

BIOANÁLISIS. PROTEÍNAS Y GLICOPROTEÍNAS

José Barbosa Torralbo

Catedrático Emérito

Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica

Universidad de Barcelona



INTRODUCCIÓN

No quisiera explicar directamente los principales logros científico-docentes alcanzados sin antes exponer, aunque sea someramente, los avatares de mi trayectoria, no mi trayectoria en sí, que he tenido la oportunidad de desarrollarla siempre en el mismo lugar, la Universidad de Barcelona. Vamos lo que se dice un profesional de la cantera. En efecto, hace ya algunos meses, en 1967 entré de alumno en la UB y hoy en 2023 sigo en la UB como profesor emérito. Aunque siempre haya pertenecido a la misma universidad, no siempre he estado en el mismo lugar. Empecé en el edificio histórico de la plaza Universidad, estrené aún como alumno el edificio de la Facultad de Química en Pedralbes e inauguré la ampliación de la Facultad de Química ya como decano de Química.

Mi vocación docente se manifestó ya a muy temprana edad por los juegos infantiles que realizaba en mi pueblo natal de Villanueva de Córdoba y mi interés por la Química se despertó en cuanto recibí las primeras clases de química en el instituto, así que no tuve que esforzarme en absoluto para escoger carrera al entrar en la Universidad. Al acabar la licenciatura en 1972 tuve la suerte de entrar directamente en el Departamento de Química Analítica de la UB para realizar la tesis doctoral bajo la dirección del Dr F. Buscarons. Fui su último doctorando, lo que mucho más tarde me valdría para obtener ayudas a nuestro grupo de investigación a través de la Fundación Mir/Puig al ser el Dr. Mir el primer doctorando del Dr. Buscarons. Durante estos años fui becario del MEC y profesor ayudante. Acabando la tesis pasé a impartir clases teóricas en 1977. Hasta ese momento mis investigaciones, como era tradicional en aquellos momentos, habían comenzado estudiando un

compuesto, la alizarina-9-imina, como reactivo cuali y cuantitativo. Por sus cambios de color con el pH, pasé a estudiarlo como indicador, pero en medios no acuosos, ácido acético y acetonitrilo principalmente, porque ya había derivado mis estudios hacia el análisis de sustancias orgánicas, cosa nada habitual en aquellos años, donde predominaba claramente el análisis inorgánico. Las valoraciones de fármacos en medios no acuosos eran un método habitual y barato de analizar principios activos de interés farmacéutico. Con el auge e implantación de los métodos cromatográficos para la detección y determinación de sustancias orgánicas, derivé mis estudios a los equilibrios en las mezclas hidroorgánicas más utilizadas en HPLC, como el acetonitrilo/agua, metanol/agua e isopropanol/agua y comprobé y cuantifiqué que el agua era el disolvente con solvatación preferencial de los analitos en estas mezclas, por lo que la extrapolación de parámetros acuosos, como el pKa, a las mezclas hidroorgánicas no muy concentradas en disolvente orgánico era factible sin un gran error.

Una vez conseguidos, no sin gran esfuerzo, un cromatógrafo de líquidos con detección de diodos y una electroforesis capilar, enfocamos nuestros esfuerzos a establecer métodos de detección y determinación de principios activos farmacológicos, tales como antibióticos, benzodiazepinas, diuréticos, péptidos, etc., tanto puros como en diferentes tipos de muestras. Uno de los campos en los que más trabajó el grupo fue en el análisis de antibióticos, principalmente quinolonas, cefalosporinas y penicilinas, en muestras de alimentos de origen animal, tales como leche; músculo de aves (pollo, pavo, buitre), cerdo, vacuno, etc.; hígado, sangre... Tras disponer de instrumentos de LC y CE con detección por espectrometría de masas, se desarrollaron métodos de detección y caracterización de antibióticos y de sus metabolitos en diferentes muestras alimentarias de origen animal que fueron implantados para su uso diario en laboratorios de control de alimentos como el ALLIC de Cabrils (Barcelona) [1][2]. A raíz de estos trabajos nuestro grupo de bioanálisis ingresó en el Instituto de Nutrición y Seguridad Alimentaria (INSA) al que seguimos perteneciendo en la actualidad.

Durante todos estos años mis asistencias a congresos nacionales e internacionales fueron muy numerosas. Uno de ellos, celebrado en Antalya (Turquía) en 1997, fue muy fructífero al coincidir con el profesor Sanz Medel, el otro único profesor español que asistía al congreso, con lo que fue fácil dialogar ampliamente con él sobre sus investigaciones en proteínas con contenido

metálico. Yo, que ya había trabajado con péptidos, pensé en estudiar esas mismas proteínas, pero investigando su contenido orgánico y así empecé con mi primera tesis de metaloproteínas en colaboración con el grupo de investigación que el Dr. Sanz Medel dirigía en Oviedo, donde realizó una estancia una de nuestras doctorandas. Esos fueron nuestros primeros pasos en el estudio de proteínas y glicoproteínas en diferentes medios, que es nuestra principal línea de investigación en la actualidad de la que expondremos algunos ejemplos más adelante.

Por otro lado, también en Antalya empezaron mis colaboraciones con la profesora Guleren Alsancak de la Universidad de Isparta (Turquía), que fue el inicio de toda una serie de colaboraciones con grupos de investigación farmacéuticos y químicos de universidades turcas como las de Estambul, Chanakale, Izmir, Konya, Ankara, Trapsor y otras universidades que enviaron numerosos becarios a realizar trabajos en nuestros laboratorios de Barcelona. También a través de los numerosos congresos en Turquía y en todo el mar Negro, establecí relaciones con profesores rumanos, en especial con la Dra E. Chirila de la Universidad de Constanza, con la que tras ímprobos esfuerzos, diferentes intercambios de becarios y estancias mías en Constanza, se consiguió establecer un laboratorio de control de calidad de alimentos en Rumanía a la vez que se me concedía el título de Dr. Honoris Causa por la Universidad de Constanza. El desarrollo y establecimiento de métodos de detección y caracterización por LC/MS, LC/MS-MS, CE/MS y CE/MS-MS de sustancias nocivas en alimentos, utilizables en laboratorios de control de Calidad, ha sido una de nuestras líneas de investigación más fructíferas desarrollada con la destacable ayuda de las Dras. V. Sanz Nebot y D. Barrón.

Sin embargo, hoy en día uno de los principales retos que tiene planteado la Química Analítica es la detección y caracterización de los miles y miles de proteínas y glicoproteínas de enorme interés en campos como el biomédico. Así, el establecimiento de biomarcadores proteicos que permitan el diagnóstico precoz, seguimiento de la enfermedad y faciliten su curación es un campo de gran actualidad e indudable interés [3]. Hay que tener en cuenta que hasta prácticamente el siglo XXI y desde el medioevo, la enfermedad solo se podía atacar una vez desarrollada y en muchas ocasiones se tenía que abordar de una manera drástica con una intervención quirúrgica si era necesario y posible. Hoy en día el reto es ir al fondo de la cuestión y buscar la disfunción metabólica responsable del desarrollo de la enfermedad. En la gran mayoría de los casos son las proteínas que intervienen en los procesos las responsables de las disfunciones, estudiándolas se llega a saber las causas de la enfermedad, lo que abre grandes posibilidades de una curación adecuada y no caústica (Figura 1). Un ejemplo importante es la administración de insulina a personas diabéticas para facilitar el metabolismo de la glucosa.



