ácido trifluoroacético al 0.1%	2	10
6	Activación de la tripsina	Bicarbonato de amonio 50mM	2	20
7	Digestión y elución	Bicarbonato de amonio 50mM	0.4	24
			2	15

En la Figura 25 se muestra una esquematización del sistema analítico utilizado en el presente artículo.

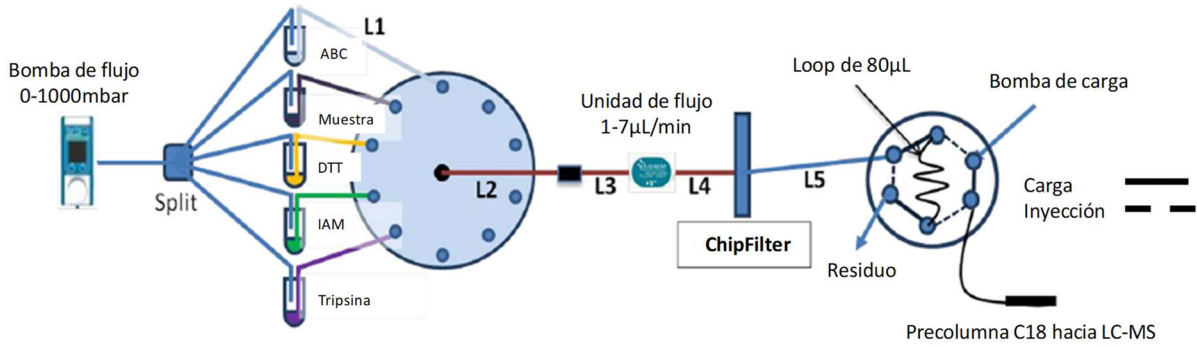


Figura 25. Configuración automatizada para el CFP acoplado a nanoLC-MS/MS. DTT: Ditiotreitolo. IAM: Iodoacetamida. ABC: bicarbonato de amonio.

El ChipFilter se probó con albúmina de suero bovino (BSA), mostrando que era completamente operacional. Posteriormente, Massamba y col. aplicaron el microchip en la caracterización del extracto de proteínas de levadura comparando los resultados con los obtenidos con el método FASP (Figura 26).

Las condiciones en las que se realizó la comparación fueron las siguientes:

- CFP: 1µg de extracto de proteína incubando durante 1 hora.
- FASP: 10µg de extracto de proteína y realizando varias incubaciones durante 1h o durante toda la noche (ON).

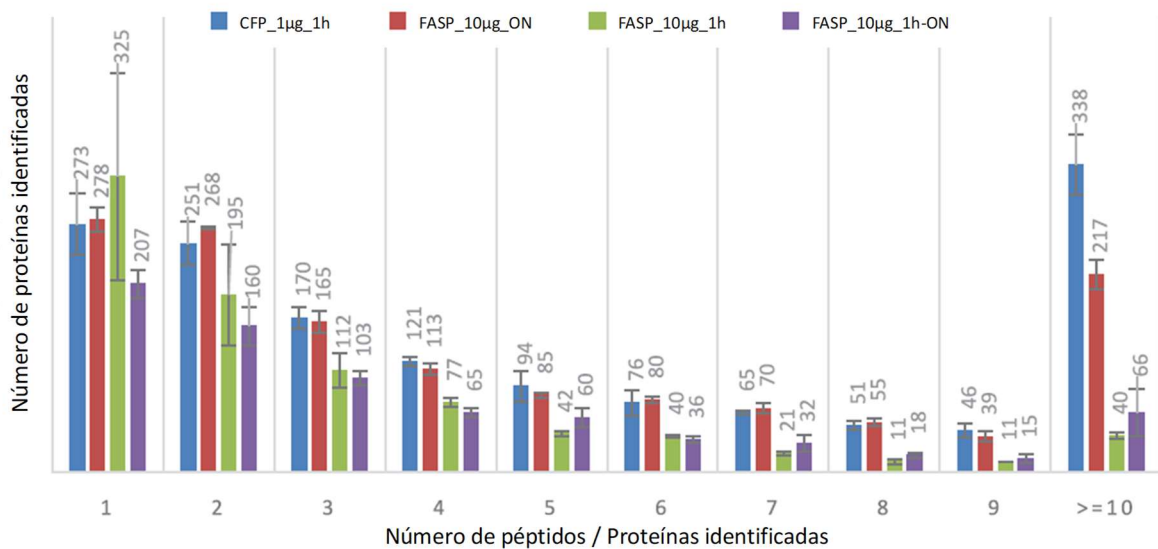


Figura 26. Comparación entre los resultados obtenidos con el método CFP (digestión on-chip) y el método FASP, en el extracto de proteínas.

El método CFP permitió disminuir drásticamente tanto la duración del procesamiento de la muestra como la cantidad de material de partida requerido.

La situación ideal es poder disponer de una técnica universal que permita la extracción y fraccionamiento de las proteínas y que, a su vez, sea rápida, no necesite sustancias surfactantes y requiera del menor número de pasos y manipulación de la muestra, y por supuesto, que se pueda automatizar.

La técnica SPEED³¹ es una nueva aproximación que, tal y como su nombre indica, reduce la preparación de la muestra a tres pasos:

- Acidificación con TFA para romper las células y extraer las proteínas.
- Neutralización con TRIS.
- Digestión con proteasas para generar péptidos.

5.2 Análisis de la muestra

Como ya se ha mencionado durante el presente trabajo, las técnicas por excelencia más utilizadas en el análisis proteómico son el HPLC y la EC.

La cromatografía de líquidos miniaturizada, utilizando nanopartículas, ha sido una de las técnicas más empleadas en el análisis de péptidos y proteínas, principalmente porque una menor velocidad de flujo hace que se mejore la ionización de péptidos por ESI para MS, mejorando así también la sensibilidad. Sin embargo, la fabricación de este tipo de columnas tiene un coste elevado, además del mantenimiento que requieren, limitando la reproducibilidad de la identificación y cuantificación de péptidos.

Bian y colaboradores⁹⁸ han evaluado el uso de microflujo LC-MS/MS en el análisis proteómico, utilizando un equipamiento HPLC estándar (disponible en cualquier laboratorio analítico). Utilizaron una columna RP de 150mm de longitud y diámetro interno igual a 1mm (comparado con los 75µm de diámetro interno que posee una columna de nanoflujo), que trabaja a 50µL/min.

Debido a que la configuración de microflujo permite la inyección directa de la muestra en la columna a 100µL/min, el tiempo necesario para cargar la muestra y/o el equilibrio de la columna se pueden reducir de manera drástica en comparación con los sistemas populares

de nanoflujo que operan a velocidades de flujo bajas, aumentando la eficiencia del MS y permitiendo el análisis de hasta 96 muestras por día (Tabla 7).

Tabla 7. Resumen del rendimiento que se puede lograr con el sistema de microflujo LC-MS/MS en comparación con una configuración típica de nanoflujo LC-MS/MS.

Gradiente (min)	Eficiencia en el MS (%)		Muestras analizadas por día	
	Micro	Nano	Micro	Nano
10	67	33	96	48
15	75	43	72	41
20	80	50	58	36
30	86	60	41	29
45	90	69	29	22
60	92	75	22	18
90	95	82	15	13
120	96	86	12	10

Además, en el estudio se configuraron dos sistemas de microflujo LC independientes en un Orbitrap Q Exactive HF-X y un Orbitrap Fusion Lumos, viendo que el rendimiento era muy similar en los dos sistemas. Se analizaron 11 líneas celulares de cáncer humano dando como resultado la identificación de 7786 y 6388 proteínas utilizando los métodos HF-X y Lumos, respectivamente, a partir de 250µg de péptidos (16h de análisis). Se observó también que, si se aumenta el gradiente de flujo de 15 a 25, los resultados obtenidos en Lumos eran comparables a los obtenidos en HF-X (7636 proteínas). En este caso, el tiempo de análisis aumenta hasta las 24h. El número de proteínas identificadas usando el sistema de nanoflujo LS acoplado al HF-X fueron 7470. Los resultados mediante las dos técnicas son comparables, aunque hay que tener en cuenta que la cantidad de péptidos necesaria para lograr este nivel de rendimiento fue entre 2-5 veces mayor. Estos resultados se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de resultados para el análisis proteómico a gran escala de 11 líneas celulares de cáncer humano utilizando sistemas LC-MS/MS de nanoflujo o microflujo.

Gradient (min)	LC	Sistema de detección MS	Péptidos identificados	Proteínas identificadas
15	Micro	Lumos	59089	6388
25	Micro	Lumos	89733	7636
15	Micro	HF-X	93698	7786
15	Nano	HF-X	76415	7470

Los resultados que se obtuvieron sugieren que el uso de la técnica de microflujo LC-MS/MS puede llegar a tener el potencial de transformar el análisis proteómico, debido a la facilidad de su implementación técnica, la amplia gama de aplicaciones factibles y la alta calidad de los datos que se obtienen.

