

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DPTO. DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS
INSTRUMENTAL



**DESARROLLO DE MÉTODOS DE
ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL ANÁLISIS
DE FORMAS DE GLICOPROTEÍNAS DE INTERÉS
FARMACÉUTICO Y CLÍNICO**

TESIS DOCTORAL

IZASKUN LACUNZA AGUIRREBENGOA



DPTO. DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL Y QUÍMICA AMBIENTAL
INSTITUTO DE QUÍMICA ORGÁNICA GENERAL (C.S.I.C.)

Madrid, 2006

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DPTO. DE QUÍMICA ANALÍTICA Y ANÁLISIS
INSTRUMENTAL



**DESARROLLO DE MÉTODOS DE
ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL ANÁLISIS DE
FORMAS DE GLICOPROTEÍNAS DE INTERÉS
FARMACÉUTICO Y CLÍNICO**

Memoria que para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas presenta:

IZASKUN LACUNZA AGUIRREBENGOA



Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. MERCEDES DE FRUTOS GÓMEZ y el Dr. JOSÉ CARLOS DÍEZ-MASA .

Tutora: Dr. MARÍA TERESA SEVILLA ESCRIBANO

Mi sincero y afectuoso agradecimiento a mis directores de tesis, los Doctores Mercedes de Frutos Gómez y José Carlos Díez-Masa. Gracias por su apoyo, confianza y dirección.

Gracias también a mi tutora de tesis, la Doctora Maria Teresa Sevilla, del Dpto. de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid, por su apoyo excepcional a este trabajo. Gracias al Dr. Jesús Rodríguez Procopio, director del Dpto. de Química Analítica y Análisis Instrumental de la Universidad Autónoma de Madrid, por el seguimiento que ha realizado a esta Tesis Doctoral.

La contribución del Dr. Jesús Sanz a este trabajo es impagable. Muchísimas gracias.

Las muestras facilitadas por el Profesor Tibor Kremmer, la Dra. Maria del Val Toledo y las proporcionadas, a través de Galina Moya, por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana (Cuba) han sido vitales en la consecución de este trabajo.

En relación a las becas que han facilitado mi formación, gracias al CSIC por la concesión de la beca I3P pre-doctoral y a la SECyTA por la concesión de diversas becas para la asistencia a congresos.

Este trabajo ha sido financiado por el CICYT, Plan I+D+I, (TIC2003-01906), por la Fundación Ramón Areces y por el Ministerio de Educación y Ciencia (Acción Integrada con Hungría, HH04-33).

Gracias a todo el personal del Instituto de Química Orgánica General, especialmente a la que fue su directora durante casi toda mi estancia en el Instituto, la Dra. Ofelia Nieto.

Mi agradecimiento al Dr. James Landers, al Dr. Jerome Ferrance y a Katie Holmes, de la Universidad de Virginia (USA). Mi estancia de en su laboratorio fue una maravilla profesional y personal.

Todo mi cariño a mis compañeros de trabajo, su compañía ha sido imprescindible. Maite, Galina, Cristi, Sara, sois estupendas. Y qué puedo decir de mis cuatro pilares, Pilar, Laura, Nadia y Miguel, no sé qué habría hecho sin ellos.

Esta tesis se la dedico a Gabi, a mi familia y a mis amigos. Se lo merecen por lo pesada que he sido.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

JUSTIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO PRESENTADO EN ESTA MEMORIA.....	III
LISTA DE ABREVIATURAS.....	IX
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	2
OBJETIVO GENERAL.....	51
CAPÍTULO 1. Desarrollo de una metodología para la asignación fidedigna de isoformas de eritropoyetina (EPO) analizadas por electroforesis capilar.....	53
CAPÍTULO 2. Desarrollo de métodos de electroforesis capilar para el análisis de formas de la alfa 1-glicoproteína ácida (AGP).....	100
CAPÍTULO 3. Desarrollo de un método de análisis de proteína C-reactiva (CRP) por electroforesis capilar en zona libre.....	181
CONCLUSIONES GENERALES.....	222
ANEXO: PUBLICACIONES RELACIONADAS.....	225

JUSTIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO PRESENTADO EN
ESTA MEMORIA

JUSTIFICACIÓN Y ORGANIZACIÓN DEL TRABAJO PRESENTADO EN ESTA MEMORIA

En esta Memoria se describe el desarrollo de métodos específicos de electroforesis capilar para el análisis de glicoproteínas de interés farmacéutico (eritropoyetina o EPO) y clínico (alfa1- glicoproteína ácida o AGP y proteína C-reactiva o CRP).

Las glicoproteínas tienen cadenas de carbohidratos unidas a su estructura polipeptídica. Estos carbohidratos juegan un papel clave sobre muchas de las características biológicas de la proteína. Además, generalmente, dan lugar a heterogeneidades, debido a que su naturaleza y número varía para una misma glicoproteína, expresada en el mismo tejido del mismo ser vivo. La complejidad de ciertas glicoproteínas puede aumentar si, además de presentar heterogeneidades en sus cadenas de carbohidratos, presenta otros tipos de heterogeneidades como pueden ser las existentes en su cadena polipeptídica. En esta Memoria, el término “formas” de una glicoproteína se utilizará cuando se haga referencia a la heterogeneidad molecular presente en una glicoproteína, sin especificar si el origen es glucídico, procedente de la cadena polipeptídica o de otras modificaciones. Por el contrario, el término “glicofomas” hará referencia a las diferentes moléculas de una proteína debidas a la composición glucídica variable de éstas.

La producción de glicoproteínas de interés farmacéutico mediante técnicas de ingeniería genética (como por ejemplo la EPO) se ha extendido en los últimos años. La expresión de genes de glicoproteínas humanas en células no humanas influye sobre la glicosilación de la proteína y, por tanto, sobre muchas de sus propiedades, como su actividad biológica. Por tanto, dentro del control de calidad de estas proteínas recombinantes, es necesario controlar el grado de glicosilación y, además, asegurar la consistencia de los diferentes lotes.

Por otro lado, está descrito en la literatura que el padecimiento de ciertas enfermedades como el cáncer puede alterar la composición de los azúcares de ciertas glicoproteínas (como por ejemplo, la de la AGP). Además, existen indicios que apuntan

a que ciertas enfermedades podrían provocar la glicosilación de proteínas que normalmente no tienen cadenas de carbohidratos (por ejemplo, la de CRP).

Desde un punto de vista físico-químico, las diferentes formas de una glicoproteína pueden variar, entre otros parámetros, en su carga total a determinado pH, en su masa y en su punto isoelectrico. Estas diferencias entre formas de una glicoproteína hacen de la electroforesis capilar (CE) una técnica adecuada para el análisis de la glicoproteína intacta, es decir, sin una etapa de hidrólisis previa que originaría la formación de péptidos, glicanos o glicopéptidos. Dos de los modos de CE son la electroforesis capilar en zona libre (CZE), que basa su separación en la diferente relación carga/masa de los analitos, y el isoelectroenfoco capilar (CIEF), que separa los analitos en función de su pI. Al analizar glicoproteínas con uno de estos dos modos de CE, éstas dan lugar a diferentes picos o bandas electroforéticas, que en esta Memoria se han denominado “isoformas”, que se atribuyen, entre otras posibilidades, a la diferente composición en azúcares de las diversas formas de la proteína y/o a la diferente cadena aminoacídica. Debido a que las formas de una misma glicoproteína suelen traducirse en pequeñas diferencias en la relación carga/masa o en el punto isoelectrico, estos picos electroforéticos suelen migrar muy cerca los unos de los otros. Una etapa clave en el análisis de formas de una glicoproteína es la asignación de picos, entendiéndose por tal la correlación entre picos de diferentes muestras de una misma glicoproteína a los que se les supone la misma composición. Si la detección utilizada es espectrofotométrica, la asignación de los picos suele realizarse a través del tiempo de migración de éstos. Sin embargo, el tiempo de migración puede no ser un parámetro de migración suficientemente fiable en la asignación, porque la dispersión de éste para un pico dado es de la misma magnitud que las diferencias entre picos. La asignación correcta de picos correspondientes a las formas de glicoproteínas es clave en el uso de la CE para el control de calidad de muestras de glicoproteínas recombinantes (por ejemplo, para asegurar la consistencia entre lotes) y para la comparación de muestras de una misma glicoproteína de interés farmacéutico o clínico de diferentes orígenes. Por tanto, es imprescindible desarrollar un sistema de asignación fiable de las bandas de glicoproteínas analizadas con esta técnica.

