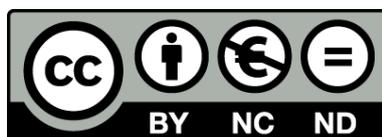




UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Optimización y estandarización de un protocolo para el estudio de perfiles peptídicos séricos mediante la tecnología Maldi-Tof MS. Aplicación en la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico precoz

Naira Rico Santana



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial – SenseObraDerivada 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial – SinObraDerivada 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs 3.0. Spain License.**



Facultad de Medicina
Departamento de Ciencias Fisiológicas I

TESIS DOCTORAL

**OPTIMIZACIÓN Y ESTANDARIZACIÓN DE UN PROTOCOLO PARA
EL ESTUDIO DE PERFILES PEPTÍDICOS SÉRICOS MEDIANTE LA
TECNOLOGÍA MALDI-TOF MS. APLICACIÓN EN LA BÚSQUEDA DE
NUEVOS BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO PRECOZ.**

NAIRA RICO SANTANA

Director:
Dr. Mario Ferrer Navarro

Tutor:
Dr. Wladimiro Jiménez Povedano

Barcelona, Junio 2015

INTRODUCCIÓN	1
1.- PROTEÓMICA.....	3
1.1.- Definición.....	3
1.1.1.- Proteoma.....	3
1.1.2.- Proteómica	3
1.1.3.- La proteómica clínica.....	4
1.2.- Tipos de estudios proteómicos	6
1.2.1.- Estudio proteómico de expresión	6
1.2.2.- Estudio proteómico estructural	7
1.2.3.- Estudio proteómico de interacción.....	7
2.- TECNOLOGÍA.....	8
2.1.- Espectrometría de masas	8
2.1.1.- Muestra	9
2.1.2.-Fuente de Ionización	9
2.1.3.-Analizador de masas	10
2.1.4.- Detector.....	10
2.1.5.- Integrador.....	11
2.2.- Espectrometría de masas por MALDI-TOF	11
2.2.1.- Breve introducción histórica	11
2.2.2.- Partes de un MALD.....	12
2.2.3.1.- La huella peptídica o “ <i>peptide mass fingerprinting</i> ”:).	18
3.- BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO.....	19
3.1.- Definición.....	19
3.2.- Características de un biomarcador ideal.....	20
4.- ESTUDIO DE PERFILES PEPTÍDICOS SÉRICOS MEDIANTE MALDI-TOF	21
4.1.- Pretratamiento de la muestra.....	21
4.1.1.- Depleción de proteínas abundantes	23
4.1.2.- Fraccionamiento.....	25
4.2.- Limitaciones.....	26
4.2.1.- Limitaciones preanalíticas	27
4.2.1.1.- Tipo de muestra	27
4.2.1.2.- Tipo de tubo	28
4.2.1.3.- Tiempo de coagulación y temperatura	28
4.2.1.4.- Almacenamiento de la muestra	29
4.2.1.4.1.- Conservación a 4°C.....	30
4.2.1.4.2.- Conservación a TA	30
4.2.1.4.3.- Conservación a – 80°C y -20°C.....	30
4.2.1.5.- Ciclos de congelación/descongelación.....	31
4.2.2.- Limitaciones analíticas	31
4.2.3.- Limitaciones postanalíticas	36
5.- APLICACIÓN CLÍNICA DE LA PROTEÓMICA.....	37
5.1.- Cáncer de Páncreas	37
OBJETIVOS	43

ACN: acetonitrilo

AUC: área bajo la curva

CEA: antígeno carcinoembrionario

CA 19.9: antígeno carbohidrato 19.9

CS: controles sanos

CV: coeficiente de variación

Cu: cobre

Da: Daltons

2,5-DHB: ácido 2,5-di-hidroxi-benzóico

2,6-DHAP: 2,6 di-hidroxiacetofenona

E: especificidad

E.N.A.: enfermedad neurológica aguda

ESI: electrospray o pulverización suave.

FT-ICR: resonancia ión ciclotrón con transformada de Fourier

HCCA: ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

HUPO: Human Proteome Organization

I.Iq. : ictus isquémico

KE: energía cinética

M/Z: masa/carga

MB-IMAC: partículas magnéticas funcionalizadas con cromatografía de intercambio iónico por metal inmovilizado

MS: espectrometría de masas

MALDI: matrix assisted laser desorption ionization o desorción/ionización mediante láser inducida por matriz.

ABREVIATURAS

MARS: multiple affinity removal system

MESH: Medical Subject Heading

NIH: National Institute of Health

NMR: nuclear magnetic resonance o resonancia magnética nuclear

OMS: Organización Mundial de la Salud

PBM: proteínas de bajo peso molecular

PM: partículas magnéticas

RM: resonancia magnética

S: sensibilidad

SCH: suero control humano

t: tiempo

T.A: temperatura ambiente

TC: tomografía computerizada

TCADB: tampón citrato de amonio dibásico

TFA: ácido trifluoroacético

TOF: tiempo de vuelo o time of flight

tPA: tratamiento trombolítico con activador del plasminógeno

TQ: triple quadropole o triple quadropolo.

I: intensidad relativa

IT: ion trap o trampa iónica

v: velocidad

V: potencial

WCX: weak cation-exchange o intercambio catiónico débil.

WS: solución de lavado

A mi familia, por aguantar mis ausencias y esperarme con una sonrisa.

A mi madre, por ayudarme tanto.

A José Luis Bedini por confiar en mi y darme la oportunidad de trabajar junto a él en el Laboratorio Core.

A Wladimiro Jiménez, por “obligarme” a escribir esta tesis, me diste el empujón necesario.

A Joan Martí Fábregas, siempre te estaré agradecida por todo tu apoyo y comprensión.

A Edgar Zapico por enseñarme lo que sé de proteómica y animarme a empezar este proyecto.

A mi director de tesis Mario Ferrer, el azar quiso que nos conociéramos y eso marcó un antes y un después en esta tesis. No me canso de decírtelo, gracias por aceptar ser mi director y ayudarme tanto.

A mis compañeras y amigas Anna, Gabriela y Laura. Me acompañasteis y animasteis durante todo este tiempo, sin vosotras este proceso hubiera sido más duro. Gabri, fuiste mi impulsora, gracias.

1.

INTRODUCCIÓN

1.- PROTEÓMICA

1.1.- Definición

La genómica ha proporcionado una gran cantidad de información acerca de los genomas de un gran número de especies. Sin embargo, aún se desconoce la función biológica de la mayoría de las proteínas codificadas por los genes contenidos en dichos genomas. Este hecho, junto con la mejora de metodologías de separación como la cromatografía líquida o la electroforesis bidimensional, en combinación con la espectrometría de masas (MS), fueron los que impulsaron la aparición de la proteómica.

1.1.1.- Proteoma: La palabra “proteoma” es la fusión de **proteína** y **genoma**, y fue acuñada por Marc Wilkins en 1994, mientras llevaba a cabo su doctorado, que lo definió como el conjunto de proteínas expresadas por el genoma de un organismo (1)

1.1.2.- Proteómica: El término proteómica fue acuñado en 1997 como una analogía con la genómica, el estudio de los genomas, por lo que la proteómica es el estudio del proteoma, es decir, el conjunto de todas las proteínas presentes en una célula, un organismo, compartimento subcelular, o un medio biológico en un momento determinado y bajo unas condiciones concretas (2). Las células expresan varios miles de proteínas diferentes y cada una de ellas pueden experimentar numerosas modificaciones post-traduccionales dinámicas, como pueden ser eventos de proteólisis, fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, y un largo etcétera, en respuesta a diferentes estados metabólicos y a microambientes cambiantes, lo cual

incrementa de manera significativa el número de proteínas presentes. Las proteínas también pueden interactuar para formar complejos con otras macromoléculas; estas interacciones varían en función del estado fisiológico. Por lo tanto el proteoma es una imagen dinámica.

En general, las enfermedades no producen alteraciones de una única proteína sino de muchas proteínas celulares y extracelulares. Por esta razón, el estudio de todas ellas en su conjunto, ante una situación patológica específica, puede servir para encontrar biomarcadores que puedan ser usados como una herramienta para el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades.

1.1.3.- La proteómica clínica es la aplicación de las técnicas y las estrategias que ofrece la proteómica a la medicina, intentando dar respuesta a un problema clínico específico (3,4). Los objetivos de la proteómica clínica pueden ser:

- *De diagnóstico:* para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico precoz o de mayor especificidad.
- *De tratamiento:* para la identificación de nuevas dianas terapéuticas.
- *De pronóstico:* para la búsqueda de biomarcadores que evolucionen con la enfermedad.

La proteómica clínica es un área multidisciplinar que debe implicar a profesionales muy diversos, tal como se refiere a continuación:

- *Los facultativos clínicos:* son los que identificarán los problemas clínicos y evaluarán, conjuntamente con los investigadores, si los hallazgos que se

pueden encontrar aplicando las metodologías que ofrece la proteómica podrían suponer una ventaja ante los métodos de referencia actuales.

- *Los investigadores:* son los que conocen la tecnología y los que pueden dar una interpretación desde el punto de vista bioquímico/molecular a los hallazgos obtenidos.
- *Los bioestadísticos:* la proteómica proporciona cantidades muy grandes de datos que deben ser tratados estadísticamente para extraer la información relevante. Por esta razón, los bioestadísticos tienen un papel importante en la proteómica clínica.

Además de los profesionales altamente especializados que requiere la proteómica clínica, en el diseño de cualquier estudio de proteómica clínica hay una serie de puntos clave que deben ser cuidadosamente tenidos en cuenta (3):

- Implicar a los facultativos clínicos para que sean ellos quienes seleccionen los pacientes y controles más adecuados.
- Comparar no sólo las muestras de pacientes que presentan la enfermedad de estudio frente a las muestras de individuos sanos, sino también con las muestras procedentes de pacientes que presenten una clínica, bioquímica o perfil metabólico semejante a nuestro grupo de estudio. De esta forma aseguraremos la especificidad de los biomarcadores.
- Seleccionar el mejor espécimen para el estudio clínico y diseñar un protocolo de recogida y almacenamiento adecuado que asegure la correcta preservación de las muestras.

- Separar la fase de descubrimiento de la fase de validación. Es decir, que los hallazgos encontrados en la primera fase de la investigación, deben ser validados utilizando muestras diferentes a las utilizadas en la fase de descubrimiento. De esta forma se evitan posibles sesgos.
- Realizar un control de calidad interno para asegurar la reproducibilidad de los resultados.
- Comparar los resultados obtenidos con la prueba o método “*gold standard*” para valorar la sensibilidad, especificidad y coste-efectividad.
- Diseñar protocolos estandarizados para las fases preanalítica, analítica y postanalítica que permitan optimizar y mejorar la reproducibilidad de los resultados.
- Intentar automatizar al máximo el procesamiento de las muestras para mejorar la reproducibilidad y el rendimiento.

1.2.- Tipos de estudios proteómicos

De una forma simplificada, podemos hablar de tres tipos de estudio proteómico. Son los siguientes:

1.2.1.- Estudio proteómico de expresión: Es el análisis de expresión de proteínas a gran escala. El principal objetivo es identificar el mayor número de proteínas presentes en una muestra particular. También incluye la identificación de los componentes del proteoma que sufren alteraciones en sus niveles de expresión a consecuencia de alteraciones fisiopatológicas o inducidas por agentes externos cuando se estudian dos

tipos de muestras, por ejemplo: muestra tratada versus muestra no tratada, o muestra de enfermedad versus muestra sana. En este caso estaríamos hablando de un estudio proteómico comparativo de expresión. En este tipo de estudios podemos identificar proteínas con el objetivo de:

- Caracterizar mecanismos moleculares.
- Identificar nuevas dianas terapéuticas.
- Identificar biomarcadores diagnósticos.

Las metodologías más comúnmente utilizadas para llevar a cabo este tipo de experimentos son: la electroforesis bidimensional con la posterior identificación de las proteínas mediante espectrometría de masas o “*mass spectrometry*” (MS), generalmente del tipo MALDI-TOF y la cromatografía líquida, acoplada a algún sistema de MS con fuente de ionización del tipo electrospray.

1.2.2.- Estudio proteómico estructural: Es el análisis de la estructura de proteínas a gran escala. Compara estructuras proteicas y ayuda a definir funciones de nuevos genes identificados. El análisis estructural ayuda a entender la interacción entre drogas y proteínas, así como mostrar el lugar de interacción entre proteínas. En este tipo de estudios se utilizan tecnologías como la cristalografía de rayos X y la resonancia magnética nuclear o “*nuclear magnetic resonance*” (NMR).

1.2.3.- Estudio proteómico de interacción: Es el análisis a gran escala de las interacciones entre proteínas. La caracterización de interacciones proteína-proteína ayuda a determinar la función de las proteínas así como determinar de qué forma se

ensamblan en grandes complejos proteicos. Las metodologías más frecuentemente utilizadas son la purificación por afinidad, MS y el sistema de levadura de dobles híbridos (5).

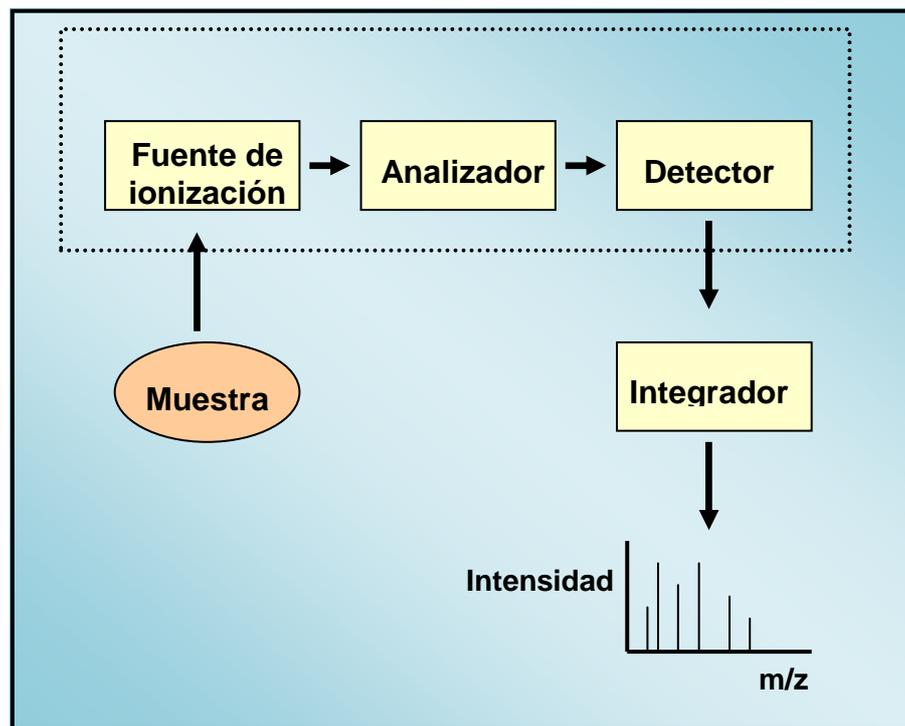
2.- TECNOLOGÍA

2.1.- Espectrometría de masas

La definición de un espectrómetro de masas puede parecer, *a priori*, simple: es un instrumento que puede ionizar una muestra y medir la relación masa/carga de los iones resultantes. La versatilidad de esta función ha permitido que llegue a ser una herramienta vital en un amplio rango de disciplinas, incluida la investigación biomédica. La versatilidad de la MS se debe a que es capaz de obtener información cualitativa y cuantitativa de muestras tanto inorgánicas como orgánicas. Las muestras pueden ser analizadas tanto en forma de gas, líquido o sólido. Otra de las virtudes es el amplio rango dinámico que permite el análisis de masas que va desde unos pocos átomos (algunos Daltons, Da.) hasta proteínas de gran masa (sobre los 300 Kilodaltons, KDa) (5).

En un espectrómetro de masas, en general, podemos diferenciar cuatro partes: una fuente de ionización, un analizador, un detector y un sistema de integración. El esquema de las partes que constituyen un espectrómetro de masas se representa en la figura 1.

Figura 1: Esquema de las partes de un espectrómetro de masas.



2.1.1.- Muestra: las muestras biológicas que se emplean en la proteómica clínica suelen estar constituidas por una mezcla generalmente bastante compleja de biomoléculas, como puede ser el plasma, suero, orina, saliva, líquido cefalorraquídeo, etc. Este tipo de muestras no pueden ser analizadas por MS de forma directa, sino que es necesario realizar una preparación previa, cuyo objetivo sea simplificar la muestra, así como eliminar los compuestos que puedan interferir en el análisis espectrométrico de las moléculas a analizar. Para ello existen múltiples y diversas técnicas de purificación, fraccionamiento y enriquecimiento cuya finalidad es concentrar la muestra en la subfracción que interesa analizar.

2.1.2.-Fuente de ionización: es la parte del espectrómetro de masas responsable de la volatilización e ionización de la muestra. De esta forma se consigue obtener los

INTRODUCCIÓN

analitos en estado gaseoso e ionizado. Existen varios tipos de fuente de ionización, pero sólo las de ionización suave son las que permiten analizar biomoléculas como las proteínas, ya que son capaces de ionizar las proteínas presentes en la muestra, sin fragmentarlas. Existen dos posibilidades de fuente de ionización suave: pulverización eléctrica o “*electrospray*” (ESI) y la desorción/ionización mediante láser inducida por matriz o “*matrix assisted laser desorption ionization*” (MALDI).

2.1.3.-Analizador de masas: tras obtener las proteínas ionizadas y en fase gaseosa, estas son aceleradas y guiadas hasta el analizador de masas, donde se separarán en función de su relación masa/carga (m/z). El movimiento de iones en el analizador puede manipularse mediante lentes electromagnéticas que permiten dirigir los iones hacia el detector.

Existen varios tipos de analizadores: de tiempo de vuelo o “*time of flight*” (TOF), triple cuadrupolo o “*triple quadrupole*” (TQ), trampa iónica o “*ion trap*” (IT) y de resonancia ión ciclotrón con transformada de Fourier o “*Fourier transform ion cyclotron resonante*” (FT-ICR). Cada uno de ellos difiere en sensibilidad, resolución, exactitud de masa y posibilidad de fragmentar los analitos ionizados (6).

2.1.4.- Detector: es la parte del espectrómetro de masas donde van a ir llegando los analitos ionizados en función de su relación m/z . El MALDI tiende a generar analitos ionizados con carga $z = +1$, por lo que las proteínas se separarán, únicamente, en función de su masa. Esto facilita la interpretación de los espectros, ya que las proteínas de menor masa son las que llegarán antes al detector y las que aparecerán al principio del espectro.

Casi todos los espectrómetros de masas suelen utilizar como detector multiplicadores electrónicos que emplean placas multiplicadoras o dínodos para amplificar la señal. Tras el choque del ión sobre el primer dínodo, se amplía el número de electrones hasta generarse entre 10^4 y 10^8 (5).

2.1.5.- Integrador: Tras la detección de los analitos se generará un espectro en el cual veremos la señal resultante de la colisión de los analitos en el detector, representados en función de su intensidad relativa (I) y de su relación m/z.

2.2.- Espectrometría de masas por MALDI-TOF

2.2.1.- Breve introducción histórica

J.J. Thompson construyó el primer espectrómetro de masas en 1912. Los primeros aparatos fueron empleados en el campo de la física para estudiar el peso atómico de los elementos y la abundancia relativa natural de los isótopos elementales. Los primeros métodos de ionización utilizados sólo servían para moléculas de pequeño tamaño. A pesar de que estos primeros aparatos no eran capaces de analizar biomoléculas, no se tardó demasiado en utilizar isótopos pesados como marcadores en sistemas biológicos. El desarrollo en el rango de masas analizable y en el tipo de muestra que podía ser vaporizada, hizo posible el estudio de componentes orgánicos. En los años 60 se demostró que la irradiación con láser pulsado de alta intensidad sobre moléculas orgánicas de pequeña masa, permitía la formación de iones que podían ser analizados posteriormente. Este fue el origen de la desorción/ionización mediante láser o "*laser desorption ionization*" (LDI). El principal problema de este

INTRODUCCIÓN

sistema era que las moléculas se fragmentaban debido al exceso de energía del láser, que producía una especie de explosión. Sin embargo, en 1987, Michael Karas y Franz Hillenkamp (11) demostraron con éxito el uso de una matriz para solventar la limitación de la técnica. Dicha matriz absorbía la energía del láser y la transmitía a la muestra amortiguando el efecto de explosión. Esta fue la base de la tecnología MALDI. Más tarde Koichi Tanaka (12) desarrolló dicha tecnología y demostró su aplicación en un amplio rango de macromoléculas biológicas. Esto le llevó a recibir en 2002 el Premio Nobel en química compartido con John B. Fenn, que desarrolló el ESI.

2.2.2.- Partes de un MALDI-TOF

2.2.2.1.- Fuente de ionización

En la tecnología MALDI la matriz tiene un papel fundamental, ya que para analizar una muestra o analito en un espectrómetro de masas del tipo MALDI-TOF, la muestra debe co-cristalizar con una matriz orgánica. La co-cristalización se consigue mezclando la muestra con la matriz, depositando dicha mezcla en una placa de metal, dejándola secar. Los cristales resultantes son irradiados con pulsos de rayos láser de una longitud de onda en la cual la matriz tiene el máximo de absorción. Este proceso produce la desorción de la mezcla y fotoactiva la matriz. La matriz excitada ioniza el analito mediante transferencia de protón. El resultado de todo este proceso es la obtención del analito ionizado en fase gaseosa, teniendo la mayoría de los iones con una sola carga positiva (6,13, 14,15). El esquema del funcionamiento de la fuente de ionización MALDI se puede ver en la figura 2.

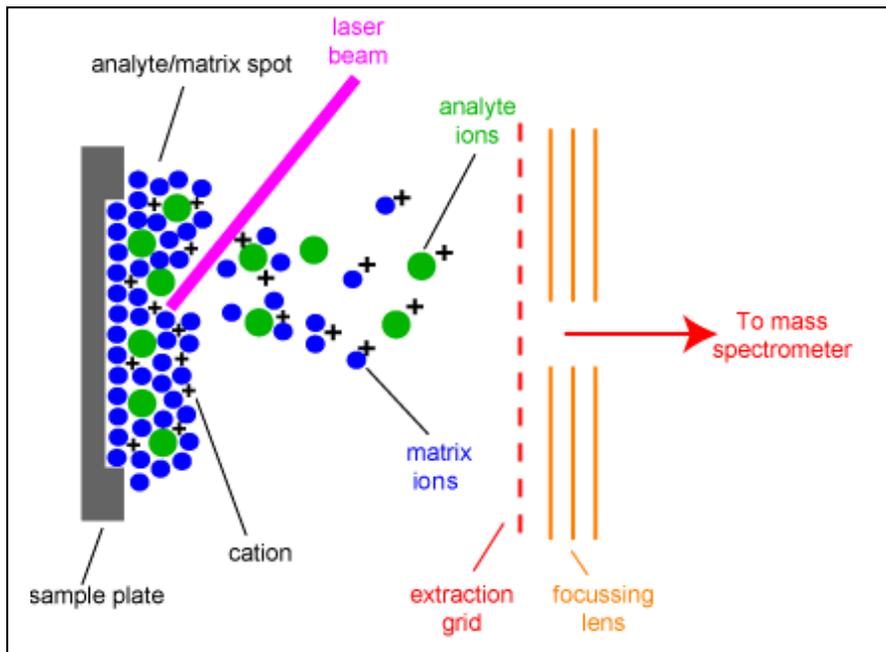
La matriz está constituida por moléculas orgánicas de pequeño tamaño. Las características de una buena matriz son:

- Tener la capacidad de absorber la radiación láser.
- Ser relativamente volátil.
- No modificar covalentemente los analitos.
- Ser soluble en los solventes apropiados. Los analitos y la matriz deben disolverse en el mismo solvente para que los péptidos queden incorporados en la matriz durante el proceso de secado.

Hay varias matrices que se pueden utilizar. La elección de una u otra dependerá del tipo de muestra que se quiera analizar. Las más utilizadas son:

- Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA): para proteínas/péptidos <10.000 Da, lípidos y nucleótidos.
- Ácido 2,5-dihidroxibenzóico (2,5-DHB): para péptidos de gran tamaño, nucleótidos, oligonucleótidos y oligosacáridos.
- El ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxi-cinámico o ácido sinapínico: para proteínas de tamaño medio entre 5000 – 150.000 Da.
- La 2,6 di-hidroxiacetofenona (2,6-DHAP) (16,17): para fosfoproteínas o fosfopéptidos.
- El ácido 3-hidroxi-picolínico: es la matriz de elección para oligonucleótidos.

Figura 2: Fuente de ionización de un MALDI



Proceso de desorción e ionización de las moléculas proteicas (imagen tomada de www.chm.bris.ac.uk/ms/maldi-ionisation.xhtml)

2.2.2.2.- Analizador

Aunque en la MS se han desarrollado varias combinaciones entre fuentes de ionización y analizadores, en el caso del MALDI el analizador más utilizado es el TOF. Sin embargo, en los últimos años se han desarrollado nuevos modelos que combinan dos analizadores para mejorar la resolución de los espectros obtenidos. La combinación más empleada es la fuente de ionización MALDI acoplado a dos analizadores TOF (MALDI-TOF-TOF).

2.2.2.2.1.- Analizador TOF: es uno de los analizadores más sencillos en cuanto a funcionamiento que se utilizan hoy en día. Una vez la muestra ha sido ionizada, un haz de iones es enfocado y dirigido hacia el analizador de masa, que separa los iones por

su relación m/z . Las medidas de la relación m/z en un analizador del tipo TOF está basada en la ecuación:

$$KE=0.5mv^2$$

Donde:

“KE”: es la energía cinética del ión.

“m”: es la masa del ión.

“v”: es la velocidad del ión.

Los iones son inicialmente acelerados mediante un campo eléctrico con un potencial “V”, el cual resulta en una energía cinética de “zV”, donde “z” es la carga del ión. Los iones entran en el tubo de vuelo de longitud “L”, al final del cual hay un detector de iones. Debido a que el tubo carece de cualquier tipo de campo magnético o eléctrico, toda la energía cinética (KE) de los iones es el resultado de la aceleración inicial. De esta forma, a partir de la ecuación anterior, se deriva que:

$$zV=0.5mv^2$$

$$m/z=(2Vt^2)/L^2$$

“V”: potencial.

“z”: carga.

“zV”: energía cinética.

“L”: longitud del tubo de vuelo.

“t”: tiempo que tarda el ión en llegar al detector.

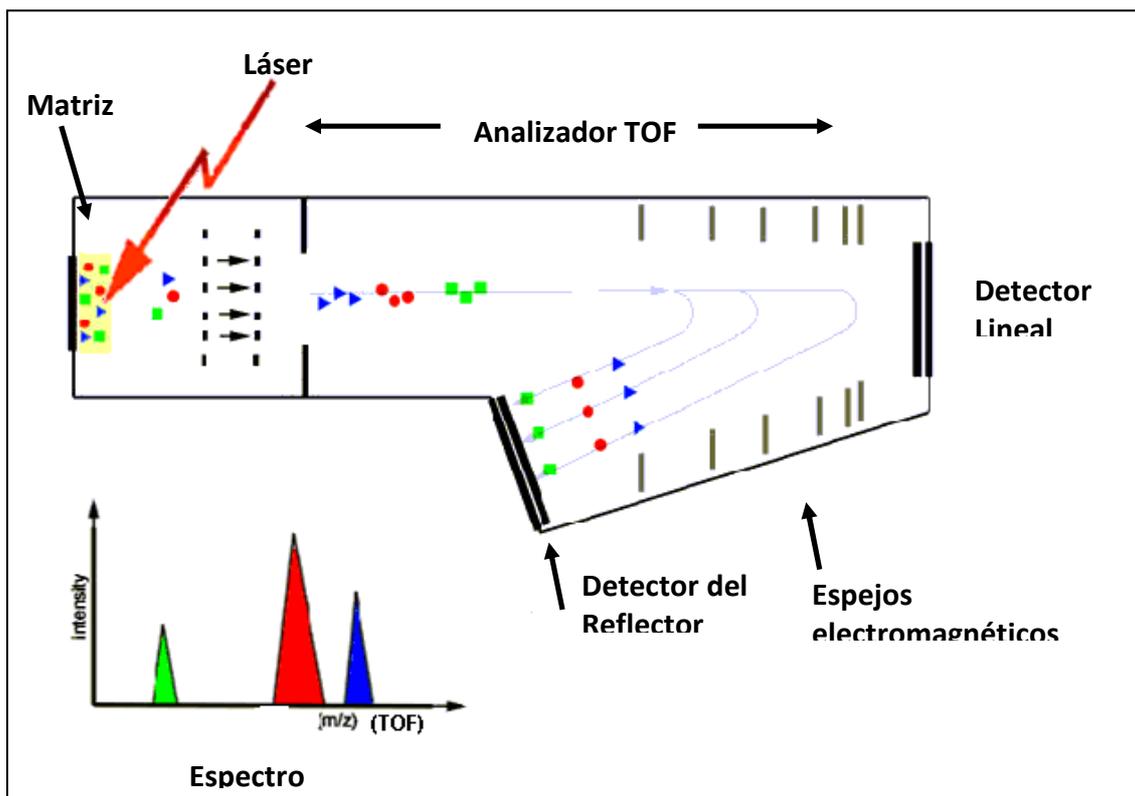
INTRODUCCIÓN

Debido a que “ V ” y “ L ” son conocidos y constantes, la relación m/z de un ión puede ser determinada por la cantidad de tiempo que transcurre entre los pulsos de láser hasta que el ión colisiona con el detector de iones. En este tipo de analizador las moléculas de mayor masa tienen un tiempo superior de llegada al detector en comparación con las de menor masa. Los primeros analizadores TOF no tenían resolución suficiente para discriminar entre las masas de isótopos peptídicos. Para solventar este problema de resolución se desarrollaron dos opciones (13,18):

- **Incorporar un modo reflectrón en el tubo de vuelo:** Lo ideal para mejorar la resolución de un analizador del tipo TOF sería alargar la longitud del tubo de vuelo. El principal inconveniente es el espacio que ocuparía un tubo de vuelo con varios metros de longitud. Para sortear este problema, se desarrolló lo que se conoce como modo reflectrón. Consiste en añadir lentes electromagnéticas al final del tubo de vuelo que desvían la trayectoria de los iones y los envía a un segundo detector. De esta manera se consigue aumentar la distancia que recorren los iones y por lo tanto se mejora notablemente la resolución del analizador de masa.
- **Extracción iónica retrasada en el tiempo:** consiste en retrasar la extracción de iones en un corto período de tiempo, antes de aplicar la aceleración. De esta manera, se consigue que los iones más rápidos se sitúen más alejados del plato de muestra que los iones más lentos. Después se aplica un campo eléctrico que hará que los iones más alejados del plato de muestra tengan un menor potencial de energía que los iones más lentos. Como resultado se obtienen paquetes de iones más compactos que dan una mayor resolución y aumentan la exactitud de las masas.

La combinación de estos dos modos, el modo reflectrón junto con la extracción iónica retrasada, mejora aún más la resolución. En la figura 3 se muestra un esquema de cómo funciona un MALDI-TOF en modo reflectrón y extracción iónica retrasada en el tiempo.

Figura 3: MALDI-TOF con modo reflectrón



(imagen tomada de <http://wln.nl/en/bacteria-quickly-identified-thanks-to-a-chemical-fingerprint/>)

2.2.3.- Aplicaciones:

La espectrometría de masas mediante MALDI-TOF se puede emplear en un amplio abanico de áreas científicas, pero en el campo de la proteómica las dos aplicaciones más empleadas son:

2.2.3.1.- La huella peptídica o “*peptide mass fingerprinting*”: consiste en, a partir de una proteína previamente aislada, realizar la digestión proteolítica con una proteasa conocida, que nos dé una especificidad de corte. Una vez digerida la proteína, se obtiene el espectro de masas de la mezcla de péptidos generada por la endoproteólisis. Después se comparan las masas peptídicas medidas (reales) con las masas peptídicas teóricas, generadas “*in silico*”, que están en las bases de datos. Los motores de búsqueda más comúnmente utilizados son: Mascot(7), MS-Fit (8) y ProFound (9).

La proteasa más empleada es la tripsina por ser muy eficaz y generar péptidos con un tamaño medio de unos 8- 10 aminoácidos, que es adecuado para el análisis por MS. La tripsina corta por los residuos arginina y lisina excepto cuando van seguidos de una prolina. El único problema de la tripsina es que es tan eficaz, que incluso se autodigiere y en el espectro de masas pueden verse claramente fragmentos peptídicos producto de la autodigestión. Para evitar este efecto, existen en el mercado tripsinas modificadas que disminuyen la autodigestión.