Otro estudio que va en una línea similar fue el desarrollado por Vowinckel y colaboradores⁹⁹ en 2018, donde ya apuntaban a que el uso de sistemas de microflujo puede mejorar los resultados obtenidos y disminuir el coste del análisis. Según Vowinckel y col., las columnas de microflujo se bloquean con menos frecuencia e idealmente duran años. En muestras preparadas y analizadas en su estudio, una columna de nanoflujo duró como máximo 200 inyecciones, mientras que las columnas de microflujo se pudieron utilizar en aproximadamente 3000 inyecciones.

También se está estudiando la mejora de los rellenos de las columnas en LC para una mejor separación de péptidos y proteínas. Sun y colaboradores¹⁰⁰ han desarrollado, haciendo uso de una técnica novedosa y de bajo coste, una columna OT de 100µm de diámetro interno (di) y 120cm de longitud, modificada con una mezcla de monómeros:

- *N*-fenilacrilamida: proporciona mayor selectividad, al controlar la polaridad de la fase estacionaria resultante.
- Estireno: para mejorar la eficacia de separación de la columna.
- Dimetacrilato de etileno (EDMA) como cross-linker.

El método desarrollado es simple ofrece una buena morfología, alta permeabilidad y una excelente estabilidad mecánica de la columna (Figura 27).

Se validó la nueva columna mediante la separación con éxito de 5 péptidos sintéticos con una alta eficiencia (211500platos/columna).

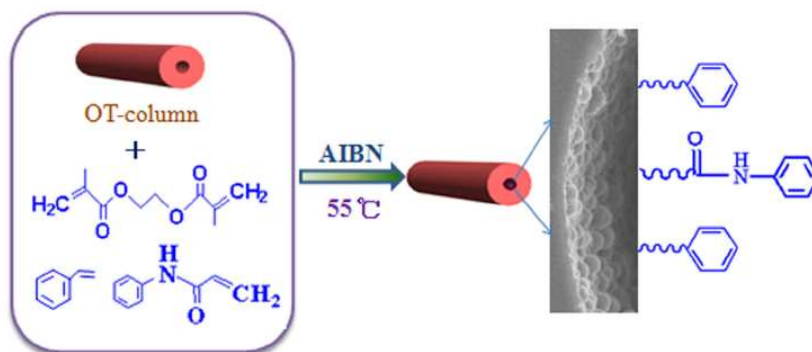


Figura 27. Esquema de preparación de la columna poli(N-fenilacrilamida-co-estireno).

La columna presentó una buena repetibilidad, tanto intra como interdía, mostrando una desviación estándar relativa inferior al 4%.

Recientemente, Wang y colaboradores¹⁰¹ han desarrollado un nuevo método para el análisis de proteínas intactas de cromatografía de líquidos bidimensional (RPxRP), mediante el uso de columnas capilares con canales (C-CP) de fibra de polipropileno en la segunda dimensión.

Para la fabricación de las columnas, siguieron las instrucciones descritas por Randunu y col. en artículos previos^{102,103}. Se analizó una mezcla sintética de 11 proteínas y se compararon los resultados obtenidos con los de las columnas comerciales de lecho empaquetado que se emplean habitualmente en 2D-LC.

La Tabla 9 muestra las columnas comerciales utilizadas, así como sus características principales: tipo de ligando (C8 y C18), longitud (50-100mm) y diámetro interno de la columna (2.1-4.6mm), y el material de soporte y el tamaño del poro que se presupone son los parámetros que más afectan a la separación de las proteínas.

Tabla 9. Detalles de las columnas comerciales utilizadas en la segunda dimensión.

Nombre	Diámetro interno de la columna (mm)	Longitud de la columna (mm)	Material de soporte	Tamaño de partícula (µm)	Tamaño de poro (Å)	Ligando
ACE Excel Super C18	2.1	50	Sílica completamente porosa	1.7	100	C18
Zorbax Eclipse Plus C8	2.1	50	Sílica completamente porosa	1.8	95	C8
Zorbax Eclipse Plus C8	3.0	50	Sílica completamente porosa	1.8	95	C8
Zorbax SB-C8	2.1	100	Sílica completamente porosa	1.8	80	C8
InfinityLab Poroshell 120 EC-C8	3.0	50	Sílica superficialmente porosa	2.7	120	C8
AdvanceBio PR-mAb SB-C8	2.1	50	Sílica superficialmente porosa	3.5	450	C8
Chromolith Performance RP-8e	4.6	100	Sílica monolítica	2*	130**	C8

*: tamaño del macroporo. **: tamaño del mesoporo.

Los cromatogramas bidimensionales obtenidos tras la separación de la mezcla sintética se presentan en la Figura 28, observándose diferencias muy significativas entre el uso de la columna de fibra (Figura 28a) y el resto de columnas.

Para todas las columnas, las condiciones cromatográficas fueron las siguientes:

- Velocidad de flujo: 1.2mL/min
- Tiempo de modulación: 0.6min (incluido el tiempo de equilibrio de 0.1min)
- Longitud de onda de detección: 216nm

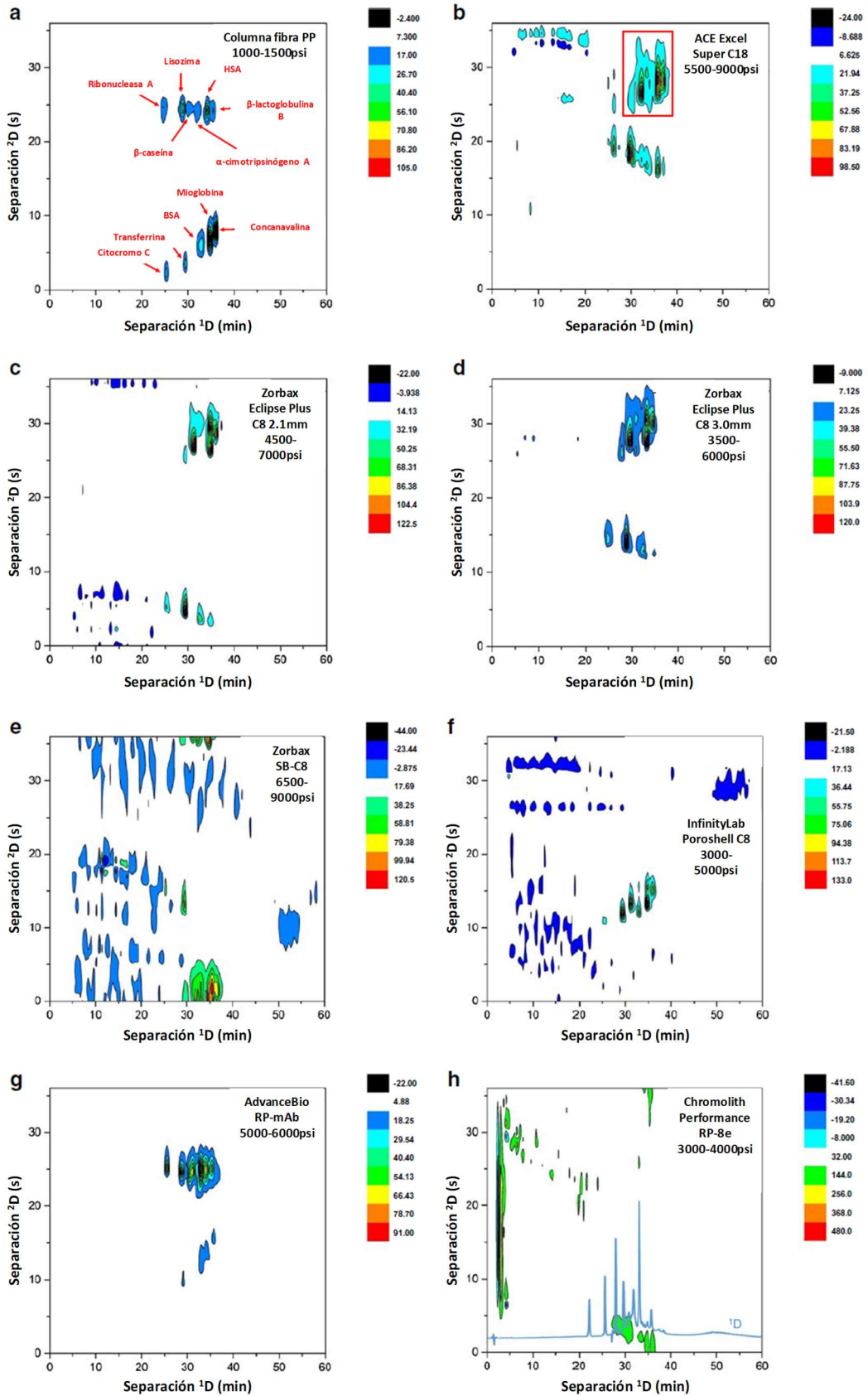


Figura 28. Mapa bidimensional de la técnica RPLCxRPLC mediante el uso de diferentes columnas en la segunda dimensión. (a) PP fiber column. (b) ACE Excel Super C18. (c) Zorbax Eclipse Plus C8 (2.1mm). (d) Zorbax Eclipse Plus C8 (3.0mm). (e) Zorbax SB-C8. (f) InfinityLab Poroshell 120 EC-C8. (g) AdvanceBio RP-mAb SB-C8. (h) Chromolith Performance RP-8e.