En este trabajo, se desarrollaron métodos de separación electroforética en capilares para tres proteínas: EPO, AGP y CRP. Además, se elaboró un programa

estadístico que permitió asignar de forma fidedigna las bandas electroforéticas de las muestras analizadas. Los métodos se aplicaron al análisis de muestras de EPO de diferentes procedencias, a muestras de AGP de donantes sanos y pacientes con distintos cánceres y al análisis de CRP en suero de donantes sanos y pacientes con lupus sistémico eritematoso y artritis. A pesar de que entraña dificultad, se ha decidido abordar el estudio de las glicoproteínas intactas, ya que puede aportar una información muy valiosa y complementaria al estudio de la proteína hidrolizada, ya que refleja los cambios que le suceden a las formas concretas y no a la mezcla de fragmentos de la proteína.

El trabajo sobre CRP se realizó en el laboratorio del Dr. James Landers en la Universidad de Virginia (Charlottesville, Virginia). El resto de la Tesis Doctoral se realizó en el Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental del Instituto de Química Orgánica General del C.S.I.C., bajo la dirección de la Dra. Dña. Mercedes de Frutos y el Dr. D. José Carlos Díez-Masa.

La Introducción General de esta Memoria se dedicada a los aspectos comunes a todos los capítulos siguientes. En ella, se describen las glicoproteínas, sus características, y su importancia en procesos patofisiológicos y en la industria farmacéutica. Además, se desarrollan los aspectos principales de la CE y su uso en el estudio de formas de glicoproteínas intactas. Los 3 capítulos de esta Memoria se dedican al estudio por CE de EPO, AGP y CRP, respectivamente. En la introducción de cada capítulo se describen las características de cada proteína, su importancia y los motivos para su estudio. Por último, las publicaciones a las que ha dado lugar este trabajo se adjuntan como Anexo al final de la Memoria.

De este modo, en el capítulo 1 de este trabajo se estudia el problema de la reproducibilidad en los tiempos de migración en los análisis por CE. Para estudiar este problema y buscar soluciones, se escogió como modelo la EPO, una glicoproteína de gran interés farmacéutico. La falta de reproducibilidad en los tiempos de migración podría impedir la comparación de bandas de una EPO recombinante con una EPO recombinante estándar (por ejemplo, la Sustancia Biológica de Referencia de la Farmacopea Europea). El método de CZE que se utilizó estuvo basado en uno ya publicado por nuestro grupo de investigación. Los resultados de los análisis por

electroforesis capilar obtenidos con esta proteína y éste método se utilizaron para diseñar un programa estadístico que permitiera elegir, entre diversos parámetros de migración ensayados (además del propio tiempo de migración), el más robusto y exacto en términos de porcentaje de asignación correcta de bandas electroforéticas. Se demostró que el método estadístico desarrollado permite comparar la exactitud en la asignación de bandas obtenida con distintos parámetros de migración. Una vez comprobada la utilidad del programa, éste se utilizó para, con los parámetros de migración adecuados, asignar con gran exactitud (superior al 95 %) bandas de EPO en muestras de diversos orígenes.

En el segundo capítulo se aborda la purificación de AGP a partir de suero humano y el desarrollo de un método de CZE y otro de CIEF para la separación de diferentes formas de AGP. Los métodos de purificación de la proteína en suero utilizados se compararon entre sí en términos de velocidad de preparación de la muestra y en términos de distribución de formas de AGP detectables con el método de CZE. Esta proteína presenta múltiples formas en función de su cadena aminoacídica y/o de sus azúcares. Para diversas enfermedades como la artritis reumatoide y algunos cánceres, se han descrito en la bibliografía cambios en la proporción de las formas con distinta cadena aminoacídica y cambios en la proporción y composición de los azúcares de la proteína. Los métodos desarrollados en este capítulo, junto con el programa estadístico desarrollado en el capítulo 1 se utilizaron para comparar muestras de AGP de suero de donantes sanos y de pacientes con cáncer de ovario, de vejiga y con leucemia. Se demostró que el programa estadístico desarrollado en el laboratorio para la separación de EPO por CZE puede utilizarse como herramienta para la correcta asignación de bandas en otros métodos de CE. La asignación de bandas de AGP con los parámetros de migración adecuados se realizó en ambos métodos (CZE y CIEF) con exactitudes superiores al 94%. A pesar de que el estudio se llevó a cabo en un bajo número de muestras, las diferencias (cuali y cuantitativas) encontradas entre el perfil electroforético de la AGP de donantes sanos y el de la AGP de algunos de los pacientes con cáncer son prometedoras para el uso de las formas de esta proteína como marcador tumoral.

En el tercer capítulo se describe el desarrollo de un método de purificación de CRP de suero y de análisis de esta proteína por CE. Aunque la CRP no está glicosilada en condiciones fisiológicas normales, parece estarlo cuando el individuo padece algunas

enfermedades como lupus y otras. Los métodos de purificación y separación desarrollados se utilizaron para comparar perfiles electroforéticos de la CRP extraída del suero de individuos sanos, con lupus sistémico eritematoso y con artritis. Aunque son necesarios más estudios, el perfil electroforético de la extracción de CRP del paciente con artritis fue distinto al obtenido para la extracción de los pacientes con lupus y los individuos sanos.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que los métodos de CE desarrollados permiten separar formas de EPO, AGP y CRP y que permiten asignar bandas de estas proteínas de forma fiable. El método de separación de formas de EPO resulta adecuado como parte del control de calidad de productos de esta glicohormona. Por otro lado, los métodos de separación de AGP y CRP son herramientas muy prometedoras para estudiar las formas de estas proteínas como marcadores de enfermedad.