2.2.3.2- Secuenciación peptídica: se realiza mediante MS en tandem en la que habrá dos analizadores unidos por una celda de colisión. El flujo de trabajo habitual es, evaluar en el primer analizador la composición peptídica de la muestra. A continuación seleccionar el péptido que se desea identificar y por último dirigirlo a la celda de colisión, donde será fragmentado mediante colisiones con las moléculas de un gas inerte, generalmente Helio. Se utilizan gases nobles durante la fragmentación para evitar posibles reacciones de los analitos con el gas de colisión. Los fragmentos resultantes se separan en un segundo analizador. Las señales de los iones

fragmentados reflejan la secuencia aminoacídica del péptido seleccionado. Para la identificación se compararán las masas de los fragmentos con las bases de datos utilizando los motores de búsqueda Mascot o Sequest (10). En el caso de que el péptido no esté en las bases de datos, se puede realizar la interpretación del espectro de masas obteniendo la secuencia aminoacídica, aproximación que se conoce como secuenciación *de novo*.

3.- BIOMARCADOR DIAGNÓSTICO

3.1.- Definición

En 1989 el Medical Subject Heading (MESH) definió el término de biomarcador como: *“parámetro biológico medible y cuantificable (ejemplo: concentración enzimática específica, concentración hormonal específica, distribución fenotípica específica de un gen en una población, presencia de una sustancia biológica) que sirve como índice de las variaciones fisiológicas o de salud, como el riesgo de una enfermedad, los trastornos psiquiátricos, la exposición ambiental y sus efectos, el diagnóstico de una enfermedad, un proceso metabólico, la drogadicción, el embarazo, el desarrollo de una línea celular, un estudio epidemiológico, etc”*.

En 2001 un grupo de trabajo del National Institute of Health (NIH) estandarizó la definición de biomarcador como: *“una característica que se mide y evalúa objetivamente como indicador de procesos biológicos normales, procesos patogénicos o respuestas farmacológicas a una intervención terapéutica (19)*.

El valor fundamental de un biomarcador es su capacidad de diferenciar dos o más estados biológicos. Esta capacidad es lo que diferencia a los biomarcadores de las

“mediciones sencillas”. Una medida se convierte en biomarcador cuando los estudios clínicos demuestran que la concentración de dicho biomarcador, por encima de un umbral definido, predice la presencia de la enfermedad (5).

3.2.- Características de un biomarcador ideal

Para que un nuevo biomarcador sustituya a otros ya existentes y se incorpore fácilmente a la rutina diaria de un laboratorio, debe reunir una serie de características como son (20):

- Tener una gran especificidad para la enfermedad de estudio.
- Ser fiable, es decir, comportarse siempre de la misma forma.
- Ser fácilmente medible.
- Poder determinarse a través de una técnica sencilla y con un bajo coste económico.

De todas formas, ante un proceso de enfermedad, generalmente, habrá varios mecanismos biológicos implicados y por tanto varios posibles biomarcadores. Es muy difícil encontrar un único biomarcador que sea capaz de diagnosticar una enfermedad con la suficiente especificidad y sensibilidad diagnóstica. Por eso, en los últimos años, se ha apostado por la utilización de paneles de biomarcadores en el diagnóstico de patologías concretas.

4.- ESTUDIO DE PERFILES PEPTÍDICOS SÉRICOS MEDIANTE MALDI-TOF

Este tipo de estudio consiste en comparar patrones de perfiles peptídicos, obtenidos mediante MS, de dos o más grupos de muestras que difieren en alguna característica importante. Normalmente se compara un grupo de muestras control con un grupo de muestras de pacientes que padecen una patología concreta y se intenta buscar diferencias en la expresión de los péptidos representada, por la presencia/ausencia de picos, o bien por cambios cuantificables en la intensidad de los picos.

En los estudios de perfiles peptídicos se analizan todos los péptidos presentes en la muestra detectados en un amplio rango analítico 500-20.000 Da. Como resultado se obtienen espectros muy complejos, con mucha información, que deben ser analizados mediante el uso de programario específico así como programario que permita realizar un buen análisis estadístico de los datos obtenidos. El objetivo es encontrar paneles o patrones de péptidos que, con el menor número de péptidos, sean capaces de discriminar entre los grupos de estudio con la mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica (21,22) .

4.1.- Pretratamiento de la muestra

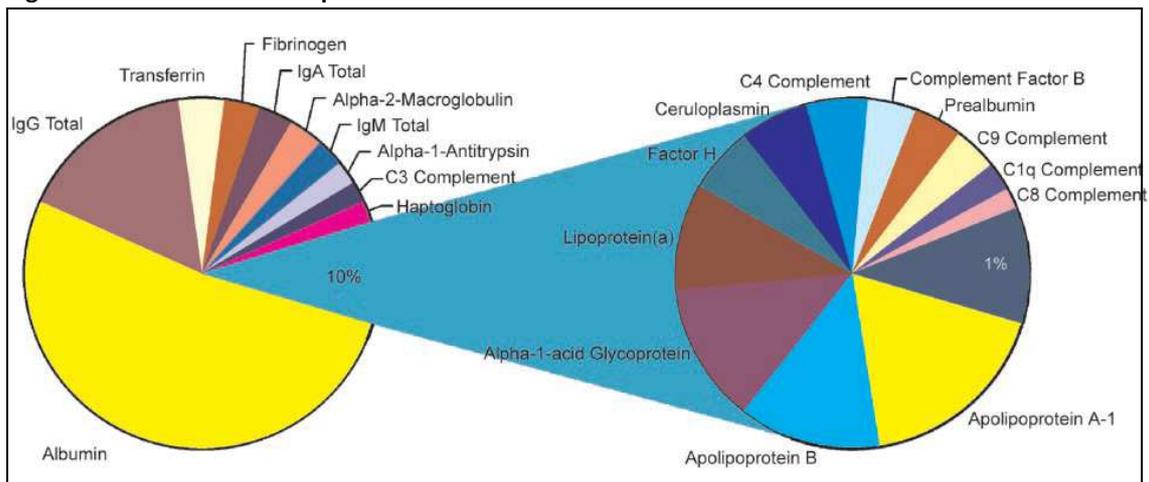
El suero o el plasma son muestras idóneas para el análisis de perfiles peptídicos, ya que están en contacto con todos los tejidos del organismo, por lo que son ideales para la búsqueda de nuevos biomarcadores.

El principal problema del suero/plasma es que está compuesto por una mezcla compleja de proteínas, de las cuales el 99% de ellas corresponde a 22 proteínas mayoritarias tales como la albúmina, inmunoglobulinas (Ig), lipoproteínas, etc. Tan

INTRODUCCIÓN

solo la albumina y las Ig representan el 70 % de las proteínas en suero. Esto deja un 1% de proteínas restantes que, principalmente, son proteínas de bajo peso molecular (PBM), cuyas concentraciones en sangre están en el orden de nanogramos y que, hasta ahora, eran desconocidas debido a su pequeño tamaño y a que se encuentran enmascaradas por el resto de proteínas mayoritarias. Hoy en día, gracias a las diferentes aproximaciones metodológicas que ofrece la proteómica se tiene acceso a ellas y pueden ser investigadas. En la Figura 4 se representa la distribución de las proteínas en la sangre (22,23,24).

Figura 4: Distribución de las proteínas séricas.



(Figura tomada de R.S. Tirumalai *et al.* Mol Cel. Proteomics. 2003,2, 1096-1103.)

Para evitar el enmascaramiento de las PBM se tiene que reducir la presencia de las proteínas mayoritarias mediante un paso de pretratamiento de la muestra antes de su análisis proteómico. Con ello se pretende aumentar la calidad de la muestra. Es decir, aumentar la pureza, eliminando contaminantes como pueden ser sales u otras biomoléculas, eliminar o disminuir al máximo la presencia de proteínas mayoritarias y

por último enriquecer la muestra en los péptidos de interés o subproteoma mediante técnicas específicas de fraccionamiento.

Los métodos de pretratamiento más utilizados se basan en la cromatografía de fase reversa, de fase normal, o de intercambio iónico o de afinidad. La cromatografía de fase reversa es la metodología cromatográfica más empleada, ya que las fracciones resultantes están libres de sales que interfieren en cualquier tipo de espectrómetro de masas. Aunque se apliquen otras metodologías de pretratamiento, la mayoría de veces, se suele realizar algún tipo de cromatografía de fase reversa con el fin de eliminar las sales.

4.1.1.- Depleción de proteínas abundantes

Consiste en la depleción o eliminación de las proteínas mayoritarias para facilitar el análisis de las PBM. Existen varios sistemas cromatográficos con esta finalidad. Según las proteínas que se eliminan pueden clasificarse en:

- *Sistemas de depleción de albúmina*: Cibacron Blue resin o el kit comercial “Montage albúmina depletion kit” (Millipore)
- *Sistemas de depleción de inmunoglobulina IgG*: columnas de inmutioafinidad
- *Sistemas de depleción de varias proteínas abundantes a la vez*: Multiple Affinity Removal System (MARS) (Agilent Technologies), SEpro IgY12 system (Gen Way), ProteoPrep 20 Plasma immunodepleción kit (Sigma-Aldrich) y la cromatografía de afinidad a heparina.

INTRODUCCIÓN

Las opiniones sobre este paso de purificación son contradictorias. Por un lado hay científicos que defienden que la purificación de las muestras mejora la resolución e incrementa la intensidad de los picos de las PBM. Sin embargo, hay autores que creen que el grado de depleción que se consigue con los métodos actuales es insuficiente y recomiendan combinar varios sistemas de depleción para conseguir la eliminación de entre 18 y 22 de las proteínas abundantes. Esto supone el 98-99 % del contenido de proteínas totales en suero (17,36).

Otro inconveniente de los métodos de purificación es la pérdida de PBM por su unión a las proteínas mayoritarias que funcionan como transportadores, como por ejemplo la albumina que actúa como transportador de pequeñas proteínas o péptidos. Tirumalai *et al.* (24) demostraron que esta pérdida se podía evitar realizando un paso previo de desnaturalización para romper los complejos PBM-proteína transportadora.

Para mejorar la purificación de la muestra, algunos grupos de investigadores han optado por desarrollar métodos que combinen un primer paso de eliminación de las proteínas transportadoras y un segundo paso de enriquecimiento de las PBM (37,52-56).

Por último, un método alternativo en el proceso de purificación de las muestras es la “protein equalizer technology”, desarrollado por Righetti *et al.*, que consiste en usar librerías de ligandos unidos a partículas cuya capacidad de unión es similar. Son ligandos que se unen a la mayoría de proteínas presentes en la muestra. Al mezclar las partículas con los ligandos y la muestra, se obtiene la unión equivalente de todas las proteínas presentes en la muestra. Tras un proceso de lavado se eliminará el exceso proteico. Una vez realizada la elución, obtenemos un fluido que contendrá cantidades equivalentes de las diferentes proteínas. De esta forma habremos disminuido la

concentración de las proteínas mayoritarias y aumentado la concentración de las proteínas minoritarias o PBM. (17,57,58).

4.1.2.- Fraccionamiento

Una estrategia comúnmente utilizada para simplificar la mezcla de proteínas, es el fraccionamiento de la muestra. En este proceso se selecciona la fracción de proteínas o subproteoma que queremos analizar. Las proteínas se seleccionan según sus características fisico-químicas utilizando columnas con resinas o partículas magnéticas funcionalizadas. Los sistemas anteriormente mencionados, se basan en cromatografía de fase sólida, donde las proteínas de interés quedan retenidas en un primer paso y después, tras una serie de lavados, son eluidas para su posterior análisis. Villanueva *et al.* (40) fueron los primeros en utilizar las partículas magnéticas funcionalizadas con cadenas hidrocarbonadas (C1 C2, C3, C8 y C18) como estrategia de fraccionamiento. Este grupo vió que los polipéptidos más grandes se unían mejor a las cadenas hidrocarbonadas cortas (C1 a C3) mientras que los péptidos más pequeños se unían mejor a las cadenas hidrocarbonadas largas (C18). Sin embargo, las partículas con las que se obtuvo un mayor número de picos fueron las funcionalizadas con C8. Más tarde se desarrollaron partículas magnéticas basadas en intercambio catiónico débil o “*weak cation-exchange*” (WCX), y funcionalizadas con iones metálicos (24,25,26). En la Tabla 1 se resumen las principales técnicas de depleción y fraccionamiento que se utilizan en los estudios proteómicos y se explican las ventajas y limitaciones de cada una de ellas.

INTRODUCCIÓN

Tabla 1: Técnicas de purificación y fraccionamiento (17).

TÉCNICAS DE DEPLECIÓN	PROTEINAS ELIMINADAS	VENTAJAS	LIMITACIONES
Cromatografía de afinidad			
"Cibacron Blue Resin"	Albúmina	Económico	Ineficaz, pérdida de PBM
Columnas de inmutioafinidad	Inmunoglobulinas	Eficaz	Caro
Columna MARS	6 proteínas	Eficaz y reproducible	Pérdida de PBM
TÉCNICAS DE FRACCIONAMIENTO			
Kit ProXPRESSION		Eficaz	
Equalizer beads		Purifica y fracciona	Poca experiencia
Extracción en fase sólida			
Columnas		Reproducible, rápido y sencillo	
Partículas magnéticas funcionalizadas		Reproducible, rápido, sencillo y automatizable	Variaciones entre lotes
Placas MALDI funcionalizadas		Rápido, sencillo y automatizable	Ineficaz

MARS: Multiple Affinity Removal System; PBM: proteínas de bajo peso molecular.

4.2.- Limitaciones

Uno de los principales problemas de la proteómica es la falta de reproducibilidad y de significación clínica de los resultados obtenidos. Se ha visto que los mismos experimentos realizados en laboratorios independientes, no obtienen los mismos patrones peptídicos (4,59). Además, hay una gran variedad en cuanto a tecnología, métodos de adquisición de datos y programas informáticos para el posterior análisis estadístico, que influyen en la variabilidad de los resultados. Hay varios grupos que han estudiado la reproducibilidad de los perfiles peptídicos obtenidos por MALDI-TOF MS. Para ello se calculó el coeficiente de variación (CV) intraensayo de las intensidades obtenidas para picos concretos en muestras que se analizaron varias veces. Los CV (%) oscilaban entre un 2 – 40 % (27). Esta dispersión se debe a que dichos estudios utilizaron diferente número de réplicas, rango de masas y número de picos para calcular el CV intraensayo.

Para evitar esta problemática, se han llevado a cabo estudios sobre los factores que influyen en la variabilidad de los perfiles peptídicos, además se recomienda crear protocolos estandarizados de las fases preanalítica, analítica y postanalítica (28,29,31,32,33,34,35).

4.2.1.- Limitaciones preanalíticas

En las muestras de sangre, las variables que más influyen son: el tipo de muestra (plasma/suero), tipo de tubo, la adición o no de un potenciador de la coagulación, tiempo que se deja coagular la muestra, temperatura y el tiempo de conservación de la muestra antes de su procesamiento.

4.2.1.1.- Tipo de muestra

Hay una gran controversia generada en torno al tipo de muestra que se debe utilizar en el análisis de perfiles peptídicos en sangre. Algunos autores recomiendan utilizar suero ya que los perfiles peptídicos presentan un mayor número de picos y de mayor intensidad (29). En el trabajo llevado a cabo por West-Nielsen *et al.* (28) se observó que, si se utilizaban muestras de plasma, se necesitaba tres veces el volumen óptimo de suero bajo las mismas condiciones de preparación de muestra, para obtener espectros de la misma calidad en cuanto a número e intensidad de picos. Sin embargo, hay autores como Findeisen *et al.* (30) que recomiendan usar plasma porque conserva mejor el perfil peptídico al evitarse la cascada de la coagulación. En esta línea la “Human Proteome Organization” (HUPO) también recomienda utilizar muestras de plasma ya que en suero, durante el proceso de coagulación *ex-vivo*, se produce neogeneración de muchos péptidos. Esto se debe por un lado a la liberación de

componentes celulares, principalmente trombocitos y leucocitos, y por otro lado a la acción de proteasas. No obstante, la HUPO reconoce que el suero es el tipo de muestra más comúnmente almacenada y por tanto es de gran utilidad para la validación de resultados. En el caso de utilizar muestras de suero, la HUPO recomienda controlar muy bien las variables de: tiempo de coagulación, temperatura y tiempo de almacenamiento. Además, tanto en plasma como en suero, recomienda la adición de inhibidores de proteasas tras la extracción de la muestra para evitar variaciones en el perfil peptídico como consecuencia de la actividad proteolítica (31).

4.2.1.2.- Tipo de tubo

Hsieh *et al.* (32) analizaron las diferencias entre muestras de suero recogidas en tubos con y sin gel separador, concluyendo que las muestras que estuvieron en contacto con gel presentaban picos de gran intensidad en el intervalo de 1800-1900 Da, que podían enmascarar PBM. Esto fue confirmado en el trabajo publicado por Luque-García *et al.* (33).

4.2.1.3.- Tiempo de coagulación y temperatura

Estas dos variables van íntimamente relacionadas, ya que el efecto del tiempo de coagulación de una muestra sobre el perfil peptídico sérico puede ser diferente dependiendo de si la muestra está refrigerada o conservada a temperatura ambiente (T.A.). El trabajo de West-Nielsen *et al.* (28) concluyó que las muestras que se dejan coagular a T.A. no deben estar sin centrifugarse más de 4 horas para evitar cambios en el perfil peptídico sérico. Sin embargo, cuando se dejan coagular refrigeradas (4°C)

pueden estar hasta 24 horas sin que ello suponga un cambio significativo en su perfil peptídico sérico.

Baumann *et al.* (29) también estudiaron el efecto del tiempo de coagulación en el perfil peptídico de muestras de suero a temperatura ambiente. Las muestras se dejaron coagular durante 10, 30, 60, 120 y 180 minutos. Se observó un efecto claro sobre el perfil peptídico desde los 30 minutos produciendo una disminución en la intensidad de los picos de peso molecular <1500 Da, un aumento en la intensidad de los picos >4000 Da, en tanto que los picos de rango intermedio no sufrieron cambios. Además, observaron un aumento del ruido de fondo en el rango de masas de 1000 a 2000 Da en muestras que se dejaron coagular durante más de 120 minutos.

Por último, Di Girolamo *et al.* (34) evaluaron el efecto del tiempo de coagulación sobre el perfil peptídico en muestras de suero conservadas a T.A. y 4°C. Concluyeron que hasta 120 minutos el efecto del tiempo de coagulación sobre el perfil peptídico era mínimo, tanto en muestras conservadas a T.A. como refrigeradas. Según este grupo, las muestras se deben dejar coagular entre 60 y 120 minutos para obtener el mayor número de picos.

4.2.1.4.- Almacenamiento de la muestra

Una vez la muestra se ha dejado coagular, se ha centrifugado y se ha separado del coágulo, es importante analizar el efecto del modo de conservación de la misma hasta el momento del análisis.

4.2.1.4.1.- Conservación a 4°C

En estas condiciones hay autores que defienden que no se observan cambios significativos hasta las 24 horas (28,29). Sin embargo Di Girolamo (34) encontró diferencias significativas a partir de 1 hora.

4.2.1.4.2.- Conservación a TA

Hay más discrepancias entre los autores. West-Nielsen (28) defiende que las muestras se podrán conservar hasta 4 horas en estas condiciones, sin embargo Baumann (29) no recomienda conservarlas más allá de 2 horas. Por su parte Di Girolamo (34) recomienda adicionar inhibidor de proteasas a las muestras conservadas a T.A. para asegurar su estabilidad hasta 1 hora.

4.2.1.4.3.- Conservación a – 80°C y -20°C

Baumann *et al.* (29) concluyeron que las muestras se pueden conservar congeladas a -80°C hasta 6 meses sin que se afecte la reproducibilidad de los resultados. En la misma línea, aunque durante un período de estudio más corto, Di Girolamo *et al.* (34) no observaron cambios significativos cuando las muestras se conservaban durante un mes a -80°C. Sin embargo, Ahmad *et al.* (35) estudiaron el efecto de períodos de conservación más largos, durante más de 6 meses, a temperaturas de -80°C y -20°C sobre el perfil peptídico de muestras séricas. En este trabajo se observó que en ambos casos (-80°C y -20°C) había una alteración del perfil peptídico, con aparición o desaparición de picos y variación en las intensidades de picos concretos cuando se comparaban con los perfiles de muestras frescas. La alteración era mucho mayor a -20°C, descartando esta opción como modo de conservación. Además, encontraron que

algunos de los picos descritos en la literatura como posibles biomarcadores de enfermedad, coincidían con los picos que se veían afectados por la conservación durante más de 6 meses. En este trabajo se recomienda que en estudios caso-control ambos tipos de muestras se conserven de la misma forma y durante el mismo tiempo para no tener falsos hallazgos (35).

4.2.1.5.- Ciclos de congelación/descongelación

En el trabajo realizado por West-Nielsen *et al.* se realizaron hasta 4 ciclos de congelación/descongelación, no observando cambios significativos en los perfiles peptídicos de dichas muestras. Hsieh *et al.* (32) realizaron hasta 10 ciclos de congelación/descongelación concluyendo que el efecto sobre el perfil peptídico era mínimo. Sin embargo, Baumann *et al.* (29) sí que encontraron diferencias significativas en las intensidades de los picos a lo largo de cinco ciclos de congelación/descongelación. Posiblemente estas discrepancias se deban a las condiciones en las que se realizó la descongelación de las muestras. En el trabajo de Hsieh *et al.* (32) las muestras fueron descongeladas sobre hielo impidiendo que la temperatura superara los 4° C.

4.2.2.- Limitaciones analíticas

Abrethsen *et al.* (27) llevaron a cabo una revisión bibliográfica sobre la reproducibilidad obtenida mediante el método de perfiles peptídicos por MALDI-TOF MS. En esta revisión se vio que el coeficiente de variación (CV) interdía de la intensidad de los picos obtenidos por diferentes laboratorios, oscilaba entre <4% y 26%. El rango

de CV ideal para un biomarcador que se utiliza en clínica se sitúa entre 1.5% y 10%. Por lo que Abrethsen *et al.* concluyeron que la optimización de los distintos pasos de la fase analítica es clave para minimizar la variabilidad de los resultados (27).

En la fase analítica los factores que influyen en la variabilidad de los resultados son: el tipo de pretratamiento, la matriz, la humedad del ambiente, la automatización del procesamiento de las muestras, el uso de calibrador interno, el uso de muestra control, las mediciones repetidas y los algoritmos utilizados para la normalización y detección de los picos.

4.2.2.1.- Pretratamiento

K. Björhall *et al.* (36), en un estudio de 2005, analizaron el efecto de la depleción de proteínas mayoritarias en el perfil proteico evaluando la eficacia, especificidad de unión y reproducibilidad de los resultados. Dicho estudio concluyó que la depleción de proteínas mayoritarias era un método eficaz para realizar estudios proteómicos en suero humano. De los métodos evaluados el “Multiple Affinity Removal Column” (Agilent Technologies) es el que mejor eficacia, especificidad y reproducibilidad obtuvo. Por otro lado Aresta *et al.* (37) analizaron el efecto sobre el perfil peptídico sérico del uso de distintos métodos de pretratamiento. Para ello utilizaron, sobre las mismas muestras, tres métodos de pretratamiento diferentes: micro extracción en fase reversa (μ -SPE), depleción de albúmina seguida de μ -SPE y ultrafiltración con punto de corte de 30 KDa seguida de μ -SPE. Observaron que los perfiles peptídicos eran muy diferentes, obteniendo un mayor número de picos cuando utilizaron el método de ultrafiltración seguida de μ -SPE. Adicionalmente, Callesen *et al.* (38) analizaron el efecto de la elección del método de fraccionamiento mediante extracción

en fase sólida en la reproducibilidad de los picos. La conclusión fue que no había un patrón claro de comportamiento entre microcolumnas y partículas magnéticas. Según este grupo es la combinación de matriz, tipo de extracción en fase sólida y el protocolo de preparación utilizado lo que influye en la reproducibilidad de los picos. Tras comparar 19 combinaciones vieron que la mejor opción era utilizar partículas magnéticas funcionalizadas con cromatografía de intercambio iónico (MB-IMAC, Bruker Daltonics) en combinación con la matriz 2,6-dihidroxiacetofenona (2,6-DHAP) y preparando las muestras mediante un protocolo optimizado distinto del recomendado por la casa comercial. En la Tabla 2 se resumen los métodos de fraccionamiento basados en diferentes sistemas cromatográficos y ordenados según afinidad cromatográfica. En esta tabla se puede ver la eficacia de cada método según el número de picos reproducibles que se obtiene.

Tabla 2: Reproducibilidad de los picos de perfiles peptídicos obtenidos mediante distintos métodos de fraccionamiento basados en diferentes sistemas cromatográficos.

Afinidad	Matriz	Protocolo	Nº de picos reproducibles	Nº de picos perfectamente reproducibles	Picos perfectamente reproducibles/ picos reproducibles (%)
MC-Anion	HCCA		278	38	13,7
MC-Anion	DHAP		331	75	22,7
MB-C8	HCCA	optimizado	343	94	27,4
MB-C8	HCCA	fabricante	325	64	19,7
MB-C8	DHAP	optimizado	362	122	33,7
MB-C8	DHAP	fabricante	377	122	32,4
MC-C8	HCCA		360	112	31,1
MC-C8	DHAP		374	107	28,6
MC-C18	HCCA		308	60	19,5
MC-C18	DHAP		372	125	33,6
MC-Quelante	HCCA		318	55	17,3
MB-IMAC	HCCA	optimizado	315	58	18,4
MB-IMAC	HCCA	fabricante	317	71	22,4
MB-IMAC	DHAP	optimizado	418	173	41,4
MB-IMAC	DHAP	fabricante	306	45	14,7
MC-SDB-RPS	HCCA		339	83	24,5
MC-SDB-RPS	DHAP		361	102	28,3
MC-SDB-XC	HCCA		338	102	30,2
MC-SDB-XC	DHAP		374	125	33,4

Tabla obtenida de Callesen *et al.* (38): microcolumnas de intercambio aniónico (MC-Anion), bolas magnéticas funcionalizadas con cadenas C8 (MB-C8), microcolumnas funcionalizadas con C8 (MC-C8), microcolumnas funcionalizadas con C18 (MC-C18), microcolumnas funcionalizadas con sustancias quelantes (MC-quelante), bolas magnéticas funcionalizadas para cromatografía de afinidad a ion metálico inmovilizado (MB-IMAC), microcolumnas de fase mixta (MC-SDB-RPS) y de fase reversa (MC-SDB-XC).

4.2.2.2.- Matriz

Es la sustancia que ayuda a co-cristalizar la muestra por lo que, la elección de la matriz, es un factor importante a tener en cuenta en la fase analítica. La elección del tipo de matriz dependerá del tipo de moléculas a analizar, de su peso molecular y de la longitud de onda del láser utilizada, así como de las propias características de la matriz. En el estudio de perfiles peptídicos séricos la matriz 2,6-DHAP ha mostrado buenos resultados. Callesen *et al.* (38) concluyen que la matriz 2,6-DHAP genera patrones parecidos a los obtenidos con HCCA aunque con mejor resolución y definición. Penno *et al.* (39) también concluyeron que la matriz 2,6-DHAP era la que mejor resultados les daba utilizando la técnica “dried droplet” descrita por Karas y Hillenkamp anteriormente (11). Una limitación del uso de la matriz 2,6-DHAP es que no cristaliza de forma homogénea, lo que dificulta la automatización del proceso.

4.2.2.3.- Automatización del procesamiento de las muestras

Con la automatización se consigue un mayor rendimiento y reproducibilidad de los resultados. Villanueva *et al.* (40,41) fueron los primeros en desarrollar un protocolo estandarizado que incluía la automatización del proceso de fraccionamiento de la muestra y la co-cristalización del eluido junto con la matriz. Jiménez *et al.* (42) también automatizaron el proceso mediante el sistema robotizado KingFisher 96 (Thermo) y compararon la reproducibilidad obtenida mediante el procesamiento manual y

automatizado. La conclusión fue que se obtenía una reproducibilidad similar pero con la automatización se ganaba en velocidad, permitía el procesamiento en paralelo de las muestras y era un proceso sin intervención del usuario. La rapidez del procesamiento es fundamental para evitar la actividad proteolítica.

4.2.2.4.- Calibrador interno o externo y control

El uso de calibradores externos e internos ayuda a mejorar la exactitud y precisión del método ya que permite ajustar las masas de los picos y así obtener siempre la misma medición. Los calibradores internos van dentro de la muestra y los calibradores externos se depositan en una posición específica de la placa soporte, fuera de la muestra. Es importante que el calibrador contenga péptidos cuyas masas abarquen todo el rango analítico de interés. Los materiales control nos ayudan a valorar la reproducibilidad de nuestros resultados. Se debe analizar al menos un material control en cada serie analítica.

4.2.2.5.- Otros

Durante el proceso analítico también se deberá controlar la temperatura ambiental, la presión atmosférica y la humedad del ambiente, ya que influirán en el proceso de co-cristalización de la matriz junto con la muestra. Además, algunos reactivos contienen solventes orgánicos que se pueden evaporar fácilmente. También ayuda a mejorar la reproducibilidad de los resultados las repeticiones en el procesamiento de la muestra. Y, finalmente, es importante el uso de algoritmos para la substracción de la línea de base o ruido de fondo, la normalización y la detección de picos (27).

4.2.3.- Limitaciones postanalíticas

Al final del proceso analítico obtendremos una gran cantidad de espectros cuyos datos deben ser analizados. Para ello existen varios programas informáticos y algoritmos estadísticos, pero estos programas informáticos son complejos y deben utilizarse correctamente para obtener resultados estadísticamente significativos. En este sentido, la bioinformática se convierte en un eslabón clave en los estudios de proteómica clínica.

Es importante realizar un pretratamiento estadístico de los datos antes de realizar la búsqueda de picos discriminantes. El esquema es el siguiente:

- *Corrección de la línea de base:* se hace para eliminar el ruido de fondo y así mejorar el cálculo de las áreas de los picos.
- *Normalización del espectro:* consiste en calcular para cada espectro un factor (fn) que minimizará la suma de las diferencias entre las intensidades (In) observadas en un rango de masas determinado y la media de dichas intensidades.

$$F_n * I_n = I_{\text{medio}}.$$

- *Alineamiento o recalibración del espectro.*
- *Análisis estadístico.*

5.- APLICACIÓN CLÍNICA DE LA PROTEÓMICA:

Las aplicaciones clínicas de la proteómica son muy variadas. A continuación nos referiremos a las aplicaciones concretas que fueron motivo de estudio en esta tesis.

5.1.- Cáncer de Páncreas

El páncreas es una glándula mixta compuesta por tejido exocrino y endocrino. Un 80-85 % del volumen pancreático es de naturaleza exocrina, un 10 -15 % de matriz extracelular y vasos y un 2% de porción endocrina. Se localiza detrás del estómago y por delante de la columna. Su función es la producción de secreciones que ayudan a descomponer los alimentos y la producción de hormonas que ayudan a controlar los niveles de azúcar en sangre.

El cáncer de páncreas o cáncer pancreático es un tumor de alta mortalidad que se origina en la glándula pancreática. Todavía se desconoce la etiología y el mecanismo de carcinogénesis pancreática. Se cree que el proceso se inicia por una alteración de las células de los conductos pancreáticos. Los carcinógenos alcanzarían estas células provocando su transformación maligna por tres posibles vías de acceso: el reflujo biliar, el reflujo duodenal y por vía sanguínea. Los principales factores de riesgo conocidos del cáncer de páncreas son el tabaco, dieta, enfermedades como la pancreatitis crónica o diabetes, alcohol y factores hereditarios. Este tipo de cáncer es difícil de detectar con anticipación, ya que no causa síntomas de inmediato. Cuando los síntomas aparecen, suelen ser vagos o imperceptibles. Estos incluyen una coloración amarillenta de la piel y los ojos, dolor abdominal y en la espalda, pérdida de peso y fatiga. Además, como el páncreas está oculto detrás de otros órganos, los

INTRODUCCIÓN

profesionales de la salud no pueden palpar los tumores en las exploraciones físicas convencionales. La detección del cáncer de páncreas suele ocurrir a través de una ecografía abdominal, en la que se aprecia la formación de tejido neoplásico alrededor del páncreas. Lamentablemente, la detección suele ocurrir cuando el cáncer ya se ha expandido a otros órganos.

El cáncer de páncreas es uno de los tumores de menor incidencia pero con peor pronóstico debido, principalmente, a su diagnóstico tardío. En España se diagnostican unos 5.000 casos anuales de los cuales 4.900 mueren por esta causa. En el año 2012 fallecieron 77.500 pacientes de cáncer de páncreas en Europa, convirtiéndolo en la cuarta causa de muerte por cáncer en Europa con independencia del sexo.