Figura 1. Diferentes métodos de abordar la enfermedad. Una vez desarrollada se intenta atajar con una intervención quirúrgica, método tradicional y caústico. Método deseable: Se estudian los procesos metabólicos implicados, se localiza la proteína causante de la disfunción y se administra al paciente.

Por ello, la caracterización de proteínas y glicoproteínas implicadas en procesos metabólicos es de un enorme interés y no solo una especie proteica, sino sus isoformas y glicofomas, que en la mayoría de las ocasiones son muy numerosas y que dificultan enormemente el estudio exhaustivo del proteoma.

Hasta prácticamente el siglo XXI el estudio de proteínas y glicoproteínas se tenía que realizar utilizando diferentes técnicas de electroforesis, lo que implicaba métodos que necesitaban 48 o más horas para su desarrollo, con lo que obviamente los avances requerían de grandes esfuerzos y por consiguiente eran claramente escasos. La disponibilidad de técnicas de separación acopladas a la espectrometría de masas y masas en tandem, como la LC/MS-MS y CE/MS-MS, permite acortar enormemente la duración de los experimentos requeridos para el estudio del proteoma humano, de ahí que se hayan multiplicado los avances en este campo en los últimos años.

En la actualidad nuestras principales líneas de investigación se enfocan en este sentido, es decir al estudio de péptidos, glicopéptidos, proteínas y glicoproteínas, desarrollando métodos para su detección y caracterización, no solo de las cadenas peptídicas principales, sino de las isoformas y glicofomas con las que pueden presentarse las proteínas y glicoproteínas de gran interés bioanalítico [3].

DOCENCIA Y CARGOS ACADÉMICOS

Como ya he indicado anteriormente mi vocación docente se manifestó ya a muy temprana edad lo que me ha ayudado a decidir el camino que afortunadamente siempre he podido escoger. Así, desde el inicio he impartido las clases a gusto cosa de la que se han apercibido los alumnos a los que, dicho sea de paso, no se les escapa una y con ello ha sido fácil que las clases transcurrieran de manera agradable y adecuada. A lo

largo de los años he impartido prácticamente todos los contenidos docentes que se le asignan al departamento de Química Analítica.

Preocupado siempre por el aprendizaje de los alumnos he elaborado materiales de soporte al aprendizaje, entre ellos ya en los años 80 los vídeos de la serie " la medida en Química" realizados junto a mis compañeras de trabajo y que fueron premiados con la medalla de Lavoisier en el congreso celebrado en Paris el año 1987. Más tarde he coordinado la elaboración de CDs, programas informáticos, cuestionarios etc. dentro del grupo docente acreditado por la UB que dirijo de la "Química Analítica en Ciencias Experimentales y Ciencias de la Salud". También he promovido y participado en la elaboración de textos docentes entre los que cabe destacar "Operaciones Básicas de Laboratorio", los capítulos de enciclopedias de Analytical Chemistry editados por el Dr. Valcárcel y sobre todo el libro de "Equilibrios iónicos y sus aplicaciones analíticas" escrito en colaboración con mi buen amigo M. Silva catedrático de la Universidad de Córdoba.

Mis preocupaciones docentes también me han llevado a desempeñar cargos de responsabilidad docente, entre ellos el de director de la sección de universidades del Instituto de Ciencias de la Educación de la UB y sobre todo el de jefe de estudios de Química, cargo con total responsabilidad docente en la UB y que desempeñé durante el gran cambio que representó el tránsito del antiguo plan de estudios de 1977 al plan de 1992, lo que representaba una gran ruptura. Este cambio fue aprovechado para conseguir, con la ayuda del decano C. Mans, por primera y última vez en la historia de nuestra facultad, ayudas suficientes para comprar instrumentos de prácticas de todo tipo de técnicas como UV-visible, fluorescencia, absorción atómica, polarografía, cromatógrafos de gases y cromatógrafos de líquidos en número adecuado para que todos los alumnos pudieran utilizarlos con una adecuada programación. Hecho insólito, que desafortunadamente no se ha vuelto a repetir, ni nada parecido, por lo que los instrumentos de prácticas actuales son los mismos prácticamente que se consiguieron hace ya 30 años.

Respecto a mi carrera docente, hace ya bastantes años, en 1991 gané la cátedra de Química Analítica con lo que conseguí representación masculina en las cátedras del Departamento de QA. He de señalar que en nuestro departamento rara vez se ha cumplido lo de la paridad de género en ningún ámbito, por haber habido prácticamente siempre mayoría femenina, eso en cuanto a número, si además añadimos personalidad entonces la mayoría ha sido abrumadora. Indudablemente el cargo que más esfuerzos me ha costado desempeñar ha sido el de Director de Departamento, cargo que ejercí del 2000 al 2004. Más tarde fui elegido decano de la Facultad de Química y durante esos años inauguramos la gran ampliación del edificio de Química de Pedralbes, 2008, lo que facilitó en gran manera los trabajos de los grupos de investigación de la Facultad, además de que

obviamente la ampliación del número de aulas facilitó la planificación docente.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN DE BIOANÁLISIS, INSTRUMENTACIÓN, TRANSFERENCIA Y DIVULGACIÓN.

Todos los investigadores somos conscientes de que nuestros trabajos necesitan, para tener éxito dos pilares fundamentales, el personal adscrito y el instrumental disponible. Ambos son enormemente difíciles de conseguir en nuestro país. La escasez de plazas remuneradas para comenzar una carrera científica y realizar una tesis doctoral es endémica, con lo que lo normal es que no se pueda seleccionar al personal. Aun así, en ocasiones se tiene suerte y entra en el grupo una persona de gran valía como en mi caso fue la llegada de la Dra. V. Sanz Nebot, colaboradora desde hace más de 30 años y hoy catedrática de QA en nuestro departamento. Rompiendo totalmente la regla, ha habido temporadas en las que hemos podido seleccionar personal, en una de ellas entró a trabajar con nosotros el Dr. Fernando Benavente pilar de nuestro grupo y hoy catedrático. Posteriormente y también en época que permitía seleccionar personal, entraron a formar parte del grupo las Dras. E. Giménez y L. Pont, hoy profesoras estables de la UB. Todos ellos constituyen el staff del grupo (Figura 2) y han realizado estancias en laboratorios de reconocido prestigio internacional, que permitieron aportar conocimientos de actualidad y de gran interés que han ayudado a situar al grupo de Bioanálisis en un lugar destacado dentro del campo al que se dedica. Especial mención merece la estancia del Dr. F. Benavente en los laboratorios de Johnson and Johnson en USA con el Dr. Norberto Guzmán, que le permitió conocer la técnica de preconcentración en línea con CE. Estas técnicas de SPE-CE-UV y SPE-CE-MS nos han permitido alcanzar grandes logros en nuestros estudios de Bioanalítica.