Un aspecto muy importante del estudio de Wang y col. es la capacidad de realizar separaciones 2D sin necesidad de recurrir a un sistema de bombeo UHPLC.

Como alternativa a la cromatografía de líquidos, Meyer y colaboradores¹⁰⁴ han demostrado que la adquisición independiente de datos del análisis de inyección de flujo (FIA-DIA) utilizando la separación de péptidos en fase gaseosa en lugar de LC, ofrece un análisis extremadamente rápido.

Se usaron tres tecnologías (Figura 29):

- Movilidad iónica (FAIMS)
- Cuadrupolo m/z
- Disociación iónica

Al incorporar la movilidad iónica con FIA-DIA, se consiguió analizar más de 500 proteínas en pocos minutos (aproximadamente 3.5proteínas/segundo). Han conseguido demostrar la utilidad de esta técnica para realizar un complejo estudio de proteoma multifactorial de interacciones entre nutrientes, genotipo y toxinas mitocondriales en una colección de células humanas cultivadas. Se midió de manera cuantitativa más de 45000 proteínas de 132 muestras en menos de 5 horas. FIA-DIA ofrece un nuevo enfoque para impulsar los estudios de descubrimiento de fármacos y biomarcadores que requieren el análisis de miles de proteínas.

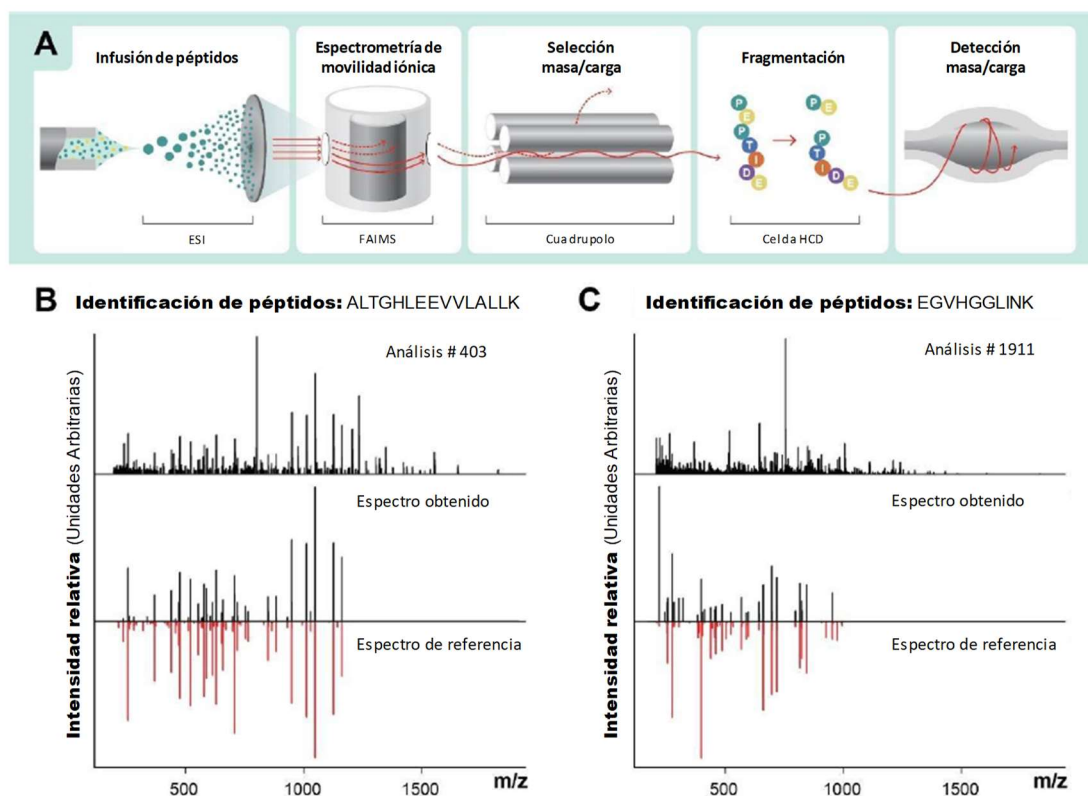


Figura 29. Resumen general de la técnica FIA-DIA para la identificación de proteínas. (A) La muestra digerida se somete a una ionización por electrospray, los iones se separan por movilidad iónica y son fragmentados en el cuadrupolo. Los fragmentos son detectados.

En el ámbito de la electroforesis capilar, Lubeckyj y colaboradores¹⁰⁵ han presentado un nuevo estudio, continuando las investigaciones realizadas por ellos mismos en un trabajo previo¹⁰⁶, en el que han tratado de aumentar la ventana de separación y el volumen de muestra en un sistema CZE-MS/MS, mediante el uso de una columna capilar con un recubrimiento interior de poli(acrilamida) lineal (LPA). Para este estudio, han utilizado un capilar de separación más largo (1.5m vs. 1m), con el objetivo de reducir el campo eléctrico a través del capilar y disminuir la velocidad electroforética de las proteoformas, dando como resultado una ventana de separación más amplia para poder adquirir e identificar más espectros en el MS/MS. Además, esto permite cargar un mayor volumen de muestra sin perder eficiencia en la separación.

Primero compararon los resultados obtenidos al analizar una mezcla de proteínas que contiene mioglobina (Mio), CA y BSA, con los capilares de 1.5m y de 1m. En ambos casos, el volumen de inyección fue de 500nL.

Tal y como se puede observar en la Figura 30, con la columna de mayor longitud se obtuvo una mayor ventana de separación (11min vs. 5min), debido a que las proteínas migran de una manera más lenta (dato que evidencia el mayor tiempo de migración).

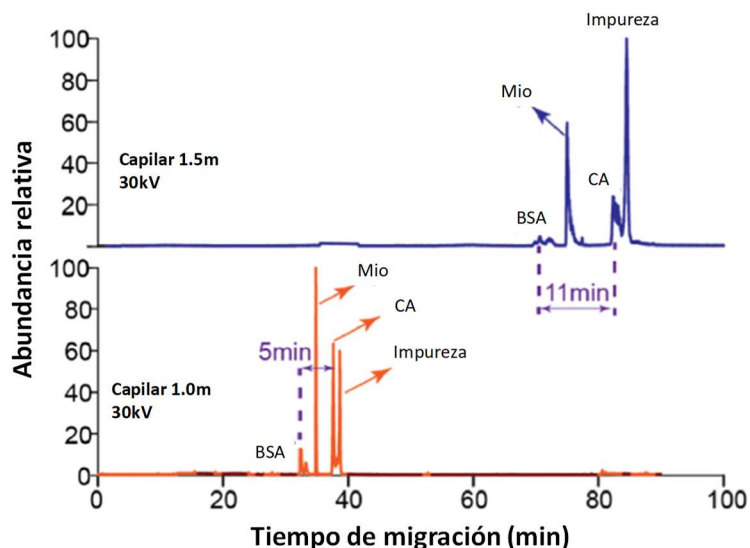


Figura 30. Electroferogramas obtenidos tras el análisis por CZE-MS usando una columna capilar de 1.5m (arriba) y 1m (abajo).

Posteriormente, se analizó la misma muestra únicamente con el capilar de 1.5m, utilizando diferentes volúmenes de muestra:

- 0.5 μL (17% del volumen total del capilar): 8ng de proteínas totales
- 1 μL (33% del volumen total del capilar): 16ng de proteínas totales
- 2 μL (67% del volumen total del capilar): 32ng de proteínas totales

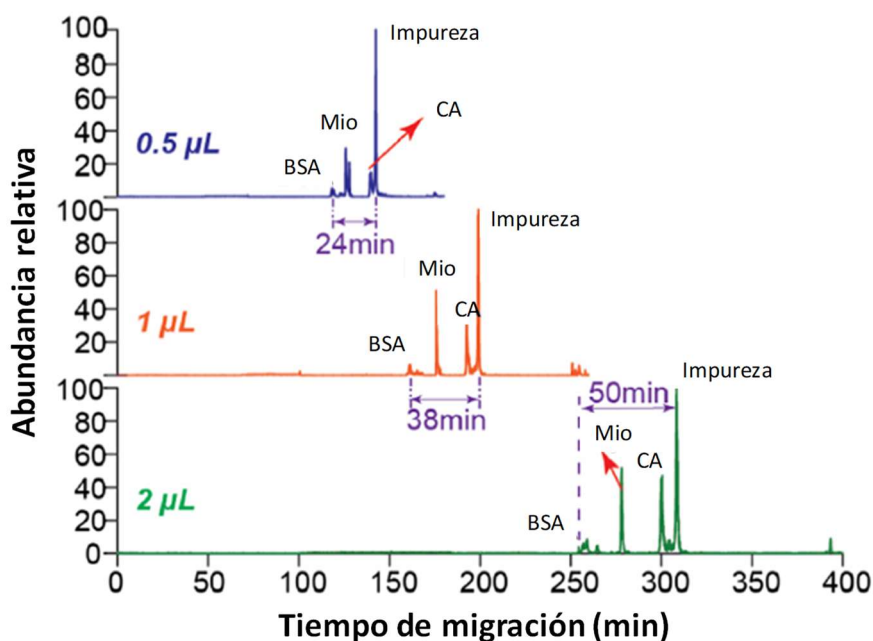


Figura 31. Análisis de una mezcla de proteínas estándar mediante CZE-MS utilizando 3 volúmenes diferentes de muestra: 0.5 μL (arriba), 1 μL (medio), 2 μL (abajo).