La esperanza de vida a 5 años es menor del 5% y la vida media de estos pacientes es menor a 6 meses. Este pronóstico tan desfavorable se debe a las siguientes causas: los síntomas no aparecen hasta bien avanzada la enfermedad, tiene un gran potencial metastásico y es resistente a las terapias convencionales. El único tratamiento efectivo es la resección quirúrgica, pero sólo se podrá realizar si el tumor se diagnostica de forma precoz. La esperanza de vida a 5 años tras la resección quirúrgica es de un 40% si el tumor es de menos de 20 mm y de un 75% cuando es menor a 10 mm. Desafortunadamente, tan sólo un 20% de los tumores se diagnostica en un estadio que permite la intervención quirúrgica (43,44).

El diagnóstico definitivo se realiza mediante pruebas de imagen que son caras, invasivas y que requieren de cierto tiempo para su interpretación. Además, no siempre pueden diferenciar pancreatitis crónica de cáncer de páncreas.

Junto a las pruebas de imagen existen otras técnicas diagnósticas tales como los marcadores tumorales. En la actualidad se emplean dos marcadores tumorales relacionados con este tumor:

- El antígeno carcinoembrionario (CEA): fue el primer marcador tumoral utilizado, pero su sensibilidad y especificidad es realmente baja (54% y 79% respectivamente). Además, el CEA resulta bastante inespecífico alterándose sus niveles de concentración en muchos otros tipos de tumores.
- El antígeno carbohidrato 19.9 (CA 19.9): es el marcador tumoral de elección para el diagnóstico de cáncer de páncreas ya que se expresa en el 70-90% de los pacientes. Su sensibilidad y especificidad diagnóstica son del 80% y 86% respectivamente. Sin embargo, el CA 19.9 presenta un alto porcentaje de falsos positivos, sobre todo en la ictericia no maligna por lo que la mayoría de guías clínicas no lo incluyen, o lo hacen con ciertos matices.

Las variaciones en el proteoma del cáncer son muy complejas y contienen información sobre todos los procesos biológicos que suceden en torno a las células cancerígenas. Las células cancerígenas liberan proteínas al torrente circulatorio que pueden ser potenciales biomarcadores específicos de cada tipo de cáncer. Se estima que de los 45.000 genes humanos se generan unas 250.000 variantes de RNA que, tras modificaciones y procesos post-translacionales, darán lugar a 1,5 millones de proteínas. Es necesario entender y estudiar todo el perfil proteico ya que es el reflejo de lo que sucede a nivel celular, se trate de células sanas o cancerosas (45). En la figura 5 se muestra un esquema del flujo de información desde el genotipo hasta el fenotipo.

INTRODUCCIÓN

Figura 5: Información desde el genotipo hasta el fenotipo

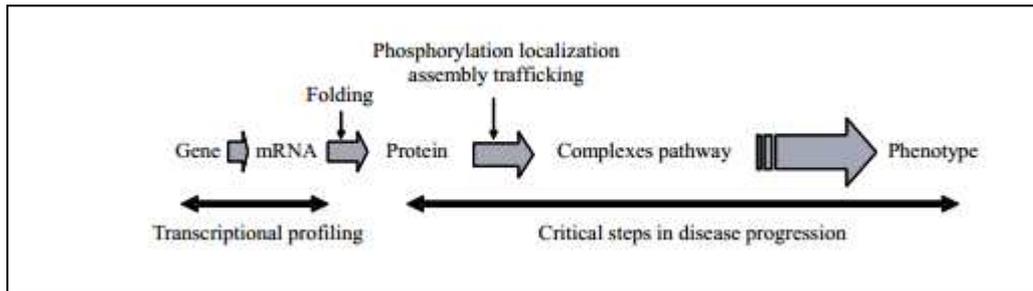


Figura tomada de Alaoui- Jamali *et al.* J Zhejiang Univ SCIENCE B 2006 7 (6):411-420.

En la última década han comenzado a aparecer estudios aplicados al cáncer de páncreas tratando de encontrar el biomarcador, o panel de biomarcadores, que discrimine entre cáncer de páncreas y control sano, y también entre cáncer de páncreas y pancreatitis crónica (44,46 ,47).

En el cáncer de páncreas actualmente no existe un buen biomarcador de diagnóstico precoz, y el tratamiento y pronóstico de estos pacientes dependerá de la precocidad en la obtención de un diagnóstico fiable. La proteómica, mediante el estudio de perfiles peptídicos, nos ofrece la posibilidad de encontrar nuevos biomarcadores de diagnóstico precoz que hasta ahora no han sido estudiados por no disponer de la tecnología adecuada.

5.2.- Ictus Isquémico

El ictus o enfermedad cerebrovascular sigue siendo uno de los mayores problemas de salud mundial por su impacto clínico y socioeconómico. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) el ictus es la tercera causa de muerte y la primera causa de discapacidad a largo plazo en los países desarrollados. Según la OMS, 15 millones de personas en todo el mundo sufren un ictus cada año, de ellas 5 millones mueren y otros 5 millones quedan discapacitados de forma permanente. De hecho, causa más muertes que el sida, la tuberculosis y la malaria juntas. Se calcula que cada 6 segundos alguien, en alguna parte del mundo, morirá por ictus (48). En España la incidencia global está entre 120-350 casos por 100.000 habitantes/año.

Se denomina Ictus al trastorno brusco del flujo sanguíneo cerebral que altera de forma transitoria o permanente la función de una determinada región del encéfalo. Como consecuencia se produce una disminución del aporte de oxígeno y glucosa al cerebro que son necesarios para su metabolismo (49). La interrupción del flujo sanguíneo da lugar a una alteración rápida del metabolismo y funciones cerebrales. Cuando esto ocurre en la región central del territorio vascular, se produce la muerte celular. Sin embargo, la zona adyacente a la interrupción del riego sanguíneo está hipoperfundida, y es en esta zona donde la alteración funcional celular es potencialmente reversible. Esta zona se denominada "*penumbra isquémica*". La "*penumbra isquémica*" constituye un territorio cerebral con un aporte sanguíneo comprometido, pero con un metabolismo energético preservado y, por tanto, potencialmente viable. Este conocimiento abre la posibilidad de poder actuar terapéuticamente para restablecer el funcionalismo cerebral (50).

INTRODUCCIÓN

Se sabe que el ictus requiere horas en su desarrollo, pero hay un tiempo denominado “*ventana terapéutica*”, durante el cual es posible dar un tratamiento trombolítico que disminuirá las secuelas clínicas o, inclusive, revertirá la lesión neurológica. Se considera que la duración de la “*ventana terapéutica*” es de 3 horas por lo que el diagnóstico de ictus ha de ser preciso y rápido. Por lo tanto, es necesario el reconocimiento inmediato de la gravedad de la situación clínica y el traslado urgente al hospital.

Actualmente, el diagnóstico definitivo del ictus isquémico se basa en una buena anamnesis y la confirmación por imagen mediante la tomografía computerizada (TC) y/o la resonancia magnética (RM). Esto implica tiempo y personal especializado, requisitos no siempre disponibles en todas las áreas de salud. Esta dificultad en el diagnóstico precoz quedaría resuelta con el hallazgo de un biomarcador o panel de biomarcadores séricos que fueran de expresión rápida, fáciles de medir, con buena sensibilidad y especificidad diagnósticas y que resulten económicos. Hoy en día, no existe ningún biomarcador que reúna estas características.

Pese a que en el campo del cáncer hay muchos estudios realizados en base a esta metodología, en el ictus hay pocos estudios científicos publicados basados en la comparación de perfiles peptídicos séricos (51). El estudio de perfiles peptídicos de pacientes con ictus isquémico puede ser una buena opción para el hallazgo de dichos biomarcadores.

2.

OBJETIVOS

2.1.-HIPÓTESIS PRINCIPAL

La hipótesis principal de los estudios incluidos en esta tesis es que el desarrollo de un protocolo estandarizado para el estudio de perfiles peptídicos séricos mediante la tecnología MALDI-TOF MS mejora la reproducibilidad de los resultados y puede ser una herramienta útil para la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico precoz.

En base a ello, en esta tesis nos hemos planteado los objetivos que se enumeran a continuación.

2.2.- OBJETIVOS CONCRETOS

- 1.- Desarrollar un protocolo estandarizado de las fases preanalítica, analítica y postanalítica optimizando dicho protocolo en base a los datos bibliográficos previos y a nuestra propia experiencia.
- 2.- Automatizar el proceso mediante un robot consiguiendo los mismos resultados óptimos.
- 3.- Evaluar el impacto del proceso de automatización en la reproducibilidad de los resultados.
- 4.- Estudiar la influencia del género y la edad en el perfil peptídico sérico humano.
- 5.- Aplicar el procedimiento desarrollado en esta tesis como un protocolo optimizado para el estudio de perfiles peptídicos séricos en la búsqueda de :
 - 5.1.- Biomarcadores de diagnóstico precoz en el cáncer de páncreas
 - 5.2.- Biomarcadores de diagnóstico precoz en el ictus isquémico

3.

MATERIAL Y MÉTODOS

En este capítulo se enumeran los diferentes factores que pueden influir en la reproducibilidad de los perfiles peptídicos séricos. Se tienen en cuenta las fases preanalítica, analítica y postanalítica con el objeto de desarrollar un protocolo optimizado y estandarizado para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico precoz.

1.- OPTIMIZACIÓN DE LA FASE PREANALÍTICA

Las muestras utilizadas en el estudio de optimización de la fase preanalítica procedían de dos voluntarios sanos (hombre de 43 años y mujer de 36 años). Todos los tubos de extracción empleados en la fase experimental fueron de la casa comercial BD Vacutainer™. Las muestras se alicuotaron (2 alícuotas de 100 µL) y congelaron a -80 °C. Por cada voluntario sano se descongelaron dos alícuotas de 100 µL para realizar un análisis por duplicado. A partir de cada muestra se depositaron dos réplicas sobre la placa de MALDI, procedentes de la mezcla de 1 µL de solución de elución y 1 µL de matriz 2,6-DHAP. De cada réplica se obtuvieron 2 espectros, por lo que al final se disponía de 4 espectros por voluntario sano.

1.1.- Obtención de los espectros mediante MALDI-TOF MS

Para el análisis de las muestras se utilizó un espectrómetro de masas Autoflex II de Bruker Daltonics, que utiliza la tecnología MALDI-TOF MS. Los espectros de perfiles peptídicos se obtuvieron mediante el software FlexControl 3.0 de Bruker Daltonics. La adquisición de dichos espectros se realizó manualmente en modo lineal siguiendo el protocolo

MATERIAL Y MÉTODOS

recomendado por la casa comercial. Se realizaron 2 adquisiciones por cada spot. En la tabla 3 se muestran las condiciones del equipo.

Tabla 3: Configuración del espectrómetro de masas Autoflex II para la adquisición de perfiles peptídicos.

Partes del Equipo	Configuración del Autoflex II
Presión de N ₂	1700 – 2000 mbar
Láser	Realizar 15 disparos previos al máximo de intensidad seguido de 100 disparos a intensidad media (60%).
Disparos	5 enfoques de 100 disparos cada uno. El espectro final era la suma de 500 disparos.
Espectrómetro	
Fuente de ionización 1	20 kV
Fuente de ionización 2	18.4 kV
Lentes	7.5 kV
Tiempo de extracción retardado	120 nsg
Polaridad	Positiva
Modo de supresión de matriz	ganancia
Fuerza de ganancia	Alta/máxima
Supresión hasta	800 Da
Detección	
Rango de Masas	900 – 15.000 Da
Ganancia del detector	1600 – 1800 V
Ratio de muestreo	1.00
Ganancia electrónica	Regular, 100 mV
Alisado a tiempo real	alta
Frecuencia del láser	50 Hz
Atenuación del láser	60/30

En cada serie analítica se utilizó un calibrador externo para poder ajustar las masas de los péptidos. Para abarcar todo el rango de masas de interés, se hizo una mezcla de dos calibradores (*“Peptide Calibration Standard II”* y el *“Protein Calibration Standard I”* de Bruker Daltonics). De esta forma se cubrió el rango de 750 a 17.000 Da. Cada uno de los calibradores se disolvió en 125 µL de TFA al 0,1%. Después se preparó una mezcla de 1 parte del calibrador *“Peptide Calibration Standard II”* con 4 partes del *“Protein Calibration Standart I”*. A partir de esta mezcla se realizaron alícuotas de 5 µL, que se congelaron a -80 °C siendo

de un solo uso. Una vez descongelada la alícuota se depositaba 1 μ L de la mezcla sobre la misma posición de calibración externa y 1 μ L de matriz. En la Tabla 4 se muestran los péptidos que contenía la mezcla de ambos estándares. El espectro del calibrador se obtuvo tras 500 disparos del mismo modo que el resto de las muestras.

Tabla 4: Péptidos contenidos en la mezcla de calibradores

Péptido	(M+H) Average (Da)
Bradiquinina 1-7	757.86
Angiotensina II	1047.19
Angiotensina I	1297.49
Sustancia P	1348.64
Bombesina	1620.86
Sustrato renina	1760.03
ACTH clip 1-17	2094.43
ACTH clip 18-39	2466.68
Somatostatina 28	3149.57
Insulina	5734.51
Ubiquitina I	8565.76
Citocromo C	12360.97
Mioglobina	16952.30

Mezcla de estándares: *peptide calibration standard II* y *protein calibration standar*.

En el estudio de la reproducibilidad de los resultados, se utilizaron las alícuotas de “Suero Control Humano” (SCH), suministrado por Sigma-Aldrich (Referencia: s7775), congeladas a -80°C. En cada serie analítica se descongeló una alícuota de SCH de 100 μ L, cuyo contenido se dividió en 2 alícuotas de 50 μ L cada una, para procesar por duplicado.

1.2.- Selección del tipo de muestra

Para elegir el tipo de muestra idónea, como ya se ha comentado, se recogieron dos muestras de sangre de dos voluntarios sanos. Una de las muestras se obtuvo con un tubo de 5 mL de suero sin gel separador ni activador de la coagulación (ref 367624, BD Vacutaniner™). La

MATERIAL Y MÉTODOS

segunda muestra se obtuvo con un tubo de 4 mL de plasma en tubo con EDTA K2E como anticoagulante (ref 368861, BD Vacutainer™). Las muestras de suero se dejaron coagular durante una hora a T.A. A continuación, tanto las muestras de suero como las de plasma se centrifugaron 10 minutos a 1500 xg y, por último, se separó el sobrenadante realizando 2 alícuotas de 100 µL que se congelaron inmediatamente a -80°C.

De cada voluntario sano se llevó a cabo el análisis de una alícuota de suero y otra de plasma que fueron descongeladas previamente a temperatura ambiente. Tras la homogenización, las muestras se sometieron a un proceso de pre-fraccionamiento con el kit MB-IMAC Cu de Bruker Daltonics™, que emplea partículas magnéticas funcionalizadas con cobre para unir selectivamente fosfoproteínas o fosfopéptidos de la muestra mediante cromatografía de intercambio iónico. Para realizar el prefraccionamiento, fue necesario modificar el protocolo recomendado por el fabricante ya que, el número de picos observados en el espectro era insuficiente en el rango de interés (800 – 4.000 Da).

Tras este paso de pre-fraccionamiento, la solución de elución enriquecida en los péptidos de interés se mezcló con la matriz 2,6-dihidroxiacetofenona (2,6-DHAP) a partes iguales. La mezcla se depositó sobre la placa de análisis del espectrómetro de masas y se dejó secar. Finalmente las muestras fueron analizadas mediante un espectrómetro de masas Autoflex II de Bruker Daltonics utilizando las condiciones previamente descritas.

Una vez obtenidos los espectros, estos fueron visualizados mediante el software FlexAnalysis 3.3.74 de Bruker Daltonics™ con el objetivo de valorar su calidad y proceder a la selección de aquellos que reuniesen las características más adecuadas para su posterior análisis estadístico.

1.3.- Tiempo de coagulación y temperatura

En un segundo paso, se analizó el efecto sobre el perfil peptídico sérico del tiempo que se dejaba coagular la muestra antes de su centrifugación. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente. Para la valoración del efecto del tiempo de coagulación y la temperatura, las muestras de los voluntarios sanos se obtuvieron en 4 tubos de suero sin gel separador. Cada uno de los tubos se dejó coagular a tiempos diferentes: 30, 60, 120 y 180 minutos, y a T.A.. Pasados los tiempos establecidos, tras centrifugación, se obtuvieron 2 alícuotas de 100 µL que fueron congeladas inmediatamente a - 80°C. Para realizar el análisis de las muestras, por cada voluntario sano, se descongelaron a temperatura ambiente y simultáneamente, las alícuotas correspondientes a los diferentes tiempos de coagulación. Tras la descongelación, las muestras se homogenizaron, se pre-fraccionaron con el kit MB-IMAC Cu y se analizaron mediante el equipo Autoflex II, utilizando como matriz la 2,6-DHAP, tal y como se ha descrito anteriormente.

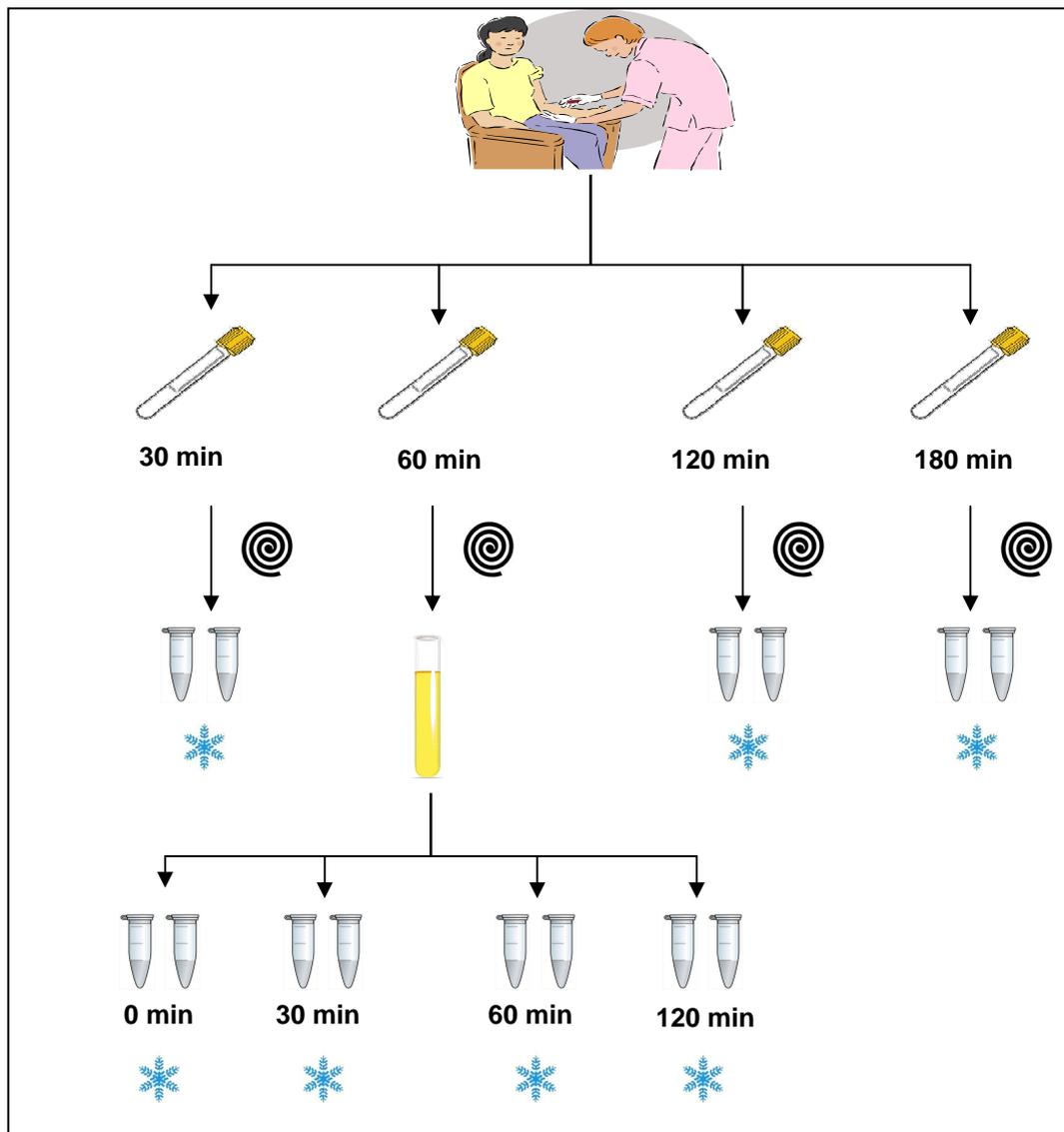
Otro factor pre-analítico que se valoró fue el efecto sobre el perfil peptídico del tiempo transcurrido desde la separación del suero haciendo una alícuota, hasta que dicha alícuota se congeló a -80 °C. Nuevamente se utilizó el suero de los controles sanos. Una vez dejados coagular 60 minutos a TA, los sueros se centrifugaron en las condiciones establecidas anteriormente. A partir de ese momento, de cada tubo se obtuvieron 2 alícuotas de 100 µL a diferentes tiempos: 0, 30, 60 y 120 minutos. Las alícuotas se almacenaron a -80 °C hasta su posterior análisis.

Previamente al procesamiento de las muestras, se descongeló a T.A. y a la vez una alícuota de cada uno de los cuatro tiempos. Una vez homogenizadas, las muestras se pre-fraccionaron con el kit MB-IMAC Cu y fueron analizadas en el espectrómetro de masas

MATERIAL Y MÉTODOS

Autoflex II. Se utilizó la matriz 2,6-DHAP, tal y como se ha descrito previamente. En la figura 6 se muestra un esquema del procedimiento seguido para la recogida de alícuotas a partir de la muestra de suero de un voluntario sano.

Figura 6: Esquema del procedimiento de recogida de alícuotas de suero para el estudio del efecto del tiempo de coagulación y temperatura.



tubo de suero, centrifugación, alícuota de 100 µL, tubo con suero separado del coágulo, congelación a -80°C.

1.4.- Almacenamiento y ciclos de congelación-descongelación

Para evitar problemas asociados al efecto de los ciclos de congelación/descongelación, una vez extraído el tubo de suero de cada paciente del estudio, se realizaron 6 alícuotas: 3 de 500 μ L y otras 3 de 100 μ L. De esta forma se disponía de alícuotas suficientes para no reutilizar ninguna de ellas una vez descongeladas.

2.- OPTIMIZACIÓN DE LA FASE ANALÍTICA

Las muestras utilizadas en el proceso de optimización de la fase analítica fueron alícuotas realizadas a partir de la reconstitución de un material control liofilizado “Suero Control Humano” de Sigma Aldrich (SCH). Este material control se reconstituyó y almacenó congelado a -80°C en forma de alícuotas de 100 μ L cada una. Las alícuotas se descongelaron a T.A. y homogeneizaron antes de su procesamiento.

2.1.- Prefraccionamiento de las muestras

Antes del análisis de las muestras de suero se realizó el prefraccionamiento de las mismas para eliminar las sales y seleccionar el subproteoma de interés. Se probaron dos tipos de extracción en fase sólida, ambos basados en partículas magnéticas funcionalizadas de distinta forma. Por un lado se probaron partículas magnéticas funcionalizadas con cadenas hidrocarbonadas de pequeño tamaño (C8) (Profiling Kit MB HIC 8, Bruker Daltonics™), que retienen proteínas/péptidos mediante cromatografía en fase reversa. Por otro lado, se probaron partículas magnéticas funcionalizadas con cobre (Cu) (Profiling Kit MB-IMAC Cu,

MATERIAL Y MÉTODOS

Bruker Daltonics™), que retienen fosfoproteínas/fosfopéptidos mediante cromatografía de afinidad. El cobre captura las proteínas/péptidos fosforilados a través de la interacción entre la carga negativa del grupo fosfato y el ión Cu^{2+} . Con el kit MB-HIC8 se realizaron diversas pruebas combinando distintas matrices, soluciones de elución, soluciones de lavado y tiempos de incubación. Se pretendía encontrar la combinación que diera los espectros con mayor número de picos, sobre todo en el rango analítico de 1000 – 4000 Da. Se probaron diversas combinaciones de soluciones de elución, matriz y tiempos de incubación, con la finalidad de atenuar al máximo las intensidades de los picos mayoritarios, permitiendo visualizar otras PBM presentes en ese rango analítico. Una vez elegida la mejor combinación, ésta se probó con el kit MB-IMAC Cu y se compararon los espectros obtenidos por ambos kits. En la Tabla 5 se describen todas las combinaciones que se evaluaron con el kit MB-HIC8.

Tabla 5: Combinaciones realizadas durante el proceso de optimización de la fase analítica.

Matriz	Solución de Elución			T. incubación	Mezcla M + E	Solución de Lavado	NH4 0,5M pH 4,5
	ACN %	TFA %	Volumen				
HCCA 0,3 mg/mL 1:Acetona/2: EtOH	50		10		5/2 → 0,3 µL		
HCCA 0,3 mg/mL 1:Acetona/2: EtOH	50		10		5/2 → 0,6 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 1:Acetona/2: EtOH	50		10		5/2 → 0,3 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 1:Acetona/2: EtOH	50		10		5/2 → 0,6 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 1:Acetona/2: EtOH	50		10		10/1 → 0,5 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 1:Acetona/2: EtOH	50		10		0,5 µL + 0,5 µL		
2,5 DHB 5 mg/mL en ACN 20% y 0,1%TFA	50		10		1 µL + 1 µL		
2,5 DHB 10 mg/mL en ACN 20 % y 0,1%TFA	50		10		1 µL + 1 µL		
2,6 DHAP 1mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	50		10		1 µL + 1 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	70		8		10 µL + 2 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	70		8		10 µL + 1 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	50		8		10 µL + 2 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	50		8		10 µL + 1 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	30		8		10 µL + 2 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	30		8		10 µL + 1 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	15		8		10 µL + 1 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	40		8		10 µL + 1 µL		
HCCA 1,8 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	20		8		10 µL + 1 µL		
2,6 DHAP 1mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	40		8		1 µL + 1 µL		
2,6 DHAP 1mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	20		8		1 µL + 1 µL		
HCCA 0,3 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	20	0,10	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,3 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	40	0,10	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,3 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	60	0,10	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		

MATERIAL Y MÉTODOS

Solución Matriz	Solución de Elución			t. incubación	Combinación M + E	Solución de Lavado	TCADB 0,5M; pH= 4,5
	ACN %	TFA %	Volumen				
HCCA 0,3 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	70	0,10	10		M: Sol. Matriz E: Sol. Elución		
HCCA 0,6 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	20	0,10	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	30	0,10	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	40	0,10	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	50	0,10	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	70	0,10	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	30	0,50	10	1 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	30	0,50	10	1,5 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	40	0,50	10	1 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,6 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	40	0,50	10	1,5 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,9 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	20	0,50	10	1 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,9 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	20	0,50	10	1,5 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,9 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	30	0,50	10	1 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,9 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	30	0,50	10	1,5 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,9 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	40	0,50	10	1 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,9 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	40	0,50	10	1,5 min.	10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL		
HCCA 0,9 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	50	0,50	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL	TFA 0,1%	
HCCA 0,9 mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	50	0,50	10		10/1 → 1 µL y 1 µL+1 µL	TFA 0,1%/ACN 10%	
2,6-DHAP 1mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	50	0,50	10	30 seg.	1 µL +1 µL	WS comercial	
2,6-DHAP 1mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	70	0,50	10	30 seg.	1 µL +1 µL	WS comercial	
2,6-DHAP 1mg/mL 20% ACN y TCADB 0,5 M pH 4,5	30	0,10	10	30 seg.	1 µL + 1 µL	Agua purificada	0,08%

HCCA: ácido α-ciano-4-hidroxi-cinámico, DHAP: ácido 2,6-dihidroxi-acetofenona, ACN: acetonitrilo, TCADB: tampón citrato de amonio dibásico, TFA: ácido trifluoroacético, M: solución Matriz, E: solución de elución, WS. Solución de lavado o "washing solution.

El protocolo de prefraccionamiento recomendado por la casa comercial fue optimizado variando las soluciones de lavado y elución así como el tiempo de incubación de la solución de elución. También se optimizó la elección de los solventes orgánicos en los que se disolvió la matriz, así como la proporción de los mismos y la concentración final.

Los pasos que se siguieron fueron los siguientes:

- Lo primero que se probó fue la matriz HCCA a diferentes concentraciones desde 0,3 mg/mL hasta 1,8 mg/mL disuelta en una parte de acetona y dos de etanol, como solución de elución se utilizó 10 μ L de ACN al 50%. También se probaron diferentes combinaciones de volumen de matriz y extracto así como el volumen final que se depositaba en la placa Anchor Chip. Sin embargo no se consiguieron espectros de la calidad adecuada en cuanto a intensidad y número de picos.
- Como solución de elución se probó el ACN a distintas concentraciones (desde un 15 hasta un 70 %) y se probó la combinación del ACN con TFA al 0,1 %, 0,5 % y 1%. Se observó que a medida que aumentaba el % de ACN en la solución de elución, en el espectro final se observaba una mayor intensidad de los péptidos más pequeños (≤ 1000). También se vio que a mayor % de TFA en el espectro final, los péptidos entre 800 – 2000 Da presentaban una mayor intensidad y los comprendidos entre 6000 – 9000 Da tenían una menor intensidad. La combinación que dio mejores espectros fue la utilización de matriz HCCA a 0,9 mg/mL con la solución de elución al 50% de ACN y 0,5% de TFA.
- El principal problema de los espectros era el apantallamiento producido por las señales que aparecían a 1467 Da, 1352 Da y 905 Da que presentaban una gran intensidad. Se realizaron pruebas para intentar disminuir la intensidad de estos picos y para ello se disminuyó el volumen de solución de elución de 10 μ L a 8 μ L

para concentrar más los péptidos del eluido y así obtener más señal de las proteínas de bajo peso molecular. Sin embargo, no se obtuvo ninguna mejora ya que de la misma forma que se concentraban las proteínas de bajo peso molecular, también se concentraban los productos que generaban las señales anteriormente mencionadas en los espectros de masas, por lo que se dejó 10 μ L como volumen de la solución de elución.

- También se probó si disminuyendo el tiempo de incubación de la solución de elución con las bolas magnéticas unidas a péptidos, se conseguía disminuir la intensidad de los péptidos predominantes. No se observó ninguna mejoría en la calidad de los espectros, por lo que el tiempo de incubación de la solución de elución se mantuvo a 5 minutos.
- Otro paso de optimización del protocolo fue la sustitución de la solución de lavado comercial que proveía el kit comercial por una solución de lavado conocida. Se probó con TFA al 0.1% y la combinación TFA 0,1%/ACN 10%, esta última mostró una ligera disminución en la intensidad del péptido 1467 Da en el espectro final.
- Tras la optimización del protocolo utilizando la matriz HCCA, se probó el mismo protocolo con la matriz 2,6-DHAP a la concentración de 1 mg/mL disuelta en una solución al 20% de ACN y citrato de amonio dibásico 0,5 M, pH 4,5. Como solución de elución se probaron varias combinaciones cambiando la proporción de ACN a distintos %, se combinó con TFA al 0,5 % y 0,1 % y también se probó el adicionar 0,08% de citrato de amonio dibásico 0,5 M, pH 4,5. El volumen de solución de elución que se adicionaba a las bolas magnéticas cargadas con péptidos fue de 10 μ L y se dejó un

tiempo de incubación de 5 minutos. Como solución de lavado se probó la solución comercial y agua purificada para HPLC. Los mejores espectros se obtuvieron al utilizar la solución de elución con ACN al 30%, 0,1% de TFA y 0,08 % de citrato de amonio dibásico.

2.2.- Selección de la matriz

Con el fin de utilizar la matriz que mejor resultados podía proveer se probaron tres matrices a concentraciones diferentes y se compararon los espectros obtenidos. Las matrices valoradas fueron:

1.- El ácido α -ciano-4-hidroxi-cinámico (HCCA): a concentración 0,3 mg/mL, 0,6 mg/mL, 0,9 mg/mL y 1,8 mg/mL usando como solvente acetona/etanol en proporción 1:2.

2.- El ácido 2,5-dihidroxi-benzoico (2,5-DHB): a concentración de 5 mg/mL y 10mg/mL usando como solvente acetonitrilo (ACN) al 20% y ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1 %.

3.- El ácido 2,6-dihidroxi-acetofenona (2,6-DHAP): a concentración de 1 mg/mL y 3 mg/mL usando como solvente el ACN al 20% y 8% de citrato de amonio dibásico al 0,5 M y pH de 4,5. La elección de los solventes utilizados en la disolución de la matriz se hizo en base a lo descrito anteriormente en el trabajo de Callesen *et al.* (17).