Figura 2. Grupo de investigación de Bioanálisis en 2023.

Respecto al otro pilar fundamental de todo grupo de investigación, la instrumentación, todos hemos padecido y padecemos las enormes dificultades que se tienen para conseguir una financiación suficiente para sufragar los gastos de instrumental que se requieren. Nuestro grupo de Bioanálisis empezó sus

investigaciones en equilibrios iónicos en medios hidroorgánicos al no disponer de ningún tipo de instrumental. Las primeras ayudas del ministerio y los primeros contratos con empresas permitieron la compra de un cromatógrafo de líquidos y de una electroforesis capilar. Las fuentes principales de financiación del grupo tradicionalmente han sido las convocatorias del ministerio y los contratos con empresas. A resaltar que a pesar del amplio número de empresas existente en nuestro entorno siempre ha resultado complicado desarrollar proyectos conjuntamente. Nuestros principales colaboradores han sido empresas muy tecnológicas o bien empresas con central en USA donde las colaboraciones universidad/empresa están muy arraigadas. Es una de las asignaturas que tenemos pendientes, las colaboraciones universidad/empresa y se deberían realizar esfuerzos para superar el desconocimiento mutuo lo que facilitaría las colaboraciones.

Para conseguir la adquisición del instrumental del que actualmente dispone el grupo en sus laboratorios, instrumentos de LC convencional, micro y UHPLC; seis CE; IT/MS; ToF/MS y QToF/MS-MS, además de proyectos con empresas, se han conseguido ayudas en convocatorias especiales del ministerio en el campo proteómico, en especial sobre la eritropoyetina y su detección en el control del dopaje, campo en el que también se han conseguido proyectos internacionales. También se ha contado con ayudas procedentes de la Fundación Mir/Puig a través de la cátedra F. Buscarons. Nuestros trabajos, reflejados en las publicaciones correspondientes, han permitido nuestra participación con éxito en convocatorias de instrumentación, tanto de la propia Universidad de Barcelona como y sobre todo del ministerio.

Otro aspecto que quisiera destacar en mi trayectoria y que considero de gran importancia es mi preocupación por la difusión y divulgación de las investigaciones, aspecto éste que creo haber inculcado a otros miembros del grupo de investigación. Ello me ha llevado a coordinar durante más de tres décadas, como delegado del rector, las actividades de la UB dentro de la Semana de la Ciencia de Cataluña. Así he organizado, entre otras, actividades como las "Exposiciones multimedia de las investigaciones en las universidades", que responden a mi gran preocupación de que la sociedad sea consciente de que nuestras universidades además de ser centros docentes son centros de investigación importantes. Aspecto éste desconocido absolutamente incluso por nuestros propios alumnos y no digamos por el público en general.

Siempre he creído que sería fundamental que la sociedad fuera consciente de que las investigaciones universitarias, como tales, pueden solucionar algunas de sus necesidades, como el control medioambiental, el control de calidad de los alimentos y avances significativos en el campo biomédico. Que realmente se conozca esta realidad puede llevar consigo que se dediquen sin perjuicios mayores recursos a las

investigaciones universitarias, recursos que indudablemente son escasos en la actualidad.

A continuación, comentaré algunas de las investigaciones realizadas por nuestro grupo de Bioanálisis en los últimos años.

PREDICCIÓN DE LA ELUCIÓN CROMATOGRÁFICA Y DE LA MIGRACIÓN ELECTROFORÉTICA DE LOS ANALITOS.

Durante una serie de años nuestras investigaciones se orientaron hacia el desarrollo de modelos de predicción de la elución cromatográfica de los compuestos en función de las características de la fase móvil tales como su polaridad/polarizabilidad y capacidades dadoras yceptoras de puentes de hidrógeno. Así, se establecieron modelos LSER (Linear Solvation Energy Relationships), como el modelo de Reichart que relaciona linealmente el factor de retención de los solutos con el parámetro solvatocrómico E_t que mide la polaridad/polarizabilidad y capacidad dadora de fases móviles hidroorgánicas, Figura 3. Este modelo permite predecir la composición óptima de la fase móvil para la separación de series de principios activos farmacológicos, tales como diuréticos, quinolonas, péptidos, hormonas peptídicas, benzodiazepinas, etc.

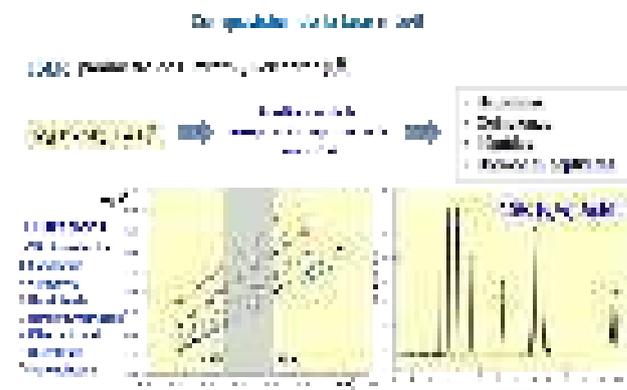


Figura 3. Predicción de la elución cromatográfica de los analitos con el porcentaje de disolvente orgánico

El método de Reichart no da información sobre el pH de la fase móvil óptimo para la separación cromatográfica, parámetro de gran influencia en la elución de los solutos ionizables. En este sentido y puesto que la retención de un soluto ionizable es función de la retención de cada una de las especies presentes en sus equilibrios ácido-base, se pueden obtener ecuaciones específicas para cada compuesto que relacionen el factor de retención con el pH de la fase móvil, como las que se muestran en la Figura 4 que permiten predecir el pH óptimo de separación.

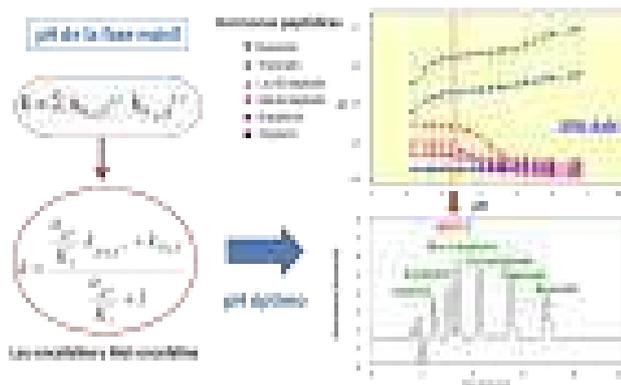


Figura 4. Predicción de la elución cromatográfica con el pH de la mezcla hidroorgánica

Si se combinan las expresiones indicadas en las Figuras 3 y 4, se obtienen expresiones que relacionan simultáneamente la retención cromatográfica con la composición y pH de la fase móvil. En la Figura 5 se muestra la ecuación obtenida para el caso de un ácido monoprótico, caso muy general para sustancias de interés farmacológico [4].