Tal y como puede verse en la Figura 31, a medida que se aumenta el volumen de muestra, mejora considerablemente la ventana de separación.

Posteriormente, analizaron el proteoma de *E. coli* identificando 800 proteoformas (usando 250ng de proteínas) y 400 proteoformas (utilizando 25ng de proteínas).

Según sus datos, esta técnica puede tener un gran potencial en la proteómica top-down cuando el volumen de muestra es limitado.

Aunque las separaciones 2D se han utilizado ampliamente desde el período inicial de la proteómica, la separación tridimensional (3D) apenas se ha utilizado en el pasado, debido a una baja reproducibilidad en la separación y al aumento en el tiempo del análisis. Pero con el desarrollo de nuevas técnicas y las mejoras de la espectrometría de masas, la separación 3D se convierte en una muy buena alternativa en el análisis proteómico. Duong y colaboradores¹⁰⁷ han realizado recientemente una revisión donde resumen las plataformas 3D-LC desarrolladas para el análisis de proteínas, tanto en el análisis off-line (Tabla 10) como on-line (Tabla 11).

Tabla 10. Desarrollo de varios sistemas off-line 3D-LC.

Configuración 3D-LC	Muestra (cantidad de proteínas)	MS	Proteínas identificadas	Tiempo de análisis MS (h)	Año Referencia
RP-SCX-RP	Plasma humano (500µg)	Agilent 1100LC/MSD Trap	484	100	2006 Shen y col.
SEC-SCX-RP	Hígado humano (1mg)	QSTARXL	636	206	2007 Zhang y col.
SEC-HILIC-RP	Suero humano (7.4mg)	Trampa de iones cuadrupolo	1955	60	2011 Garbis y col. ¹⁰⁸
ERLIC-RP-RP	Suero humano (1.2mg)	QTOF	1088	216	2013 Boichenko and col.
SCX-RP-RP	Fibroblasto embrionario de ratón (1mg)	Orbitrap LTQ XL	5051	-	2013 Betancourt y col.
SCX-HILIC-RP	Células K562 (3mg)	Orbitrap LTQ-Velos	4708	126	2013 Zhou y col.
SCX-HILIC-RP	Células HeLa (500µg)	Orbitrap LTQ-Velos	3424	126	2013 Zhou y col.
SEC-HILIC-RP	<i>Paracoccus denitrificans</i> (8mg)	Orbitrap Elite	2627	66	2015 Pernikářová y col.
SCX-RP-RP	Células madre embrionarias humanas (-)	Thermo Finnigan LTQ	3184	117	2015 Zhao y col.
RP-RP-RP	Células Jurkat (720µg)	TripleTOF 5600	14230	189	2016 Spicer y col.
GELFrEE-RP-RP & LPIEF-RP-RP	Orina humana (5mg)	TripleTOF 5600	6085	720	2017 Zhao y col.
SAX-RP-RP	Células HEK 293T (30µg)	Orbitrap Fusion	8222	20.4	2017 Chen y col.
SCX & SAX-RP-RP	Suero humano (-)	Orbitrap Fusion	862	12	2018 Xue y col.

Tabla 11. Desarrollo de varios sistemas on-line 3D-LC.

Configuración 3D-LC	Muestra (cantidad de proteínas)	MS	Proteínas identificadas	Tiempo de análisis MS (h)	Año Referencia
RP-SCX-RP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (200µg)	LCQ Deca XP	1900	140	2005 Wei y col.
RP-SAX-RP	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (5µg)	Orbitrap XL	4004 3821	202 102	2011 Zhou y col. 2011 Zhou y col.
RP-SAX-RP	Células madre embrionarias murinas (25µg)	Orbitrap XL	11352	580	2013 Zhou y col.
RP-SCX-RP	Células PC12 (100µg)	AB Sciex QSTAR XL QTOF	5345	24	2015 Law y col.

Además, Duong y col. han analizado y comparado el rendimiento del análisis 3D con el 2D de última generación (**Tabla 12**).

Tabla 12. Comparativa de la estrategia off-line vs. on-line

Característica	Off-line 3D-LC	On-line D-LC
Puesta a punto	Simple	Generalmente sofisticada
Capacidad de transferir la tecnología a otro laboratorio	Alta	Baja-media
Cantidad de muestra	Alta, hasta mg. No adecuada para muestras de cantidad limitada	Baja, del orden de μg
Operabilidad	Dimensiones separadas, fácil y sencilla de operar	Generalmente, completamente automatizado. Requiere entrenamiento.
Mezcla de muestras	Permitido	No permitido
Manipulación de muestras	Alta	Baja
Pérdida de muestra	Alta-media	Baja

La proteómica top-down está emergiendo como una estrategia muy potente para la caracterización de proteínas intactas, pero el análisis de proteínas de membrana es un gran desafío debido a su baja solubilidad, poca abundancia y su complejidad. Kyle y colaboradores¹⁰⁹ recientemente han reportado un método simple pero efectivo para enriquecer y separar proteínas de membrana en muestras de células renales embrionarias humanas y lisados de tejido cardíaco, permitiendo la identificación de 188 y 124 proteínas de membrana integrales endógenas, respectivamente.

La técnica desarrollada (ver Figura 32) consiste en el enriquecimiento de las proteínas de membrana mediante la técnica de extracción en punto de nube (Cloud Point Extraction, CPE), utilizando surfactantes no iónicos como Triton X-114 o Tergitol NP-7, a partir de muestras complejas de células o tejidos. Posteriormente realizaron una separación SEC, donde se consigue eliminar el surfactante, para finalmente analizar el extracto de proteínas enriquecidas mediante RP-MS/MS. Se detectaron proteoformas en un rango de 6 a 115kDa.

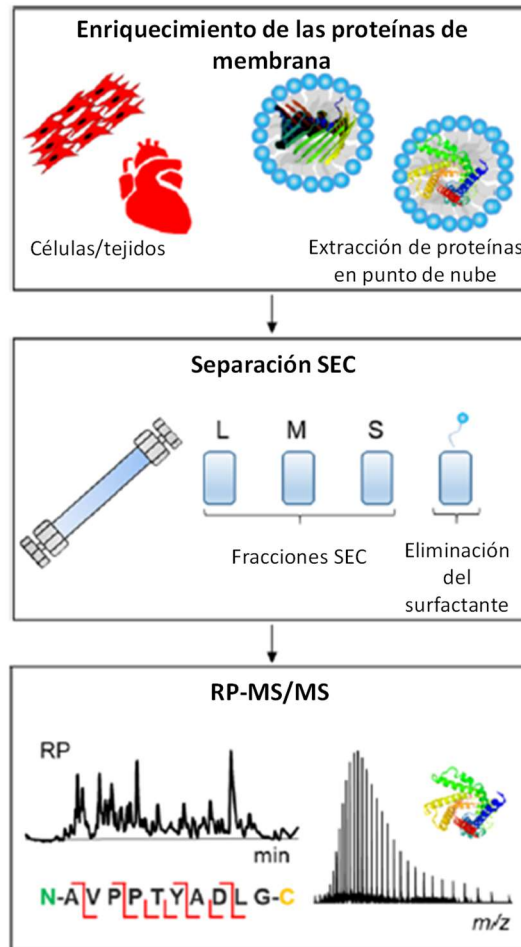


Figura 32. Aproximación Top-down para la caracterización de proteínas de membrana endógenas.

Además, Kyle y col. han demostrado en su estudio que la RP-MS/MS es una técnica efectiva para la separación y caracterización de proteínas de membrana.

6 PROTEÓMICA Y SARS-CoV-2

El último año se ha declarado una pandemia mundial debido a una nueva severa enfermedad respiratoria causada por coronavirus 2 (SARS-CoV-2) llamada enfermedad por coronavirus 2019 (COVID-19). Haas y colaboradores¹¹⁰ han escrito un artículo científico donde exponen como la comunidad científica del campo de la proteómica puede ayudar a investigar en cuatro áreas clave para conocer más sobre la biología del virus:

- 1) Cómo las técnicas basadas en espectrometría de masas pueden superar las limitaciones y complementar las aproximaciones estructurales tradicionales, para informar sobre la estructura dinámica de las proteínas del SARS-CoV-2.
- 2) Cómo el conocer la interacción proteína-proteína entre el virus y el huésped puede identificar la maquinaria celular necesaria para la replicación del SARS-CoV-2.
- 3) La abundancia global de proteínas y las PTM pueden caracterizar las vías de señalización que se forman durante la infección.
- 4) La proteómica puede ayudar en la identificación de biomarcadores, el diagnóstico y el desarrollo de fármacos para monitorizar la patología de COVID-19 e investigar estrategias de tratamiento.