LISTADO DE ABREVIATURAS

LISTADO DE ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda
ϵ_0	Permitividad en el vacío
ϵ_r	Constante dieléctrica del medio de separación
η	Viscosidad del medio de separación
μ_{app}	Movilidad electroforética aparente
μ_{eff}	Movilidad electroforética efectiva
μ_{EOF}	Movilidad electroosmótica
ζ	Potencial zeta
2D-electroforesis	Electroforesis en dos dimensiones
AcH	Ácido acético
ACN	Acetonitrilo
AcNa	Acetato sódico
AF	Frente del anolito
AFP	Alfa-fetoproteína
Asn	Asparagina
BHK	Células de riñón de cría de hámster
Bórax	Tetraborato sódico dihidratado
C ₆ MetBr	Bromuro de hexametonio
CaCl ₂	Cloruro de calcio
CAIE	Inmunocromatografía de afinidad cruzada
CCK	Péptido colecistoquinina
CDGs	Desórdenes congénitos en la glicosilación
CE	Electroforesis capilar
CE-MS	Electroforesis capilar-espectrometría de masas
CGE	Electroforesis capilar en geles
CHO	Células de ovario de hámster china
CIEF	Isoelectroenfoque capilar
CIEF gel	Gel de isoelectroenfoque capilar
Con A	Concanavalina A
CRP	Proteína C-reactiva
CRPr	Proteína C-reactiva recombinante

CSF	Fluido cerebrospinal
CZE	Electroforesis capilar en zona libre
DAB	1,4-diaminobutano (putrescina)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E	Campo eléctrico
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
EOF	Flujo electroosmótico
EPO	Eritropoyetina
EPOr	Eritropoyetina recombinante
FSHr	Hormona folículo estimulante humana recombinante
Fuc	Fucosa
Gal	Galactosa
GC	Cromatografía de gases
GC-MS	Cromatografía de gases-espectrometría de masas
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
HClO ₄	Ácido perclórico
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta eficacia
HPMC	Hidroxipropilmetilcelulosa
HSA	Seroalbúmina humana
Hyp	Hidroxiprolina
i.d.	Diámetro interno
IA	Artritis inflamatoria
IEF	Isoelectroenfoque
IFN- γ	Interferón- γ
IgG	Inmunoglobulina G
ITP	Isotacoforesis
K ₂ CO ₃	Carbonato potásico
L	Longitud total del capilar
l	Longitud efectiva del capilar
LC	Cromatografía de líquidos
LC-MS	Cromatografía de líquidos-espectrometría de masas

LIF	Fluorescencia inducida por láser
Lys-Phe	Dipéptido lisina-fenilalanina
MALDI-TOF-MS	Ionización-desorción por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo-espectrometría de masas
Man	Manosa
MEKC	Cromatografía electrocinética micelar
MgCl ₂	Cloruro de magnesio hexahidratado
MS	Espectrometría de masas
NaCl	Cloruro sódico
NaN ₃	Azida sódica
NaOH	Hidróxido sódico
NESP	Nueva proteína de estimulación de la eritropoyesis (Novel erythropoiesis stimulating protein)
NeuAc	Ácido neuramínico
NMR	Resonancia magnética nuclear
P.E.	Farmacopea Europea
PAA	Poliacrilamida
PAGE	Electroforesis nativa en geles de poliacrilamida
PC	Fosfocolina
PEG	Polietilenglicol
pI	Punto isoeléctrico
PI	Patrón interno
PSA	Antígeno específico de próstata
PTM	Modificación post-traducciona
PVA	Polivinilalcohol
q	Carga eléctrica de un elemento o molécula
q _{eff}	Carga efectiva
r	Radio de un elemento o molécula
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensajero
RP-HPLC	HPL en fase reversa
rtPA	activador de plasminógeno de tejido recombinante
SAP	Componente amiloide-P

SCA	Síndrome coronario agudo
SDS/PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
Ser	Serina
SLE	Lupus eritromatoso sistémico
TEMED	Tetrametiletilendiamina
t_{EOF}	Tiempo de migración correspondiente al flujo electroosmótico
TEPA	Tetraetilenpentamina
Thr	Treonina
TI	Inhibidor de tripsina
t_m	Tiempo de migración de un compuesto
t_m / t_{EOF}	Tiempo de migración de un compuesto relativo al tiempo de migración del flujo electroosmótico
t_m / t_{PI}	Tiempo de migración de un compuesto relativo al tiempo de migración del patrón interno
TRF	Transferrina
UV	Ultravioleta
V	Voltaje

Nota: En la mayoría de los casos se ha utilizado la abreviatura inglesa debido a su uso generalizado.

INTRODUCCIÓN GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

1 LAS GLICOPROTEÍNAS.....	3
1.1 Heterogeneidad de las glicoproteínas.....	4
1.2 Tipos de glicosilación en una proteína.....	6
1.2.1 Glicosilación a través de nitrógeno.....	7
1.2.2 Glicosilación a través de oxígeno.....	11
1.2.3 Consideraciones sobre la heterogeneidad de los glicanos en las proteínas.....	12
1.3 Glicosilación en las proteínas recombinantes de interés farmacéutico.....	13
1.4 Glicosilación y enfermedad.....	14
2 ELECTROFORESIS CAPILAR.....	16
2.1 Instrumentación.....	17
2.2 La columna capilar.....	18
2.2.1. Formas de evitar la adsorción de proteínas a la pared de sílice.....	20
2.3 Comparación con otras técnicas.....	24
2.4 Principales modos de CE para el análisis de proteínas.....	25
2.4.1 Electroforesis capilar en zona libre (CZE).....	25
2.4.2 Isoelectroenfoque capilar (CIEF).....	27
2.4.2.1 Preparación de la muestra e inyección.....	29
2.4.2.2 Papel de los anfolitos y proceso de enfoque.....	29
2.4.2.3 Inestabilidades del gradiente de pH.....	31
2.4.2.4 Detección.....	32
2.4.2.5 “Two-step CIEF” o CIEF en dos pasos....	33
2.4.2.6 “One-step CIEF” o CIEF en un paso.....	35
2.5 Falta de reproducibilidad en los tiempos de migración de los analitos en CE.....	36
3 LA ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS INTACTAS.....	40
3.1 Separación de formas de glicoproteínas por CZE.....	42
3.2 Separación de formas de glicoproteínas por CIEF.....	44
4 BIBLIOGRAFÍA.....	46

1. LAS GLICOPROTEÍNAS

Las glicoproteínas son proteínas que tienen ancladas, a través de aminoácidos específicos (también denominados “sitios de unión”), cadenas de oligosacáridos. Los azúcares unidos pueden ser desde monosacáridos a oligosacáridos (glicanos). Este tipo de modificación post-traducciona es la más habitual en células eucariotas [1]. De este modo, en el caso de los mamíferos, se estima que el 50% de las proteínas están glicosiladas [2].

La gran mayoría de las glicoproteínas se encuentran en la parte extracelular de la membrana plasmática, en la parte insoluble de la matriz extracelular y, en el caso de los animales superiores, en los fluidos corporales como sangre y orina, que son los encargados de hacer circular y excretar estas proteínas. Existen casos de glicoproteínas citoplasmáticas, pero no son tan abundantes. La glicosilación forma parte del mecanismo de secreción de proteínas de la célula (las células glicosilan las proteínas que van a secretar), por lo que durante el tiempo que están en el interior de la célula están siendo procesadas en los orgánulos correspondientes para su posterior secreción.