Figura 5. Predicción de la elución cromatográfica con la composición y pH de la fase móvil.

Además de las técnicas cromatográficas, la electroforesis capilar (CE) es la otra gran técnica de separación particularmente atractiva para el análisis de compuestos con grupos ionizables, como péptidos y proteínas en muestras biológicas. Así, llevamos a cabo investigaciones sobre la aplicabilidad de la CE al análisis de series de sustancias de interés farmacológico. De igual manera que para la predicción de la elución cromatográfica, se establecieron modelos de migración electroforética con la finalidad de predecir la movilidad a un determinado pH y seleccionar de forma sencilla y rápida las condiciones óptimas de análisis. En la Figura 6 se muestra la ecuación general que se puede aplicar a cualquier sustancia teniendo en cuenta el número de grupos ionizables y su carga. El ajuste de la ecuación a los datos experimentales es excelente como se observa en la Figura para el caso de los péptidos amiloides. A partir de estas curvas se pueden predecir las mejores condiciones de separación y también se pueden obtener los valores de pKa de las sustancias analizadas.

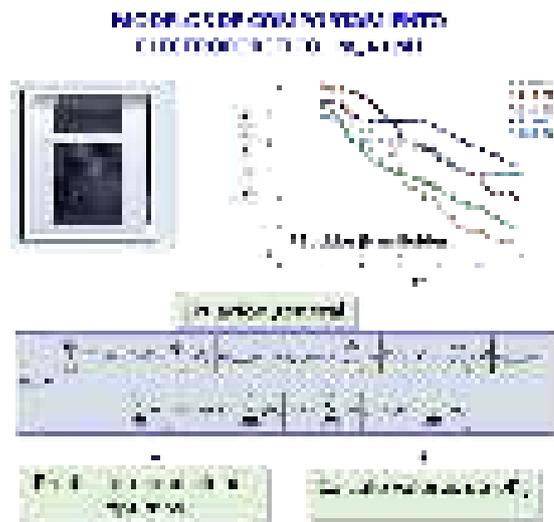


Figura 6. Predicción de la migración electroforética con el pH.

Dependiendo de la complejidad de los compuestos a analizar el ajuste de estas ecuaciones puede necesitar de bastantes puntos experimentales. Sin embargo, si se utilizan los modelos semiempíricos que relacionan la movilidad electroforética (me) con la carga (q) y la masa (M) de la especie, la optimización puede ser mucho más simple, Figura 7. Para los péptidos amiloides, el modelo que proporciona la mejor correlación es el modelo del polímero clásico, en que α toma el valor de 1/2. Si se dispone de los valores adecuados de pKa, se puede calcular la carga a partir de la ecuación de Henderson-Haselbach a cualquier valor de pH y representar las curvas simuladas frente al pH, que como se puede ver en la Figura 7 son muy semejantes a las experimentales y nos permiten encontrar las condiciones óptimas de análisis sin realizar trabajo experimental. En la Figura 7 se muestran los electroferogramas simulados y los experimentales a pH 3.5, demostrándose que el modelo indicado predice bien el comportamiento electroforético de los solutos [5].

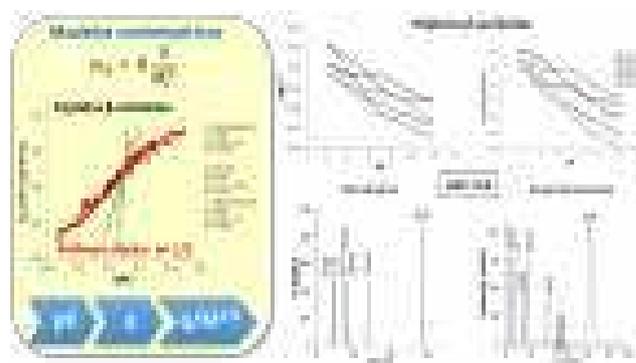


Figura 7. Predicción de la movilidad electroforética con la carga y masa de los analitos y con el pH. Predicción del pH óptimo para la separación electroforética.

DESARROLLO DE MÉTODOS DE PRECONCENTRACIÓN POR EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA EN LÍNEA CON LA ELECTROFORESIS CAPILAR, SPE-CE-UV Y SPE-CE-MS.

La principal dificultad en la determinación de compuestos bioactivos deriva de la baja concentración a la que se encuentran en fluidos biológicos y de la complejidad que presentan en muestras biológicas. Dado que todos estos compuestos bioactivos, como los biomarcadores peptídicos y proteicos, se suelen encontrar a concentraciones muy bajas en muestras biológicas complejas, la disminución de los límites de detección ha constituido uno de los ejes centrales de nuestro grupo de trabajo. Así, se ha trabajado en una línea de investigación centrada en el desarrollo de dispositivos y metodologías analíticas para el acoplamiento en línea de la extracción en fase sólida (SPE) con la electroforesis capilar, con el objetivo de preconcentrar y purificar los analitos de interés. Esta metodología consiste en insertar cerca de la entrada del capilar de separación electroforética un preconcentrador empacutado con partículas de sorbentes adecuados, Figura 8.

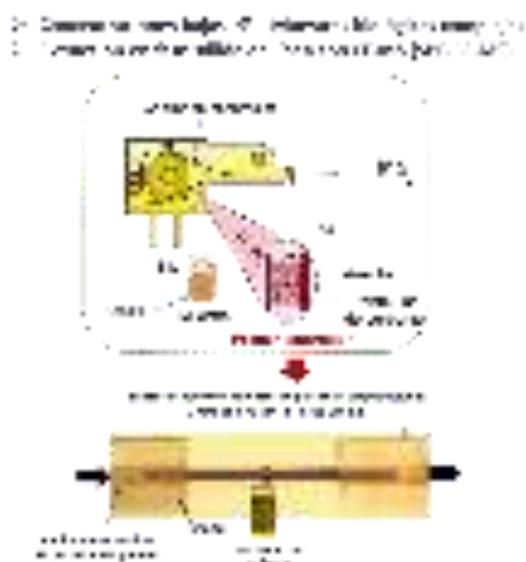


Figura 8. Desarrollo de métodos de preconcentración por extracción en fase sólida en línea con la electroforesis capilar. SPE-CE-UV y SPE-CE-MS.

Nuestro grupo de trabajo aplicó estas metodologías de SPE-CE-MS inicialmente al análisis de neuropéptidos en muestras de plasma, utilizando sorbentes C18. Para el análisis de una mezcla de patrones de neuropéptidos se consiguió una mejora de tres órdenes de magnitud en los límites de detección respecto al análisis por CE-MS, Figura 9. En el análisis de muestras de plasma fue necesario un pretratamiento sencillo de la muestra para eliminar las proteínas mayoritarias y no sobrecargar el preconcentrador, Figura 9.