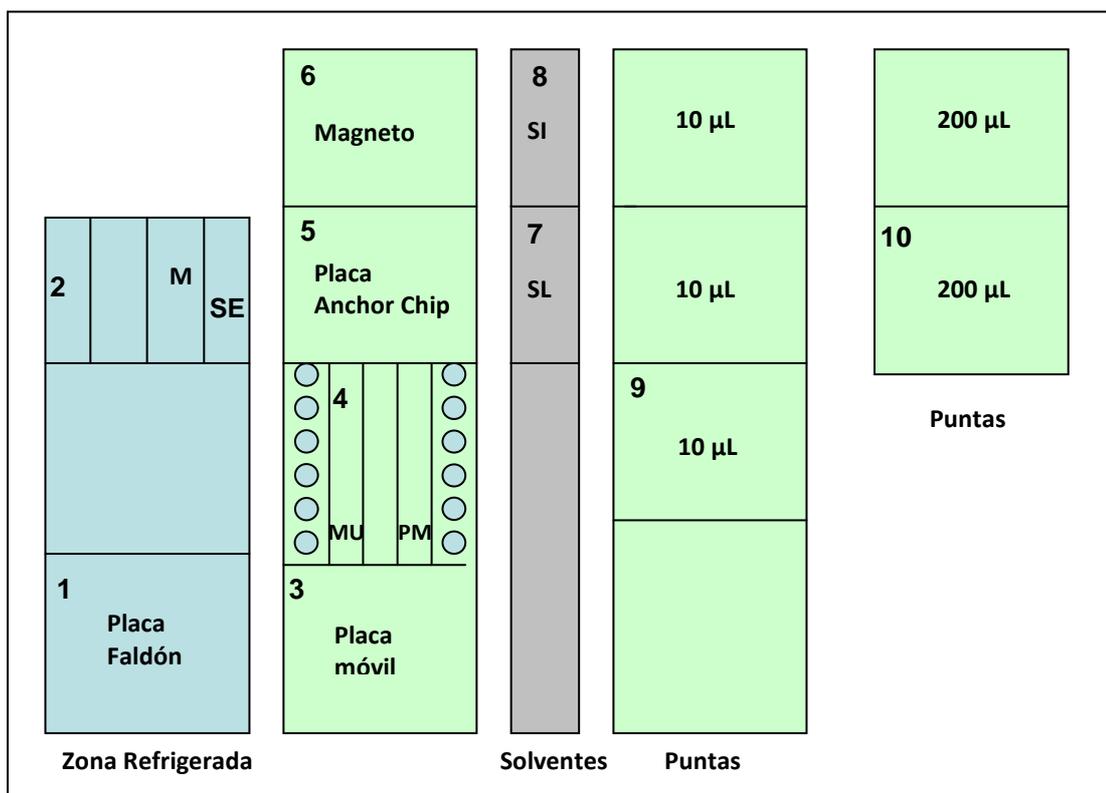
Las matrices se disolvieron, como se ha indicado, en solventes orgánicos susceptibles de evaporación. Para evitar diferencias de concentración en las disoluciones debidas a procesos de evaporación, las matrices se prepararon antes de cada serie analítica y se conservaron refrigeradas hasta el momento de su utilización.

2.3.- Automatización de la fase analítica

Como se ha expuesto anteriormente (capítulo 2) uno de los objetivos de la presente tesis es la automatización de la fase analítica para conseguir minimizar la variabilidad de los resultados y aumentar el rendimiento del proceso. El proceso de pretratamiento y el de mezcla del eluido con la matriz se automatizó mediante la utilización del sistema robotizado Freedom Evoware de Tecan (Männedorf, Switzerland). La programación de este sistema robotizado se realizó de forma personalizada. Para trabajar con el robot se utilizaron placas de 96 pocillos de forma cónica (Thermo-Fast 96 PCR, ABGENE®). En esta placa se realizó todo el proceso de pre-fraccionamiento de las muestras. El robot empleaba puntas de 200 μL y de 10 μL para poder aspirar o dispensar volúmenes desde 1 μL hasta volúmenes de 100 μL .

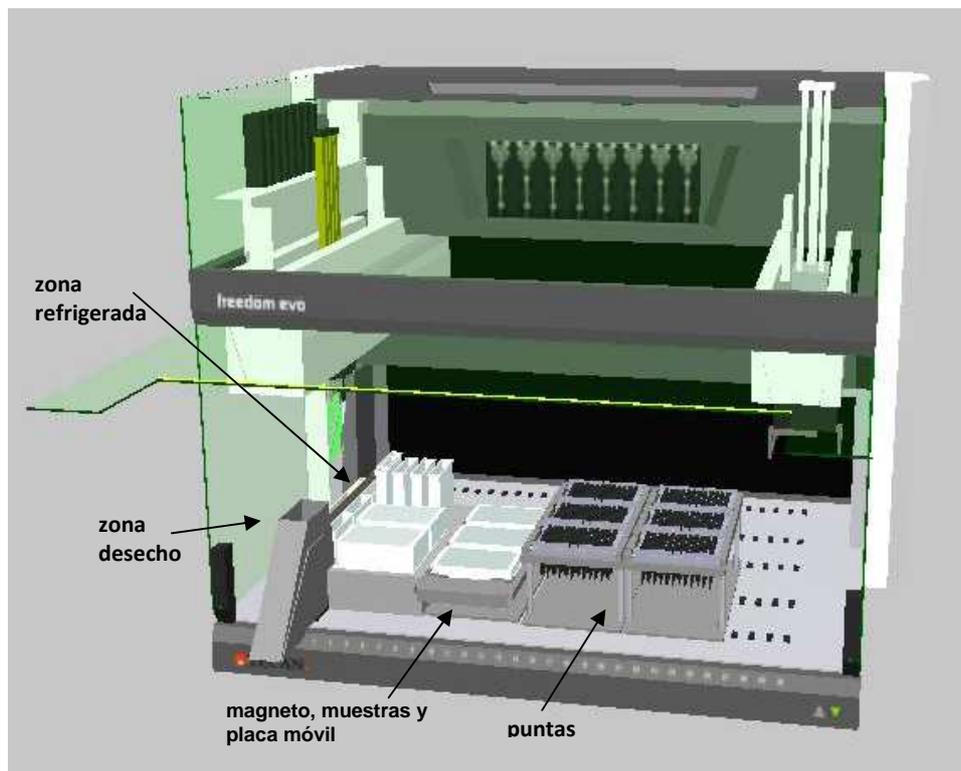
La mesa de trabajo del robot (ver figuras 7 y 8) constaba de una parte refrigerada donde se depositaban, en contenedores desechables, las soluciones de elución y matriz para evitar la evaporación de los solventes orgánicos. Además, en esta zona reposaba la placa durante el proceso de incubación con la solución de elución. En otra fila se situaba la zona de reposo de la placa de 96 pocillos, el soporte de las alícuotas de muestras y partículas magnéticas, el “magneto” (placa magnética de soporte) y la placa AnchorChip™, donde finalmente se depositaba la matriz y la solución de eluido que contenía los analitos. En otra fila se situaban las zonas de desecho tanto de solventes como de puntas, y los contenedores con las soluciones de lavado y el tampón de incubación. Por último, en la mesa de trabajo se disponía de dos filas de puntas de 10 μL y 200 μL (Liquid Handling Disposable Tips- Standard Tray ref. 10612516 y 30000627) de Tecan. Las figuras 7 y 8 muestran el esquema de la mesa de trabajo del robot así como la disposición de todos los elementos.

Figura 7: Esquema de la mesa de trabajo del Robot Freedom Evo Ware de Tecan.



1) Soporte Placa: zona de reposo de la placa; 2) M: matriz y SE: solución de elución; 3) Placa Móvil: placa donde se realiza el proceso de pre-fraccionamiento; 4) MU: muestras, PM: partículas magnéticas; 5) Placa Anchor Chip: placa para análisis en MALDI; 6) Magneto: placa magnética con zonas imantadas; 7) SL: solución de lavado; 8) SI: solución de incubación; 9) Zona de puntas de 10 µL; 10) Zona de puntas de 200 µL.

Figura 8: Representación en 3D de la disposición de la mesa de trabajo del robot.



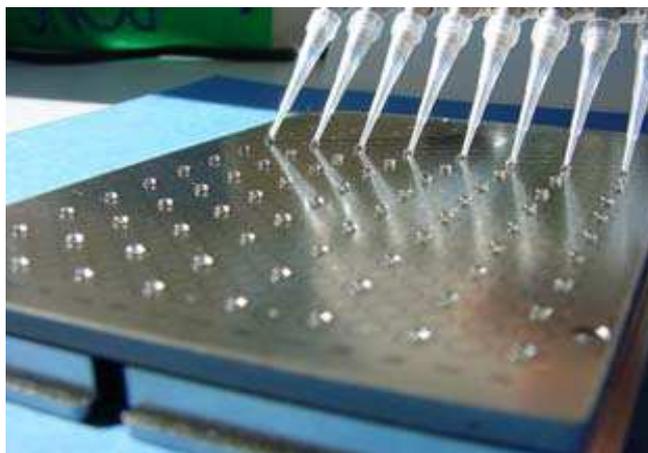
El robot dispone de un brazo de 8 puntas y otro en forma de pinza para coger y mover las placas. Al final del procesamiento de una fila de 8 muestras se consumía un total de 104 puntas de 10 μL y 64 puntas de 200 μL .

La automatización de la fase analítica permitió aumentar la velocidad y el volumen de muestras procesadas. Sin embargo, una vez procesadas, las muestras depositadas y secadas sobre la placa del MALDI se analizaron antes de que transcurrieran 24 horas para evitar su deterioro. Dado que la cristalización con la matriz 2,6-DHAP proporciona una muestra no homogénea en la placa del MALDI, no se pudo hacer una adquisición de espectros automatizada teniendo que hacerse manual para seleccionar las zonas de disparo con el láser.

Debido a ello, el número máximo de muestras que se podían procesar en un día se fijó en 32, distribuidas de la siguiente forma: 2 alícuotas de control interno (suero control humano de Sigma Aldrich (Sigma cat. nº S7023) y 10 pacientes de estudio cuyas muestras se analizaron por triplicado descongelando tres alícuotas de 100 μ L. Al final del proceso de extracción peptídica o pretratamiento, el robot depositaba 1 μ L del eluido sobre la placa soporte, y seguidamente depositaba sobre esa gota 1 μ L de matriz. La placa se dejaba evaporar a temperatura ambiente y, una vez seca, se analizaba mediante el MALDI TOF MS.

Como placa soporte se empleó una placa AnchorChip™ de 400 μ m de Bruker Daltonics. Se eligió la placa AnchorChip™ por la peculiaridad de que presenta una superficie hidrofóbica y unos “anillos” con propiedades hidrofílicas. Con estas características lo que se consigue es repeler las soluciones acuosas y solventes orgánicos formando unas gotitas que se concentran en la superficie hidrofóbica favoreciendo el enriquecimiento de los péptidos en el centro del anillo. En la figura 9 y 10 se muestra una placa Anchor Chip y su propiedad hidrofóbica.

Figura 9: placa Anchor Chip.



Gotas formadas por 1 μ l de eluido y 1 μ L de matriz.

Figura 10: Proceso de cristalización de una matriz en una placa Anchor Chip.



Imagen tomada de <http://www.ms-textbook.com/>

El tamaño del Anchorchip dependerá del tipo de matriz utilizada. En nuestro caso se eligió un anchor de 400 μm que es el recomendado para matrices solubles en agua. Además, las placas AnchorChipTM de 200-400 μm son las que poseen una mejor sensibilidad ya que necesitan menos cantidad de matriz, obteniendo un mayor rendimiento analito/matriz.

3- ANÁLISIS DE DATOS

3.1.- Pre-procesamiento de los datos

Tras la obtención de los espectros con el software Flexcontrol (Bruker Daltonics) los espectros se visualizaron con el software FlexAnalysis 3.3.74 (Bruker Daltonics). Cada muestra de paciente se analizó por triplicado dando lugar a tres spots. De cada spot se realizaron dos adquisiciones obteniéndose un total de seis espectros por muestra de paciente. En el caso de las muestras SCH, se analizaron por duplicado dando lugar a dos spots. De cada spot se realizaron tres adquisiciones, siempre que fuera posible, para así obtener un total de seis espectros al igual que con las muestras de pacientes.

Mediante el software FlexAnalysis, se visualizaron de forma simultánea los seis espectros obtenidos de cada muestra de paciente y se seleccionaron los 4 de mejor resolución.

Tras la selección de los espectros que se iban a utilizar en el análisis estadístico, se realizó un paso previo de preprocesamiento para estandarizar dichos espectros. En este paso se utilizó el software ClinProTools 2.2 (Bruker Daltonics) con el cual se realizaron las siguientes acciones:

- substracción de la línea de base. El punto de corte de la relación señal/ruido se fijó en 5.
- normalización de los espectros
- recalibración: a partir de un calibrador externo.

3.2.- Análisis estadístico de los datos.

Una vez estandarizados todos los espectros, el siguiente paso fue realizar un análisis estadístico de los mismos comparando los espectros de los grupos de interés. Para ello se utilizó la herramienta *“peak statistic report”* del software ClinProTools. Dicha herramienta genera un resumen que contiene: el número de picos detectados, su masa, la media del área de cada pico para cada grupo del estudio, la diferencia entre dichas medias, la desviación estándar de la media del área de cada pico en cada grupo de estudio, el valor p de t-test (si la distribución de la variable es normal), el valor p del test de Wilcoxon (si la distribución de la variable no es normal) y el valor p del test de Anderson-Darling que nos indica si la distribución es normal o no. En dicho informe se ordenan de mayor a menor significación estadística todos picos que habían sido

detectados en el espectro. Un ejemplo de “*Peak statistic report*” se puede ver en la Figura 11.

Figura 11: ClinProt Peak Statistic I.lq vs C.S. 0 horas.

ClinProt Peak Statistic												
												
ClinProTools Version: 2.2 build 80												
Number of peaks: 300												
Sort Mode: p value wkw												
S	Index	Mass	DAve	PTTA	PWKW	PAD	Ave1	Ave2	StdDev1	StdDev2	CV1	CV2
X	74	3264.49	26.04	< 0.000001	< 0.000001	0.18	12.63	38.67	9.14	14.17	72.36	36.64
X	47	2155.24	2.12	0.00000691	< 0.000001	< 0.000001	3.18	1.06	1.96	0.8	61.66	75.7
X	39	1929.02	5.99	0.00145	< 0.000001	< 0.000001	6.94	0.96	9.26	0.26	133.39	26.95
X	130	5755.5	0.59	< 0.000001	< 0.000001	< 0.000001	0.22	0.81	0.12	0.54	54.29	67.19
X	73	3193.47	12.04	< 0.000001	< 0.000001	0.269	6.58	18.63	5.35	6.7	81.24	35.95
X	57	2555.08	6.93	0.0000354	< 0.000001	< 0.000001	10.73	3.8	6.91	4.5	64.4	118.49
X	36	1822.21	2.47	0.00854	< 0.000001	< 0.000001	3.63	1.16	4.72	0.47	130.16	40.71
X	88	3953.88	19.99	< 0.000001	< 0.000001	0.0000113	7.17	27.16	8.02	13.55	111.94	49.87
X	50	2272.23	5.24	0.000312	< 0.000001	< 0.000001	6.68	1.45	6.86	0.71	102.68	49.42
X	134	5906.67	4.87	< 0.000001	< 0.000001	< 0.000001	1.14	6.02	1.53	4.82	134.06	80.12
X	114	5006.26	1.44	0.00026	< 0.000001	< 0.000001	1.83	0.39	1.84	0.24	100.61	61.8
X	32	1692.91	3.63	0.00299	< 0.000001	< 0.000001	4.84	1.21	6.06	0.49	125.33	40.5
X	45	2091.09	6.55	0.00306	< 0.000001	< 0.000001	8.16	1.62	10.92	2.13	133.81	132.13
X	34	1779.47	5.23	0.000265	< 0.000001	< 0.000001	6.89	1.66	6.72	0.61	97.49	36.84

Index: índice de los picos; Mass: masa en Daltons de los picos detectados; DAve: diferencia entre el máximo y el mínimo del área media del pico/ intensidad de todos los picos; PTTA: valor “p” según la t-test; PWKW: valor “p” según test Wilcoxon para distribuciones no normales; PAD: valor “p” del test de Anderson-Darling da información sobre la distribución (0: distribución no normal, 1: distribución normal); AveN: área del pico/media de la intensidad para la clase N; StdDevN: desviación estándar del AveN; CVN: coeficiente de variación en % de la clase N. Los 10 picos marcados en azul son los estadísticamente más significativos.

A partir del informe del “*peak statistic report*” los datos de las masas de los picos y la media de las áreas de los picos de cada grupo de interés se exportaron en un fichero de texto en formato XML y se adicionó una columna donde se indicó de forma numérica a qué grupo de estudio pertenecían las muestras (0: sanos, 1: enfermos).

Para el estudio de la reproducibilidad de los resultados, se utilizaron los datos procedentes de las muestras de suero control humano (SCH). Estas muestras se analizaron de forma manual y automatizada con el fin de comparar la reproducibilidad obtenida por ambos métodos. El análisis de la reproducibilidad se hizo mediante el cálculo del coeficiente de variación a partir de las áreas de cada uno de los picos (m/z) obtenidos en el espectro.

También se analizó la influencia del género y la edad en los perfiles peptídicos. Para ello se analizaron los espectros obtenidos en el grupo de voluntarios sanos que fueron un total de 56 (18 hombres y 38 mujeres) con una edad media de 46 (17 – 85) años. Los espectros analizados contenían un total de 273 picos. La media del área de cada pico (m/z) se comparó entre los grupos de ambos sexos usando el método estadístico t-test ya que se trataba de comparar dos grupos de distribución normal. Por otro lado, para valorar la relación entre la media del área de los picos y la edad se utilizó el coeficiente de correlación de Pearson. Este es un índice que mide la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas. A diferencia de la covarianza, la correlación de Pearson es independiente de la escala de medida de las variables. El coeficiente de correlación entre dos variables aleatorias X e Y es el resultado del cociente de su covarianza dividido por el producto de las desviaciones estándar de ambas variables:

$$R = \frac{\sigma_{XY}}{\sigma_X \cdot \sigma_Y}$$

Donde σ_{XY} es la covarianza de (X, Y) y σ_X y σ_Y las desviaciones típicas de las distribuciones marginales.

3.2.1. Diseño de un Modelo Estadístico

Para el análisis de los datos obtenidos tras la aplicación del protocolo estandarizado a los dos estudios clínicos (cáncer de páncreas e ictus isquémico) se decidió no utilizar las herramientas del software ClinProTools, ya que se trata de un software cerrado y cuyo funcionamiento no se conoce en profundidad.

Se diseñó un modelo de regresión logística binaria a partir del software SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, Ill). Dicho modelo, utilizaba como variables estadísticas la media de las áreas de los picos para cada uno de los grupos del estudio. A partir del informe del "Peak Statistic Report" se seleccionaron los 10 picos estadísticamente más significativos según la p del test de Wilcoxon ya que los datos de la variable presentaban una distribución no normal según la p de Anderson-Darling. En el modelo estadístico no se utilizaron todos los péptidos estadísticamente significativos, para evitar incluir demasiadas variables en el modelo y con ello evitar "ruido estadístico de fondo". Dicho modelo estadístico realizaba combinaciones con el objetivo de encontrar el panel que, con el menor número de picos, pudiera discriminar entre los grupos de estudio con una mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica. La combinación de péptidos se realizó mediante el método de pasos hacia atrás (razón de verosimilitud), es decir, el modelo partía de la combinación de los 10 picos seleccionados e iba realizando combinaciones quitando cada vez un pico (el menos significativo), hasta quedarse con la combinación que con menor número de picos

tuviera la mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica. Antes de aplicar el modelo estadístico a los datos de la media de las áreas de los picos, estos se transformaron a escala logarítmica para obtener una distribución gaussiana. Las diferencias entre los grupos de estudio se calcularon utilizando el test de la χ^2 para variables categóricas y el t-test para variables continuas. Una vez seleccionado el panel de biomarcadores, se calculó su curva ROC para obtener el área bajo la curva o *area under the curve* (AUC) junto con su intervalo de confianza del 95%.

4.- RECLUTAMIENTO DE LOS PACIENTES

4.1.- Controles sanos

Desde el servicio de extracciones del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau se seleccionaron los candidatos a ser controles sanos (C.S.) mediante un cuestionario previo que recogía datos demográficos y clínicos. Se descartaron las personas que presentaban enfermedad cardiovascular y/o tumoral.

El reclutamiento se realizó siempre a la misma hora, entre las 8:00 y las 9:00 de la mañana. La extracción de muestras fue realizada por la misma extractora y los tiempos de extracción fueron tenidos en cuenta para que los tubos de suero no se dejaran coagular durante más de 60 minutos.

4.2.- Estudio de cáncer de páncreas

Se incluyeron un total de 47 pacientes diagnosticados de cáncer de páncreas por el Servicio de Gastroenterología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau entre Enero de 2007 y Diciembre de 2008. El diagnóstico de cáncer de páncreas se confirmó histopatológicamente en todos los casos.

Simultáneamente se reclutaron aleatoriamente un total de 55 pacientes con pancreatitis crónica. El diagnóstico de pancreatitis crónica se realizó en base a la presencia de al menos uno de los siguientes criterios:

- Dolor abdominal crónico y/o calcificaciones pancreáticas.
- Dolor abdominal y figuras morfológicas de distorsión en pancreatografía ductal
- Insuficiencia pancreática exocrina
- Observación de cambios histopatológicos en casos en los cuales la resección quirúrgica fuese indicada.

4.3.- Estudio de ictus isquémico

Se incluyeron un total de 45 pacientes que fueron diagnosticados de ictus isquémico (I.Iq.) por el servicio de neurología del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Estos pacientes llegaron al servicio de urgencias del hospital con síntomas de déficit neurológico agudo de menos de 6 horas de evolución desde el comienzo de los síntomas. Además presentaban una puntuación según las escala *del National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)* mayor o igual a 5. El diagnóstico de I.Iq. fue confirmado además por neuroimagen mediante tomografía computerizada o resonancia magnética.

A 22 de los 45 pacientes de I.Iq. se les administró terapia trombolítica con el activador del plasminógeno (tPA). En el resto de pacientes no se administró ningún tratamiento trombolítico debido a la recuperación espontánea, el ingreso con más de 3 horas desde el comienzo de los síntomas, o bien por tratarse de un déficit neurológico menor.

Por otro lado, se reclutaron un total de 18 pacientes que llegaron al servicio de urgencias con una enfermedad neurológica aguda (E.N.A.) pero cuyo diagnóstico final no fue ictus isquémico. El diagnóstico de estos pacientes se realizó desde el servicio de neurología y los pacientes que se incluyeron fueron:

- 2 accidentes isquémicos transitorios con síntomas de déficit neurológico de menos de 1 hora y neuroimagen negativa.
- 9 hemorragias intracerebrales (8 intracraneales y 1 subaracnoidea) confirmado por neuroimagen.
- 1 traumatismo craneoencefálico sin presencia de hematoma intra o extraparenquimal.
- 1 infarto de miocardio
- 5 crisis

A todos los pacientes de ambos grupos (I.Iq. y E.N.A.) se les extrajo muestras a tres tiempos: en el momento del ingreso antes de poner el tratamiento (tiempo 0 horas), a las 6 horas y a las 24 horas post-ingreso.

En ambos estudios, tanto voluntarios sanos como pacientes, firmaron un consentimiento informado para poder utilizar sus muestras. El estudio fue aprobado por el Comité Ético del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.

4.

RESULTADOS

1.- PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE LA FASE PREANALÍTICA

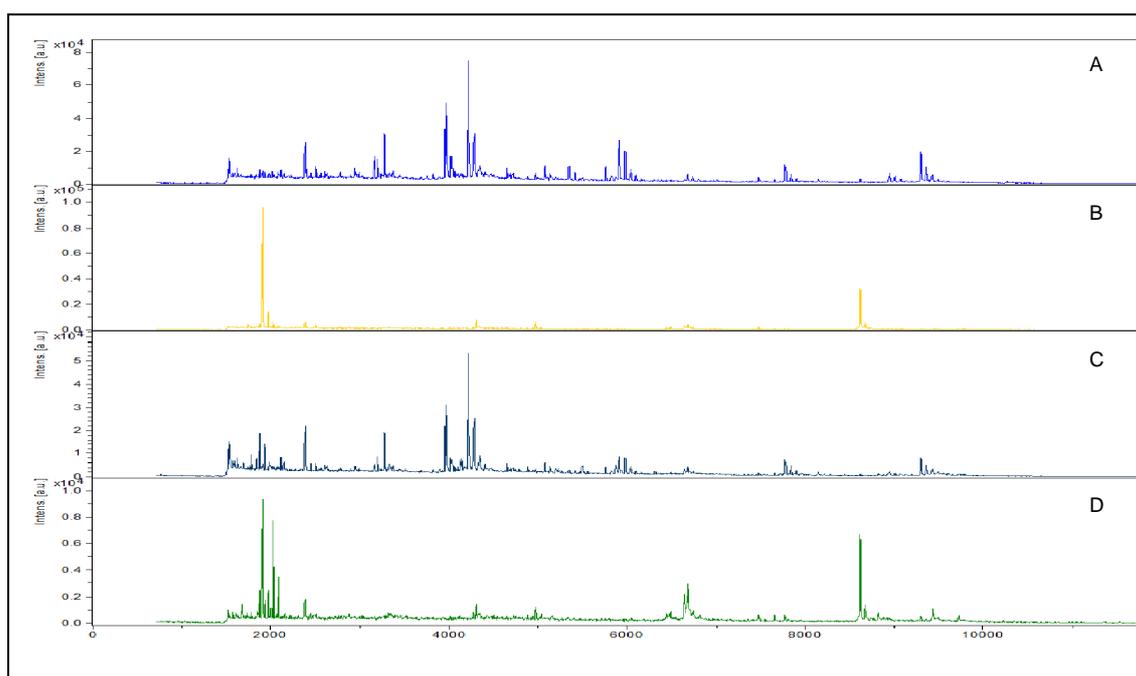
1.1.- Selección del tipo de muestra: suero o plasma

La sangre es el fluido ideal para la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico ya que está en contacto directo con todos los órganos y así alberga proteínas que un órgano específico puede expresar en condiciones patológicas concretas. La elección del tipo de muestra (suero o plasma) influye en la variabilidad de los perfiles peptídicos. La comunidad científica no se pone de acuerdo en cuál de los dos tipos de muestra es mejor, por lo que antes de iniciar nuestro estudio, se realizó una parte experimental con la finalidad de comparar los perfiles peptídicos, y elegir el tipo de muestra que nos diera los espectros de mejor calidad. Para ello se partió de muestras de dos voluntarios sanos tal como se ha comentado en el capítulo anterior.

Tras el prefraccionamiento de las muestras de suero y plasma correspondientes a los dos voluntarios sanos, las mismas se analizaron por MALDI-TOF MS bajo condiciones idénticas. Una descripción más detallada del proceso y condiciones utilizados está descrita en el capítulo de Material y Métodos. Adicionalmente la Figura 6 muestra de forma esquematizada el flujo de trabajo llevado a cabo. En la Figura 12 se muestra un ejemplo de los espectros obtenidos tanto para suero como para plasma de los dos voluntarios.

RESULTADOS

Figura 12: Espectros obtenidos a partir de muestras de suero y plasma de dos voluntarios sanos.



Espectro obtenidos a partir del prefraccionamiento realizado con bolas magnéticas IMAC-Cu y el uso de la matriz 2,6-DHAP. A: Muestras de suero del voluntario 1; B: Muestra de plasma del voluntario 1; C: Muestra de suero del voluntario 2; D: Muestra de plasma del voluntario 2.

Cuando se compararon los espectros obtenidos en las muestras de suero con respecto a los obtenidos a partir de las muestras de plasma, se observó un mayor número de picos en los espectros de muestras de suero, sobre todo en el rango de 800-5000 Da, que es el rango de interés. Además, los espectros obtenidos en suero mostraron una gran calidad, obteniéndose picos estrechos y con una buena relación señal/ruido de fondo. Los mismos resultados se obtuvieron a partir de las muestras de los dos voluntarios sanos confirmando dichos resultados.

1.2.- Efecto del tiempo de coagulación y la temperatura en el perfil peptídico sérico

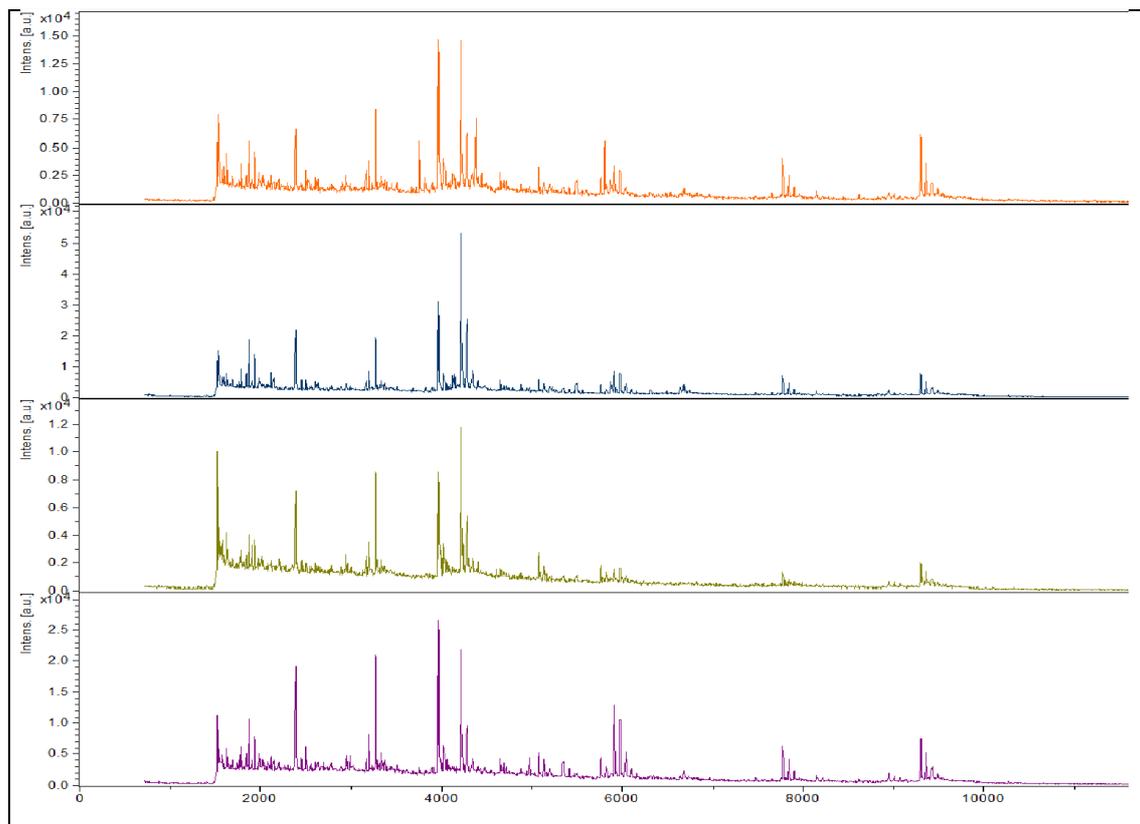
Otro factor que influye en la variabilidad de los perfiles peptídicos séricos es el tiempo transcurrido desde que se extrae la muestra hasta que se centrifuga. Además, se debe

tener en cuenta influye la temperatura a la que se mantiene la muestra durante todo el proceso.

En la fase experimental se partió de las muestras recogidas a partir de los dos voluntarios sanos descongelando dos alícuotas de 100 μ L de cada uno de los cuatro tiempos de coagulación (30, 60, 120, 180 minutos), para realizar el análisis por duplicado. La metodología empleada para evaluar el efecto del tiempo de coagulación y temperatura fue la misma que la empleada en el apartado 1.1.