La proteómica puede informar la estructura de una única proteína viral, la composición de un virión completo y una visión global del proteoma del huésped durante la infección. Los métodos proteómicos proporcionan una visión única de la interacción entre el virus y el huésped, incluida la maquinaria del huésped elegida para la replicación viral y las vías de señalización que caracterizan la respuesta del huésped. Las herramientas proteómicas también se pueden utilizar para investigar las interacciones entre compuestos y proteínas, y representan una poderosa estrategia para el descubrimiento de fármacos.

Las técnicas propuestas para el estudio del SARS-CoV-2, incluidos los tipos de muestras que se pueden usar, los conocimientos moleculares que se pueden obtener y cómo se pueden integrar las tecnologías para informar la biología del SARS-CoV-2 y la patología del COVID-19, pueden verse resumidas en la Figura 33.

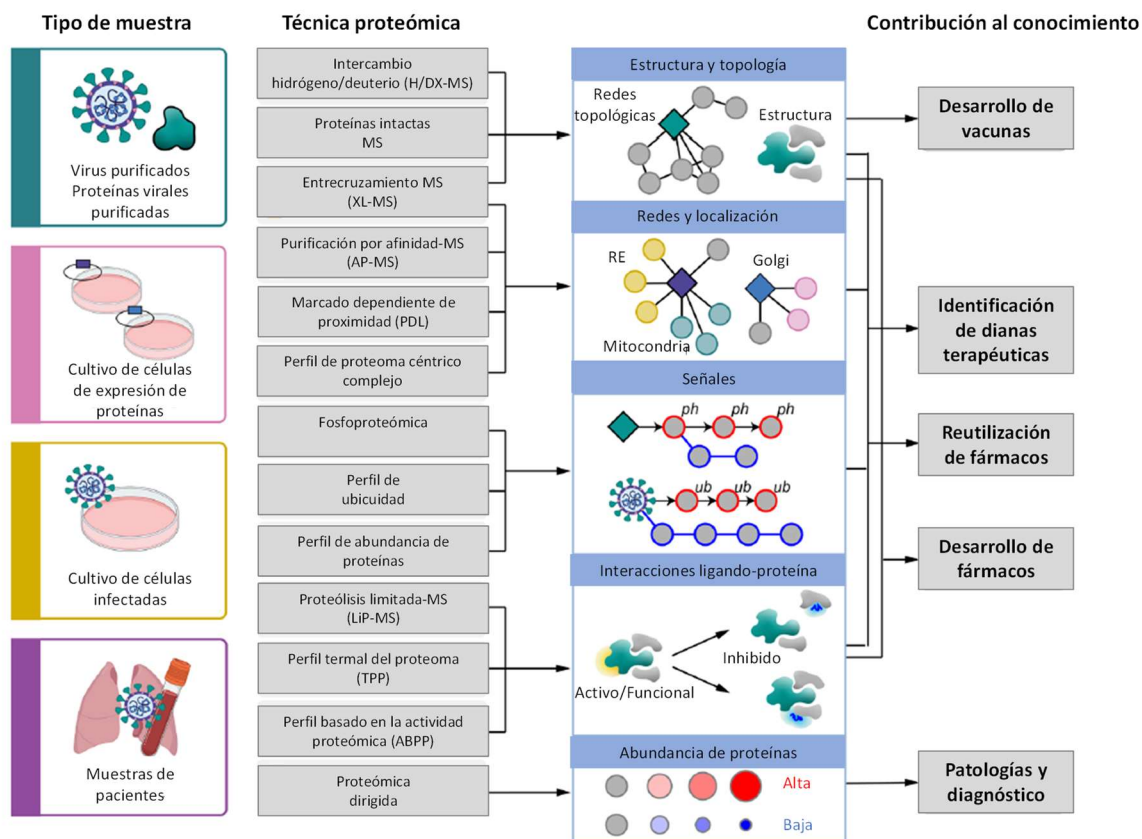


Figura 33. Resumen de las técnicas basadas en espectrometría de masas propuestas para el estudio de SARS-CoV-2.

La pandemia de SARS-CoV-2 requiere el estudio urgente de la estructura de la proteína viral, su replicación, la interacción virus-huésped y la respuesta del huésped, para obtener una comprensión molecular de la patogenicidad e investigar estrategias para posibles tratamientos. El campo de la proteómica está bien posicionado para poder responder a preguntas actualmente abiertas:

- ¿Cómo informan de la patogenicidad las estructuras dinámicas de las proteínas y los viriones del SARS-CoV-2?
- ¿Qué maquinaria celular utiliza el SARS-CoV-2 durante la infección?
- ¿Qué vías de señalización se activan durante la infección por SARS-CoV-2?
- ¿Cuáles son las estrategias para monitorizar la patología de COVID-19 e investigar estrategias de tratamiento?

De hecho, hay un precedente de importantes contribuciones proteómicas en el estudio de otras infecciones virales como el VIH y la influenza.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

El objetivo actual del análisis proteómico y en lo que se centran los estudios más recientes, es en conseguir técnicas cada vez más rápidas y que permitan la identificación del máximo número de péptidos y proteínas posibles.

La combinación de métodos para la separación de proteínas (como puede ser la 2DE) con una estrategia bottom-up (ESI LC-MS/MS) podría ser una buena aproximación para incrementar la productividad de la espectrometría de masas en tándem¹¹¹.

Además, mejoras recientes en el ámbito de la espectrometría de masas, abre las puertas para el análisis 4D en proteómica¹¹². En la conferencia virtual organizada por la American Society for Mass Spectrometry (ASMS) en 2020, Bruker Corporation (www.bruker.com) anunció el lanzamiento de métodos únicos para el análisis de proteómica 4D mediante nanoLC-CCS-MS/MS.

La proteómica top-down también ha experimentado en los últimos años un aumento en popularidad, debido a que los métodos en espectrometría de masas han evolucionado considerablemente. Tecnologías emergentes como la DIA pueden aplicarse también en el análisis top-down, haciendo que se puedan solventar las dificultades en la complejidad de los espectros y en la detección de proteoformas que se encuentren en bajas concentraciones¹³.

Además, enfoques sencillos como la RP-MS/MS se puede utilizar ampliamente para la caracterización de proteínas de membrana¹⁰⁹.

El análisis Top-down y las medidas encaradas a resolver y caracterizar proteoformas tienen un valor de gran especificidad molecular, de cara, por ejemplo, a poder detectar ciertas patologías. El incremento en número de usuarios de esta metodología y los avances realizados y en constante evolución, serán los agentes de conducción hacia un cambio de rumbo en la proteómica aplicada¹⁴.

8 CONCLUSIONES

Las conclusiones que se pueden extraer del presente trabajo se presentan a continuación:

- Las estrategias Bottom-up y Top-down se pueden considerar técnicas complementarias. Mientras que la primera se centra básicamente en la cuantificación de péptidos, la segunda caracteriza proteoformas intactas.
- La cromatografía de líquidos y la electroforesis capilar son las técnicas de preferencia para el análisis proteómico, por su alta capacidad de separación y selectividad.
- El mayor problema en el análisis proteómico es el tamaño de muestra y la baja concentración de algunas proteínas, además del tiempo de análisis, que suele ser elevado.
- Para conseguir unos resultados óptimos en el análisis en proteómica se requiere de la combinación de varias técnicas analíticas acopladas entre ellas, es decir, separación multidimensional (MD) combinada con la espectrometría de masas. Las separaciones multidimensionales proporcionan una capacidad de pico mejorada y reducen la complejidad de la muestra, lo que permite que la MS analice más proteínas con mayor sensibilidad.
- Se ha conseguido mejorar notablemente los resultados en el análisis proteómico mediante la introducción de técnicas como la 2D LC o la 3D LC, requiriendo esta última de tres técnicas de separación que sean independientes y ortogonales. Aunque la 3D LC no siempre es mejor opción que la 2D LC, sobre todo teniendo en cuenta el incremento en el tiempo de análisis y el consumo y la posible pérdida de muestra.
- La identificación y caracterización completa de las proteoformas en la proteómica top-down todavía no es sencilla porque requiere una determinación y localización precisas de todas las modificaciones en las secuencias de proteínas. Una fragmentación más extensa de las proteoformas podría beneficiar la identificación y caracterización completa de las mismas.
- El campo de la proteómica es un complemento esencial en los estudios sanitarios, tal y como ya se demostró con sus contribuciones en el estudio de infecciones virales como el VIH, la influenza y el SARS-CoV-2.