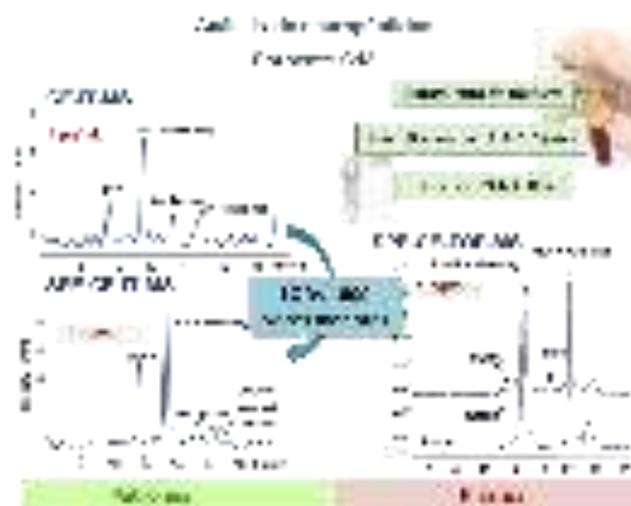


Figura 9. Análisis de neuropéptidos por SPE-CE-MS

A lo largo de los años, hemos establecido metodologías de extracción en fase sólida en línea con la electroforesis capilar-masas que utilizan diferentes sorbentes con mayor selectividad hacia diferentes tipos de analitos, como los sorbentes de inmunofinidad, con anticuerpos intactos o fragmentados inmovilizados sobre un soporte sólido, Figura 10 [6][7]. Recientemente hemos utilizado SiC como sorbente para el análisis y caracterización de las modificaciones post-transcripcionales de microRNAs en muestras de leucemia linfocítica. Los factores de preconcentración pueden llegar a las 10000 veces.



Figura 10. Sorbentes utilizados en SPE-CE-MS

Es de resaltar que nuestro grupo de investigación constituye un referente de la utilización de las técnicas de preconcentración en línea con la CE-MS, línea de trabajo que ha dado excelentes resultados en el análisis de principios activos peptídicos, proteicos y glicoproteicos. Recientemente el uso de aptámeros como ligandos de afinidad abre nuevas perspectivas en este campo por sus ventajas frente a los anticuerpos, como su mayor robustez y menor precio, línea ésta en la que nuestro grupo trata de profundizar en la actualidad.

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PÉPTIDOS, PROTEÍNAS, GLICOPROTEÍNAS Y GLICOPÉPTIDOS.

Una de las principales líneas de investigación de nuestro grupo de Bioanálisis se orienta al desarrollo de métodos de detección y caracterización de péptidos, proteínas y las proteoformas que se generan por modificaciones co- y post-traduccionales de las proteínas. Entre éstas destacan las glicoproteínas, que son proteínas glicosiladas que presentan numerosas glicoformas y que destacan por su complejidad estructural y relevancia biológica, Figura 11.



Figura 11. Péptidos, proteínas, glicoproteínas y glicopéptidos

Una de las glicoproteínas más importantes en el campo biomédico por sus numerosas aplicaciones y elevado volumen de muestras es la eritropoyetina (EPO), que también es utilizada fraudulentamente como agente dopante. Esta glicoproteína, Figura 12, se sintetiza con metodología de ADN recombinante y como en el caso de otros biofármacos requiere de un control de calidad. En este sentido, comprobamos que la CE conseguía separar de una manera rápida y sencilla diferentes glicoformas de la EPO.

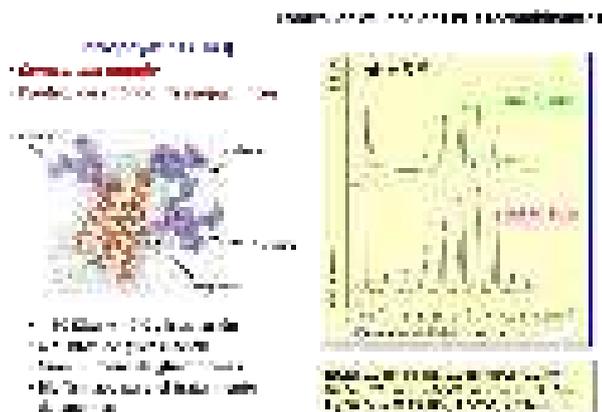


Figura 12. Separación de glicoformas de la eritropoyetina por CE

En la Figura 12 se pueden ver los electroferogramas de dos EPOs recombinantes producidas por diferentes laboratorios mediante procesos ligeramente diferentes, por lo que presentan distintos perfiles de glicosilación. A pesar de la buena separación, el electrolito utilizado en estos casos es incompatible con la detección por MS y por tanto la información estructural que se puede

obtener es limitada. Esta información estructural es importante, entre otras cosas, para el control del dopaje, ya que la EPO humana endógena se diferencia de la recombinante (rHuEPO) por sus distintas glicoformas.

Así, surgió la necesidad de desarrollar métodos de detección y caracterización de EPO compatibles con la MS, para ello fue necesario llevar a cabo el acoplamiento CE-MS. Los trabajos sobre el acoplamiento CE-MS, mucho más complejo que el LC-MS, fueron un verdadero reto para nuestro grupo de investigación que se superó con un primer trabajo en el que se llevó a cabo la separación de una serie de hormonas peptídicas de interés terapéutico. Se compararon las prestaciones de una interfase comercial con líquido auxiliar y la interfase sheathless, sin líquido auxiliar, utilizando puntas recubiertas de polvo de grafito. La interfase sheath flow comercial mostró buena reproducibilidad, estabilidad y mayor versatilidad por lo que fue la interfase escogida para el resto de trabajos [8].

Cabe destacar que nuestro grupo de trabajo ha sido pionero en el uso del acoplamiento CE-MS, constituyendo una referencia a nivel nacional en la aplicación de esta técnica en el área del Bioanálisis y a lo largo de los años, ha desarrollado un elevado número de metodologías de análisis de péptidos, proteínas y glicoproteínas en muestras biológicas y alimentarias [9].

Uno de nuestros trabajos pioneros en este campo se desarrolló dentro de un proyecto coordinado, con ayuda concedida por el COI, en el que participamos junto con el IMIM de Barcelona, la Universidad de Granada, el instituto de Química Orgánica del CSIC de Madrid y la empresa Johnson and Johnson de USA, Figura 13.

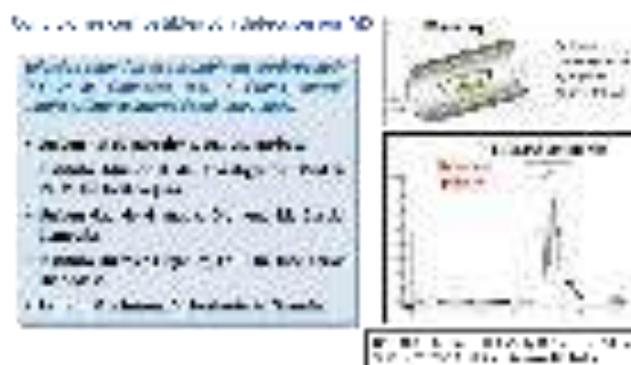


Figura 13. Eritropoyetina recombinante humana por CE-MS

Se estableció una metodología de análisis de la rHuEPO por CE-MS, utilizando un recubrimiento de polibren y un electrolito de separación de ácido acético, compatible con la detección por espectrometría de masas. Los trabajos realizados dieron lugar a una publicación en Analytical Chemistry que ha tenido una repercusión importante [10].