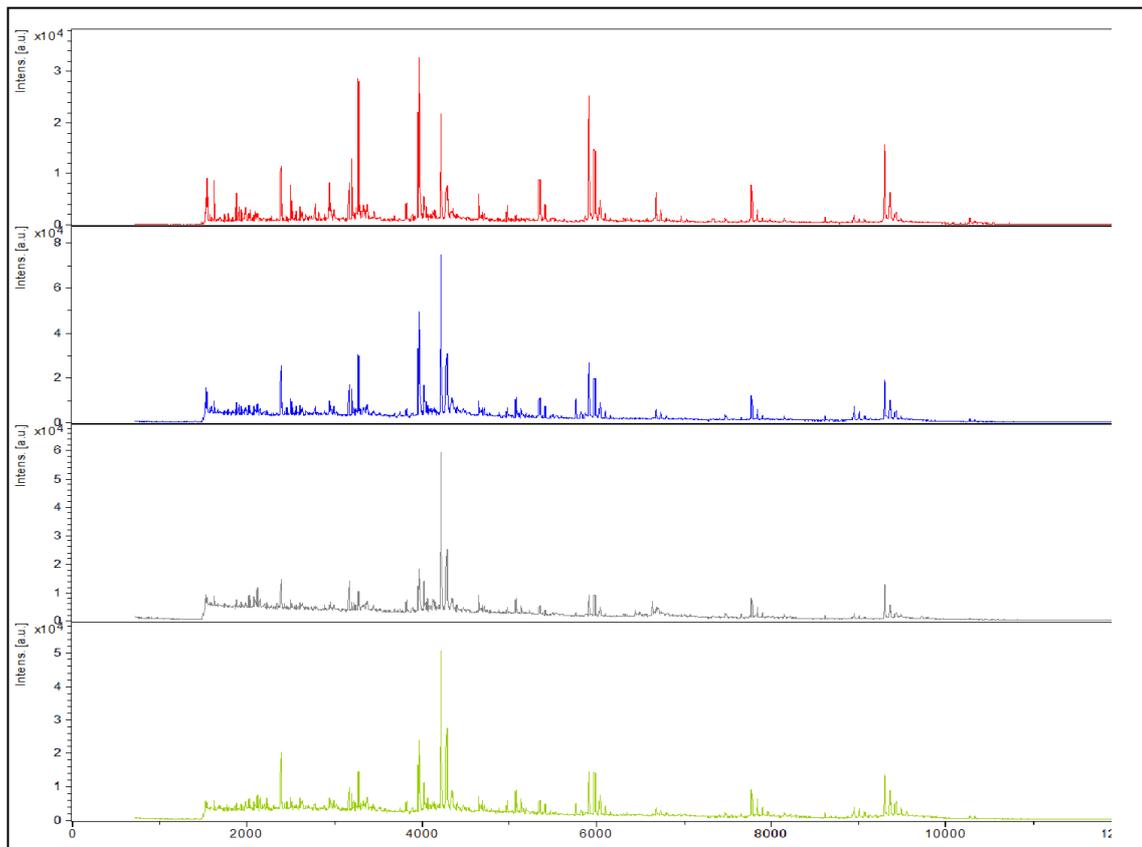
En las figuras 13 y 14 se pueden ver ejemplos de los espectros obtenidos a partir de las alícuotas de cada uno de los dos voluntarios sanos.

Figura 13: Espectros séricos del Voluntario 1.



Espectros séricos obtenidos a partir de distintos tiempos de coagulación. 30: tiempo de coagulación 30 minutos; 60: tiempo de coagulación 60 minutos; 120: tiempo de coagulación 120 minutos; 180: tiempo de coagulación 180 minutos.

Figura 14: Espectros séricos del Voluntario 2.



Espectros séricos obtenidos a partir de distintos tiempos de coagulación. 30: tiempo de coagulación 30 minutos; 60: tiempo de coagulación 60 minutos; 120: tiempo de coagulación 120 minutos; 180: tiempo de coagulación 180 minutos.

En los espectros séricos adquiridos, se observó un mayor número de picos en aquellos obtenidos a partir de muestras que se dejaron coagular durante 30 y 60 minutos. Sin embargo, cuando las muestras se dejaron coagular durante 60 minutos, las intensidades de los picos fueron el doble de la observada a los 30 minutos. A partir de los 120 minutos, el ruido de fondo aumentaba demasiado disminuyendo la calidad de los espectros

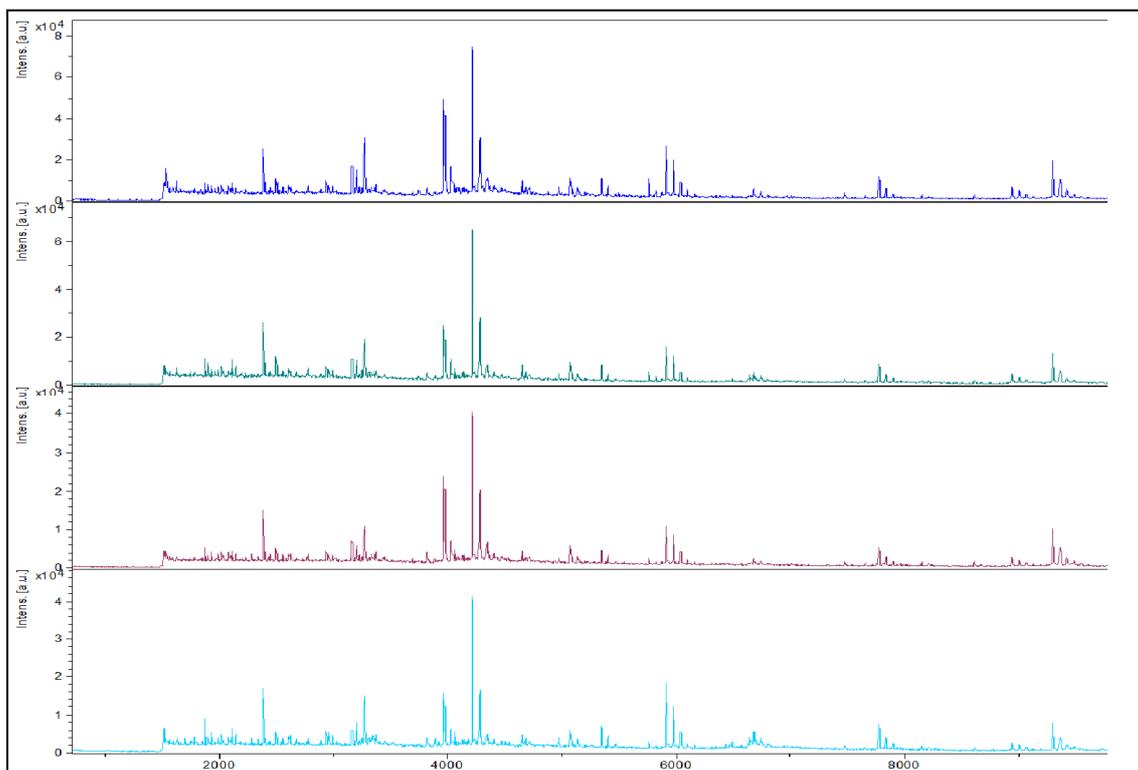
El tiempo de coagulación que dio lugar a los mejores espectros fue el de 60 minutos. En dichos espectros se observó el mayor número de picos con intensidades adecuadas y la mejor relación señal/ruido de fondo, sobre todo en el rango de interés de 800 a

5000 Da. Los mismos resultados se obtuvieron en ambos voluntarios sanos confirmándolos.

Otro factor que también se estudió fue el efecto del paso del tiempo transcurrido desde que se separaba el sobrenadante del suero hasta que este era congelado a -80 °C, ya que tal y como se ha descrito previamente en la literatura, también influye en el perfil peptídico sérico (28, 29,30). Para ello se emplearon las muestras de suero de los dos voluntarios sanos dejadas coagular durante 60 minutos, por ser las que proporcionaban mejores espectros, y se congelaron transcurridos los siguientes tiempos: 0, 30, 60 y 120 minutos. La metodología empleada fue la misma que se utilizó en los dos apartados anteriores.

En las figuras 15 y 16 se muestran los espectros obtenidos para ambos voluntarios sanos.

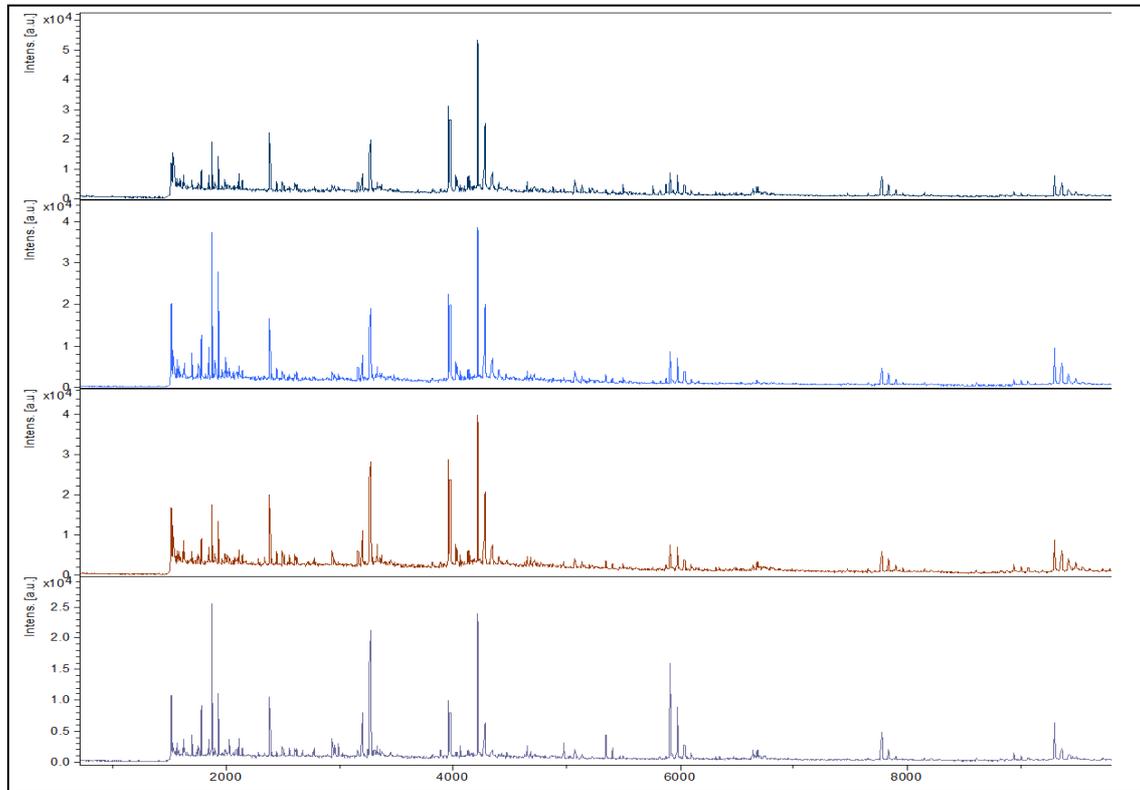
Figura 15: Espectros séricos del Voluntario 1.



RESULTADOS

Espectros séricos de distintos tiempos hasta congelación a -80 °C. Muestra de suero dejada coagular durante 60 minutos. Tras la coagulación el sobrenadante fue separado y mantenido 0, 30, 60 o 120 minutos a temperatura ambiente hasta su posterior congelación.

Figura 16: Espectros séricos del Voluntario 2.



Espectros séricos de distintos tiempos hasta congelación a -80 °C. Muestra de suero dejada coagular durante 60 minutos. Tras la coagulación el sobrenadante fue separado y mantenido 0, 30, 60 o 120 minutos a temperatura ambiente hasta su posterior congelación.

Tras el análisis de las muestras y la obtención de los espectros, se realizó la comparación. Se observó una disminución de la intensidad de los picos en el rango comprendido entre 800 -5000 Da a medida que aumentaba el tiempo transcurrido desde la separación del suero, hasta su posterior congelación. Por otra parte los picos cuya masa era superior a 6000 Da, aumentaron su intensidad con el paso del tiempo. Este efecto fue evidente desde el tiempo 30 minutos y los mismos resultados se obtuvieron en ambos voluntarios confirmando las observaciones.

2.- PROTOCOLO ESTANDARIZADO DE LA FASE ANALÍTICA

2.1.- Fraccionamiento de las muestras

La muestra de suero es una muestra compleja desde el punto de vista proteómico, ya que presenta una gran concentración de proteínas, donde el 99% de ellas son proteínas mayoritarias y el 1% restante contiene las proteínas PBM que son potenciales biomarcadores que, hasta el desarrollo de la metodología e instrumentación con la sensibilidad necesaria, no se podían detectar. Sin embargo, antes de su análisis, es necesario simplificar al máximo las muestras con el fin de que esas PBM no queden enmascaradas por las proteínas mayoritarias. Para ello existen varias técnicas de fraccionamiento basadas en técnicas cromatográficas, que eliminan las sales y seleccionan los péptidos y proteínas de interés.

En el presente estudio se eligió como método de fraccionamiento las partículas magnéticas cuyo funcionamiento se basa en la cromatografía de fase sólida. Se compararon los espectros obtenidos con el kit MB-HIC 8 que utiliza partículas magnéticas funcionalizadas con cadenas carbonadas C8 y el kit MB-IMAC Cu que utiliza partículas magnéticas funcionalizadas con cobre (Cu). Una explicación más detallada del proceso se recoge en el capítulo de Material y Métodos.

Tras el análisis de las muestras de Suero Control Humano (SCH), se seleccionó el kit MB-IMAC Cu por ser el que daba espectros con un mayor número de picos y mejor resolución en el rango analítico de interés (800 – 5000 Da)

Una vez seleccionado el kit MB-IMAC Cu, se llevaron a cabo pequeñas modificaciones en el protocolo recomendado por la casa comercial con el objetivo de optimizar los resultados. Dichas modificaciones fueron: se aumentó el tiempo de incubación de las

RESULTADOS

partículas magnéticas con la muestra, se sustituyó la solución de lavado del kit por agua purificada y se cambió la solución de elución del kit por una solución que se preparaba de forma manual cada vez que se realizaba una serie analítica. Solución de elución contenía acetonitrilo (ACN) al 30%, 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) y tampón citrato amónico dibásico 0,5M al 0,08%.

En la figura 17 queda representado el proceso de extracción peptídica y en la figura 18 se describen los diferentes pasos del protocolo optimizado de extracción peptídica o prefraccionamiento.

Figura 17: Esquema del prefraccionamiento de las muestras.

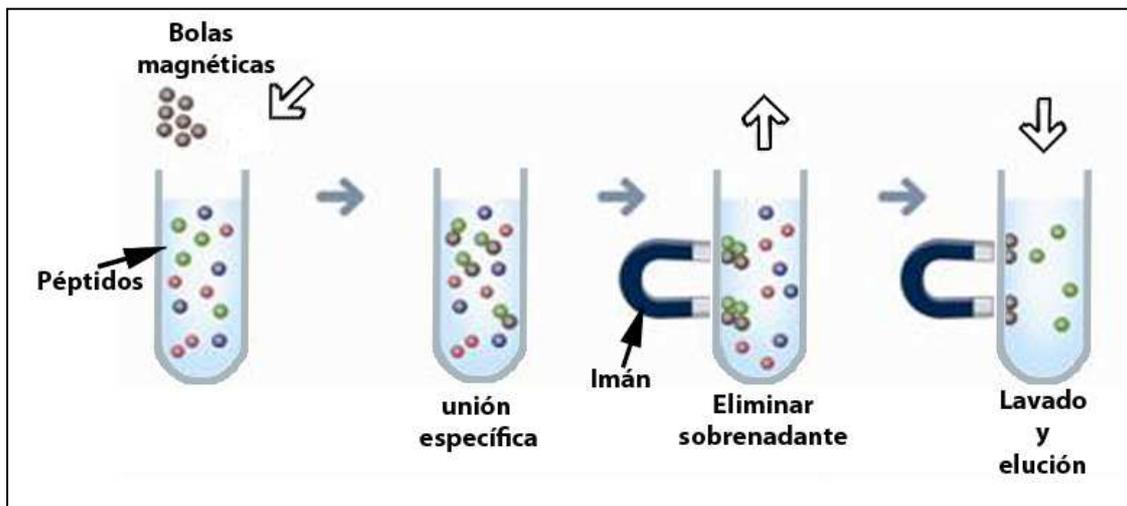


Figura 18: Protocolo optimizado de prefraccionamiento.

1º - En un tubo eppendorf mezclar 5 μ L de partículas magnéticas (PM) con 50 μ L del tampón de incubación.

2º - Mezclar 10 veces con la pipeta y después situar en la imán (las PM se quedan pegadas a la pared del tubo eppendorf). Dejar 20 segundos para que todas las partículas en suspensión se peguen a la pared del tubo.

3º - Eliminar el sobrenadante.

4º - Repetir los pasos 1-3 dos veces más.

5º - Mezclar los 5 μ L de PM lavadas con 20 μ L de tampón de incubación y con 5 μ L del suero de la muestra. Mezclar 10 veces con la pipeta.

6º - Dejar incubar durante 5 minutos.

7º - Situar el eppendorf en el imán y dejar 20 segundos.

8º - Eliminar el sobrenadante que contendrá los péptidos no unidos.

9º - Realizar 3 lavados de las PM con 100 μ L de agua milliQ. Para cada lavado mezclar 10 veces mediante pipeteo y después situar durante 20 segundos el eppendorf en el imán. Finalmente descartar el sobrenadante.

10º - Tras el último lavado, añadir 10 μ L de solución de elución. Mezclar 10 veces con pipeta y situar en el imán. Dejar 5 minutos y transferir el eluido a un tubo nuevo.

11º - Aspirar 1 μ L del eluido que contendrá los péptidos de interés y depositarlo en un anillo de la placa AnchorChip. Depositar 1 μ L de la solución matriz sobre la gota de la solución de eluido. Dejar secar.

2.3.- Selección del tipo de matriz

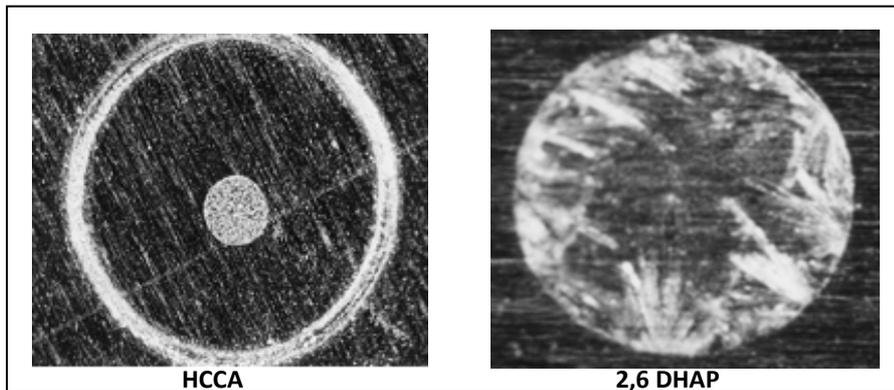
Las matrices utilizadas en espectrometría de masas del tipo MALDI-TOF son moléculas orgánicas de pequeño tamaño que absorben la longitud de onda de la luz láser de la fuente de ionización del espectrómetro de masas y transfieren esta energía a los analitos para que estos queden ionizados y puedan volar en un campo eléctrico. Cuando se mezcla la muestra purificada con la matriz, esta última cocrystaliza con los analitos evitando que, cuando incide el láser, los péptidos de la muestra se fragmenten. La elección del tipo de matriz dependerá de la naturaleza del analito que se desee analizar.

En el estudio se probaron tres matrices: el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (HCCA) que es la matriz adecuada para péptidos <10.000 Da, lípidos y nucleótidos; el ácido 2,5-dihydrobenzoico, matriz indicada para el análisis de péptidos, nucleótidos, oligonucleótidos y oligosacáridos; y el ácido 2,6-dihydroxiacetofenona (2,6-DHAP), matriz especialmente indicada para el análisis de fosfopéptidos.. Las combinaciones que se probaron durante el proceso de optimización de la fase analítica se recoge en la Tabla 5 del capítulo anterior.

Los espectros de mejor resolución, mayor número de picos y relación señal/ruido en el rango de interés fueron los obtenidos con la matriz 2,6-DHAP a la concentración de 1mg/mL usando como solvente el ACN al 20% y 8% de citrato de amonio dibásico al 0,5 M y pH de 4,5. A pesar de que esta matriz proporcionó los mejores espectros, presenta una limitación, su falta de homogeneidad en la forma de cocrystalizar con la muestra. Esta matriz cristaliza formando un anillo de pequeños cristales que dificulta la automatización del proceso de adquisición de espectros, teniendo que seleccionar de forma manual las zonas de disparo del láser.

En la Figura 19 se muestra un ejemplo del anillo característico que se obtiene con la matriz 2,6-DHAP y con la matriz HCCA, cuya cocrystalización es más homogénea.

Figura 19: Cristalización matriz HCCA y matriz 2,6-DHAP.



Representación de una cristalización homogénea obtenida con HCCA y otra en forma de anillo con la matriz 2,6- DHAP.

2.4.- Automatización de la fase analítica

La programación del sistema robotizado se realizó de forma personalizada adaptando el robot al protocolo que previamente se había optimizado de forma manual y que ha sido explicado y discutido en detalle anteriormente. Una de las principales dificultades del proceso de robotización fue el manejo de volúmenes inferiores a 10 μ L. Además existían pasos críticos de lavado y elución en los que resultaba difícil no arrastrar partículas magnéticas. Para asegurar que los volúmenes dispensados o aspirados eran los adecuados, se llevó a cabo una comprobación manual de cada paso realizado por el robot mediante una pipeta semiautomática aspirando y midiendo los volúmenes de forma manual. Algunos de los pasos críticos que se detectaron fueron los siguientes:

RESULTADOS

- Durante la aspiración de las partículas magnéticas el robot no siempre aspiraba correctamente los 5 μ L. Para mejorar este paso el robot se programó para que aspirara los 5 μ L cuando la punta bajaba al 50% del volumen que se ponía en cada pocillo de la placa de 96 que se empleaba para realizar el enriquecimiento de fosfopéptidos.
- Para evitar el arrastre de partículas magnéticas después de los pasos de incubación y de lavados, se ajustaron las coordenadas para que el robot tuviera en cuenta que en las filas impares las partículas magnéticas quedaban pegadas a la pared de la derecha del pocillo y por tanto la punta debía bajar y aspirar pegando a la pared izquierda del pocillo para no arrastrar partículas magnéticas. En el caso de las filas pares sucedía lo contrario, por lo que la manipulación de la muestra en las filas pares se programó para que la bajada y subida de la punta tuviera lugar en la posición contraria del tubo donde quedaban adheridas las partículas magnéticas.
- Aumentar el tiempo que se dejaba la placa sobre el imán o placa magnética de 20 a 30 segundos. Al ampliar el tiempo de incubación con la placa magnética se aseguraba la total ausencia de partículas magnéticas en suspensión, y todas las partículas magnéticas permanecían pegadas al interior del pocillo que estaba en contacto con la placa magnética.
- En los procesos de lavado con agua se cambió la forma de dispensación de los 100 μ L para homogeneizar mejor la muestra. En vez de dispensar el agua sobre la pared donde estaban pegadas las bolas, se dispensó en el centro del pocillo para asegurar una completa homogenización de las partículas magnéticas en la solución de lavado.

- Se diferenciaron dos fases en el proceso analítico robotizado, una primera en la que se realizaba la incubación de las bolas con las muestras y se realizaban los lavados. Y una segunda fase que comenzaba con la dispensación de la solución de elución y terminaba en la dispensación de 1 μ L de solución de elución y 1 μ L de matriz. De esta forma las soluciones de elución y matriz se preparaban siempre frescas mientras se realizaba la primera fase y dichas soluciones se colocaban en la zona refrigerada del robot cuando se acababa el proceso de lavado de esta forma se evitaba la evaporación de las soluciones ya que su formulación contenía solventes orgánicos de rápida evaporación a T.A.

3.- ESTUDIO DE LA REPRODUCIBILIDAD DE LOS RESULTADOS

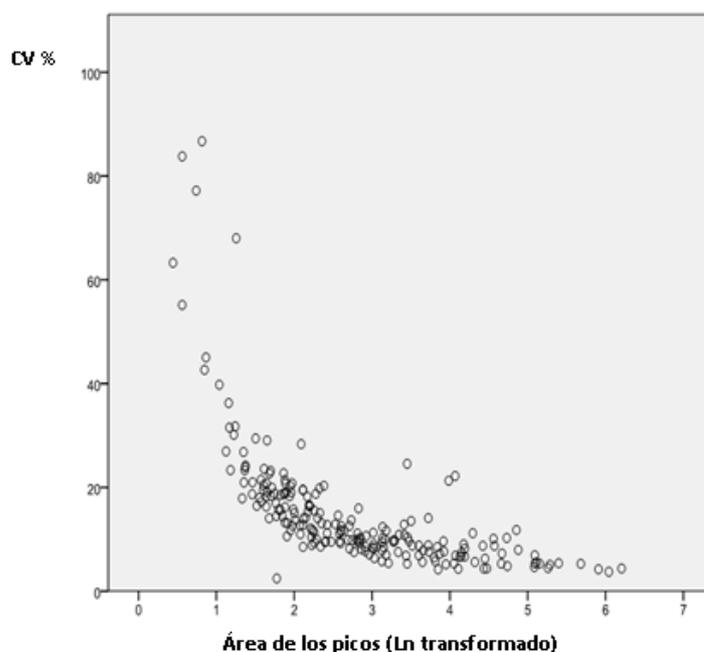
La limitación principal de los estudios de perfiles peptídicos séricos mediante MALDI-TOF es la falta de reproducibilidad. La comunidad científica está de acuerdo en la necesidad de crear protocolos estandarizados que consigan minimizar esa falta de reproducibilidad. Con esta finalidad, en el presente estudio se diseñó un protocolo optimizado y estandarizado. Para valorar la reproducibilidad de los resultados obtenidos a partir de dicho protocolo, se partió del análisis de muestras SCH y se calculó el coeficiente de variación interdía (CV) del área de todos los picos que se detectaron en los espectros.

En una primera fase, se analizaron de forma manual 58 muestras de SCH. En una segunda fase, tras la automatización de la fase analítica mediante el sistema robotizado Freedom Evoware de Tecan, se analizaron 67 muestras SCH.

RESULTADOS

En el cálculo del CV interdió se tuvieron en cuenta 210 picos (m/z) situados en el rango de 800 – 15.000 Da. La media del CV interdió del área de los picos (m/z) fue de un 62% para el método manual y de un 11,6% ($P_{90} = 23,9\%$) para el método automatizado. La relación entre el área de los picos y el CV fue inversamente proporcional, es decir, cuanto más pequeño era el área del pico, mayor era el CV y por tanto mayor imprecisión y peor reproducibilidad.

Figura 20: Coeficiente de variación versus área de los picos.



La descripción de la obtención de los espectros así como el análisis estadístico de los mismos se describe en detalle en el capítulo de Material y Métodos.

4.- ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL GÉNERO Y LA EDAD EN EL PERFIL PEPTÍDICO SÉRICO HUMANO

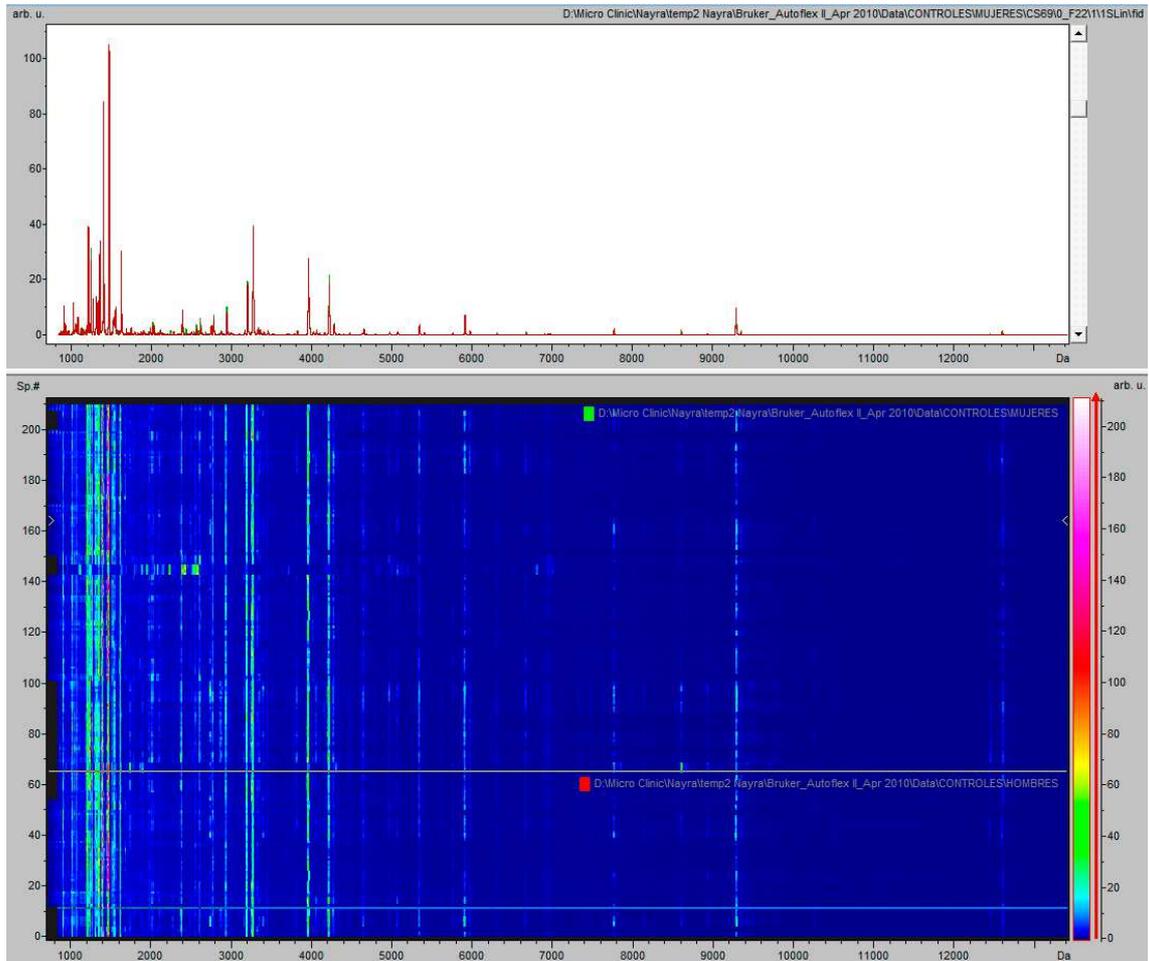
La influencia del género y la edad en los perfiles peptídicos séricos apenas se ha tenido en cuenta en la literatura. Uno de los objetivos del presente estudio, fue analizar la influencia del género y la edad en dichos perfiles. Para ello partimos de 56 muestras de voluntarios sanos, 18 hombres y 38 mujeres de edades comprendidas entre 17 años y 85 años con una media de edad de 46 años. Una descripción detallada de cómo se llevó a cabo metodológicamente este análisis se proporciona en la sección 3.2 del capítulo de Material y Métodos.

Tras el análisis del efecto del género sobre los perfiles peptídicos séricos, se observó que en sólo 7 (2,6%) de los 273 picos había diferencias estadísticamente significativas. Por lo que se podría considerar despreciable.

Cuando analizamos el efecto de la edad en los perfiles peptídicos séricos se observó que 31 (11,4%) de los 273 picos se correlacionaban débilmente con la edad según el coeficiente de correlación de Pearson ($<0,16$; $P<0,05$).

RESULTADOS

Figura 21: Análisis del efecto del género en los perfiles peptídicos séricos.



Panel superior: Espectro medio calculado para hombres (rojo) y mujeres (verde). Se observa que los dos espectros medios se superponen casi perfectamente indicando que las diferencias debido al género en el perfil sérico obtenido mediante la metodología empleada son mínimas. Panel inferior: espectros de masas en visión tipo gel, y visualización en pseudocolor de arcoiris de todos los pacientes utilizados (y sus réplicas) para hombres (recuadro con rectángulo rojo) verde) y mujeres (recuadro con rectángulo verde)

5.- RESULTADOS DE LOS ESTUDIOS CLÍNICOS

Los resultados obtenidos han sido publicados en dos revistas internacionales e indexadas:

1. Zapico-Muniz, E., Farré-Viladrich, A., Rico-Santana, N., González-Sastre, F., & Mora-Brugués, J. (2010). Standardized peptidome profiling of human serum for the detection of pancreatic cancer. *Pancreas*, 39(8), 1293-1298.

2. Santana, N. R., Muñiz, E. Z., Cocho, D., Bravo, Y., Mederos, R. D., & Martí-Fàbregas, J. (2014). Analysis of Peptidome Profiling of Serum from Patients with Early Onset Symptoms of Ischemic Stroke. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases*, 23(2), 235-240.

Los artículos originales se encuentran al final del capítulo de Resultados.

RESULTADOS

5.1.- Estudio de cáncer de páncreas:

El fin que se perseguía con el presente estudio era encontrar un biomarcador o panel de biomarcadores que fuera capaz de discriminar entre cáncer de páncreas y pancreatitis crónica. Para ello se aplicó nuestro protocolo optimizado y estandarizado a las muestras de suero recogidas tal y como se detalla en el capítulo de Material y Métodos.

5.1.2.- Características de los pacientes

Para el presente estudio se incluyeron 56 muestras de controles sanos (C.S.), 55 muestras de pacientes con pancreatitis crónica (P.C.) y 47 muestras de pacientes con cáncer de páncreas (Ca.P). Las características demográficas de cada grupo se pueden ver resumidas en la Tabla 6.

Tabla 6: Características demográficas de los voluntarios sanos y pacientes incluidos en el estudio.