9 BIBLIOGRAFÍA

- (1) Klose, J. Review Genotypes and Phenotypes Proteomics and 2-DE. *Rev. Lit. Arts Am.* **1999**, *20*, 643–652.
- (2) Robles, V. P.; Batista, F. Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. *Biotecnología* **2007**, 97–108.
- (3) Torrades, S. Proteómica. El diseño molecular de la vida. *Offarm* **2004**, *23*, 126–130.
- (4) Universidad Complutense de Madrid. Unidad de Proteómica. <https://www.ucm.es/gyp/proteomica> (acceso 15 Noviembre 2020).
- (5) Vasudevan, R. *Biomolecular and Bioanalytical Techniques.*, 1ª Edición; 2019.
- (6) Giordano, F. J.; Ping, P.; McKirnan, M. D.; Nozaki, S.; Demaria, A. N.; Dillmann, W. H.; Mathieu-Costello, O.; Hammond, H. K. From Proteins to Proteomes: Large Scale Protein Identification by Two-Dimensional Electrophoresis and Amino Acid Analysis. *Nat. Med.* **1996**, *2* (4), 534–539.
- (7) Williams, K. L.; Gooley, A. A.; Wilkins, M. R.; Packer, N. H. A Sydney Proteome Story. *J. Proteomics* **2014**, *107*, 13–23.
- (8) Alsagaby, S. A. Understanding the Fundamentals of Proteomics. *Curr. Top. Pept. Protein Res.* **2019**, *20*, 25–33.
- (9) Cooper, J. W.; Wang, Y.; Lee, C. S. Recent Advances in Capillary Separations for Proteomics. *Electrophoresis* **2004**, *25*, 3913–3926.
- (10) Zhang, Y.; Fonslow, B. R.; Shan, B.; Baek, M. C.; Yates, J. R. Protein Analysis by Shotgun/Bottom-up Proteomics. *Chem. Rev.* **2013**, *113* (4), 2343–2394.
- (11) Gregorich, Z. R.; Chang, Y. H.; Ge, Y. Proteomics in Heart Failure: Top-down or Bottom-Up? *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **2014**, *466* (6), 1199–1209.
- (12) Chait, B. T. Mass Spectrometry: Bottom-up or Top-Down? *Science.* **2006**, *314* (5796), 65–66.
- (13) Cupp-sutton, K. A.; Wu, S. High-Throughput Quantitative Top-down Proteomics. *R. Soc. Chem.* **2020**, *16*, 91–99.
- (14) *Manual de Proteómica Vol. II.* Sociedad Española de Proteómica. 2014.

- (15) Rodríguez, R. A.; Urrego, W. A.; Sanabria, M. C.; Sánchez-Gómez, M.; Umaña-Perez, A. Implementation of a Methodology to Separate Human Plasma Proteomes by Two-Dimensional Electrophoresis. *Rev. Colomb. Quim.* **2015**, *44* (3), 30–38.
- (16) Feist, P.; Hummon, A. B. Proteomic Challenges: Sample Preparation Techniques for Microgram-Quantity Protein Analysis from Biological Samples. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16* (2), 3537–3563.
- (17) Schlüter, H.; Apweiler, R.; Holzhütter, H. G.; Jungblut, P. R. Finding One's Way in Proteomics: A Protein Species Nomenclature. *Chem. Cent. J.* **2009**, *3* (1), 1–10.
- (18) Tyers, M.; Mann, M. From Genomics to Proteomics: One Approach. *Am. Lab.* **2002**, *34* (24), 28.
- (19) *Manual de Proteómica Vol. I.* Sociedad Española de Proteómica. 2019.
- (20) Klose, J. From 2-D Electrophoresis to Proteomics. *Electrophoresis* **2009**, *30*, 142–149.
- (21) Smithies, O.; Poulik, M. D. Two-Dimensional Electrophoresis of Serum Proteins. **1956**, *177*, 1033.
- (22) Grabar, P.; Williams, C. A. Method Permitting the Simultaneous Study of Electrophoretic and Immunochemical Properties of a Mixture of Proteins. Application to Blood Serum. *Biochem. Biophys.* **1953**, *10*, 193–194.
- (23) Raymond, S.; Weintraub, L. Acrylamide Gel as a Supporting Medium for Zone Electrophoresis. *Science.* **1959**, *130* (3377), 711.
- (24) Raymond, S. Acrylamide Gel Electrophoresis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1964**, *121*, 350–365.
- (25) Simpson, R. J. *Proteins and Proteomics. A Laboratory Manual.*, 1ª Edición; New York, 2003.
- (26) Erni, F.; Frei, W. Two-Dimensional Column Liquid Chromatographic Technique for Resolution of Complex Mixtures. *J. Chromatogr.* **1978**, *149*, 561–569.
- (27) Bushey, M. M.; Jorgenson, J. W. Automated Instrumentation for Comprehensive Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography of Proteins. *Anal. Chem.* **1990**, *62* (2), 161–167.
- (28) Patterson, S. D.; Aebersold, R. H. Proteomics: The First Decade and Beyond. *Nat. Genet.* **2003**, *33* (3S), 311–323.
- (29) Opiteck, G. J.; Lewis, K. C.; Jorgenson, J. W.; Anderegg, R. J. Comprehensive On-Line LC/LC/MS of Proteins. *Anal. Chem.* **1997**, *69* (8), 1518–1524.

- (30) Pepaj, M.; Wilson, S. R.; Novotna, K.; Lundanes, E.; Greibrokk, T. Two-Dimensional Capillary Liquid Chromatography: PH Gradient Ion Exchange and Reversed Phase Chromatography for Rapid Separation of Proteins. *J. Chromatogr. A* **2006**, *1120* (1–2), 132–141.
- (31) Dupree, E. J.; Jayathirtha, M.; Yorkey, H.; Mihasan, M.; Petre, B. A.; Darie, C. C. A Critical Review of Bottom-up Proteomics: The Good, the Bad, and the Future of This Field. *Proteomes* **2020**, *8* (3), 1–26.
- (32) Penque, D. Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry for Biomarker Discovery. *Proteomics - Clin. Appl.* **2009**, *3* (2), 155–172.
- (33) Holler, J. F.; Crouch, S. R. *Fundamentos de Química Analítica*, 9ª Edición; 2015.
- (34) Blue, L. E.; Franklin, E. G.; Godinho, J. M.; Grinias, J. P.; Grinias, K. M.; Lunn, D. B.; Moore, S. M. Recent Advances in Capillary Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1523*, 17–39.
- (35) Cromatografía de intercambio iónico <http://ufq.unq.edu.ar/Docencia-Virtual/BQblog/Cromatografía de intercambio iónico.pdf> (acceso 6 Diciembre 2020).
- (36) Giese, S. H.; Ishihama, Y.; Rappsilber, J. Peptide Retention in Hydrophilic Strong Anion Exchange Chromatography Is Driven by Charged and Aromatic Residues. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (7), 4635–4640.
- (37) Muneeruddin, K.; Nazzaro, M.; Kaltashov, I. A. Characterization of Intact Protein Conjugates and Biopharmaceuticals Using Ion-Exchange Chromatography with Online Detection by Native Electrospray Ionization Mass Spectrometry and Top-Down Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2015**, *87* (19), 10138–10145.
- (38) Departamento de Ingeniería Química. Tema 4. Cromatografía de líquidos de alta resolución. *Univ. Alicante*. **2008**, 1–31.
- (39) Cromatografía de exclusión por tamaño para el análisis de biomoléculas www.agilent.com/chem/bioHPLC (acceso 28 Diciembre 2020).
- (40) Cai, W.; Tucholski, T.; Chen, B.; Alpert, A. J.; McIlwain, S.; Kohmoto, T.; Jin, S.; Ge, Y. Top-Down Proteomics of Large Proteins up to 223 KDa Enabled by Serial Size Exclusion Chromatography Strategy. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (10), 5467–5475.
- (41) Tucholski, T.; Knott, S. J.; Chen, B.; Pistono, P.; Lin, Z.; Ge, Y. A Top-down Proteomics Platform Coupling Serial Size Exclusion Chromatography and Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2019**, *91* (6), 3835–3844.