Una vez establecido el acoplamiento CE-MS, se continuaron los estudios para la caracterización de EPO

utilizando capilares recubiertos y electrolitos compatibles con la detección por MS. En estas condiciones se obtuvieron los electroferogramas de iones que se pueden ver en la Figura 14 para el análisis por CE-MS de eritropoyetina [11][12].

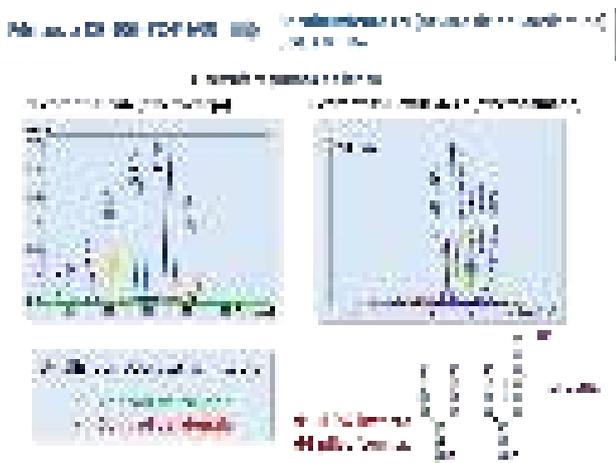


Figura 14. Caracterización por CE-MS de las glicofomas de la rHuEPO intacta

En la primera Figura, se observa el electroferograma de las glicofomas que difieren en su número de ácidos siálicos y por tanto son glicofomas que tienen diferente número de cargas negativas. En la segunda Figura se puede observar la separación de glicofomas que contienen el mismo número de ácidos siálicos, pero que difieren en la longitud de la cadena. Por tanto, el método desarrollado permite la separación de glicofomas que tienen la misma carga, pero difieren sólo en 365 Da, en una glicoproteína que pesa alrededor de 30.000 Da. Se pudieron identificar un total de 64 glicofomas correspondientes a diferencias en los ácidos siálicos y en las cadenas de los glicanos. Además se pudieron identificar muchas más glicofomas correspondientes a acetilaciones y oxidaciones principalmente en los ácidos siálicos, hasta completar unas 200 glicofomas [11][12].

Así, mediante el análisis de la glicoproteína intacta se pueden identificar y cuantificar diferentes glicofomas, lo que tiene aplicaciones claras en bioanálisis. Ahora bien, la limitación en la sensibilidad debido al elevado peso molecular y a la baja eficacia de ionización, limitan la aplicabilidad del método para, por ejemplo, el control del dopaje.

Con el objetivo de solucionar estas limitaciones se abordó el estudio de los glicopéptidos de la Eritropoyetina. Para ello se llevó a cabo la digestión enzimática de la glicoproteína con tripsina, de manera que se obtuvo una mezcla de péptidos y glicopéptidos, entre ellos el O126 con el glicano unido a la serina 126 y el N83 con el glicano unido a la asparagina en posición 83 y un glicopeptido de mayor tamaño con dos puntos de N glicosilación que fue necesario fragmentar mediante el uso de otra enzima, GluC (Endoproteínasa Glu-C) [13].

En la Figura 15 se muestra, como ejemplo, el electroferograma de iones de las formas tetrantenarias del glicopéptido, que se utilizaron para optimizar las condiciones de separación y detección por MS. En la tabla se indican todas las glicofomas detectadas para dicho glicopéptido N83, así como las glicofomas detectadas en total, para los 4 glicopéptidos de la eritropoyetina.



Figura 15. Caracterización por CE-MS de las glicofomas de los glicopéptidos de la rHuEPO

En el caso del O-glicopéptido [14], en la tabla de la Figura 16 se pueden ver las 8 glicofomas detectadas y en las figuras, las glicofomas mayoritarias que se diferencian en el número de ácidos siálicos. Aunque el ácido siálico más común es el N-acetilneuramínico, en algunas glicofomas se detectó el ácido N-glicolilneuramínico. Las formas que contienen este ácido se encuentran a una concentración muy baja, constituyendo un 2% del contenido total en ácido siálico. El N-glicolil no existe en la EPO endógena humana, se encuentra en las EPOs recombinantes porque han sido expresadas en células no humanas, CHO, ovario de hamster chino. Este rasgo diferencial puede resultar muy útil en el control del dopaje, puesto que, si se detecta alguna glicofoma que contenga glicolil, supone la confirmación inequívoca del consumo de EPO recombinante.

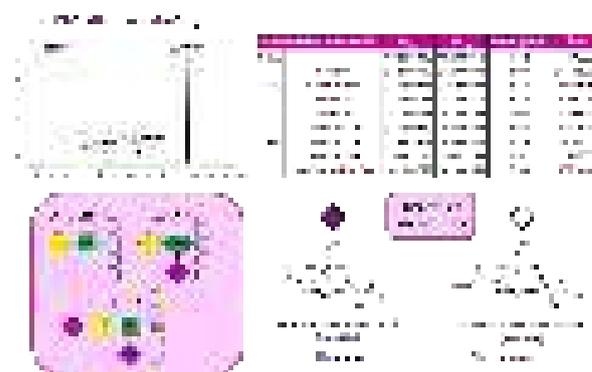


Figura 16. Caracterización estructural por CE-MS de las glicofomas del O-glicopéptido de la rHuEPO

Ahora bien, el problema de la detección de estos glicopéptidos con N-glicolilneuramínico, es su baja concentración. En colaboración con el Dr. J. A. Pascual del IMIM se estableció un método de análisis de elevada sensibilidad, mediante nanoLC-MS/MS utilizando un LTQ-Orbitrap como analizador. En la Figura 17 se pueden ver los cromatogramas de iones obtenidos por el

método optimizado para las glicofomas escogidas, la exógena o recombinante, con un glicolil y un acetilneuramínico, y la endógena. Como se puede ver, se consigue la detección y separación de ambas formas, pero los límites de detección no fueron todavía lo suficientemente bajos para poder ser aplicados en el control del dopaje. Esto, unido a ciertos problemas de matriz obliga a plantear estrategias de purificación y preconcentración. Estos estudios fueron posibles gracias a dos proyectos internacionales concedidos por la WADA. En la Figura 17 se resumen los proyectos y ayudas concedidos al grupo de investigación de Bioanálisis, centrados principalmente en la caracterización de eritropoyetina.