	Controles Sanos n=56	Cáncer de Páncreas n= 47	Pancreatitis Crónica n= 55
Sexo (% hombres)	32	43	73
Edad * (años)	46 (17 a 85)	74 (44 a 83)	52 (20 a 76)
CA 19.9 (U/mL)	13 (0,9 a 53,5)	938 (0,6 a 284.350)	15 (0,2 a 290)

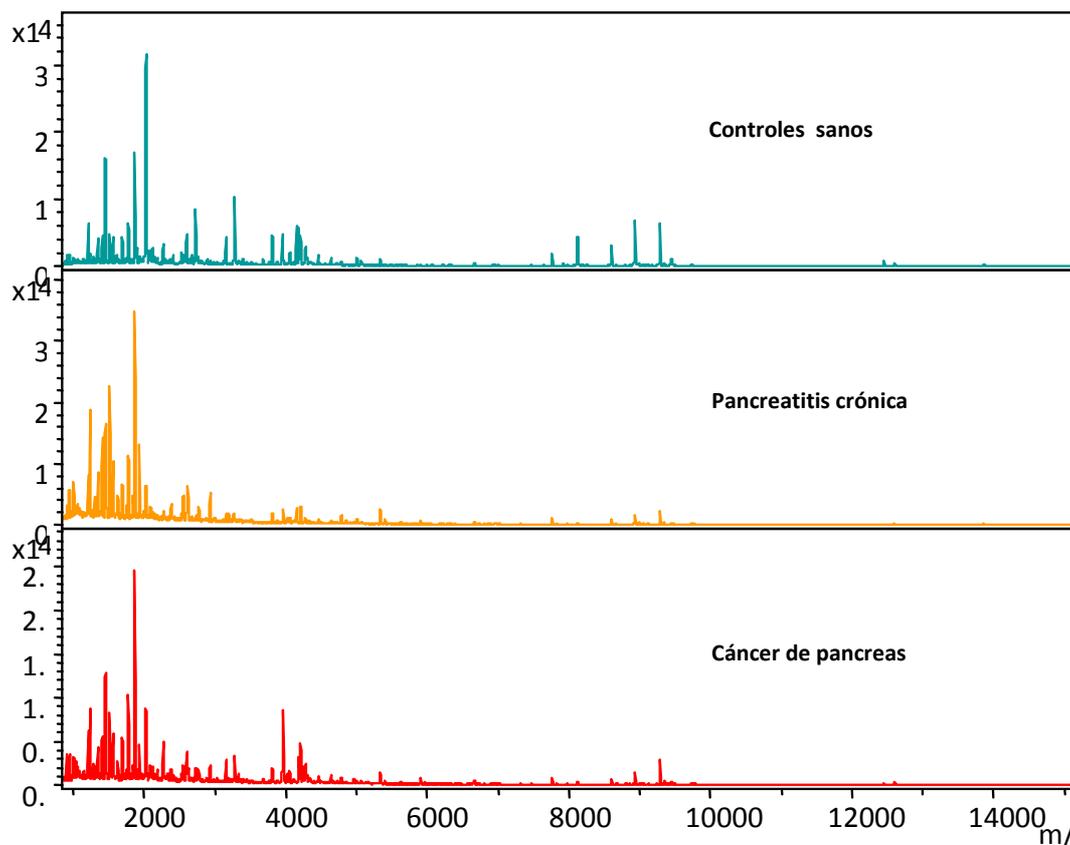
* Mediana (mínimo a máximo)

Los pacientes con Ca.P presentaban una media de edad mayor que el grupo de P.C. y el C.S. ($P<0,001$). En cuanto al género, hubo un predominio del género masculino en el grupo de pancreatitis crónica ($P<0,001$). En la tabla 6 también se muestran la concentración media del marcador tumoral CA 19.9 medido en los tres grupos de

estudio, siendo mucho mayor en el grupo de pancreatitis crónica que en los otros dos ($P < 0,001$).

En la Figura 22 se muestra un ejemplo de los espectros obtenidos, en cada uno de los grupos del estudio, mediante el analizador MALDI-TOF MS.

Figura 22: Espectros característicos de los grupos de voluntarios sanos y pacientes incluidos en el estudio



En todos los espectros se tuvieron en cuenta un total de 273 picos en el rango de masas de 800 – 15.000 Da.

5.1.2.- Análisis estadístico

5.1.2.1.- Comparación de perfiles peptídicos de los grupos cáncer de páncreas vs pancreatitis crónica.

Al comparar los espectros de ambos grupos se encontró un total de 43 péptidos que diferían en su intensidad de forma estadísticamente significativa ($P < 0,05$). De los 43 péptidos, 26 presentaban una mayor intensidad en los espectros del grupo de pacientes con Ca.P., mientras que los 17 restantes, presentaban una mayor intensidad en los espectros del grupo de P.C. En la Tabla 7 se detallan los 43 péptidos con sus masas, media del área de cada pico y el valor "P" correspondiente a la significación estadística.

Tabla 7: Comparación Cáncer de Páncreas versus Pancreatitis Crónica.

m/z	ÁREA MEDIA		P
	P.C.	Ca.P	
1929,65	2,83	1,13	0,0000277
1006,52	5,66	1,91	0,0000542
1804,39	1,49	2,39	0,0000725
943,09	5,34	1,43	0,000194
1866,51	10,33	3,9	0,00202
4962,71	0,43	1,04	0,00202
2,603,51	12,17	6,21	0,00249
1238,79	10,23	2,61	0,00319
1788,36	8,44	15,77	0,0039
921	4,89	1,93	0,0039
6189,83	0,21	0,29	0,00415
905,44	6,88	2,98	0,00437
4212,72	2,07	3,77	0,00437
2708,65	1,45	2,64	0,00437
6805,26	0,24	0,39	0,00437
6049,53	0,19	0,26	0,00465
3428,15	0,66	0,87	0,00606
2740,81	4,36	2,9	0,00731
6066,12	0,23	0,33	0,00799
8104,47	0,14	0,26	0,00799
2307,59	1,48	3,11	0,00943
4111,22	0,71	0,94	0,0104
885,41	2,55	1,38	0,0144

m/z	ÁREA MEDIA		P
	Ca,P,	P,C,	
7921,47	0,25	0,45	0,0144
2982,43	1,62	2,44	0,0177
1897,18	5,26	2,81	0,0177
1155,02	1,85	1,26	0,0177
8440,72	0,1	0,12	0,0177
1172,22	1,58	3,81	0,0217
9060,01	0,18	0,12	0,0234
3579,25	0,62	0,86	0,0236
1451,13	7,31	2,58	0,0283
1208,97	0,05	0,07	0,0304
8287,24	0,17	0,25	0,0321
8933,43	3,69	1,65	0,0355
3248,56	0,67	1,35	0,0355
5807,61	0,18	0,2	0,0355
5968,78	0,31	0,43	0,0398
5399,99	0,33	0,52	0,0428
1741,6	2,76	1,35	0,0452
1210,87	7,89	3,25	0,0458
6399,43	0,19	0,25	0,0465
4127,55	1,08	1,67	0,05

Área media de los picos con P<0.05. de los grupos Ca.P.: Cáncer de Páncreas y P.C.:Pancreatitis Crónica, P: grado de significación estadística

De cada uno de los 43 péptidos individuales se calculó el área bajo la curva o *area under the curve* (AUC), la sensibilidad y especificidad diagnóstica para diferenciar entre los dos grupos de estudio. Sin embargo se vio que ningún péptidos conseguía mejorar la capacidad diagnóstica del CA 19.9 cuyo AUC era de 0,871, la sensibilidad diagnóstica de 75,5% y la especificidad diagnóstica de 87,3%.

Sin embargo, cuando se combinó el CA 19.9 con los 43 péptidos y se aplicó el modelo de regresión logística binaria diseñado en el estudio, se obtuvo como panel de biomarcadores óptimo, el formado por dos péptidos (1006.52 y 1929.65 Da) y el CA 19.9. Este panel mostró un AUC de 0,928, una sensibilidad diagnóstica del 89,9% y una especificidad diagnóstica del 92,7%. En la tabla 8 se muestran las AUC, sensibilidades y

RESULTADOS

especificidades diagnósticas individuales del CA 19.9, de los 2 péptidos seleccionados y del panel formado por los tres componentes.

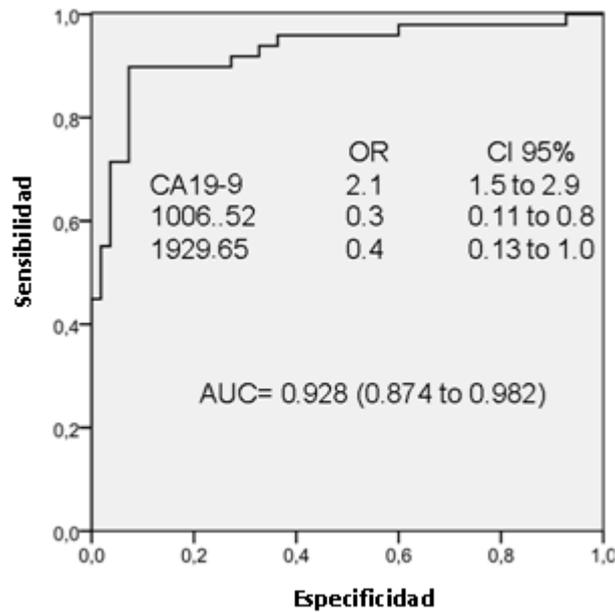
Tabla 8: Panel discriminante entre Cáncer de Páncreas y Pancreatitis Crónica.

Biomarcadores	AUC (95% CI)	Sensibilidad, %	Especificidad, %
CA 19.9	0,871 (0,797-0,945)	75,5	87,3
1006,52 Da	0,820 (0,736-0,904)	73,5	78,4
1929,65 Da	0,796 (0,710-0,883)	69,4	70,9
PANEL	0,928 (0,874-0,982)	89,9	92,7

Ca.P: Cáncer de Páncreas, P.C: Pancreatitis Crónica, PANEL: combinación de CA 19.9, 1006,52 Da y 1929,65 Da.

Una vez seleccionado el panel constituido por el CA 19.9, el péptido 1006,52 Da y el péptido 1929,65 Da como el mejor para discriminar entre Ca.P y P.C., el siguiente paso fue el cálculo de la curva ROC y su AUC. En la Figura 23 se puede ver representada la curva ROC del panel. En esta figura se puede ver que el AUC es próximo a uno (0,928) mejorando el AUC que se obtenía con el CA 19.9 (0,871) cuando se utilizaba sólo, por lo que se trata de un panel de elevada sensibilidad y especificidad diagnóstica.

Figura 23: Curva ROC del panel discriminante entre Cáncer de Páncreas y Pancreatitis Crónica.



5.1.2.2.- Comparación de perfiles peptídicos de los grupos enfermedad pancreática versus controles sanos.

En un segundo paso, se planteó como objetivo buscar biomarcadores específicos de enfermedad pancreática.(E.P.). Para ello se unificaron las muestras de pacientes con Ca.P. y P.C. formando el grupo E.P., y este se comparó con el grupo de C.S.. Al analizar los espectros se encontró que 223 péptidos de los 273 detectados en total, presentaban diferencias en cuanto a su intensidad en ambos grupos de estudios. Dichas diferencias resultaron estadísticamente significativas ($P < 0,05$). La mitad (111) se encontraron con intensidad superior en el grupo de E.P.

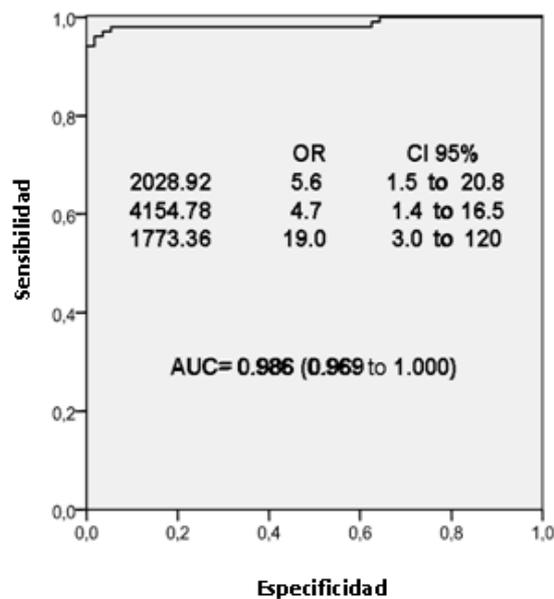
Al analizar la sensibilidad y especificidad diagnóstica para cada uno de los 223 péptidos de forma individual, se vio que 118 péptidos presentaron una mejor capacidad

RESULTADOS

diagnóstica que el CA19.9 por lo que se decidió no incluir el CA 19.9 en el estudio estadístico para la búsqueda del panel de biomarcadores óptimo.

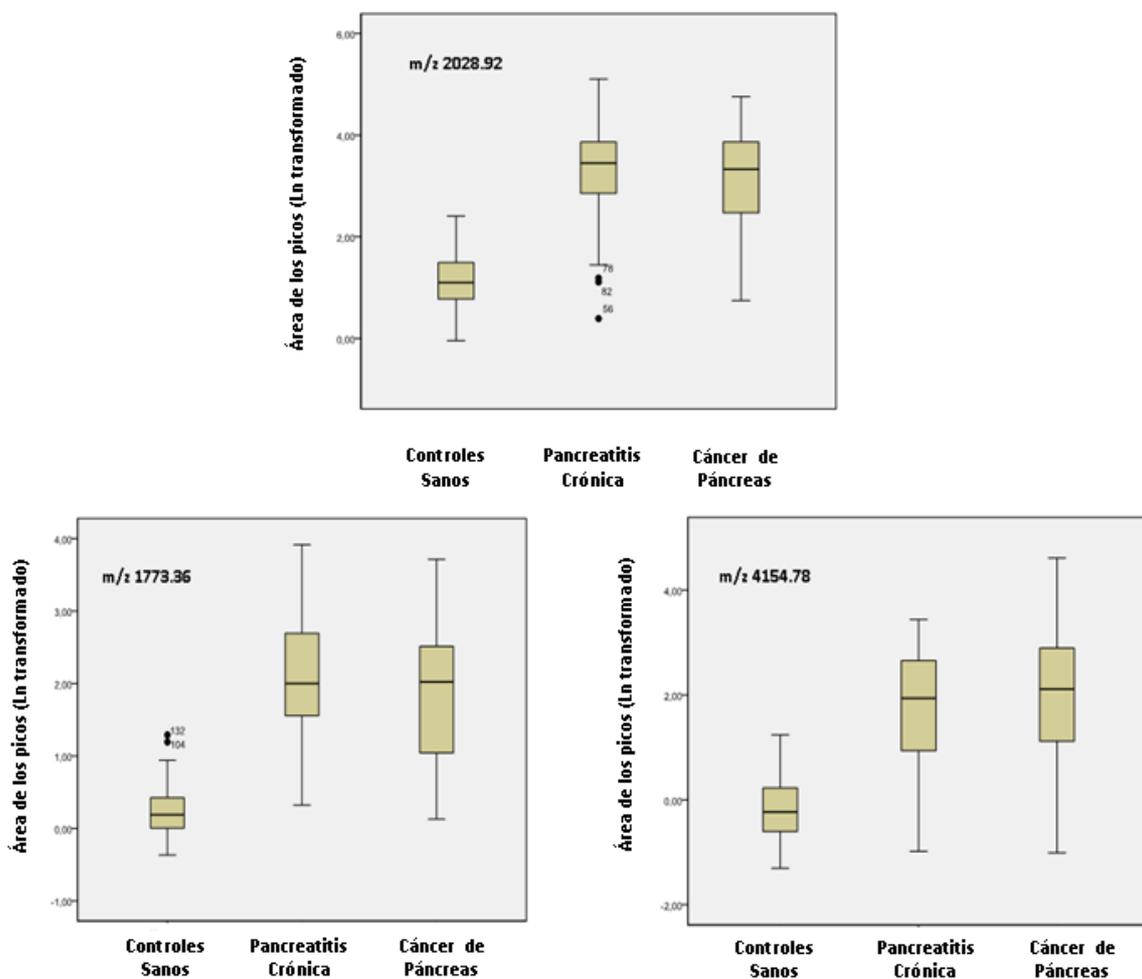
Partiendo de los 118 péptidos nombrados anteriormente, se seleccionaron los 10 estadísticamente más significativos y a estos se les aplicó el modelo de regresión logística binaria. Dicho modelo eligió como panel óptimo el formado por los 3 péptidos de m/z 2028,2; 4154,78 y 1773,36 Da cuya sensibilidad y especificidad diagnóstica fueron de 98,2% y 97,1% respectivamente. Una vez seleccionado este panel, se realizó el cálculo de su curva ROC que mostró un AUC de 0,986 (0,969 – 1,000) mostrando una gran capacidad diagnóstica. En la figura 24 se puede ver representada la curva ROC del panel de péptidos.

Figura 24: Curva ROC del panel diagnóstico entre pacientes con Enfermedad Pancreática versus Controles Sanos.



Una vez seleccionado el panel, se quiso ver el comportamiento de dichos péptidos en cada uno de los grupos de interés. Para ellos se realizó un diagrama de cajas o *box-plot* a partir de las áreas medias de los péptidos. En dichas gráficas se puede observar que los tres péptidos se expresan más en los dos grupos de enfermedad pancreática (Pa.C. y Ca. P.) que en el grupo de controles sanos. Sin embargo, ninguno de los tres péptidos presenta una diferencia significativa en cuanto a su expresión entre los grupos Pa.C. y Ca.P. En la Figura 25 se muestra el comportamiento de cada uno de los picos individuales en los tres grupos de estudio.

Figura 25: Comportamiento de los picos 2028,92 Da, 1773,36 Da y 4154,78 Da en los tres grupos de estudio: Controles Sanos, Pancreatitis Crónica y Cáncer de Páncreas.



5.2.- Estudio de ictus isquémico.

El objetivo del estudio fue encontrar un biomarcador o panel de biomarcadores de diagnóstico precoz de ictus isquémico (I.Iq.) y que fuera capaz de discriminar entre I.Iq. y enfermedad neurológica aguda (E.N.A.) con una buena sensibilidad y especificidad diagnóstica.

5.2.1.- Características de los pacientes

En el estudio se incluyeron muestras de voluntarios sanos, pacientes con ictus isquémicos (I.Iq.) y pacientes con enfermedad neurológica aguda (E.N.A.). Las características demográficas de los tres grupos de estudio se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9: Características demográficas de los grupos de estudio.

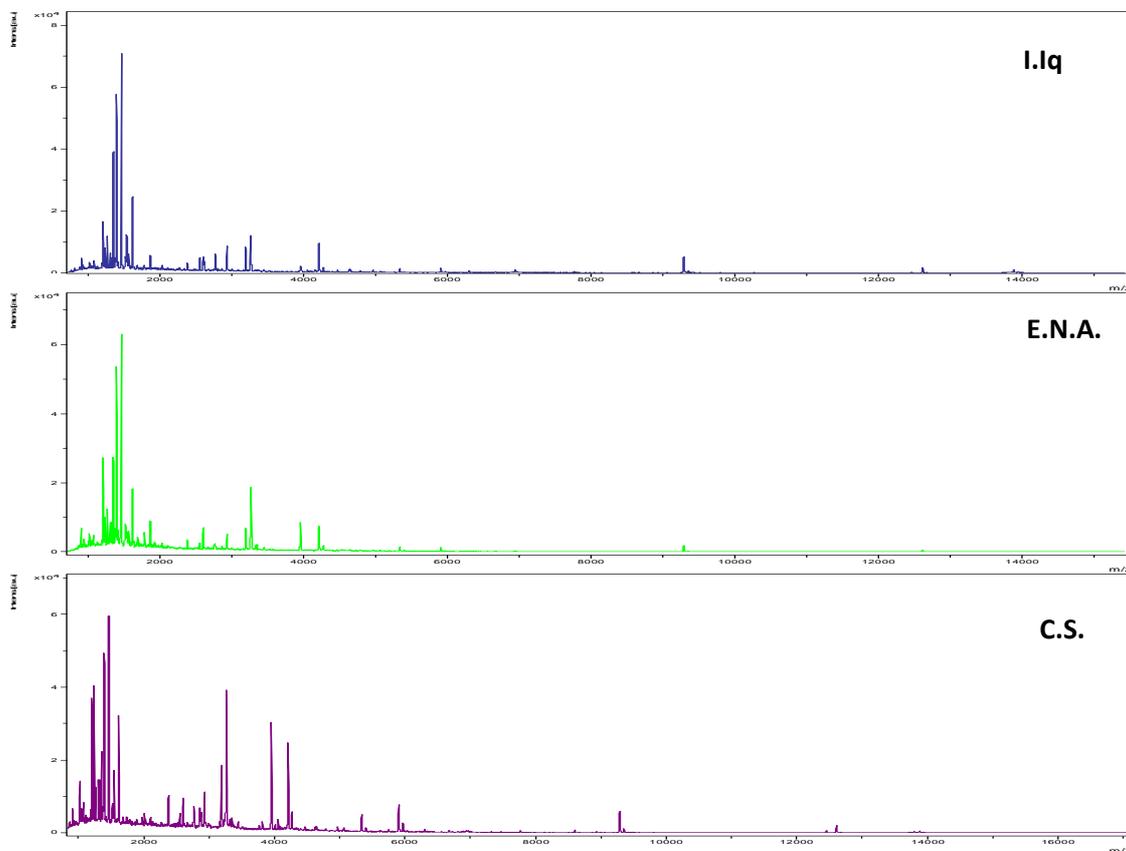
	Controles sanos n=56	Ictus isquémico n=45	Enfermedad neurológica aguda n= 18
Sexo (% hombres)	32	67	72
Edad * (años)	46 (17 a 85)	73 (38 a 84)	76 (55 a 85)

*Mediana (mínimo a máximo)

Los pacientes con enfermedad neurológica presentaban mayor edad que el grupo de voluntarios sanos ($P < 0,05$) con una mediana de edad de 73 para I.Iq. y de 76 para E.N.A.. En cuanto al sexo, sólo encontramos diferencias significativas entre los pacientes neurológicos y los C.S. ($P < 0,05$) no así entre el grupo de I.Iq. y el de E.N.A. ($P = 1$). Los hombres fueron predominantes en el grupo de enfermos neurológicos.

Todos los espectros obtenidos en el estudio presentaron un total de 300 picos situados en el rango de masas de 800 – 15.000 Da. Los picos más abundantes, así como los de mayor intensidad, se situaron en el rango de 800 – 5000 Da. En la figura 26 se muestra un ejemplo de los espectros obtenidos en cada grupo del estudio. Tal y como se puede observar en dicha figura, los espectros obtenidos a partir de las muestras de I.Iq y E.N.A presentan un perfil peptídico aparentemente muy semejante. Sin embargo, los espectros obtenidos a partir de las muestras de controles sanos presentan un perfil peptídico diferente cuando se compara con los de I.Iq y E.N.A. Las principales diferencias se pueden observar en el rango de 2000 -5000 Da

Figura 26: Espectros representativos de los tres grupos del estudio.



I.Iq.: Ictus isquémico, E.N.A.: Enfermedad neurológica aguda; C.S.: Controles sanos. Espectros obtenidos a tiempo 0 horas

5.2.2.- Análisis estadístico

5.2.2.1.- Comparación Ictus Isquémico versus Enfermedad Neurológica Aguda.

En este estudio se trató de identificar un panel, que con el menor número de péptidos, fuera capaz de discriminar entre I.Iq. y E.N.A. con una buena sensibilidad y especificidad diagnóstica. Además, se quería ver la evolución de dicho panel a lo largo del tiempo.

Las muestras de ambos grupos se dividieron según el tiempo en el que fueron extraídas: 0 , 6 y 24 horas después del ingreso del paciente.

Cuando se compararon las muestras de I.Iq. y E.N.A. a tiempo 0 horas, el modelo de regresión logística binaria generó un panel de 5 péptidos (2554, 9290, 2229, 5907 y 2820 Da) que discriminaba entre I.Iq. y E.N.A. de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Este panel fue el que mejor sensibilidad (S) y especificidad (E) diagnóstica mostró con el menor número de péptidos siendo de 82,4% y 68,8% respectivamente.

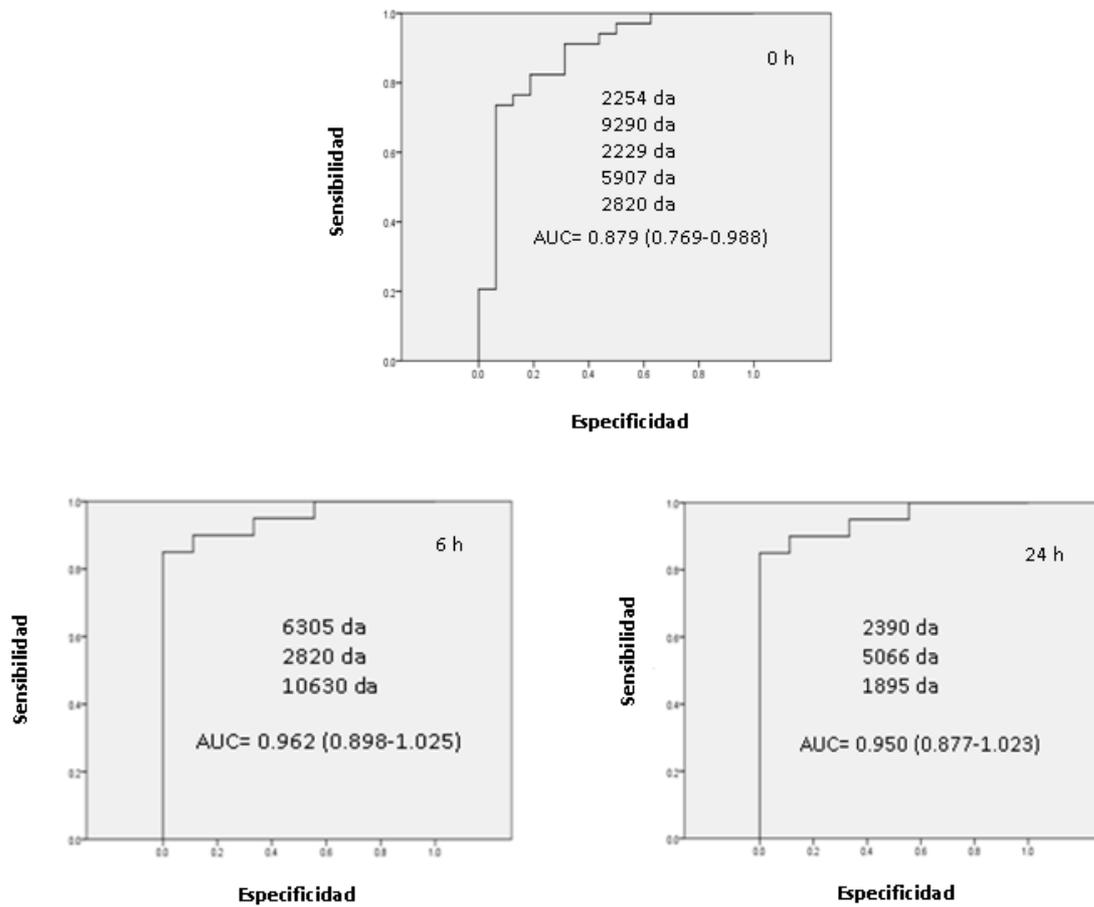
A tiempo 6 horas, el modelo de regresión logística binaria generó un panel de 3 péptidos (6305, 2820 y 10,630 Da) que discriminaba entre los grupo I.Iq. y E.N.A. de forma estadísticamente significativa ($p < 0,001$). Este panel discriminaba entre I.Iq. y E.N.A. con una S del 100% y una E del 84,6%.

Por último a tiempo 24 horas, el modelo de regresión logística binaria generó un panel de otros 3 péptidos (2390, 5066 y 1895 Da) que discriminó entre I.Iq. y E.N.A. de forma estadísticamente significativa. Con este panel conseguimos una S del 90% y una E del 89%.

Una vez seleccionados los paneles de biomarcadores más óptimos en cada uno de los tiempos, se calcularon las curvas ROC y las AUC para cada uno de ellos. En la Figura 27

quedan representadas las curvas ROC de los tres paneles de péptidos: 0 horas, 6 horas y 24 horas.

Figura 27: Comparación I.Iq. vs E.N.A., curvas ROC de los paneles obtenidos a 0, 6 y 24 horas.



En esta figura se puede observar que a medida que avanza el tiempo los paneles necesitan menos cantidad de péptidos para discriminar entre ambos grupos y sus curvas ROC son mejores, con AUC más próximas al valor de uno.

RESULTADOS

En la Tabla 10 se muestra un resumen del AUC, la S y E diagnósticas obtenidas para cada uno de los péptidos de forma individual, así como de cada uno de los paneles de péptidos seleccionados como óptimo para cada uno de los tres tiempos.

Tabla 10. AUC (Área Bajo la Curva), sensibilidad y especificidad diagnósticas de los péptidos y paneles.

Masa/carga (Da)	AUC	p	Sensibilidad %	Especificidad %
t= 0 horas				
2554	0,670 (0,506-0,832)	0,056	97,1	6,2
9290	0,314 (0,158-0,470)	0,036	94,1	25,0
2229	0,333 (0,166-0,500)	0,058	97,1	6,2
5907	0,335 (0,162-0,507)	0,061	91,2	12,5
2820	0,700 (0,543-0,858)	0,023	100	25,0
Panel	0,879 (0,769-0,988)	<0,001	82,4	68,8
t= 6 horas				
6305	0,831 (0,707-0,955)	0,001	93,3	46,2
2819	0,769 (0,589-0,949)	0,005	100	23,1
10630	0,263 (0,094-0,431)	0,014	93,3	30,8
Panel	0,962 (0,898-1,025)	P<0,001	100	84,6
t=24 horas				
2390	0,878 (0,741-1,015)	0,001	95	66,7
5066	0,850 (0,712-0,988)	0,003	80	44,4
1895	0,783 (0,591-0,975)	0,016	95	55,6
Panel	0,950 (0,877-1,023)	P<0,001	90	89

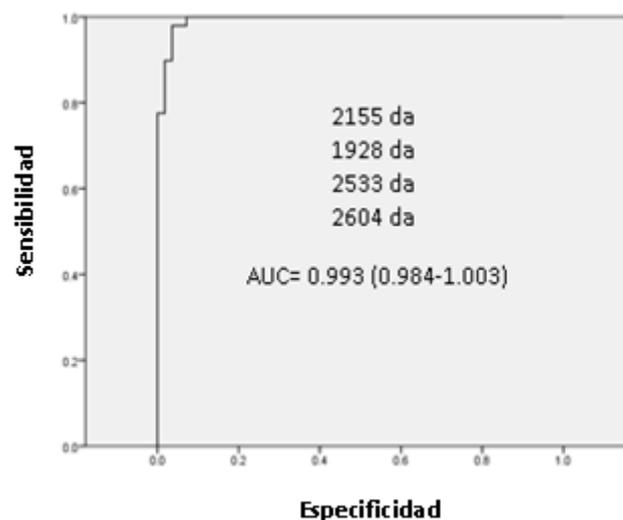
En esta tabla se puede observar que sólo hay un péptido que se repite en dos de los tres paneles, es el péptidos 2820 Da que se encuentra formando parte del panel de tiempo 0 horas y del panel de tiempo 6 horas. También se puede observar todos los péptidos, de forma individual, presentan un buena S pero una baja E. Sin embargo cuando se combinan para formar el panel, se mejora notablemente la E y en consecuencia el AUC.

5.2.2.2.- Pacientes con enfermedad neurológica (E.N.) versus controles sanos (C.S.)

En un segundo paso, se agruparon los enfermos de I.lq. y los de E.N.A. para compararlos con el grupo de C.S., con la finalidad de encontrar péptidos específicos de enfermedad neurológica (E.N.). En esta comparación, 223 péptidos de los 300 detectados, presentaban diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de estudio ($p < 0,05$)

Cuando se aplicó el modelo de regresión logística binaria, se obtuvo como mejor panel discriminante el formado por 4 péptidos (2155, 1928, 2533 y 2604 Da). Todos los péptidos presentaron un $AUC \geq 0,90$. Aplicando este panel, 48 de 49 pacientes con E.N. se clasificaron correctamente y sólo 2 de 56 C.S. se clasificaron de forma errónea dando una S del 98% y una E del 96,4%. Una vez seleccionado el panel, se calculó la curva ROC y su AUC que fue de 0,993 (0,984-1,003). En la Figura 28 se puede ver la curva ROC del panel y como la curva se aproxima a uno indicando una sensibilidad y especificidad diagnóstica próximas al 100%.

Figura 28: Curva ROC del panel discriminante entre Enfermedad Neurológica versus Controles Sanos.