- (42) Rafferty, J. L.; Zhang, L.; Siepmann, J. I.; Schure, M. R. Retention Mechanism in Reversed-Phase Liquid Chromatography: A Molecular Perspective. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (17), 6551–6558.
- (43) Modos de separación. Cromatografía fase reversa. https://www.waters.com/waters/es_ES/Modos-de-Separación/nav.htm?cid=10009385&locale=es_ES (acceso 5 Diciembre 2020).
- (44) Yuritz, C. Universidad A. M. Efecto del pH sobre el perfil de péptidos potencialmente bioactivos producidos por *Lactococcus Lactis* Subsp. *Cremoris* NCFB 712. 2012.
- (45) Kawashima, Y.; Ohara, O. Development of a NanoLC-MS/MS System Using a Nonporous Reverse Phase Column for Ultrasensitive Proteome Analysis. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (21), 12334–12338.
- (46) Huang, T. Y.; Chi, L. M.; Chien, K. Y. Size-Exclusion Chromatography Using Reverse-Phase Columns for Protein Separation. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1571*, 201–212.
- (47) Hwang, H.; Jeong, J. E.; Lee, H. K.; Yun, K. N.; An, H. J.; Lee, B.; Paik, Y. K.; Jeong, T. S.; Yee, G. T.; Kim, J. Y.; Yoo, J. S. Identification of Missing Proteins in Human Olfactory Epithelial Tissue by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J. Proteome Res.* **2018**, *17* (12), 4320–4324.
- (48) Sun, J.; Shi, J.; Wang, Y.; Chen, Y.; Li, Y.; Kong, D.; Chang, L.; Liu, F.; Lv, Z.; Zhou, Y.; He, F.; Zhang, Y.; Xu, P. Multiproteases Combined with High-PH Reverse-Phase Separation Strategy Verified Fourteen Missing Proteins in Human Testis Tissue. *J. Proteome Res.* **2018**, *17* (12), 4171–4177.
- (49) Mahn, A. V. Modelación Fenomenológica de Cromatografía de Interacción Hidrofóbica. *Inf. Tecnol.* **2009**, *20* (3), 135–144.
- (50) Cromlab S.L. Blog de Cromatografía. <http://blog.cromlab.es/nuevas-columnas-de-interaccion-hidrofobica-hic/> (acceso 6 Diciembre 2020).
- (51) Chen, B.; Peng, Y.; Valeja, S. G.; Xiu, L.; Alpert, A. J.; Ge, Y. Online Hydrophobic Interaction Chromatography-Mass Spectrometry for Top-Down Proteomics. *Anal. Chem.* **2016**, *88* (3), 1885–1891.
- (52) Logotheti, M.; Theochari, K.; Kostakis, M.; Pasiadis, I. N.; Thomaidis, N. S. Development and Validation of a HILIC-UV Method for the Determination of Nucleotides in Fish Samples. *Food Chem.* **2018**, *248*, 70–77.
- (53) Boersema, P. J.; Mohammed, S.; Heck, A. J. R. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) in Proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391* (1), 151–159.

- (54) Gargano, A. F. G.; Roca, L. S.; Fellers, R. T.; Bocxe, M.; Domínguez-Vega, E.; Somsen, G. W. Capillary HILIC-MS: A New Tool for Sensitive Top-Down Proteomics. *Anal. Chem.* **2018**, *90* (11), 6601–6609.
- (55) Azarkan, M.; Huet, J.; Baeyens-Volant, D.; Looze, Y.; Vandebussche, G. Affinity Chromatography: A Useful Tool in Proteomics Studies. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *849* (1–2), 81–90.
- (56) Lee, W. C.; Lee, K. H. Applications of Affinity Chromatography in Proteomics. *Anal. Biochem.* **2004**, *324* (1), 1–10.
- (57) Genosphere Biotechnologies. <https://www.genosphere-biotech.com/es/productos/anticuerpos-policonales/purificacion-de-los-anticuerpos/> (acceso 6 Diciembre 2020).
- (58) Katayama, H.; Oda, Y. Chemical Proteomics for Drug Discovery Based on Compound-Immobilized Affinity Chromatography. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2007**, *855*, 21–27.
- (59) Wang, F.; Chmil, C.; Pierce, F.; Ganapathy, K.; Gump, B. B.; MacKenzie, J. A.; Metchref, Y.; Bendinskas, K. Immobilized Metal Affinity Chromatography and Human Serum Proteomics. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2013**, *934*, 26–33.
- (60) Sommella, E.; Cacciola, F.; Donato, P.; Dugo, P.; Campiglia, P.; Mondello, L. Development of an Online Capillary Comprehensive 2D-LC System for the Analysis of Proteome Samples. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35* (4), 530–533.
- (61) Vollmer, M.; Hörth, P.; Nägele, E. Optimization of Two-Dimensional off-Line LC/MS Separations to Improve Resolution of Complex Proteomic Samples. *Anal. Chem.* **2004**, *76* (17), 5180–5185.
- (62) Stoll, D. R. Recent Progress in Online, Comprehensive Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography for Non-Proteomic Applications. *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, *397* (3), 979–986.
- (63) Kajdan, T.; Cortes, H.; Kuppanan, K.; Young, S. A. Development of a Comprehensive Multidimensional Liquid Chromatography System with Tandem Mass Spectrometry Detection for Detailed Characterization of Recombinant Proteins. *J. Chromatogr. A* **2008**, *1189* (1–2), 183–195.

- (64) Dowell, J. A.; Frost, D. C.; Zhang, J.; Li, N. Comparison of Two-Dimensional Fractionation Techniques for Shotgun Proteomics. *Anal. Chem.* **2008**, *80* (17), 6715–6723.
- (65) Moore, A. W.; Jorgenson, J. W. Comprehensive Three-Dimensional Separation of Peptides Using Size Exclusion Chromatography/Reversed Phase Liquid Chromatography/Optically Gated Capillary Zone Electrophoresis. *Anal. Chem.* **1995**, *67* (19), 3456–3463.
- (66) Opiteck, G. J.; Ramirez, S. M.; Jorgenson, J. W.; Moseley, M. A. Comprehensive Two-Dimensional High-Performance Liquid Chromatography for the Isolation of Overexpressed Proteins and Proteome Mapping. *Anal. Biochem.* **1998**, *258* (2), 349–361.
- (67) Wang, S.; Zhang, X.; Regnier, F. E. Quantitative Proteomics Strategy Involving the Selection of Peptides Containing Both Cysteine and Histidine from Tryptic Digests of Cell Lysates. *J. Chromatogr. A* **2002**, *949* (1–2), 153–162.
- (68) Wilson, S. R.; Jankowski, M.; Pepaj, M.; Mihailova, A.; Boix, F.; Vivo Truyols, G.; Lundanes, E.; Greibrokk, T. 2D LC Separation and Determination of Bradykinin in Rat Muscle Tissue Dialysate with On-Line SPE-HILIC-SPE-RP-MS. *Chromatographia* **2007**, *66* (7–8), 469–474.
- (69) Mondello, L.; Donato, P.; Cacciola, F.; Fanali, C.; Dugo, P. RP-LC x RP-LC Analysis of a Tryptic Digest Using a Combination of Totally Porous and Partially Porous Stationary Phases. *J. Sep. Sci.* **2010**, *33* (10), 1454–1461.
- (70) Donato, P.; Cacciola, F.; Sommella, E.; Fanali, C.; Dugo, L.; Dachà, M.; Campiglia, P.; Novellino, E.; Dugo, P.; Mondello, L. Online Comprehensive RPLC x RPLC with Mass Spectrometry Detection for the Analysis of Proteome Samples. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (7), 2485–2491.
- (71) Cassidy, L.; Prasse, D.; Linke, D.; Schmitz, R. A.; Tholey, A. Combination of Bottom-up 2D-LC-MS and Semi-Top-down GelFree-LC-MS Enhances Coverage of Proteome and Low Molecular Weight Short Open Reading Frame Encoded Peptides of the Archaeon *Methanosarcina Mazei*. *J. Proteome Res.* **2016**, *15* (10), 3773–3783.
- (72) Shi, Y.; Xiang, R.; Horváth, C.; Wilkins, J. A. The Role of Liquid Chromatography in Proteomics. *J. Chromatogr. A* **2004**, *1053*, 27–36.

- (73) Singh, P.; Singh Rajput, R.; Dev, D.; Maharshi, A.; Prachi Singh, C. Proteomics Approaches to Study Host Pathogen Interaction. *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2018**, *7* (4), 1649–1654.
- (74) Vesterberg, O. History of Electrophoretic Methods. *J. Chromatogr.* **1989**, *480*, 3–19.
- (75) Valsecchi, S. M.; Polesello, S. Analysis of Inorganic Species in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1999**, *834* (1–2), 363–385.
- (76) Kartsova, L. A.; Makeeva, D. V.; Davankov, V. A. Nano-Sized Polymer and Polymer-Coated Particles in Electrokinetic Separations. *Trends Anal. Chem.* **2019**, *120*, 115656.
- (77) Sandoval-Usme, M. C.; Umaña-Pérez, A.; Vallejo-Pulido, A. F.; Arévalo-Ferro, C.; Sánchezgómez, M. La proteómica en la era postgenómica. *Acta Biol. Colomb.* **2009**, *14* (3), 19–30.
- (78) Goez, M. M.; Torres-Madroñero, M. C.; Röthlisberger, S.; Delgado-Trejos, E. Preprocessing of 2-Dimensional Gel Electrophoresis Images Applied to Proteomic Analysis: A Review. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **2018**, *16* (1), 63–72.
- (79) Chopin, M. Principios básicos de electroforesis capilar: técnica analítica de separación de analitos. *Rev. Tecnol. y Salud* **2012**, *1* (2), 86–89.
- (80) Shen, X.; Yang, Z.; McCool, E. N.; Lubeckyj, R. A.; Chen, D.; Sun, L. Capillary Zone Electrophoresis-Mass Spectrometry for Top-down Proteomics. *Trends Anal. Chem.* **2019**, *120*, 115644.
- (81) Arentz, G.; Weiland, F.; Oehler, M. K.; Hoffmann, P. State of the Art of 2D DIGE. *Proteomics. Clin. Appl.* **2015**, *9* (3–4), 277–288.
- (82) Lim, L. C.; Looi, M. L.; Syed Zakaria, S. Z.; Sagap, I.; Rose, I. M.; Chin, S. F.; Jamal, R. Identification of Differentially Expressed Proteins in the Serum of Colorectal Cancer Patients Using 2D-DIGE Proteomics Analysis. *Pathol. Oncol. Res.* **2016**, *22* (1), 169–177.
- (83) Calderón Rodríguez, S. I.; Umana Pérez, A. Estudio proteómico 2DE- DIGE en plasma sanguíneo de pacientes en etapa infantil con leucemia linfoblástica aguda. *Rev. Colomb. Quim.* **2019**, *48*, 5–15.
- (84) Chen, D.; Shen, X.; Sun, L. Strong Cation Exchange-Reversed Phase Liquid Chromatography-Capillary Zone Electrophoresis-Tandem Mass Spectrometry Platform with High Peak Capacity for Deep Bottom-up Proteomics. *Anal. Chim. Acta* **2018**, *1012*, 1–9.