El papel que cumplen los azúcares en las funciones de la glicoproteína es muy variado y, en ocasiones, crucial. En general, los oligosacáridos interfieren, modifican o influyen sobre el funcionamiento de una proteína. Así, pueden modificar su estabilidad, solubilidad, resistencia a las proteasas y actividad biológica. También pueden dirigir el tráfico de la glicoproteína (intra y extracelularmente), mediar la adhesión celular, e influir sobre el plegamiento de la proteína, entre otras muchas funciones [3-5]. El tamaño de los oligosacáridos permite que éstos cubran áreas importantes de la proteína, modulando de esa forma las interacciones de la glicoproteína con otras moléculas o afectando a la velocidad de los procesos que dan lugar a cambios conformacionales de ésta. En general, las funciones de los oligosacáridos de las glicoproteínas podrían clasificarse en tres grupos. En el primer grupo, como ya se ha descrito, se encontraría la modulación de las interacciones intermoleculares de la proteína (como la reactividad de una enzima con su sustrato) a través de la “protección” de ciertas partes de la misma con esos oligosacáridos. Por ejemplo, en su estado glicosilado, la enzima ribonucleasa (ribonucleasa B) presenta menor actividad que en su estado no glicosilado (ribonucleasa A) probablemente debido a que los glicanos dificultan el acceso de su sustrato, el RNA,

al centro activo de la enzima [5]. En el segundo grupo de funciones de los glicanos se encontrarían las estructurales. De ese modo, facilitan que las proteínas de membrana se anclen a ésta y también ayudan a mantener la estructura cuaternaria de la proteína. En el tercer grupo se encontrarían todas aquellas funciones relacionadas con el reconocimiento de los glicanos de una proteína por las lectinas, que son proteínas que reconocen y unen oligosacáridos. Este reconocimiento de las glicoproteínas por parte de las lectinas tiene muchas implicaciones biológicas, pudiendo formar parte del sistema de reconocimiento inmunológico o afectando a la eliminación de esa glicoproteína del organismo. Por ejemplo, en el hígado, existe un receptor de asialoglicoproteínas, es decir, glicoproteínas sin ácido siálico, que es el paso inicial para la eliminación de estas moléculas de la circulación. Por otro lado, la adhesión intercelular se debe también a este tipo de reconocimiento lectina-oligosacárido [5].

1.1 Heterogeneidad de las glicoproteínas

La glicosilación de cada proteína es función de su estructura primaria y terciaria. Cada sitio de unión de un glicano en la cadena polipeptídica determina el tipo de glicosilación característico del mismo. Por ejemplo, la glicosilación de un sitio específico en una proteína puede verse dificultada por interacciones estéricas en su entorno, lo que determina en parte el tipo de glicosilación posible en ese sitio [5].

Para una proteína dada, la variabilidad en la naturaleza y en el contenido en oligosacáridos con que las células glicosidan la misma cadena polipeptídica hace que ésta presente diferentes glicoformas, entendiéndose por glicoformas a las moléculas que tienen la misma cadena aminoacídica pero diferente composición glucídica. Este hecho se debe a que la glicosilación de una proteína dada está controlada por cientos de enzimas (genéricamente llamadas “glicosiltransferasas” y “glicosidasas”) que van sintetizando un glicano concreto unido a un sitio de unión de la cadena aminoacídica de la proteína. Cada reacción enzimática individual que forma parte del proceso puede no llevarse a cabo en todas las moléculas de la proteína, lo que da lugar a la síntesis de diferentes glicoformas de una misma glicoproteína [5]. A diferencia de las proteínas, la síntesis de las cadenas de azúcares no tiene un “molde” como lo tienen las proteínas con el RNA mensajero (RNAm), a pesar de que, lógicamente, y de forma indirecta, la síntesis de la parte glucídica de las glicoproteínas está también regulada por el DNA del

organismo. Por tanto, esta síntesis está sometida a más variabilidad que la de una cadena polipeptídica de una proteína determinada. Además de esta variabilidad, que provoca la existencia de las glicofomas de una misma proteína sintetizadas en una misma célula, el tipo de glicosilación de una glicoproteína es específico de cada célula/tejido y organismo. Por otro lado, ya que en el proceso de glicosilación de una proteína, el tipo de enzima, su concentración, sus características cinéticas y distribución en los compartimentos celulares reflejan el entorno interior y exterior en que la célula está glicosilando sus proteínas, no es extraño que el tipo de glicosilación de las proteínas que resulta en cada momento esté relacionado con el estado patofisiológico del individuo [5,6].

Las diferentes glicofomas de una misma proteína pueden presentar, debido a sus diferencias en la composición de azúcares, diferentes propiedades. En el caso de la eritropoyetina o EPO (una hormona glicoprotéica) se ha demostrado que el número de ácidos siálicos de la molécula está relacionado con la actividad biológica de ésta. Este descubrimiento fue la base para crear, por medio de ingeniería genética, la nueva proteína de estimulación de eritropoyesis (NESP). El gen de la EPO se modificó para que diera lugar a una cadena polipeptídica que tuviera dos nuevos sitios de unión de glicanos a través de nitrógeno, y por tanto, pudiera albergar un mayor número de ácidos siálicos, obteniéndose así una molécula que tiene mayor actividad biológica que la EPO [7].

Por otro lado, si una glicoproteína es de interés farmacéutico y se fabrica mediante técnicas de ingeniería genética y se purifica con fines terapéuticos, el tipo de célula en que se exprese, el medio de cultivo (por ejemplo, la concentración de glucosa en el medio), y el método de extracción también influirán sobre la glicosilación que se observe en las diferentes glicofomas de la proteína [8, 9].

Existen diversas teorías para explicar la variedad de glicofomas para una misma proteína. Por un lado, puede ser una forma de responder con flexibilidad al ambiente externo e interno de la célula mediante la producción de un grupo de glicofomas, permitiendo así la existencia de una variedad de actividades de la proteína [5]. Sin ser incompatible con la anterior, también se especula con la posibilidad de que, en parte,

esta heterogeneidad de glicofomas de una misma proteína pueda deberse a “ruido biológico” sin significado o función [3].

1.2 Tipos de glicosilación en una proteína

La glicosilación de una proteína puede deberse a la unión de un monosacárido sencillo a la cadena polipeptídica o a la unión de un conjunto de monosacáridos, también llamada glicano u oligosacárido. Los restos de monosacáridos que forman un glicano se unen covalentemente a la cadena polipeptídica de la proteína a través de residuos aminoacídicos concretos, bien a través de enlaces nitrógeno-carbono, bien a través de enlaces oxígeno-carbono. En el primer caso, el aminoácido por el que se lleva a cabo la unión es la asparagina (Asn). En el segundo caso, los residuos aminoacídicos protagonistas son la serina (Ser), la treonina (Thr) o, menos frecuentemente, la hidroxiprolina (Hyp).

Los monosacáridos más habituales en la glicosilación de proteínas son la N-acetilglucosamina (GlcNAc), la manosa (Man), la galactosa (Gal), la fucosa (Fuc) y el ácido siálico (sus estructuras están representadas en la **Figura 1.1**). El nombre de ácido siálico agrupa un gran número de azúcares. El más común en las glicoproteínas de mamíferos es el ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), que es un azúcar con nueve carbonos que procede de la condensación de un piruvato con una N-acetilmanosamina. En esta Memoria se hablará genéricamente del ácido siálico, que es el único azúcar que forma parte de las glicoproteínas que tiene carga neta negativa a pH fisiológico debido a su residuo carboxílico. El resto de azúcares que participan en la glicosilación de las proteínas son neutros.

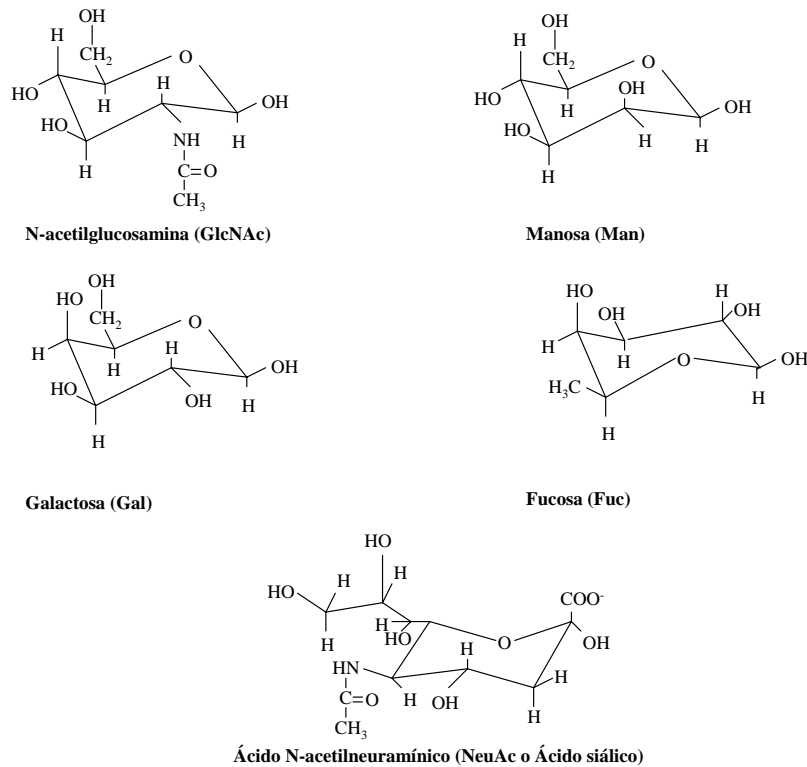


Figura 1.1. Estructuras de los azúcares más habituales en la glicosilación de proteínas en mamíferos.