Figura 17. Caracterización de glicofomas de la rHUEPO para el control del dopaje

Por otro lado, la neuroEPO, es un análogo de la EPO que presenta su misma secuencia peptídica y puntos de glicosilación, pero tiene un menor contenido en ácidos siálicos. Al igual que la EPO, presenta un efecto neuroprotector, pero, a diferencia de ésta, no estimula la eritropoyesis, por lo que se perfila como un biofármaco prometedor en el tratamiento de trastornos neurodegenerativos [3].

En este sentido, hemos establecido recientemente un convenio entre la UB y el Centro de inmunología molecular (CIM) de la Habana, Cuba, para desarrollar métodos de análisis que permitan caracterizar la neuroEPO, puesto que no existe información detallada sobre su estructura y su patrón de glicosilación.

Debido al menor contenido en ácidos siálicos de la neuroEPO, el control de calidad utilizado para la EPO no resulta útil, por lo que se desarrolló una metodología de separación de las glicofomas de la glicoproteína intacta por CE, utilizando un electrolito de separación de malonato de sodio a pH 6, que permitió separar 6 glicofomas de la NeuroEPO. En el análisis de los glicopéptidos de la NeuroEPO, se ha observado, en general, una disminución de las glicofomas más ramificadas y sialiladas. También se han detectado en la neuroEPO algunas glicofomas con bajo contenido en ácido siálico no detectadas en la eritropoyetina recombinante.

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE BIOMARCADORES.

Sin duda, el campo de trabajo más relevante y de mayor actualidad a lo largo de mi actividad investigadora, ha sido la caracterización e identificación de biomarcadores de procesos patológicos, constituidos por péptidos, proteínas, glicopéptidos y glicoproteínas, metabolitos y microRNAs, que se asocian a la presencia de una enfermedad concreta. Su detección y cuantificación en muestras biológicas es de vital importancia debido a los evidentes beneficios derivados de un diagnóstico precoz mediante técnicas no invasivas, del seguimiento continuo de la evolución de la enfermedad y de la selección del tratamiento más adecuado, Figura 18. Los cambios que dichos biomarcadores pueden experimentar al desarrollarse una enfermedad van desde el simple aumento o disminución de la concentración total hasta cambios en la expresión de una proteoforma concreta o del patrón de proteoformas, o procesos de disociación y agregación, Figura 18.



Figura 18. Identificación y caracterización de biomarcadores.

A lo largo de los años hemos estudiado numerosos compuestos biomarcadores, relacionados con diferentes patologías, que se resumen en esta tabla de la Figura 19. La mayoría de los trabajos se han llevado a cabo en colaboración con investigadores de prestigio dentro del área correspondiente. En muchos casos se trata de enfermedades neurodegenerativas bien conocidas, como Fibromialgia, Alzheimer, Parkinson o diversos tipos de cáncer. Otras son enfermedades raras como los defectos congénitos de la glicosilación (CDGs) [15], la enfermedad de Huntington [9] o la esclerosis lateral amiotrófica [16], que afectan a un porcentaje muy bajo de la población.

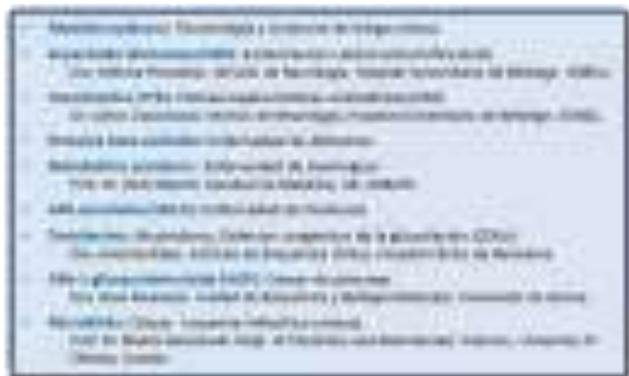


Figura 19. Biomarcadores estudiados y colaboraciones.

El estudio de compuestos biomarcadores se ha llevado a cabo empleando diferentes técnicas analíticas, fundamentalmente técnicas microseparativas y espectrometría de masas. Se han utilizado diferentes aproximaciones, como el análisis dirigido a un biomarcador concreto o *targeted*, o la comparación de perfiles o improntas características mediante análisis no dirigido o *global profiling*. En el análisis dirigido, se ha trabajado con la proteína intacta o con fragmentos obtenidos mediante hidrólisis enzimática. Los datos obtenidos de las diferentes técnicas y aproximaciones se han analizado utilizando técnicas quimiométricas de análisis multivariante de datos.

Uno de los estudios en que se abordó el análisis dirigido de la proteína intacta o aproximación top-down, fue el análisis de la transtiretina (TTR) como biomarcadora de polineuropatía familiar amiloidótica (FAP-1), Figura 20 [16]. Las enfermedades amiloidóticas, como el Parkinson o el Alzheimer, son enfermedades degenerativas que se caracterizan por la deposición de agregados insolubles de proteínas en el cerebro y otros órganos. En el caso de la FAP-1 la enfermedad se origina por la mutación en el gen de la TTR, de modo que una Valina en posición 30 se substituye por una metionina, Figura 20. En nuestros trabajos se caracterizó la TTR mediante CE-MS.

Una vez optimizado y validado el método de análisis con patrones, se procedió a analizar muestras de suero humano de pacientes de FAP-I en diferentes estadios de evolución y controles sanos. Para llevar a cabo el análisis de las muestras de suero, se optimizó un procedimiento de inmunoprecipitación basado en la utilización de partículas magnéticas con un anticuerpo policlonal unido covalentemente a las mismas [17]. En la Figura 20 se muestran los espectros de masas deconvolucionados de la TTR de un control sano y de un paciente de FAP-I asintomático, en el que se detectaron las proteoformas con la mutación responsable de la enfermedad. Estas proteoformas mutantes se detectaron en todos los pacientes de FAP-I, pero es especialmente importante su detección en estadios tempranos como es el caso del paciente asintomático.

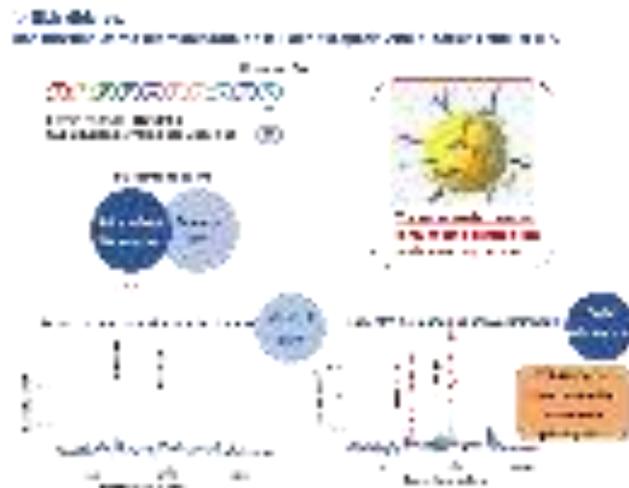


Figura 20. Identificación y caracterización de la transtiretina como biomarcador de FAP-1 por análisis dirigido de la proteína intacta.