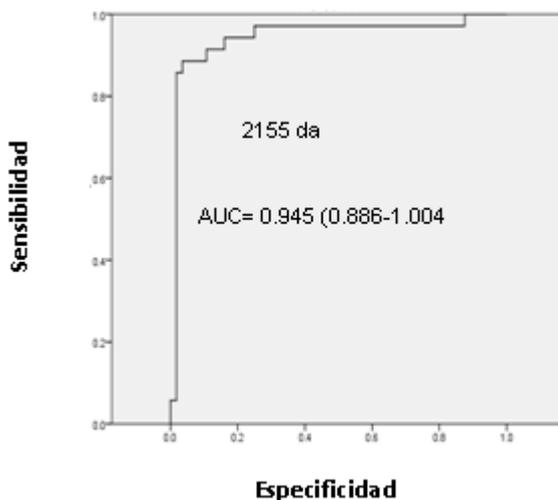


5.2.2.3.- Ictus isquémico versus controles sanos sanos

Por último se comparó el grupo I.lq. con el grupo de controles sanos. En esta comparación 220 péptidos de 300 mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,005$). El modelo de regresión logística binaria generó un panel que con tan sólo un péptido (2155 Da) era capaz de discriminar entre I.lq. y C.S. con una S del 88,6 % y una E del 96,4 %. Si nos basáramos en las áreas de este péptidos para clasificar los grupos de estudio, el péptido clasificaba correctamente 31 de los 35 pacientes con I.lq. y 54 de los 56 C.S..

Una vez seleccionado el péptido, se calculó la curva ROC y su AUC siendo de 0,945 (0,886-1,004). En la Figura 29 se puede ver representada la curva ROC de este péptido.

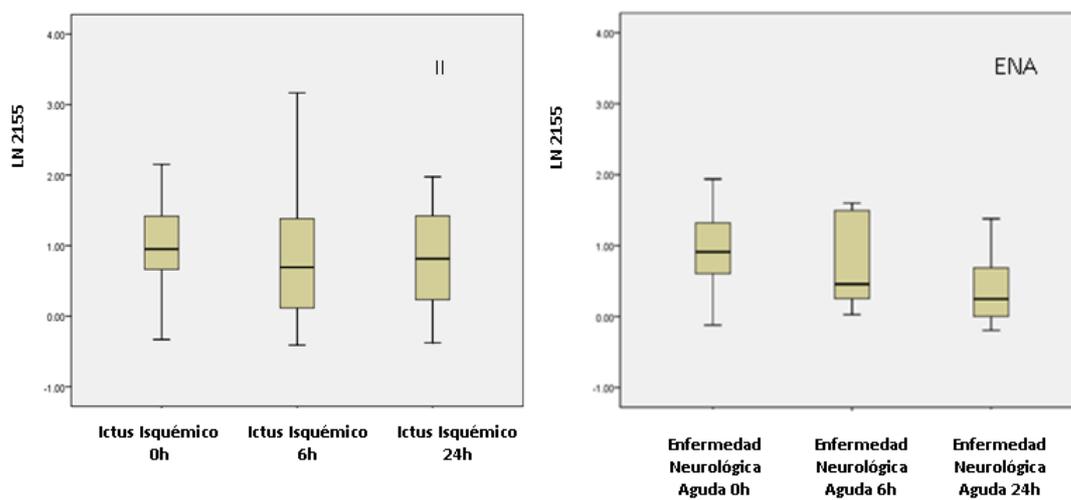
Figura 29: Curva ROC del péptido 2155 en la comparación entre Ictus Isquémico versus Controles Sanos.



Si comparamos esta curva ROC con otras obtenidas durante el estudio, vemos que el AUC no es tan elevado como en otras ocasiones. Sin embargo, en el resto de casos se necesitó un mínimo 3 péptidos para conseguir una buena S y E. Ningún péptido por sí sólo había obtenido tan buenos resultados de AUC, S y E.

Por este motivo, se decidió analizar el comportamiento del péptido 2155 Da en el grupo de I.Iq. y en el de E.N.A. con el paso del tiempo (0, 6 y 24 horas). Par ello se realizó un diagrama de cajas donde se veía que en el grupo de I.Iq. los niveles de expresión del péptido 2155 Da se mantenían, pero en el grupo E.N.A. la expresión disminuía conforme avanzaba el tiempo. Una representación de este comportamiento se puede ver en la Figura 30.

Figura 30: Box-Plot del péptido 2155 Da en los grupos Ictus Isquémico. versus Enfermedad Neurológica Aguda con respecto al tiempo.



II: ictus isquémico, ENA: enfermedad neurológica aguda.

5.

DISCUSIÓN

El estudio de perfiles peptídicos ha sido, desde el desarrollo de la instrumentación de espectrometría de masas, un campo prometedor. Sin duda es una metodología atractiva desde el punto de vista clínico, ya que permite trabajar con tipos de muestra de fácil obtención (sangre, orina, saliva, etc). Si bien algunos fluidos como la orina y la saliva se pueden obtener de forma menos invasiva que la sangre, estos fluidos presentan una gran desventaja, que es la dilución en que se encuentran los analitos de interés para la proteómica. La sangre es la muestra ideal, ya que es rica en proteínas, está en contacto con todos los órganos del cuerpo, su obtención no es invasiva para el paciente y es fácil de conservar.

El estudio de perfiles peptídicos séricos para la búsqueda de nuevos biomarcadores específicos de enfermedad, es un método que, a priori, parece prometedor. No obstante, los estudios realizados en diferentes laboratorios han demostrado que existen muchos factores que se deben considerar y definir antes de llevar a cabo un estudio de búsqueda de biomarcadores. En este sentido, Petricoin *et al.* (60) fueron el primer grupo de investigación en encontrar patrones diferenciales de perfiles peptídicos que permitían discriminar entre cáncer de ovario y controles sanos, con una sensibilidad y especificidad cercanas al 100%. Sin embargo, este estudio fue cuestionado debido a diferentes interpretaciones sobre los cálculos estadísticos de los datos. También se puso en duda la reproducibilidad de la metodología propuesta por los autores. Desde la publicación de Petricoin *et al.*, se creó entre la comunidad científica un cierto escepticismo sobre la aplicación de la proteómica clínica en la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico, ya que varios grupos de investigación encontraron diferentes biomarcadores estudiando el mismo tipo de muestra y

utilizando la misma tecnología. Esto indicaba que existían variables relacionadas con la recogida de la muestra, la preparación de la misma, su análisis y posterior estudio estadístico, que influían en los perfiles peptídicos y que requerían una estandarización (61).

A partir de trabajos como el de Petricoin *et al.* se hizo patente la necesidad de diseñar protocolos estandarizados del manejo de las muestras y su procesamiento. Desde ese momento, surgieron varios estudios enfocados a identificar los factores que influían en la reproducibilidad de los resultados con la idea de optimizar los perfiles peptídicos séricos (22,27,29-36).

Uno de los objetivos de esta tesis es el diseño de un protocolo optimizado y estandarizado para el estudio de perfiles peptídicos séricos que incluya las fases preanalítica, analítica y postanalítica. Durante la fase experimental se tuvo en cuenta todas las variables que podían influir en la reproducibilidad de dichos perfiles peptídicos.

En la selección del tipo de muestra se valoró la posibilidad de utilizar suero o plasma. El suero es el resultado de la extracción de sangre y su recogida en un tubo sin anticoagulante. El suero no contiene fibrinógeno ya que, *ex vivo*, se va a producir la cascada de la coagulación activando enzimas proteolíticas endógenas que actuarán sobre proteínas endógenas, como el fibrinógeno, dando lugar a un perfil peptídico sérico característico. Algunos de los inconvenientes de la utilización del suero son: la posible unión de proteínas al coágulo de forma incontrolada, la influencia de la temperatura y el tiempo de coagulación en el perfil peptídico sérico y la aparición de señales muy intensas en los espectros que pueden enmascarar la señal de otros péptidos endógenos de bajo peso molecular (31). Como ventaja, el suero es la muestra

más frecuentemente recogida en todos los estudios clínicos y, de hecho, la mayoría de de estudios publicados sobre la comparación de perfiles peptídicos han sido realizados con muestras de suero (61).

El plasma es la sangre extraída y recogida en tubo con anticoagulante. Al no activarse la cascada de la coagulación *ex vivo*, la muestra es más estable. La elección de un correcto anticoagulante es importante: EDTA y citrato son los recomendados por la HUPO (31). Los inconvenientes de utilizar plasma para el estudio de perfiles peptídicos están relacionados con la presencia de plaquetas y su activación. Se estima que el 14% de los péptidos presentes en el plasma han sido liberados por las plaquetas o son consecuencia de enzimas liberadas por las plaquetas. Por este motivo, se recomienda retirar las plaquetas tras la extracción para evitar dicha interferencia (31).

Los grupos de Baumann *et al.* (29) y West-Nielsen *et al.* (28) seleccionaron el suero como muestra ideal para sus estudios ya que obtuvieron espectros con mayor número de picos y de mayor intensidad sobre todo en el rango de 1000-3000 Da.

Findeisen *et al.*(30) y el "*Specimen Collection and Handling Committee* (SCHC) de la HUPO (31) recomiendan la utilización de plasma ya que conserva mejor el perfil peptídico, evitando la acción proteolítica que se produce durante la cascada de la coagulación. Sin embargo Villanueva y Liotta (63,64) introdujeron una nueva teoría según la cual la cascada proteolítica producida en el suero daría lugar a perfiles peptídicos séricos característicos de la enfermedad. Villanueva *et al.* encontraron evidencias de que el peptidoma sérico humano está formado, en gran medida, por péptidos obtenidos durante la fase *ex vivo* a partir de la acción de proteasas sobre proteínas endógenas durante la activación de la cascada de la coagulación y activación del complemento. En un primer paso, las endoproteasas actuarían sobre las proteínas

dando lugar a péptidos sobre los que, en un segundo paso, actuarían exoproteasas liberadas por las células “tumorales” dando así un perfil peptídico sérico característico de la enfermedad. Este grupo seleccionó como muestra ideal para sus estudios el suero y no recomendaba la adición de inhibidores de proteasa al suero (63).

En el presente estudio se analizaron los perfiles peptídicos obtenidos a partir de muestras de suero y plasma de dos voluntarios sanos. Los perfiles peptídicos de suero mostraron un mayor número de picos en el rango de interés entre 800-5000 Da en comparación a los observados en las muestras de plasma. Los picos observados fueron de gran calidad, obteniéndose picos estrechos y con una buena relación señal/ruido de fondo. A partir de estos resultados, se seleccionó el suero como la muestra ideal para aplicar el protocolo de nuestro estudio.

Una vez seleccionada la muestra de suero, se estudiaron y optimizaron todas las variables que podían influir en la reproducibilidad de los perfiles peptídicos séricos como son: el tiempo de coagulación, la temperatura y el tiempo transcurrido hasta la congelación del tubo de alícuota.

El tiempo de coagulación es el tiempo que se deja coagular la muestra de suero a temperatura ambiente. Algunos autores como Villnaueva *et al.* y Bauman *et al.* (29,40) recomiendan como tiempo óptimo de coagulación los 30 minutos.

Girolamo *et al.*, Hsieh *et al.* y Zeng *et al.* (34,32,69) también analizaron el efecto del tiempo de coagulación, eligiendo los 60 minutos como el más óptimo.

En el presente estudio se analizó el efecto de diferentes tiempos de coagulación en el perfil peptídico sérico, los tiempos que se estudiaron fueron: 30, 60, 120 y 180 minutos. Tras el análisis de los espectros obtenidos, se seleccionó como tiempo de coagulación óptimo el de 60 minutos, ya que era el que daba un mayor número de

picos y de gran intensidad. Los espectros obtenidos a los 30 minutos presentaban un gran número de péptidos pero de menor intensidad que los obtenidos a 60 minutos. A partir de los 120 minutos, al igual que lo descrito por otros autores (29,40), se obtuvo un aumento del ruido de fondo que disminuía la calidad de los espectros obtenidos. Tras estos resultados se seleccionó como tiempo óptimo de coagulación el de 60 minutos.

Otro factor que influye en la reproducibilidad de los perfiles peptídicos séricos es el tiempo que transcurre entre que el suero es separado del coágulo hasta su posterior almacenamiento a -80°C .

En la fase experimental se realizaron pruebas dejando el suero en contacto con el coágulo durante distintos tiempos: 0, 30, 60 y 120 minutos. En los espectros analizados se observó un efecto claro desde el tiempo 30 minutos. Dicho efecto consistió en una disminución en la intensidad de los picos de masa comprendida entre 800-5000 Da y un aumento de la intensidad de los picos cuya masa era superior a 6000 Da. Esta observación coincide con lo descrito anteriormente por Baumann *et al.* y West-Nielsen *et al.* (28,29,). Tras los resultados obtenidos, se decidió que la separación del suero y el coágulo se debía realizar en un tiempo inferior a los 30 minutos para evitar efectos en la reproducibilidad de los perfiles peptídicos séricos.

La muestra de suero es rica en proteínas pero tan sólo un 1% de la proteínas totales son potenciales biomarcadores de diagnóstico ya que hasta ahora, no se podían analizar por falta de una tecnología potente. Con la finalidad de evitar el enmascaramiento de esas proteínas minoritarias, se debe realizar un enriquecimiento de la muestra en las proteínas de interés.

DISCUSIÓN

El objetivo de la presente tesis es diseñar un protocolo estandarizado y optimizado que se pueda aplicar a la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico precoz de cáncer de páncreas y de ictus isquémico. Con esta idea, se seleccionó el fosfoproteoma como el subgrupo de proteínas de interés ya que está implicado en procesos tumorales y neurológicos.

La fosforilación de las proteínas es una de las modificaciones postraduccionales con mayor prevalencia (70). Se trata de un mecanismo control de muchos procesos celulares incluyendo señales de transducción, expresión génica, ciclo celular, regulación del citoesqueleto y apoptosis, entre otros (71). El fosfoproteoma se genera por la acción de kinasas y fosfatasa que participan en la fosforilación y defosforilación de proteínas en los residuos de serina, treonina y tirosina. La interrupción de estas rutas, puede dar lugar a procesos patológicos como el desarrollo de tumores (77-80). Por este motivo se pensó que un enriquecimiento del fosfoproteoma sería adecuado para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico precoz de cáncer de páncreas.

Además, los procesos de fosforilación de proteínas también están implicados en el correcto funcionamiento de las neuronas participando en la estructura, organización y funcionamiento sináptico (83-85). El ictus isquémico es un proceso fisiopatológico donde las neuronas de una parte concreta del cerebro, sufren un proceso de apoptosis por lo que se planteó como hipótesis que dichas neuronas pudieran liberar al líquido cefalorraquídeo fosfoproteínas y/o fosfopéptidos que podrían atravesar la barrera hematoencefálica y ser así detectables en sangre. El estudio del fosfoproteoma puede ser, por tanto, de interés para la búsqueda de nuevos biomarcadores de ictus isquémico.

En el presente trabajo se seleccionó el método de cromatografía de afinidad a metal inmovilizado (IMAC) como el óptimo para el realizar el enriquecimiento del suero en fosfoproteínas. En concreto, se utilizó el kit IMAC-Cu (Bruker Daltonics) donde unas partículas superparamagnéticas están cubiertas con metal cobre (Cu), que interacciona con el grupo fosfato de los péptidos reteniéndolos y posteriormente los péptidos son eluidos. El protocolo de prefraccionamiento recomendado por la casa comercial, fue modificado para optimizar los resultados, obteniendo espectros más limpios y con mayor número de péptidos.

La automatización del proceso analítico consiguiendo los mismos resultados óptimos que de forma manual, era uno de los objetivos de la presente tesis. El procesamiento manual es una importante fuente de variabilidad debido al “factor humano” (40-42,89). Por eso, una vez optimizado el proceso de prefraccionamiento de forma manual, este paso se automatizó mediante el uso de un robot Freedom Evoware (Tecan). La automatización permitió minimizar los errores debidos al procesamiento manual de las muestras, se mejoró la velocidad y el rendimiento en el análisis de las mismas. La programación del sistema robotizado se realizó de forma personalizada adaptando el robot al protocolo que previamente se había optimizado de forma manual y que ha sido explicado y discutido en detalle anteriormente.

Otro objetivo de la presente tesis era analizar el impacto del proceso de automatización en la reproducibilidad de los resultados. En la fase experimental se partió de muestras SCH. Para valorar la reproducibilidad, se calculó el CV de la media del área de cada uno de los picos que se detectó en el espectro (n=210 picos). Este es el único estudio publicado donde, para valorar la reproducibilidad, se tienen en cuenta todos los picos presentes en el espectro.

DISCUSIÓN

Abrethsen (27) publicó una revisión sobre la reproducibilidad de varios estudios de perfiles peptídicos séricos realizados mediante MALDI TOF-MS, y encontró que los CV interdía de los diferentes trabajos analizados oscilaban entre el 4 % y el 26%. Esta dispersión se puede deber a la diferencia en el número de réplicas, rango de masas y número de picos tenidos en cuenta para el cálculo del CV.

En nuestro estudio, con el procesamiento manual del protocolo optimizado, se obtuvieron espectros con un CV interdía del 62%. Tras la automatización de la fase analítica, se volvieron a procesar muestras SCH obteniendo una importante mejoría en la reproducibilidad de los resultados ya que el CV interdía disminuyó hasta un 11,6 % ($P_{90}=23,9$ %). En el ámbito del diagnóstico clínico el CV de un método se considera aceptable cuando se encuentra entre el 1,5% y el 10%, incluyendo variaciones interlaboratorios. Sin embargo, teniendo en cuenta que la variación biológica de los biomarcadores es muchas veces superior al 10%, el CV interdía de nuestro método se puede considerar aceptable para ser aplicado en estudios biológicos (90).

El estudio de la influencia del género y la edad en los perfiles peptídicos séricos, es otro de los objetivos de la presente tesis. Hay pocos estudios realizados al respecto, Villanueva *et al.*(91) encontraron un efecto del género despreciable en población general. Sin embargo cuando estudiaron población joven, con edad inferior a 35 años sí que encontraron una mayor influencia del género aumentando la capacidad discriminatoria entre ambos sexos hasta un 70%. Miike *et al.*(92) encontraron diferencias significativas en los perfiles peptídicos séricos según el género, pero en este estudio se estudio también una población joven de edades comprendidas entre los 19 y 24 años.

El presente trabajo es el primero que analiza la influencia del género y la edad en un rango de edades más amplio (17 y 85 años) con una mediana de edad de 46 años. El análisis de todos los picos presentes en el espectro, mostró que la influencia del género y la edad en los perfiles peptídicos séricos era mínima y se consideró despreciable. Las características en cuanto a edad y sexo de la población control estudiada en el presente trabajo, eran más similares a los grupos de estudio (cáncer de páncreas e ictus isquémicos) que la población estudiada por el grupo de Miike *et al.*

Uno de los objetivos clave de la presente tesis era aplicar el protocolo optimizado y estandarizado en dos estudios clínicos para la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico precoz de Cáncer de Páncreas (Ca.P.) y de Ictus Isquémico (I.Iq). Para realizar el análisis estadístico de los resultados obtenidos en los dos estudios clínicos realizados, se diseñó un modelo estadístico basado en la regresión logística binaria. Dicho modelo estadístico trataba de buscar la combinación de péptidos que, con el menor número de ellos, discriminara entre los grupos de estudio con una gran S y E diagnósticas.

El cáncer de páncreas (Ca.P.) es uno de los cánceres de menor incidencia pero con peor pronóstico ya que, cuando se diagnostica el tumor, el paciente suele estar en un estadio avanzado y no se pueden aplicar terapias efectivas. La esperanza de vida a 5 años es menor del 5% con una media de supervivencia de menos de 6 meses. En España se calcula que hay unos 5.000 casos anuales, de los cuales 4900 mueren por esta causa. El 90 % de los casos de cáncer de páncreas es de tipo adenocarcinoma ductal, siendo la única terapia posible la resección quirúrgica. Con este tratamiento la esperanza de vida a 5 años si el tamaño del tumor es menor a 20 mm es del 40%, pero

DISCUSIÓN

si es menor a 10mm la esperanza aumenta hasta un 75 %. Por eso es importante diagnosticar el tumor de una forma precoz, no sólo para que pueda aplicarse la terapia adecuada, sino para que ésta sea efectiva y la esperanza de vida sea elevada (43,44)

El diagnóstico definitivo de cáncer de páncreas se basa en pruebas de imagen, sin embargo a veces no resulta fácil diferenciar entre cáncer de páncreas y pancreatitis crónica (43). Pero las pruebas de imagen son caras y lentas. En la actualidad no existe ningún biomarcador sérico que haya mostrado una buena sensibilidad y especificidad en el diagnóstico precoz del Ca.P.. El antígeno carcinoembrionario 19.9 (CA 19.9) es un marcador tumoral relacionado con el Ca. P. sin embargo, las guías clínicas no recomiendan el uso del CA 19.9 para diagnóstico de cáncer de páncreas debido al elevado número de falsos positivos (43,97). Además, no se observa un aumento del antígeno CA 19.9 en estadios tempranos del cáncer o en los tipos de tumor de pequeño tamaño con lo que este biomarcador no es útil para el diagnóstico precoz de la enfermedad. Es necesario pues, encontrar un biomarcador o panel de biomarcadores cuya S y E sean mayores y, adicionalmente, que detecten la enfermedad de forma precoz para que la terapia pueda ser efectiva (43,47,98)

En el estudio de búsqueda de biomarcadores de diagnósticos precoz de Ca.P., se incluyeron muestras de Ca.P., pancreatitis crónica (P.C.) y controles sanos (C.S.). Se trataba de encontrar un biomarcador o panel de biomarcadores que fuera capaz de diferenciar entre Ca. P. y C.S pero también entre Ca. P. Y P.C. ya que son dos patologías difíciles de discriminar.

A todas las muestras se les midió el CA 19.9 obteniendo una sensibilidad del 75,5% y una especificada del 87,3% , para diferenciar entre Ca.P. y P.C., que coincidía con lo

descrito en otros estudios (99) pero que, tal y como se ha comentado anteriormente, presentaba el problema de los falsos positivos.

Al aplicar el protocolo optimizado en este trabajo y comparar muestras de Ca.P. y de P.C. encontramos que, 43 de 273 péptidos detectados mostraron intensidades diferentes entre ambos grupos de forma estadísticamente significativa. Partiendo de los 10 péptidos estadísticamente más significativos e incorporando el CA 19.9 como una variable más, se aplicó el modelo estadístico de regresión logística binaria para buscar el biomarcador o panel de biomarcadores que discriminase entre ambos grupos de interés con la mejor S y E diagnóstica. Como resultado se obtuvo un panel formado por la combinación de los péptidos 1006,52 Da, 1929,65 Da y el CA 19.9 que mejoraba significativamente la sensibilidad y especificidad diagnóstica del CA 19.9 cuando se utilizaba sólo, aumentando la sensibilidad diagnóstica de un 75,5 % a un 89,8 % y la especificidad diagnóstica de un 87,3 % a un 92,7 %. Este hallazgo mejora los resultados obtenidos por otros autores que también analizaron perfiles peptídicos séricos para buscar biomarcadores de diagnóstico precoz de Ca. P. (44,100,101). Hay que remarcar que ninguno de estos autores incluyeron el CA 19.9 en sus algoritmos.

También comparamos el grupo de pacientes con enfermedad pancreática (E.P.) (Ca.P. y P.C.) frente al grupo de C.S. con la finalidad de encontrar un panel de biomarcadores específicos de patología pancreática. En este caso 223 de 273 péptidos detectados mostraron una intensidad estadísticamente diferente en ambos grupos de estudio. Además, 118 de esos 223 péptidos mostraron una mayor capacidad diagnóstica que el CA 19.9 por lo que, en esta comparación no se incluyó el CA 19.9 en el algoritmo. Al aplicar el modelo estadístico de regresión logística binaria a los 10 péptidos de mayor significación estadística, se obtuvo un panel de 3 péptidos de m/z 2028,2; 4154,78 y

DISCUSIÓN

1773,36 Da cuya S y E diagnóstica fueron del 98,2% y 97,1%. La capacidad diagnóstica del panel de péptidos obtenida fue similar a lo descrito por otros artículos (46,103) y claramente mejoraba la del biomarcador CA 19.9.

Cabe mencionar que la mayoría de estudios que se han llevado a cabo utilizando esta metodología, se han realizado comparando muestras de cáncer de páncreas versus controles sanos (46,47,63,104-106). Obviamente, estos dos grupos son muy diferentes ya que uno presenta enfermedad y el otro no. Lo realmente difícil, interesante y a la vez desafiante, es poder diferenciar entre los grupos Ca.P. y P.C. que son dos grupos fisiopatológicamente más parecidos y donde las pruebas de imagen no siempre son concluyentes. Hay pocos estudios que hayan comparado estos dos grupos (44,98,107). A diferencia del estudio de Navaglia *et al.* (107), en el presente estudio sí que encontramos que la combinación de perfil peptídico y CA 19.9 mejoraba la capacidad diagnóstica para diferenciar entre Ca.P. y P.C. .

En la comparación de E.P y C.S se seleccionó un panel de tres péptidos uno de los cuales, el 4155 Da, es también uno de los seleccionados por Guo J. *et al.* como candidato para discriminar entre los grupos Ca.P., P.C. y C.S. Este hallazgo confirma que dicho péptido es característico de enfermedad pancreático, ya que ha sido seleccionado en nuestro trabajo y en el de otro grupo de investigación utilizando la misma metodología.

El segundo estudio clínico al que se aplicó el protocolo optimizado y estandarizado, fue el de búsqueda de biomarcadores de diagnóstico precoz de ictus isquémico (I.Iq). El ictus es, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), la tercera causa de muerte y la primera causa de discapacidad a largo plazo en los países desarrollados. Es por tanto, un problema de salud internacional. El ictus isquémico consiste en una falta de aporte sanguíneo a una determinada zona del parénquima encefálico, mientras que el ictus hemorrágico se debe a la rotura de un vaso sanguíneo encefálico con extravasación de sangre fuera del lecho vascular. El 85% de los ictus son isquémicos mientras que el resto son hemorrágicos (108). Cuando se produce el ictus isquémico, la zona queda hipoperfundida y por tanto sin aporte de oxígeno y nutrientes, esto da lugar a un proceso de muerte celular, pero hay una zona adyacente hipoperfundida llamada “penumbra isquémica” que durante un período de tiempo de 3 horas resulta recuperable ya que presenta un metabolismo energético preservado y por tanto, potencialmente viable. Ese período de 3 horas desde el comienzo de los síntomas se denomina “ventana terapéutica” ya que, si durante ese tiempo se le aplica un tratamiento trombolítico, ese paciente podrá recuperarse. Pero es importante asegurarse de que el ictus es isquémico y no hemorrágico, ya que si se le aplica un tratamiento trombolítico a un ictus hemorrágico las consecuencias pueden ser devastadoras.

El único método diagnóstico que existe hoy en día es el realizado por pruebas de imagen, mediante tomografía computerizada y/o resonancia magnética. Estos métodos, además de caros y no disponibles en todos los centros, necesitan tiempo para realizarse y este factor es limitante para los pacientes con ictus.

DISCUSIÓN

Un biomarcador o panel de biomarcadores séricos sería la mejor opción para este tipo de pacientes ya que, además de no ser invasivo, se podría realizar de forma fácil y accesible a todos los centros sanitarios e incluso unidades móviles. Con este objetivo se aplicó el protocolo optimizado y estandarizado diseñado en el presente trabajo para la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico precoz de Ictus isquémico.

En este estudio se compararon los perfiles de los tres grupos de pacientes que interesaba discriminar: pacientes con I.Iq., pacientes con enfermedad neurológica aguda (E.N.A.) y C.S..

En primer lugar se compararon los perfiles peptídicos séricos de los grupos I.Iq. y E.N.A. a diferentes tiempos (0, 6 y 24 horas) con la finalidad de buscar un panel que, con el menor número de péptidos, fuera capaz de discriminar entre ambos grupos con una buena S y E diagnóstica. Además se esperaba que dicho panel tuviera un comportamiento de evolución con el tiempo, observando un aumento o disminución de las intensidades de los picos en cada uno de los tres tiempos (0, 6 y 24 horas). Al aplicar el modelo de regresión logística binaria en cada uno de los tres tiempos, se obtuvieron tres paneles de péptidos diferentes, necesitando un mayor número de péptidos a tiempo 0 horas para poder discriminar entre ambos grupos de estudio con una buena S y E diagnóstica. Este resultado tiene sentido ya que, en las primeras horas post-infarto, es cuando más cuesta diagnosticar el I.Iq y diferenciarlo de E.N.A. ya que en este grupo están incluidas patologías que imitan la sintomatología del I.Iq como por ejemplo: el ictus hemorrágico, ataque isquémico transitorio, crisis comicial, encefalitis, migraña con aura, etc. De los tres paneles obtenidos, sólo un péptido (2820 Da) resultó seleccionado en dos paneles (0 y 24 horas), por lo que no fuimos capaces de encontrar un único panel de péptidos que fuera capaz de

discriminar con una buena S y E entre ambos grupos de estudio (I.Iq. y E.N.A.) y que mostrara una evolución con el tiempo. Esto se puede deber a que dentro del grupo E.N.A. se incluyeron un gran número de pacientes con ictus hemorrágico cuya fisiopatología es muy semejante a la del I.Iq. El poder diferenciar entre estas dos patologías resulta interesante ya que el tratamiento trombolítico que se debe aplicar en las primeras horas tras el I.Iq. es incompatible con el ictus hemorrágico, por lo que interesa encontrar un biomarcador o panel de biomarcadores que los discriminen.

Cuando se comparó el grupo de enfermedad neurológica (I.Iq. y E.N.A.) con el grupo de C.S. y por otro lado el grupo I.Iq. con el de C.S., el modelo estadístico de regresión logística binaria encontró un péptido común (2155 Da) en ambos paneles discriminantes. Este péptido podría ser un buen biomarcador de diagnóstico de I.Iq. ya que, él sólo es capaz de discriminar entre I.Iq. y C.S. con una S y E del 88,6% y del 96,9% respectivamente (AUC 0,980; 95% CI 0,956-1,004; $P < 0,001$)

Hasta la fecha, tan sólo hemos encontrado un estudio parecido al que aquí se presenta, realizado con muestra de plasma y analizado mediante la tecnología SELDI. El estudio de Zhang *et al.* (51) comparó muestras de I.Iq. con C.S. y tras el análisis estadístico de los datos obtuvieron un panel de 13 péptidos que discriminaba entre ambos grupos con una sensibilidad del 84,4 % y una especificidad del 95%. En nuestro estudio obtuvimos una sensibilidad y especificidad similar con tan sólo un péptido (2155 Da). Esta diferencia en el número de péptidos seleccionados se puede deber a variaciones en el protocolo utilizado ya que Zhang X. *et al.* partieron de muestras de plasma, utilizaron un sistema de espectrometría de masas distinto (SELDI) y un método de análisis estadístico diferente. Además este estudio no incorporó muestras de

DISCUSIÓN

pacientes con E.N.A., por lo que no imita las condiciones reales en las que se debe diferenciar un paciente que sufre I.Iq.

Basándonos en nuestros resultados, el péptido 2155 Da podría ser un buen biomarcador para diferenciar I.Iq. y C.S. Pero en el estudio nos propusimos dar un paso más y ver cómo se comportaba este péptido en los grupos I.Iq. y E.N.A. con el paso del tiempo. Las gráficas Box Plot mostraron variaciones en los niveles de dicho péptido en ambos grupos de estudio con el paso del tiempo. Pese a la dispersión de los datos, en el grupo E.N.A. el péptido 2155 Da muestra una clara tendencia de disminución con el paso del tiempo, mientras que en el grupo I.Iq. los niveles se mantuvieron más o menos constantes. Estos resultados no fueron estadísticamente significativos, probablemente debido al pequeño tamaño muestral. Se necesitarían estudios adicionales con un mayor tamaño muestral para corroborar dicho hallazgo. El presente trabajo es el primero donde se han comparado los perfiles peptídicos séricos de los grupos I.Iq. y E.N.A. estudiando muestras recogidas a distintos tiempos (0, 6 y 24 horas) para ver la evolución de los péptidos con el paso del tiempo.

Como limitación del estudio hay que comentar que en 22 de los 45 casos de Ictus isquémico los pacientes recibieron tratamiento trombolíticos. Las muestras de tiempo 0 horas se obtuvieron antes de aplicar dicho tratamiento, pero el perfil peptídicos de la segunda y tercera muestra (6 y 24 horas) podría verse afectado por la presencia de los compuestos administrados durante el tratamiento trombolítico. Para próximos estudios de validación de resultados se deberían descartar muestras de pacientes que hayan recibido tratamiento trombolítico.

En conclusión, el péptido 2155 Da es un buen biomarcador peptídico para discriminar entre I.Iq. y C.S. Además podría ser un biomarcador peptídico de ictus isquémico ya

que presenta distinto comportamiento entre pacientes con I.Iq. y E.N.A. Sin embargo, estos resultados deberían ser confirmados mediante validación en un grupo de pacientes no seleccionados y completado con un proceso de identificación de dicho péptido. Una vez realizada la identificación, seremos capaces de diseñar un inmunoensayo específico que es el método más usado para determinar biomarcadores proteicos.