1.2.1 Glicosilación a través de nitrógeno

Los glicanos unidos a través de nitrógeno (N-glicosilación) lo hacen por el grupo amida de la Asn. En general, las asparaginas a las que se unen los glicanos deben formar parte de los tripéptidos Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, siendo X cualquier aminoácido, excepto prolina. Además, para que los glicanos puedan anclarse, las Asn deben estar dispuestas en un lugar apropiado en la estructura tridimensional de la proteína. En las células animales, el azúcar unido a la asparagina es casi siempre GlcNAc.

La biosíntesis de la N-glicosilación de las proteínas tiene lugar en el retículo endoplasmático rugoso y en el aparato de Golgi de la célula y puede dividirse en dos etapas. En la primera etapa, y durante la síntesis de la cadena polipeptídica, ésta va entrando en el retículo endoplasmático. Es durante este proceso de síntesis de la cadena aminoacídica cuando se une a ésta un oligosacárido, denominado precursor. El oligosacárido recibe este nombre porque su unión a la cadena es el comienzo del

proceso de síntesis de glicanos de una glicoproteína. Durante la segunda etapa, el oligosacárido precursor va procesándose y modificándose (sufriendo eliminaciones y adiciones de azúcares a través de su extremo no reductor) mientras la proteína migra a través del aparato de Golgi. Las enzimas implicadas en este proceso son múltiples, siendo la oligosacariltransferasa la que une el oligosacárido precursor. Posteriormente, entran en acción múltiples glicosidasas (que eliminan azúcares) y glicotransferasas (que los transfieren) [3]. A pesar de que suele asumirse que la glicosilación es una modificación post-traducciona, realmente, la N-glicosilación es co-traducciona. En el mismo momento en que se ensambla la cadena polipeptídica en el ribosoma, ésta está entrando en el retículo endoplasmático rugoso y está comenzando su glicosilación.

Los N-glicanos pueden ser de cuatro tipos: ricos en manosa, glicanos complejos, estructuras híbridas y glicanos N-acetil-lactosamina [5]. Todos los tipos se caracterizan por contener una estructura o núcleo común, que consiste en un pentasacárido con 3 Man y 2 GlcNAc (recuadrado en gris en las **Figuras 1.2, 1.3, y 1.4**), y diferir en la composición terminal que se extiende desde esa estructura.

Oligosacáridos ricos en manosa

Este tipo de oligosacáridos son muy comunes en proteínas de la superficie celular y contienen entre 5 y 9 residuos de manosa (**Figura 1.2**).

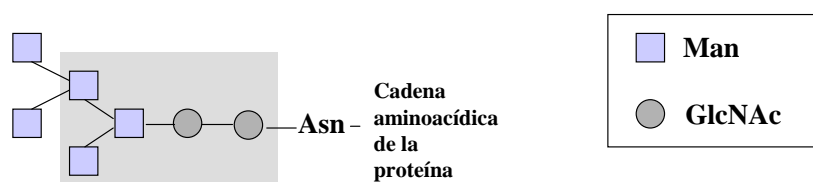


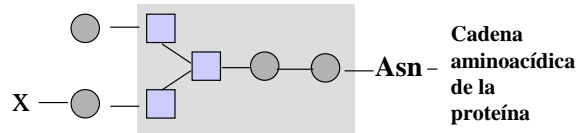
Figura 1.2. Representación gráfica de un tipo de glicano rico en manosa. El recuadro gris representa el oligosacárido o núcleo común en todos los N-glicanos.

Glicanos complejos

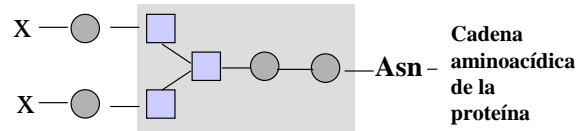
Los oligosacáridos complejos no contienen residuos de manosa, excepto los correspondientes al pentasacárido común. Poseen “antenas” o “ramas” que comienzan

con un GlcNAc y que continúan extendiéndose. Un glicano complejo puede ser mono-, di-, tri-, tetra- y penta-antenario, como puede verse en la **Figura 1.3**.

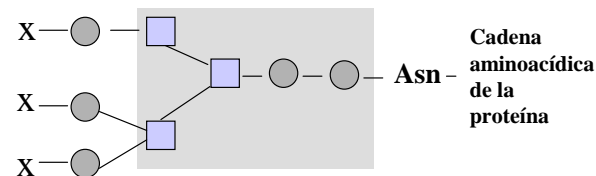
Glicano complejo mono-antenario



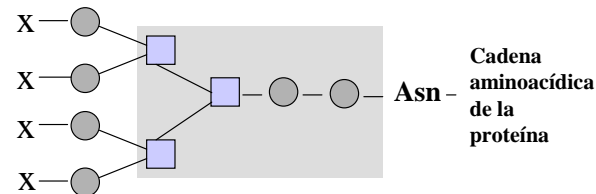
Glicano complejo bi-antenario



Glicano complejo tri-antenario



Glicano complejo tetra-antenario



Glicano complejo penta-antenario

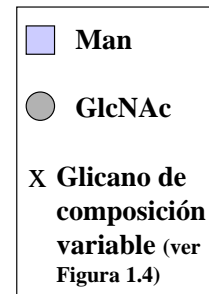
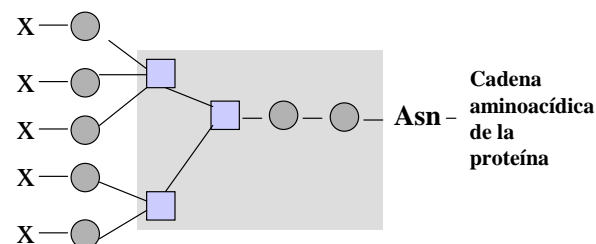


Figura 1.3. Esquema de las ramificaciones de los glicanos complejos, que contribuye a la gran diversidad de estructuras de este grupo de N-glicanos. El recuadro gris representa el oligosacárido o núcleo común en todos los N-glicanos.

Estas antenas pueden estar compuestas por varios monosacáridos, entre los que puede estar presente, o no, la fucosa. Además, los GlcNAc unidos a las manosas del

pentasacárido pueden tener anclado uno o más azúcares. En la **Figura 1.4** están representados algunos ejemplos de la posible composición de cada antena. Todas estas posibles variaciones (en el número de antenas y en la composición de éstas) contribuyen al hecho de que los glicanos complejos presenten una enorme complejidad y variedad [5].