- (85) Chen, B.; Brown, K. A.; Lin, Z.; Ge, Y. Top-Down Proteomics: Ready for Prime Time? *Anal. Chem.* **2018**, *90* (1), 110–127.
- (86) Waas, M.; Bhattacharya, S.; Chuppa, S.; Wu, X.; Jensen, D. R.; Omasits, U.; Wollscheid, B.; Volkman, B. F.; Noon, K. R.; Gundry, R. L. Combine and Conquer: Surfactants, Solvents, and Chaotropes for Robust Mass Spectrometry Based Analyses of Membrane Proteins. *Anal. Chem.* **2014**, *86* (3), 1551–1559.
- (87) Zhang, Z.; Wu, S.; Stenoien, D. L.; Paša-Tolić, L. High-Throughput Proteomics. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **2014**, *7*, 427–454.
- (88) Brown, K. A.; Tucholski, T.; Eken, C.; Knott, S.; Zhu, Y.; Jin, S.; Ge, Y. High-Throughput Proteomics Enabled by a Photocleavable Surfactant. *Angew. Chemie* **2020**, *132* (22), 8484–8488.
- (89) Kachuk, C.; Doucette, A. A. The Benefits (and Misfortunes) of SDS in Top-down Proteomics. *J. Proteomics* **2018**, *175*, 75–86.
- (90) Zhang, X. Less Is More: Membrane Protein Digestion beyond Urea-Trypsin Solution for next-Level Proteomics. *Mol. Cell. Proteomics* **2015**, *14* (9), 2441–2453.
- (91) Botelho, D.; Wall, M. J.; Vieira, D. B.; Fitzsimmons, S.; Liu, F.; Doucette, A. Top-down and Bottom-up Proteomics of Sds-Containing Solutions Following Mass-Based Separation. *J. Proteome Res.* **2010**, *9* (6), 2863–2870.
- (92) Yu, Y. Q.; Gilar, M.; Lee, P. J.; Bouvier, E. S. P.; Gebler, J. C. Enzyme-Friendly, Mass Spectrometry-Compatible Surfactant for In-Solution Enzymatic Digestion of Proteins. *Anal. Chem.* **2003**, *75* (21), 6023–6028.
- (93) Yu, Y. Q.; Gilar, M.; Corporation, W. RapiGest SF Surfactant: An Enabling Tool for In-Solution Enzymatic Protein Digestions What Is RapiGest SF? Compatibility with Tryptic Digestion Fast Proteolytic Digestions. *Waters Tech.* **2002**.
- (94) Saveliev, S. V.; Woodroffe, C. C.; Sabat, G.; Adams, C. M.; Klaubert, D.; Wood, K.; Urh, M. Mass Spectrometry Compatible Surfactant for Optimized In-Gel Protein Digestion. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (2), 907–914.
- (95) Chang, Y. H.; Gregorich, Z. R.; Chen, A. J.; Hwang, L.; Guner, H.; Yu, D.; Zhang, J.; Ge, Y. New Mass-Spectrometry-Compatible Degradable Surfactant for Tissue Proteomics. *J. Proteome Res.* **2015**, *14* (3), 1587–1599.
- (96) Nagaraj, J. R. W. A. Z. N.; Mann, M. Universal Sample Preparation Method for Proteome Analysis. *Nat. Methods* **2009**, *6*, 359–362.

- (97) Ndiaye, M. M.; Ta, H. P.; Chiappetta, G.; Vinh, J. On-Chip Sample Preparation Using a ChipFilter Coupled to NanoLC-MS/MS for Bottom-Up Proteomics. *J. Proteome Res.* **2020**, *19* (7), 2654–2663.
- (98) Bian, Y.; Zheng, R.; Bayer, F. P.; Wong, C.; Chang, Y. C.; Meng, C.; Zolg, D. P.; Reinecke, M.; Zecha, J.; Wiechmann, S.; Heinzlmeir, S.; Scherr, J.; Hemmer, B.; Baynham, M.; Gingras, A. C.; Boychenko, O.; Kuster, B. Robust, Reproducible and Quantitative Analysis of Thousands of Proteomes by Micro-Flow LC–MS/MS. *Nat. Commun.* **2020**, *11* (1), 1–12.
- (99) Vowinckel, J.; Zelezniak, A.; Bruderer, R.; Mülleder, M.; Reiter, L.; Ralser, M. Cost-Effective Generation of Precise Label-Free Quantitative Proteomes in High-Throughput by MicroLC and Data-Independent Acquisition. *Sci. Rep.* **2018**, *8* (1), 1–11.
- (100) Sun, G.; Lu, Y. A Novel One-pot Strategy of Preparation N -phenylacrylamide-styrene Co-polymer Open Tubular Capillary Column for Peptides Separation. *J. Sep. Sci.* **2020**, 1–8.
- (101) Wang, L.; Marcus, R. K. Polypropylene Capillary-Channeled Polymer Fiber Column as the Second Dimension in a Comprehensive Two-Dimensional RP × RP Analysis of a Mixture of Intact Proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2020**, *412* (12), 2963–2979.
- (102) Randunu, K. M.; Marcus, R. K. Microbore Polypropylene Capillary Channeled Polymer (C-CP) Fiber Columns for Rapid Reversed-Phase HPLC of Proteins. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *404* (3), 721–729.
- (103) Randunu, K. M.; Dimartino, S.; Marcus, R. K. Dynamic Evaluation of Polypropylene Capillary-Channeled Fibers as a Stationary Phase in High-Performance Liquid Chromatography. *J. Sep. Sci.* **2012**, *35* (23), 3270–3280.
- (104) Meyer, J.; Niemi, N.; Pagliarini, D.; Coon, J. Peptide Identification and Quantification by Gas Phase Fractionation Enables Proteomics Without Liquid Chromatography. **2020**. <https://doi.org/10.26434/chemrxiv.12367376.v1> (Lectura On line). *ChemRxiv* (En prensa).
- (105) Lubeckyj, R. A.; Basharat, A. R.; Shen, X.; Liu, X.; Sun, L. Large-Scale Qualitative and Quantitative Top-Down Proteomics Using Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry with Nanograms of Proteome Samples. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2019**, *30* (8), 1435–1445.

- (106) Lubeckyj, R. A.; McCool, E. N.; Shen, X.; Kou, Q.; Liu, X.; Sun, L. Single-Shot Top-Down Proteomics with Capillary Zone Electrophoresis-Electrospray Ionization-Tandem Mass Spectrometry for Identification of Nearly 600 Escherichia Coli Proteoforms. *Anal. Chem.* **2017**, *89* (22), 12059–12067.
- (107) Duong, V. A.; Park, J. M.; Lee, H. Review of Three-Dimensional Liquid Chromatography Platforms for Bottom-up Proteomics. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21* (4), 1524-1544.
- (108) Garbis, S. D.; Roumeliotis, T. I.; Tyritzis, S. I.; Zorpas, K. M.; Pavlakis, K.; Constantinides, C. A. A Novel Multidimensional Protein Identification Technology Approach Combining Protein Size Exclusion Prefractionation, Peptide Zwitterion-Ion Hydrophilic Interaction Chromatography, and Nano-Ultraperformance RP Chromatography/NESI-MS2 for the in-Depth Ana. *Anal. Chem.* **2011**, *83* (3), 708–718.
- (109) Brown, K. A.; Tucholski, T.; Alpert, A. J.; Eken, C.; Wesemann, L.; Kyrvasilis, A.; Jin, S.; Ge, Y. Top-Down Proteomics of Endogenous Membrane Proteins Enabled by Cloud Point Enrichment and Multidimensional Liquid Chromatography – Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2020**, *92*, 15726–15735.
- (110) Haas, P.; Muralidharan, M.; Krogan, N. J.; Kaake, R. M.; Hu, R. Proteomic Approaches to Study SARS-CoV - 2 Biology and COVID-19 Pathology. **2020**. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.0c00764> (Lectura On line) *Am. Chem. Soc.* (En prensa)
- (111) Naryzhny, S. Inventory of Proteoforms as a Current Challenge of Proteomics: Some Technical Aspects. *J. Proteomics* **2019**, *191*, 22–28.
- (112) Bruker Introduces Breakthrough MALDI-2 Source on timsTOF fleX , and Further Innovations in CCS-Enabled 4D Proteomics on timsTOF <https://search.proquest.com/docview/2407530073?accountid=14609> (acceso 10 Enero 2021).