6.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

6.1.- RESUMEN

El estudio de perfiles peptídicos mediante la tecnología de espectrometría de masas MALDI-TOF es una metodología útil y prometedora para la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico. Sin embargo, queda clara la necesidad de estandarizar todas las fases del proceso desde la preanalítica, analítica y postanalítica para poder mejorar la reproducibilidad inter e intralaboratorio.

Existen muchos factores que pueden influir en la variabilidad de los resultados obtenidos: tipo de muestra, conservación de la muestra, método de prefraccionamiento, depleción o no de proteínas mayoritarias, tipo de matriz, solventes utilizados, automatización del proceso, uso de calibradores, tipo de analizador, método estadístico, etc. Realizar un análisis previo de los factores que pueden influir en la calidad de los espectros y diseñar un protocolo estandarizado que sea óptimo para los biomarcadores que se busquen, es fundamental para no fracasar en el estudio de investigación.

En el presente estudio se ha diseñado un protocolo estandarizado para el estudio de perfiles peptídicos séricos que incluye las fases preanalítica, analítica y postanalítica, con el objetivo de poder ser aplicado a diferentes patologías en la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico precoz.

Tras analizar las variables que influyen en los perfiles peptídicos se seleccionó la muestra de suero como la más idónea por ser la que daba espectros con mayor

RESUMEN Y CONCLUSIONES

número de picos y de mejor calidad. El tiempo de coagulación óptimo se estableció en 60 minutos y el tiempo máximo desde la extracción de la muestra hasta la posterior congelación de las alícuotas, no debía superar las 2 horas. Como método de prefraccionamiento se eligió el basado en cromatografía en fase sólida utilizando partículas magnéticas funcionalizadas con cobre (IMAC-Cu), se seleccionó la matriz 2',6',-dihidroxiacetofenona (2,6-DHAP) a la concentración de 1mg/mL disuelta en acetonitrilo (ACN) al 20% y citrato de amonio dibásico 0,5 M y pH 4,5. Como solución de elución se eligió el ACN al 30% con 0,1% de ácido trifluoroacético y 0,08% de citrato de amonio dibásico.

La fase preanalítica se automatizó siguiendo el protocolo previamente optimizado de forma manual, para ello se empleó el robot Freedom Evo Ware de Tecan. La placa seleccionada para el análisis fue la Anchor Chip de 400 μm . El análisis por espectrometría de masas se realizó con el analizador Autoflex II (Bruker Daltonics) basado en la tecnología MALDI-TOF MS. Se utilizaron calibradores y controles antes de cada serie analítica.

En el presente trabajo se evaluó el efecto de la automatización de la fase analítica sobre la reproducibilidad de los resultados a partir del cálculo del CV interdía del área media de cada uno de los picos presentes en el espectro. Las muestras analizadas para dicho fin, fueron las muestras "suero control humano" (SCH) (Sigma Aldrich). El CV interdía pasó de ser un 62%, cuando el proceso se realizaba de forma manual, a un 11.6% cuando se automatizó el proceso. Se concluye que, con la automatización del proceso analítico, se consigue una importante mejoría en la reproducibilidad de los

resultados, obteniendo un CV interdía en el orden de lo aceptable para un biomarcador de uso diagnóstico.

En el presente trabajo también se ha analizado la influencia del género y la edad sobre los perfiles peptídicos séricos llegando a la conclusión de que el efecto de estas dos variables es mínimo y se puede considerar despreciable.

Para el análisis estadístico de los resultados, se diseñó un modelo de regresión logística binaria a partir del software SPSS 15.0 que, partiendo de los 10 péptidos estadísticamente más significativos, era capaz de buscar la combinación que, con menor número de péptidos, consiguiera discriminar entre los grupos de estudio con una mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica.

El protocolo estandarizado y optimizado se aplicó a la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico precoz de cáncer de páncreas comparando muestras de cáncer de páncreas (Ca.P.), pancreatitis crónica (P.C.) y controles sanos (C.S.). Cuando se compararon los grupos Ca.P. y P.C., al incorporar el marcador tumoral CA 19.9 como una variable más del modelo estadístico, se obtuvo un panel discriminante constituido por dos péptidos (1006,52 y 1929,65 Da) y el CA 19.9. Dicho panel mejoraba notablemente la sensibilidad y especificidad diagnóstica del CA 19.9 cuando este se utilizaba sólo. Con el nuevo panel de biomarcadores, la sensibilidad diagnóstica pasaba a ser de un 75,5% a un 89,8 % y la especificidad diagnóstica mejoraba de un 87,3% a un 92,7%.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Cuando se comparó el grupo enfermedad pancreática (Ca.P. y P.C.) frente al grupo C.S., el modelo estadístico seleccionó un panel de tres péptidos y se descartó el CA 19.9 como variable, ya que presentaba una menor capacidad diagnóstica que los péptidos seleccionados. De los tres péptidos elegidos, el péptido 4155 Da había sido previamente descrito en la bibliografía como característico de enfermedad pancreática (98) confirmando nuestros resultados. A partir de estos datos podemos concluir que el péptido 4155 Da es característico de enfermedad pancreática.

El protocolo estandarizado y optimizado se aplicó también a la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico precoz de ictus isquémico. En este estudio se compararon muestras de ictus isquémico (I.Iq.), enfermedad neurológica aguda (E.N.A.) y controles sanos (C.S.). Se recogieron muestras de los pacientes con I.Iq. y E.N.A. a distintos tiempos: 0, 6 y 24 horas postinfarto. En la comparación de las muestras de los grupos I.Iq. y E.N.A. a los distintos tiempos, no se consiguió un único panel de péptidos que evolucionara con el paso del tiempo, aumentando o disminuyendo la expresión de sus péptidos.

Sin embargo, tanto al comparar enfermedad neurológica (I.Iq. y E.N.A.) frente a C.S. como al comparar I.Iq. frente a C.S., el modelo estadístico seleccionó un péptido en común en ambos paneles discriminantes: el péptido 2155 Da. Utilizando sólo el péptido 2155 Da, se consigue discriminar entre I.Iq. y C. S. con una sensibilidad y especificidad diagnóstica del 88,6% y del 96,9% respectivamente.

Además, al analizar el comportamiento del péptido 2155 Da en los dos grupos de interés (I.Iq. y E.N.A.), se observa una clara tendencia de disminución, en cuanto a su

expresión con el paso del tiempo, en el grupo E.N.A.. Sin embargo, en el grupo I.lq. los niveles del péptido 2155 Da permanecen más o menos estable. A partir de estos datos se puede concluir que el péptido 2155 Da puede ser un buen biomarcador de diagnóstico precoz de I.lq.. Este hallazgo debe confirmarse en un estudio de validación realizado con nuevas muestras y con un mayor tamaño muestral para obtener resultados estadísticamente significativos.

6.2.- CONCLUSIONES

Del trabajo desarrollado en la presente tesis doctoral se obtienen las siguientes conclusiones:

1.- Se ha obtenido un protocolo estandarizado y optimizado que se puede aplicar a distintos tipos de patología con el objetivo de encontrar biomarcadores séricos de diagnóstico precoz.

2.- La automatización de la fase preanalítica, mediante robotización, mejora la reproducibilidad de los resultados consiguiendo un coeficiente de variación interdía en el orden de lo recomendado para un biomarcador de uso diagnóstico.

3.- Se ha podido demostrar que el efecto del género y la edad en los perfiles peptídicos séricos no es significativo.

4.- En los estudios de comparación de perfiles peptídicos séricos para la búsqueda de nuevos biomarcadores de diagnóstico precoz, es importante comparar no sólo enfermos frente a sanos, sino también se debe tener un grupo de patología similar a la del estudio, con el fin de asegurar la especificidad de los péptidos discriminantes.

5.- En el estudio de cáncer de páncreas se ha conseguido mejorar la capacidad diagnóstica del marcador clásico CA19.9 añadiendo los péptidos seleccionados en el estudio (1006,52 Da y 1929,65 Da). De esta manera se mejora notablemente la

sensibilidad diagnóstica de un 75,5% a un 89,8% y la especificidad diagnóstica de un 87,3% a un 92,7%. Dichos resultados quedan pendientes de validación e identificación de los péptidos seleccionados.

6.- En el estudio de cáncer de páncreas también se concluye que el péptido 4155 Da es característico de enfermedad pancreática. Dicho péptido queda pendiente de validación e identificación.

7.- En el estudio de ictus isquémico no se obtuvo un panel de péptidos único que evolucionara modificando su expresión con el paso del tiempo.

8.- En el estudio de ictus isquémico se concluye que el péptido 2155 Da es un buen biomarcador de diagnóstico precoz con un sensibilidad diagnóstica del 88,6% y una especificidad diagnóstica del 96,9% para discriminar entre ictus isquémico y controles sanos.

9.- El péptido 2155 Da puede discriminar entre ictus isquémico y enfermedad neurológica aguda al presentar diferente patrón de expresión a lo largo del tiempo en ambas patologías. Queda pendiente la validación de este resultado así como la identificación del péptido.

7.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Wilkins, M. R., Sanchez, J. C., Gooley, A. A., Appel, R. D., Humphery-Smith, I., *et al.* (1996). Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnology and genetic engineering reviews*, 13(1), 19-50.
- 2.- Anderson, N. L., & Anderson, N. G. (1998). Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis*, 19(11), 1853-1861.
- 3.- Mischak, H., Apweiler, R., Banks, R. E., Conaway, M., Coon, J., *et al.* (2007). Clinical proteomics: a need to define the field and to begin to set adequate standards. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 1(2), 148-156.
- 4.- González-Buitrago, M., Ferreira, L., Del Carmen Muñiz, M. (2008). Proteómica clínica y nuevos biomarcadores en los líquidos biológicos. *Medicina clínica*, 131(11), 426-434.
- 5.- González de Buitrago, J.M.; Ferreira L. Proteómica Clínica. Sociedad Española de Bioquímica clínica y patología molecular (SEQC), 2006. Monografía. ISBN: 978-84-89975-25-5
- 6.- Aebersold, R., Goodlett, D. R. (2001). Mass spectrometry in proteomics. *Chemical reviews*, 101(2), 269-296.
- 7.- Cottrell, J. S., London, U. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis*, 20(18), 3551-3567.
- 8.- Clauser, K. R., Baker, P., Burlingame, A. L. (1999). Role of accurate mass measurement (± 10 ppm) in protein identification strategies employing MS or MS/MS and database searching. *Analytical chemistry*, 71(14), 2871-2882

BIBLIOGRAFÍA

- 9.- Zhang, W., & Chait, B. T. (2000). ProFound: an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Analytical chemistry*, 72(11), 2482-2489.
- 10.- Eng, J. K., McCormack, A. L., Yates, J. R. (1994). An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5(11), 976-989.
- 11.- Karas, M., Hillenkamp, F. (1988). Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Analytical chemistry*, 60(20), 2299-2301.
- 12.- Tanaka, K., Waki, H., Ido, Y., Akita, S., Yoshida, Y., *et al.* (1988). Protein and polymer analyses up to m/z 100000 by laser ionization time of flight mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 2(8), 151-153.
- 13.- Pusch, W., Flocco, M. T., Leung, S. M., Thiele, H., Kostrzewa, M. (2003). Mass spectrometry-based clinical proteomics. *Pharmacogenomics*, 4(4), 463-476.
- 14.- Hortin, G. L. (2006). The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clinical chemistry*, 52(7), 1223-1237.
- 15.- Marvin, L. F., Roberts, M. A., Fay, L. B. (2003). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica chimica acta*, 337(1), 11-21.
- 16.- Westermeier R., Naven T. Proteomics in Practice. A laboratory Manual of Proteome Analysis. Ed. Wiley-VCH Verlag-GmbH. Weinheim, 2002. ISBN: 9783527600175
- 17.- Callesen, A. K., Madsen, J. S., Vach, W., Kruse, T. A., Mogensen, O., Jensen, O. N. (2009). Serum protein profiling by solid phase extraction and mass spectrometry: A future diagnostics tool?. *Proteomics*, 9(6), 1428-1441.

- 18.-** Hortin, G. L. (2006). The MALDI-TOF mass spectrometric view of the plasma proteome and peptidome. *Clinical chemistry*, 52(7), 1223-1237.
- 19.-** Atkinsons, A. J., Colburn, W. A., DeGruttola, V. G., DeMets, D. L., Downing, G. J., Hoth, D. F. (2001). Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. Biomarker definition working group. *Clin. Pharmacol. Ther*, 69, 89-95.
- 20.-** Sturgeon, C., Hill, R., Hortin, G. L., & Thompson, D. (2010). Taking a new biomarker into routine use: A perspective from the routine clinical biochemistry laboratory. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 4(12), 892-903.
- 21.-** Davis, M. T., Auger, P., Spahr, C., Patterson, S. D. (2007). Cancer biomarker discovery via low molecular weight serum proteome profiling—Where is the tumor?. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 1(12), 1545-1558.
- 22.-** Magni, F., Van Der Burgt, Y. E., Chinello, C., Mainini, V., Gianazza, E., *et al.* (2010). Biomarkers discovery by peptide and protein profiling in biological fluids based on functionalized magnetic beads purification and mass spectrometry. *Blood Transfusion*, 8 (Suppl 3), s92.
- 23.-** Bailey, J., Mrozinski, P., Preckel, T., Miller, C., Martosella, J., & Kincaid, R. (2006). New Sample Fractionation Strategies for Proteomic Analyses by LC-MS. *LC GC Magazine-North America-Solutions for Separation Scientists*, 34, 16-23.
- 24.-** Tirumalai, R. S., Chan, K. C., Prieto, D. A., Issaq, H. J., Conrads, T. P., & Veenstra, T. D. (2003). Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2(10), 1096-1103.
- 25.-** Navare, A., Zhou, M., McDonald, J., Noriega, F. G., Sullards, M. C., *et al.* (2008). Serum biomarker profiling by solid-phase extraction with particle-embedded micro tips

BIBLIOGRAFÍA

and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 22(7), 997-1008.

26.- Guo, N., Wen, Q., Li, Z. J., Xu, R. C., Peng, F. F., *et al.* (2014). Optimization and evaluation of magnetic bead separation combined with Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectroscopy (MALDI-TOF MS) for proteins profiling of peritoneal dialysis effluent. *International journal of molecular sciences*, 15(1), 1162-1175.

27.- Albrethsen, J. (2007). Reproducibility in protein profiling by MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 53(5), 852-858.

28.- West-Nielsen, M., Høgdall, E. V., Marchiori, E., Høgdall, C. K., Schou, C., Heegaard, N. H. (2005). Sample handling for mass spectrometric proteomic investigations of human sera. *Analytical chemistry*, 77(16), 5114-5123.

29.- Baumann, S., Ceglarek, U., Fiedler, G. M., Lembcke, J., Leichtle, A., & Thiery, J. (2005). Standardized approach to proteome profiling of human serum based on magnetic bead separation and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 51(6), 973-980.

30.- Findeisen, P., Sismanidis, D., Riedl, M., Costina, V., Neumaier, M. (2005). Preanalytical impact of sample handling on proteome profiling experiments with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical chemistry*, 51(12), 2409-2411.

31.- Rai, A. J., Gelfand, C. A., Haywood, B. C., Warunek, D. J., Yi, J., Schuchard, M. D., *et al.* (2005). HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*, 5(13), 3262-3277.

- 32.-** Hsieh, S. Y., Chen, R. K., Pan, Y. H., & Lee, H. L. (2006). Systematical evaluation of the effects of sample collection procedures on low-molecular-weight serum/plasma proteome profiling. *Proteomics*, 6(10), 3189-3198.
- 33.-** Luque-Garcia, J. L., Neubert, T. A. (2007). Sample preparation for serum/plasma profiling and biomarker identification by mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1153(1), 259-276.
- 34.-** Di Girolamo, F., Alessandrini, J., Somma, P., Guadagni, F. (2010). Pre-analytical operating procedures for serum Low Molecular Weight protein profiling. *Journal of proteomics*, 73(3), 667-677.
- 35.-** Ahmad, S., Sundaramoorthy, E., Arora, R., Sen, S., Karthikeyan, G., & Sengupta, S. (2009). Progressive degradation of serum samples limits proteomic biomarker discovery. *Analytical biochemistry*, 394(2), 237-242.
- 36.-** Björhall, K., Miliotis, T., & Davidsson, P. (2005). Comparison of different depletion strategies for improved resolution in proteomic analysis of human serum samples. *Proteomics*, 5(1), 307-317.
- 37.-** Aresta, A., Calvano, C. D., Palmisano, F., Zambonin, C. G., Monaco, A., *et al.* (2008). Impact of sample preparation in peptide/protein profiling in human serum by MALDI-TOF mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 46(1), 157-164.
- 38.-** Callesen, A. K., Madsen, J. S., Vach, W., Zapico, E., Cold, S., *et al.* (2008). Reproducibility of serum protein profiling by systematic assessment using solid-phase extraction and matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry*, 22(3), 291-300.

BIBLIOGRAFÍA

- 39.-** Penno, M. A., Ernst, M., Hoffmann, P. (2009). Optimal preparation methods for automated matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry profiling of low molecular weight proteins and peptides. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23(17), 2656-2662.
- 40.-** Villanueva, J., Philip, J., Entenberg, D., Chaparro, C. A., Tanwar, M. K., *et al.* (2004). Serum peptide profiling by magnetic particle-assisted, automated sample processing and MALDI-TOF mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 76(6), 1560-1570.
- 41.-** Villanueva, J., Lawlor, K., Toledo-Crow, R., Tempst, P. (2006). Automated serum peptide profiling. *Nature protocols*, 1(2), 880-891.
- 42.-** Jimenez, C. R., El Filali, Z., Knol, J. C., Hoekman, K., Kruyt, F. A., *et al.* (2007). Automated serum peptide profiling using novel magnetic C18 beads off-line coupled to MALDI-TOF-MS. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 1(6), 598-604.
- 43.-** Chan, A., Diamandis, E. P., Blasutig, I. M. (2013). Strategies for discovering novel pancreatic cancer biomarkers. *Journal of proteomics*, 81, 126-134.
- 44.-** Kojima, K., Asmellash, S., Klug, C. A., Grizzle, W. E., Mobley, J. A., & Christein, J. D. (2008). Applying proteomic-based biomarker tools for the accurate diagnosis of pancreatic cancer. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 12(10), 1683-1690.
- 45.-** Alaoui-Jamali, M. A., Xu, Y. J. (2006). Proteomic technology for biomarker profiling in cancer: an update. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 7(6), 411-420.
- 46.-** Ehmann, M., Felix, K., Hartmann, D., Schnölzer, M., Nees, M., *et al.* (2007). Identification of potential markers for the detection of pancreatic cancer through comparative serum protein expression profiling. *Pancreas*, 34(2), 205-214.

- 47.- Bhattacharyya, S., Siegel, E. R., Petersen, G. M., Chari, S. T., Suva, L. J., Haun, R. S. (2004). Diagnosis of pancreatic cancer using serum proteomic profiling. *Neoplasia*, 6(5), 674-686.
- 48.- World Health Organization. Atlas of Heart Disease and Stroke, WHO, September 2004.
- 49.- Castillo, J., Noya, M. (Eds.). (1993). *Patología cerebrovascular isquémica*. Servicio de Neurología, Hospital Xeral de Galicia, Clínico Universitario, Facultad de Medicina.
- 50.- A. Arboix (Eds.). (2006). *Métodos Diagnósticos en las enfermedades vasculares cerebrales*. ISBN: 9788484734512
- 51.- Zhang, X., Guo, T., Wang, H., He, W., Mei, H., et al. (2008). Potential biomarkers of acute cerebral infarction detected by SELDI-TOF-MS. *American journal of clinical pathology*, 130(2), 299-304.
- 52.- Rodthongkum, N., Ramireddy, R., Thayumanavan, S., Richard, W. V. (2012). Selective enrichment and sensitive detection of peptide and protein biomarkers in human serum using polymeric reverse micelles and MALDI-MS. *Analyst*, 137(4), 1024-1030.
- 53.- An, Y., Goldman, R. (2013). Analysis of peptides by denaturing ultrafiltration and LC-MALDI-TOF-MS: In *the Low Molecular Weight Proteome* (pp. 13-19). Springer New York. ISBN: 978-1-4614-7209-4
- 54.- Martosella, J., Zolotarjova, N., Liu, H., Nicol, G., Boyes, B. E. (2005). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic prefractionation of immunodepleted human serum proteins to enhance mass spectrometry identification of lower-abundant proteins. *Journal of proteome research*, 4(5), 1522-1537.

BIBLIOGRAFÍA

- 55.- Jmeian, Y., El Rassi, Z. (2009). Multicolumn separation platform for simultaneous depletion and prefractionation prior to 2-DE for facilitating in-depth serum proteomics profiling. *Journal of proteome research*, 8(10), 4592-4603.
- 56.- Harkins IV, J. B., Katz, B. B., Pastor, S. J., Osucha, P., Hafeman, D. G., *et al.* (2008). Parallel electrophoretic depletion, fractionation, concentration, and desalting of 96 complex biological samples for mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 80(8), 2734-2743.
- 57.- Beseme, O., Fertin, M., Drobecq, H., Amouyel, P., Pinet, F. (2010). Combinatorial peptide ligand library plasma treatment: Advantages for accessing low-abundance proteins. *Electrophoresis*, 31(16), 2697-2704.
- 58.- Thulasiraman, V., Lin, S., Gheorghiu, L., Lathrop, J., Lomas, L., Hammond, D., & Boschetti, E. (2005). Reduction of the concentration difference of proteins in biological liquids using a library of combinatorial ligands. *Electrophoresis*, 26(18), 3561-3571.
- 59.- Diamandis, E. P. (2004). Mass spectrometry as a diagnostic and a cancer biomarker discovery tool opportunities and potential limitations. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(4), 367-378.
- 60.- Petricoin, E. F., Ardekani, A. M., Hitt, B. A., Levine, P. J., Fusaro, V. A., *et al.* (2002). Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *The lancet*, 359(9306), 572-577.
- 61.- Palmblad, M., Tiss, A., Cramer, R. (2009). Mass spectrometry in clinical proteomics: From the present to the future. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 3(1), 6-17.
- 62.- Rai, A. J., Stemmer, P. M., Zhang, Z., Adam, B. L., Morgan, W. T., *et al.* (2005). Analysis of Human Proteome Organization Plasma Proteome Project (HUPO PPP)

reference specimens using surface enhanced laser desorption/ionization-time of flight (SELDI-TOF) mass spectrometry: multi-institution correlation of spectra and identification of biomarkers. *Proteomics*, 5(13), 3467-3474.

63.- Villanueva, J., Shaffer, D. R., Philip, J., Chaparro, C. A., Erdjument-Bromage, H., *et al.* (2006). Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns. *The Journal of clinical investigation*, 116(1), 271-284.

64.- Liotta, L. A., Petricoin, E. F. (2006). Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold. *The Journal of clinical investigation*, 116(1), 26-30.

65.- Kushner, I. (1982). The phenomenon of the acute phase reponse. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 389(1), 39-48.

66.- Nissen, M. H., Thim, L., & Christensen, M. (1987). Purification and biochemical characterization of the complete structure of a proteolytically modified β -2-microglobulin with biological activity. *European Journal of Biochemistry*, 163(1), 21-28.

67.- Rossi, L., Martin, B. M., Hortin, G. L., White, R. L., Foster, M., Moharram, R., ... & Panelli, M. C. (2006). Inflammatory protein profile during systemic high dose interleukin-2 administration. *Proteomics*, 6(2), 709-720.

68.- Huijbers, A., Velstra, B., Dekker, T. J., Mesker, W. E., van der Burgt, Y. E., *et al.* (2010). Proteomic serum biomarkers and their potential application in cancer screening programs. *International journal of molecular sciences*, 11(11), 4175-4193.

69.- Zeng, X., Zhao, L., Li, Z., Yang, J., Xiang, J. J., *et al.* (2011). Impact of experimental and demographic variables in serum peptide profiling based on magnetic bead and MALDI-TOF mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 412(1), 112-119.

BIBLIOGRAFÍA

- 70.- Cohen, P. (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. *European Journal of Biochemistry*, 268(19), 5001-5010.
- 71.- Dunn, J. D., Reid, G. E., & Bruening, M. L. (2010). Techniques for phosphopeptide enrichment prior to analysis by mass spectrometry. *Mass spectrometry reviews*, 29(1), 29-54.
- 72.- Olsen, J. V., Blagoev, B., Gnäd, F., Macek, B., Kumar, C., *et al.* (2006). Global, in vivo, and site-specific phosphorylation dynamics in signaling networks. *Cell*, 127(3), 635-648.
- 73.- Hunter, T., Sefton, B. M. (1980). Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(3), 1311-1315.
- 74.- Manning, G., Whyte, D. B., Martinez, R., Hunter, T., Sudarsanam, S. (2002). The protein kinase complement of the human genome. *Science*, 298(5600), 1912-1934.
- 75.- Cohen, P. T. (2002). Protein phosphatase 1: Targeted in many directions. *Journal of Cell Science*, 115(2), 241-256.
- 76.- Zhou, W. (2011). Phosphoproteomic analysis of pancreatic ductal adenocarcinoma cells reveals differential phosphorylation of cell adhesion, cell junction and structural proteins. *Journal of Proteomics & Bioinformatics*.
- 77.- Adams, J. A. (2001). Kinetic and catalytic mechanisms of protein kinases. *Chemical reviews*, 101(8), 2271-2290.
- 78.- Johnson, S. A., & Hunter, T. (2005). Kinomics: methods for deciphering the kinome. *Nature methods*, 2(1), 17-25.
- 79.- Cohen, P. (2001). The role of protein phosphorylation in human health and disease. *European Journal of Biochemistry*, 268(19), 5001-5010.

- 80.- Lim, Y. P. (2005). Mining the tumor phosphoproteome for cancer markers. *Clinical cancer research*, 11(9), 3163-3169.
- 81.- Yi, T., Zhai, B., Yu, Y., Kiyotsugu, Y., Raschle, T., *et al.* (2014). Quantitative phosphoproteomic analysis reveals system-wide signaling pathways downstream of SDF-1/CXCR4 in breast cancer stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(21), E2182-E2190.
- 82.- Harsha, H. C., Jimeno, A., Molina, H., Mihalas, A. B., Goggins, M. G., *et al.* (2008). Activated epidermal growth factor receptor as a novel target in pancreatic cancer therapy. *Journal of proteome research*, 7(11), 4651-4658.
- 83.- DeGiorgis, J. A., Jaffe, H., Moreira, J. E., Carlotti, C. G., Leite, J. P., *et al.* (2005). Phosphoproteomic analysis of synaptosomes from human cerebral cortex. *Journal of proteome research*, 4(2), 306-315.
- 84.- Ellis, J., Grimm, R., Clark, J. F., Pyne-Gaithman, G., Wilbur, S., Caruso, J. A. (2008). Studying protein phosphorylation in low MW CSF fractions with capLC- ICPMS and nanoLC- CHIP-ITMS for identification of phosphoproteins. *Journal of proteome research*, 7(11), 4736-4742.
- 85.- Parker, B. L., Larsen, M. R., Edvinsson, L. I., Povlsen, G. K. (2013). Signal transduction in cerebral arteries after subarachnoid hemorrhage—a phosphoproteomic approach. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 33(8), 1259-1269.
- 86.- Feng, S., Ye, M., Zhou, H., Jiang, X., Jiang, X., *et al.* (2007). Immobilized zirconium ion affinity chromatography for specific enrichment of phosphopeptides in phosphoproteome analysis. *Molecular & Cellular Proteomics*, 6(9), 1656-1665.

BIBLIOGRAFÍA

- 87.-** Gorman, J. J., Ferguson, B. L., Speelman, D., Mills, J. (1997). Determination of the disulfide bond arrangement of human respiratory syncytial virus attachment (G) protein by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Protein science*, 6(6), 1308-1315.
- 88.-** Gorman, J. J., Ferguson, B. L., & Nguyen, T. B. (1996). Use of 2, 6-Dihydroxyacetophenone for Analysis of Fragile Peptides, Disulphide Bonding and Small Proteins by Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization. *Rapid communications in mass spectrometry*, 10(5), 529-536.
- 89.-** Boccardi, C., Rocchiccioli, S., Cecchettini, A., Mercatanti, A., & Citti, L. (2012). An automated plasma protein fractionation design: high-throughput perspectives for proteomic analysis. *BMC research notes*, 5(1), 612.
- 90.-** D'Imperio, M., Della Corte, A., Facchiano, A., Di Michele, M., Ferrandina, G., *et al.* (2010). Standardized sample preparation phases for a quantitative measurement of plasma peptidome profiling by MALDI-TOF. *Journal of proteomics*, 73(7), 1355-1367.
- 91.-** Villanueva, J., Martorella, A. J., Lawlor, K., Philip, J., Fleisher, M., *et al.* (2006). Serum peptidome patterns that distinguish metastatic thyroid carcinoma from cancer-free controls are unbiased by gender and age. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5(10), 1840-1852.
- 92.-** Miike, K., Aoki, M., Yamashita, R., Takegawa, Y., Saya, H., *et al.* (2010). Proteome profiling reveals gender differences in the composition of human serum. *Proteomics*, 10(14), 2678-2691.
- 93.-** Merlos Rodrigo, M. A., Zitka, O., Krizkova, S., Moullick, A., Adam, V., Kizek, R. (2014). MALDI-TOF MS as evolving cancer diagnostic tool: A review. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 95, 245-255.

- 94.- Velstra, B., Bonsing, B. A., Mertens, B. J., Burgt, Y. E., Huijbers, A., *et al.* (2013). Detection of pancreatic cancer using serum protein profiling. *HPB*, 15(8), 602-610.
- 95.- Goonetilleke, K. S., Siriwardena, A. K. (2007). Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 33(3), 266-270.
- 96.- Steinberg, W. (1990). The clinical utility of the CA 19-9 tumor-associated antigen. *The American journal of gastroenterology*, 85(4), 350-355.
- 97.- Molina, R., Filella, X., Agugé, J.M., Escudero, J.M. Utilidad clínica de los marcadores tumorales. Roche Diagnostics S. L. 2011.
- 98.- Guo, J., Wang, W., Liao, P., Lou, W., Ji, Y., *et al.* (2009). Identification of serum biomarkers for pancreatic adenocarcinoma by proteomic analysis. *Cancer science*, 100(12), 2292-2301.
- 99.- Goonetilleke, K. S., Siriwardena, A. K. (2007). Systematic review of carbohydrate antigen (CA 19-9) as a biochemical marker in the diagnosis of pancreatic cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 33(3), 266-270.
- 100.- Koopmann, J., Zhang, Z., White, N., Rosenzweig, J., Fedarko, N., *et al.* (2004). Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clinical Cancer Research*, 10(3), 860-868.
- 101.- Yu, Y., Chen, S., Wang, L. S., Chen, W. L., Guo, W. J., *et al.* (2005). Prediction of pancreatic cancer by serum biomarkers using surface-enhanced laser desorption/ionization-based decision tree classification. *Oncology*, 68(1), 79-86.
- 102.- Honda, K., Hayashida, Y., Umaki, T., Okusaka, T., Kosuge, T., *et al.* (2005). Possible detection of pancreatic cancer by plasma protein profiling. *Cancer Research*, 65(22), 10613-10622.

BIBLIOGRAFÍA

- 103.-** Fiedler, G. M., Leichtle, A. B., Kase, J., Baumann, S., Ceglarek, U., *et al.* (2009). Serum peptidome profiling revealed platelet factor 4 as a potential discriminating Peptide associated with pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research*, 15(11), 3812-3819.
- 104.-** Velstra, B., Vonk, M. A., Bonsing, B. A., Mertens, B. J., Nicolardi, S., *et al.* (2014). Serum peptide signatures for pancreatic cancer based on mass spectrometry: a comparison to CA 19-9 levels and routine imaging techniques. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 141(3) 531-41.
- 105.-** Gao, H., Zheng, Z., Yue, Z., Liu, R., Zhou, L., Zhao, X. (2012). Evaluation of serum diagnosis of pancreatic cancer by using surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *International journal of molecular medicine*, 30(5), 1061.
- 106.-** Ward, D. G., Wei, W., Buckels, J., Taha, A. M., Hegab, B., *et al.* (2010). Detection of pancreatic adenocarcinoma using circulating fragments of fibrinogen. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 22(11), 1358-1363.
- 107.-** Navaglia, F., Fogar, P., Basso, D., Greco, E., Padoan, A., *et al.* (2009). Pancreatic cancer biomarkers discovery by surface-enhanced laser desorption and ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 47(6), 713-723.
- 108.-** Ustrell-Roig, X., Serena-Leal, J. (2007). Ictus. Diagnóstico y tratamiento de las enfermedades cerebrovasculares. *Revista española de cardiología*, 60(7), 753-769.
- 109.-** Allard, L., Lescuyer, P., Burgess, J., Leung, K. Y., Ward, M., *et al.* (2004). ApoC-I and ApoC-III as potential plasmatic markers to distinguish between ischemic and hemorrhagic stroke. *Proteomics*, 4(8), 2242-2251.