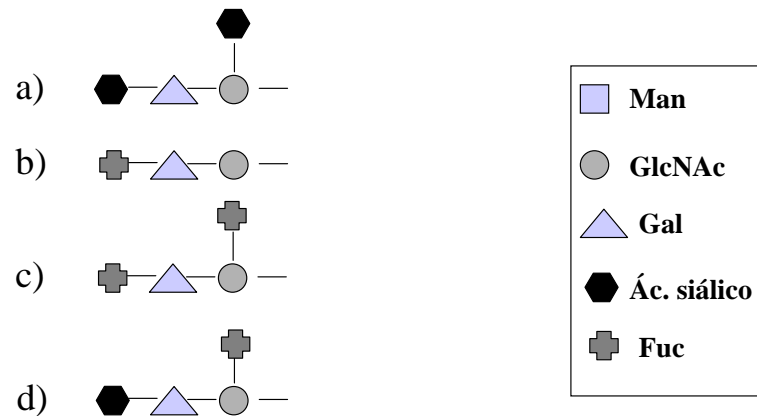


Figura 1.4. Algunos ejemplos de la composición en azúcares (representados como “X-●-” en la **Figura 1.3**) de las cadenas de los glicanos complejos.

Glicanos híbridos

Los glicanos híbridos tienen características comunes a los glicanos complejos y a los ricos en manosa. Una de las manosas del pentasacárido común está unida a uno o dos residuos de manosa y otra de las manosas tiene unidas una o dos antenas como las que se encuentran en los glicanos híbridos. En la **Figura 1.5** pueden verse dos ejemplos de glicanos híbridos.

Glicanos N-acetil-lactosamina

Este tipo de glicanos contienen repeticiones del disacárido Gal-GlcNAc unidas al núcleo central. Estas repeticiones no están distribuidas de forma uniforme en todas las antenas del glicano. Las extensiones de poli-lactosamina son frecuentes en glicanos tetra-antenarios (en la **Figura 1.6** está representado uno de estos glicanos).

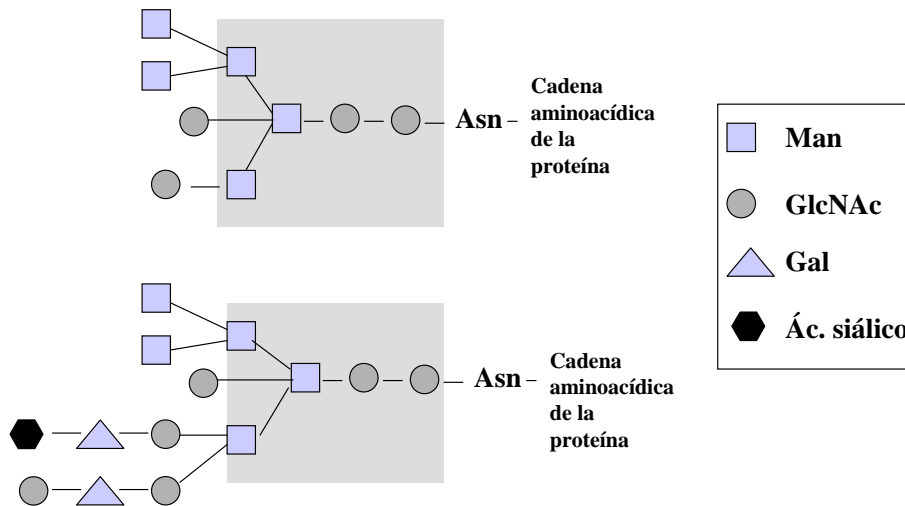


Figura 1.5. Algunas de las posibles variaciones en la ramificación de los glicanos que dan lugar a glicanos híbridos. El recuadro gris representa el oligosacárido o núcleo común en todos los N-glicanos.

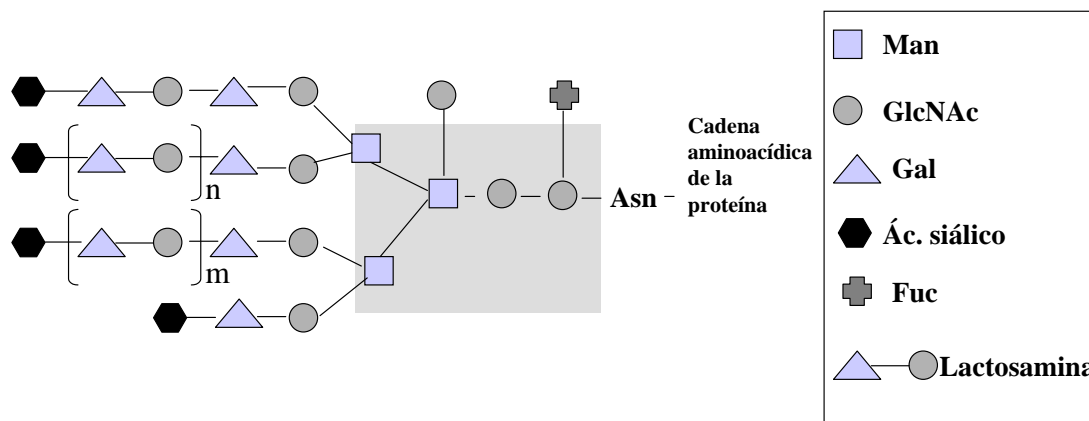


Figura 1.6 Representación de un tipo de glicano N-acetil-lactosamina. El recuadro gris representa la estructura de oligosacáridos común en todos los N-glicanos.

1.2.2 Glicosilación a través de oxígeno

La Ser y la Thr son los aminoácidos implicados más frecuentemente en la unión de glicanos a través de oxígeno a la proteína. A diferencia de la glicosilación a través de nitrógeno, la O-glicosilación se produce por adición de un monosacárido cada vez, no en bloques. Además, la glicosilación no es co-traducciona sino post-traducciona, es decir, es cuando la cadena polipeptídica se ha sintetizado completamente cuando ésta se O-glicosila. Casi todas las proteínas que presentan este tipo de glicosilación son

mucinas, que son largos polipéptidos cuya adición de oligosacáridos a través de oxígeno da lugar a zonas de la proteína con elevada carga negativa, lo que provoca que las mucinas tenga la propiedad de poder unir una gran cantidad de agua. Existen mucinas en la saliva, en la vagina o en las fosas nasales. La función principal de este tipo de proteínas es lubricar. Existen otras proteínas que no son mucinas que también tienen glicanos unidos a través de oxígeno como, por ejemplo, la EPO [10].

1.2.3 Consideraciones sobre la heterogeneidad de los glicanos en las proteínas

Teniendo en cuenta la variabilidad en los tipos de glicanos descrita en los apartados anteriores, podría haber cientos de glicanos por glicoproteína. Sin embargo, esto no ocurre en todas las glicoproteínas. En un extremo, puede darse la circunstancia de que una asparagina sólo albergue un tipo de oligosacárido. También, existen proteínas donde los residuos de asparagina están ocupados por clases concretas de glicanos. Como ya se ha apuntado con anterioridad, esto se debe a que la conformación tridimensional y la disposición de los sitios de unión en la proteína ejercen una influencia sobre el tipo de glicosilación. Tal es el caso de la ribonucleasa B, cuyo sitio de glicosilación está siempre ocupado por un glicano rico en Man (con entre 3 y 9 Man) [11]. En el otro extremo, un gran número de proteínas tienen glicanos que exhiben heterogeneidad en el grado de ramificación de la proteína, en la presencia o ausencia de Fuc, en la presencia o ausencia de colas de poli-lactosamina, etc. Puede ocurrir que un sitio de unión de oligosacárido de una proteína esté derivatizado con glicanos complejos, híbridos o ricos en Man [3]. Además, si se tiene en cuenta que ciertas glicoproteínas pueden tener más de un sitio de unión para glicanos, la variedad de formas que pueden presentar es muy grande. Por ejemplo, la EPO tiene tres sitios de unión de glicanos a través de nitrógeno y uno a través de oxígeno. Se han descrito más de cuarenta formas diferentes en función de la glicosilación de la molécula [12]. Otra glicoproteína, la alfa-1-glicoproteína ácida (AGP) tiene cinco sitios de unión de glicanos a través de nitrógeno, habiéndose descrito más de 20 formas diferentes en función de la glicosilación de la molécula [13].