Otra aproximación llevada a cabo en el estudio de biomarcadores, fue el análisis no dirigido de metabolitos en sangre o fluidos biológicos, aplicado a la enfermedad de Huntington, que es una enfermedad neurodegenerativa hereditaria para la que en la actualidad no existen tratamientos eficaces [9]. Para llevar a cabo el estudio, se analizaron muestras de plasma de ratones sanos y de ratones modificados genéticamente para desarrollar esta enfermedad, con 8, 12 y 30 semanas de edad.

En la Figura 21 se muestran los electroferogramas totales obtenidos para los ratones de 12 semanas. Como se puede ver, no se observan diferencias entre los perfiles sanos y patológicos, por lo que el tratamiento de datos se abordó llevando a cabo análisis multivariante de datos con la aplicación de MCR-ALS (resolución multivariante de curvas por mínimos cuadrados alternados) a las matrices obtenidas previamente por CE-MS. De este modo, se pudieron detectar 74 metabolitos (features, relaciones m/z), que se cuantificaron en todas las muestras a partir de los electroferogramas de iones.

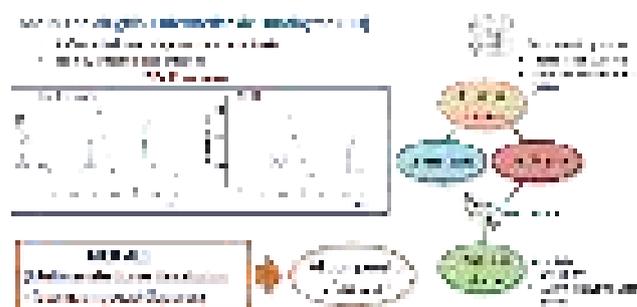


Figura 21. Identificación de biomarcadores por análisis no dirigido de metabolitos en sangre aplicado a la enfermedad neurodegenerativa de Huntington

Una vez cuantificados estos metabolitos, se construyeron diferentes modelos de PLS-DA con el objetivo de diferenciar entre: muestras control y patológicas, y también entre muestras patológicas a diferentes semanas de edad, para evaluar la progresión de la enfermedad [7][9]. Tal y como se puede observar en la Figura 22, los modelos de PLS-DA permitieron discriminar entre los diferentes grupos de muestras. A partir de los gráficos de VIP, se seleccionaron los 33 metabolitos que presentaban VIPs superiores a 1, que son los que más influyen en la diferenciación. Seguidamente, se procedió a su identificación empleando bases de datos en línea para la investigación metabolómica. Esta búsqueda permitió proponer una identidad para 29 de los 33 metabolitos anteriores. Finalmente, se procedió a investigar las posibles rutas metabólicas asociadas a dichos metabolitos, pudiéndose encontrar 13 metabolitos asociados a rutas metabólicas, la mayor parte de ellos relacionados con mecanismos de señalización celular.

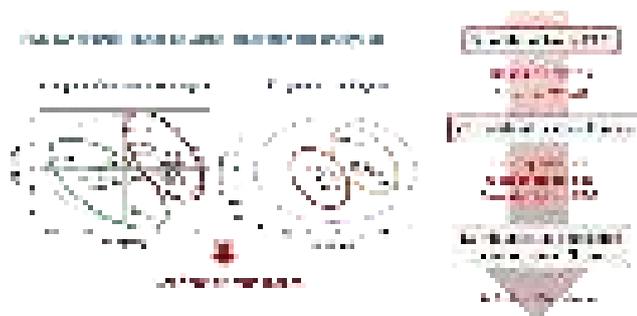


Figura 22. Identificación de biomarcadores metabólicos de la enfermedad de Huntington por análisis de muestras control y patológicas a diferentes estadios de la enfermedad

En este sentido, el método desarrollado permitió proponer posibles biomarcadores de Huntington, que podrían ser de gran utilidad para diagnosticar y predecir un inicio temprano de esta enfermedad, así como para proponer nuevas dianas terapéuticas que detengan su progresión.

En la actualidad las investigaciones de nuestro grupo de Bioanálisis se orientan principalmente a profundizar en los estudios de biomarcadores y en el uso de aptámeros como sorbentes en SPE-CE-MS/MS, así como a innovar en el desarrollo y la aplicación de técnicas acopladas a la espectrometría de masas, para resolver problemas analíticos complejos en proteómica y metabolómica relacionados con la biomedicina, la industria farmacéutica y la industria agroalimentaria.

REFERENCIAS

- [1] Blanco, G., Junza, A., Segarra, D., Barbosa, J., Barrón, D., *Chemosphere* 2016, 144, 1536–1543.
- [2] Morales-Gutiérrez, F. J., Barbosa, J., Barrón, D., *Food Chem.* 2015, 172, 30–39.
- [3] Giménez, E., Pont, L., Barbosa, J., Benavente, F., Sanz-Nebot, V., *Actual. Analítica. Boletín la Soc. Española Química Analítica* 2021, 76, 23–26.
- [4] Ballesteros, O., Toro, I., Sanz-Nebot, V., Navalón, A., Vílchez, J. L., Barbosa, J., *Chromatographia* 2002, 56, 413–421.
- [5] Però-Gascón, R., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *J. Chromatogr. A* 2017, 1508, 148–157.
- [6] Medina-Casanellas, S., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Anal. Chim. Acta* 2013, 789, 91–99.
- [7] Pont, L., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Benavente, F., in: Ramautar, R., Ed., *Capillary Electrophoresis-Mass Spectrometry for Metabolomics*, Royal Society of Chemistry, 2018, pp. 113–133.
- [8] Sanz-Nebot, V., Balaguer, E., Benavente, F., Barbosa, J., *Electrophoresis* 2005, 26, 1457–1465.
- [9] Pont, L., Benavente, F., Jaumot, J., Tauler, R., Alberch, J., Ginés, S., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* 2016, 37, 795–808.
- [10] Sanz-Nebot, V., Benavente, F., Vallverdú, A., Guzman, N. A., Barbosa, J., *Anal. Chem.* 2003, 75, 5220–5229.
- [11] Barroso, A., Giménez, E., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* 2016, 37, 987–997.
- [12] Balaguer, E., Demelbauer, U., Pelzing, M., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., Neusüß, C., *Electrophoresis* 2006, 27, 2638–2650.
- [13] Giménez, E., Ramos-Hernan, R., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Anal. Chim. Acta* 2012, 709, 81–90.
- [14] Mancera-Arteu, M., Giménez, E., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *J. Proteome Res.* 2017, 16, 4166–4176.
- [15] Barroso, A., Giménez, E., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Talanta* 2016, 160, 614–623.
- [16] Pont, L., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* 2015, 36, 1265–1273.
- [17] Però-Gascón, R., Pont, L., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., *Electrophoresis* 2016, 37, 1220–1231.