1.3 Glicosilación en las proteínas recombinantes de interés farmacéutico

Algunas de las proteínas que se fabrican por medio de técnicas de DNA recombinante para su uso farmacéutico son glicoproteínas [14-16]. Además, la importancia de los residuos de carbohidratos en las glicoproteínas recombinantes destinadas a la terapia en humanos es ampliamente reconocida, porque afecta a la actividad biológica, a la estabilidad, a la solubilidad, a la vida media en el organismo y a la farmacocinética de la proteína [1, 4, 17]. Por tanto, en muchas ocasiones, la proteína no será efectiva si no está correctamente glicosilada. Tal es el caso de la eritropoyetina (EPO), una hormona que regula la producción de eritrocitos en el organismo. Cuando se obtiene por técnicas de ingeniería genética en células de *Escherichia Coli* (*E. Coli*), la hormona tiene una muy escasa actividad *in vivo*. Sin embargo, la EPO presenta actividad biológica *in vivo* cuando se expresa en células de ovario de hámster china (CHO) [18]. El motivo para la baja actividad de la EPO expresada en *E. Coli* es que las células procariontas no glicosilan sus proteínas como lo hacen las células de mamíferos [19]. La importancia de la glicosilación de la EPO se vio confirmada en un trabajo en el que se forzó una glicosilación deficiente de la proteína, viéndose desfavorecida la actividad *in vivo* [10].

La producción de glicoproteínas por técnicas de ingeniería genética suele realizarse, por tanto, en células eucariotas (que tienen la capacidad de glicosilar sus proteínas). Son muy habituales las células de ovario hámster china (CHO) y de riñón de crías de hámster (BHK) y están cobrando interés las células de insectos y de plantas. Aún tratando de aproximar el tipo de glicosilación de la proteína de interés a la humana, la glicosilación es diferente, siendo ésta función de la línea celular, la especie, el medio de cultivo donde se esté expresando y el método de purificación utilizado [4, 14]. Por tanto, el estudio de la glicosilación es esencial en los controles de calidad en la producción de estas proteínas, para asegurar la consistencia entre lotes y el cumplimiento de los requerimientos del producto.

Dentro de las glicoproteínas que se están produciendo actualmente con interés farmacéutico cabe destacar la eritropoyetina recombinante (rEPO) [20], el activador de plasminógeno de tejido recombinante (rtPA) por su uso para el tratamiento de infarto de miocardio [4], y el γ -interferón recombinante (IFN- γ) por su uso en tratamientos contra

cánceres y enfermedades virales [21], entre otros. La EPOr ocupa actualmente el primer puesto en ventas de productos biofarmacéuticos [22-24].

1.4 Glicosilación y enfermedad

Las deficiencias congénitas o adquiridas en la glicosilación de proteínas se manifiestan en diversas enfermedades [3, 6, 25]. La glicosilación confiere a estas proteínas características importantes en su papel biológico, por lo que no es extraño que las deficiencias en glicosilación estén asociadas o implicadas en carencias o enfermedades importantes.

Una glicosilación congénita deficiente de las proteínas puede dar lugar a un grupo de enfermedades muy poco extendidas que se denominan desórdenes congénitos de glicosilación (CDGs) [26]. Dentro de las CDGs, cabe destacar dos subgrupos importantes. En el primero, existen glicoproteínas en el suero de los enfermos pero los potenciales sitios de unión a través de nitrógeno están menos ocupados por oligosacáridos que en los individuos sanos. Los síntomas de estas enfermedades incluyen defectos en el desarrollo y pérdida del tono muscular. En el segundo subgrupo casi todos los sitios de unión de oligosacáridos de las glicoproteínas están ocupados pero los oligosacáridos son más pequeños y menos complejos. También provocan defectos en el desarrollo [3].

Otro ejemplo de enfermedad congénita asociada a una glicosilación deficiente o diferente de una proteína es la deficiencia del factor de von Willebrand, que está relacionada con la coagulación de la sangre. La expresión errónea de una glicosiltransferasa en las células endoteliales hace que el factor von Willebrand, que se expresa en esas células, que es clave en la coagulación de la sangre, y que normalmente no está glicosilada, se glicosile. Esta glicosilación (que no presenta ácidos siálicos) hace que el receptor de asialoglicoproteínas del hígado reconozca el factor y lo elimine de la circulación, con los consiguientes problemas de coagulación [3].

Por otro lado, al estar la glicosilación de proteínas originada por un grupo de reacciones enzimáticas, está sometida a la variación de la concentración de enzimas o sustratos presentes en cada momento en la célula. Por tanto, los cambios en el estado de

la célula (que pueden deberse a una determinada patología) pueden afectar al tipo de glicosilación de sus proteínas [25].

Un ejemplo de alteración adquirida de la glicosilación de una glicoproteína es el caso de la transferrina (TRF). La TRF es una glicoproteína que tiene diversas formas determinadas por polimorfismos genéticos, grado de saturación de hierro y composición de sus oligosacáridos. En el plasma normal, la glicofoma mayoritaria es la tetrasialilada (con 4 residuos de ácidos siálicos por molécula), siendo minoritarias las penta y trisialiladas. El aumento de la concentración de formas de TRF con menor número de ácidos siálicos (principalmente la forma “asialo” o sin ácidos siálicos) se ha relacionado con el consumo excesivo de alcohol por el paciente [27].

Existe una extensa bibliografía en la que se han descrito cambios en la composición glucídica de las glicoproteínas en pacientes con cáncer (sobre todo, de la membrana celular de las células cancerosas). En muchas ocasiones, estos cambios en la estructura glucídica de las glicoproteínas de membrana vienen acompañados de cambios muy similares en las proteínas que las células tumorales secretan [28]. Muchos de estos cambios en la glicosilación de la pared celular se han descubierto usando anticuerpos frente a carbohidratos. Está confirmado que esta reactividad diferencial de los tumores a anticuerpos para carbohidratos se debe a aumentos, disminuciones, o alteraciones en las estructuras glucídicas de las glicoproteínas presentes en la superficie celular. Actualmente, se especula sobre la influencia de estos cambios en la glicosilación sobre la adhesión celular y la capacidad de las células metastásicas para moverse de una región a otra [3, 25, 28]. Por ejemplo, se ha correlacionado un aumento del número de ácidos siálicos en las glicoproteínas (hipersialización) de la pared celular con el potencial metastásico del tumor. Una de las hipótesis para explicar este aumento es que existen unas lectinas que reconocen ácido siálico y que median la adhesión celular. Por tanto, existe la posibilidad de que la función del ácido siálico en la pared de las células cancerígenas sea liderar procesos de adhesión celular que ocurren en la metástasis [3,28].

Dentro de las proteínas del suero que sufren cambios en su glicosilación asociados a diversas enfermedades se encuentra la AGP. La AGP es una glicoproteína sintetizada por el hígado y muy relacionada con procesos de inflamación en el

organismo. Uno de los capítulos de esta Memoria se dedica al estudio por electroforesis capilar de esta proteína, por lo que es en ese capítulo donde se ha realizado una revisión de los trabajos publicados sobre los cambios en su estructura relacionados con estados patológicos.

Además de cambios en el tipo de glicosilación de una proteína, puede darse el caso de que una proteína no glicosilada se glicosile en ciertos estados patológicos. Este es el caso de la proteína C-reactiva (CRP), una proteína no glicosilada en estados normales de salud. Sin embargo, su glicosilación ha sido descrita en pacientes que presentaban ciertas enfermedades, como lupus sistémico eritematoso (SLE) [29]. Esta proteína es objeto de estudio en el Capítulo 3 de esta Memoria, y es en ese capítulo donde se le prestará especial atención a este fenómeno. Otro ejemplo de glicosilaciones “*de novo*” corresponde a la glicosilación que sufren las proteínas en los pacientes diabéticos cuando tienen niveles muy altos de glucosa en sangre. La glicosilación de las proteínas de la sangre, en este caso, es química (se produce una reacción de Maillard), no enzimática [4].

2. ELECTROFORESIS CAPILAR

La electroforesis capilar (CE) es una técnica de separación que se basa en la diferente movilidad electroforética de los analitos bajo la acción de un campo eléctrico. La separación se lleva a cabo en el interior de un tubo capilar, normalmente de sílice fundida y con un diámetro interno del orden de decenas-centenas de micras. La CE mejora el poder de resolución de la electroforesis convencional y aporta una instrumentalización que permite una detección “on-line”, la cuantificación de los analitos y una mejora de la reproducibilidad, entre otras ventajas. Los análisis por CE son muy rápidos (en general, menores de 30 min) y requieren muy poco volumen de muestra (del orden de microlitros). Además, las eficacias de separación suelen estar entre los 10^5 - 10^6 platos teóricos por metro de capilar. Los analitos que pueden analizarse con esta técnica son muy variados (desde iones hasta proteínas o células) [30].

2.1 Instrumentación

La instrumentación habitual de un equipo de electroforesis capilar está representada gráficamente en la **Figura 1.7**. El equipo cuenta con una fuente de alto voltaje (normalmente, de 0 a 30 kV), un capilar, dos viales para el tampón de separación que albergan, además, los extremos del capilar y los electrodos conectados a la fuente de alto voltaje. Debido a que el mantenimiento de la temperatura del capilar es clave para obtener separaciones de alta eficacia y reproducibles, los equipos cuentan con un sistema de termostatación. Los detectores más habituales están basados en técnicas espectroscópicas, siendo la detección ultravioleta (UV) la más utilizada y, en auge, la fluorescencia inducida por láser (LIF) [31]. También existen detectores basados en técnicas electroquímicas y equipos de CE acoplados a espectrómetros de masas.

Normalmente, la inyección de la muestra se realiza en el extremo del capilar más alejado del punto de detección. Para ello, se sustituye el vial que contiene el tampón de separación por otro vial con la muestra en disolución. En ese momento, y durante un tiempo establecido, se aplica una presión (inyección hidrodinámica) o un voltaje (inyección electrocinética) determinados. Con el primer tipo de inyección, una alícuota de la muestra entra en el capilar. Con el segundo tipo la inyección es diferencial, siendo la masa de los diferentes analitos de la muestra que entran en el capilar función de la relación carga/masa de éstos. Por otro lado, el voltaje de separación una vez inyectada la muestra suele aplicarse en el modo denominado polaridad normal, es decir, el ánodo en el vial de separación más alejado del detector y el cátodo en el vial de separación más cercano al detector. En las ocasiones en que sea necesario, también se puede aplicar voltaje en polaridad inversa.

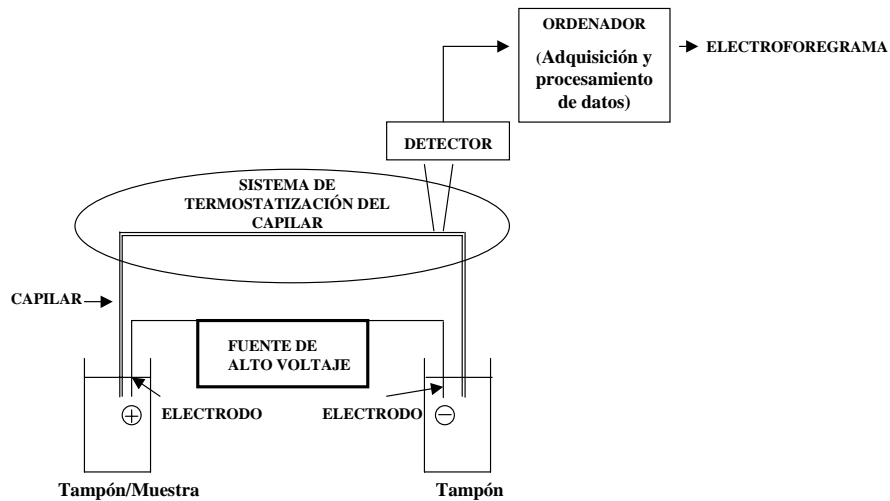


Figura 1.7. Esquema de la instrumentación de un equipo de CE.

2.2 La columna capilar

La columna capilar es una de las partes fundamentales de la instrumentación de CE. La columna más empleada es un tubo de sílice fundida con un diámetro interno de decenas-centenas de micras y un diámetro externo de centenas de micras, siendo su longitud habitual del orden de las decenas de centímetros. La sílice fundida es muy frágil, por lo que se recubre de un polímero protector (normalmente, poliimida), excepto en la zona del detector. La sílice presenta muy buenas propiedades para la CE, principalmente por ser transparente a la luz UV-visible, lo que permite la detección en columna con sistemas de detección espectrofotométricos. Además, el pequeño espesor de la pared permite la disipación del calor generado por el efecto Joule.

Los capilares de sílice fundida presentan la característica de que en su pared interna, cuando está en contacto con tampones acuosos con pHs superiores a 2,5, se originan cargas negativas debidas a la ionización de los silanoles de la sílice. El grado de ionización de los grupos silanoles de la pared del capilar es función del pH del tampón presente en su interior [32]. La ionización de la pared del capilar hace que los contraiones presentes en el tampón se acumulen en la superficie interna del capilar, provocando un exceso de cargas positivas en la pared respecto de las que existen en las zonas interiores del capilar, dando lugar a una doble capa eléctrica. Esta doble capa consiste en una zona compacta o capa de Stern, en la que la interacción entre los

contraiones y los silanoles del capilar es muy fuerte. Más allá de esta zona compacta las interacciones son más débiles y se genera la llamada zona difusa. Bajo la acción de un campo eléctrico, esta acumulación de cargas positivas en las cercanías de las paredes del capilar se mueve hacia el cátodo, arrastrando el agua de solvatación asociada y creando un movimiento global del tampón, que se denomina flujo electroosmótico (EOF). El EOF es uno de los factores importantes en la separación por CE, como se describirá más adelante. Además, es también uno de los fenómenos que más influye en la reproducibilidad de las separaciones en los capilares.

La movilidad correspondiente al EOF (μ_{EOF}) depende de diversos factores, como puede observarse en la **ecuación 1**, donde ϵ_r es la constante dieléctrica del medio de separación, ϵ_0 la permitividad en el vacío, ζ el potencial zeta de la superficie, y η la viscosidad del tampón de separación. El potencial zeta corresponde a la diferencia de potencial entre la capa de Stern y el del tampón de separación. Por otro lado, la velocidad del EOF (v_{EOF}) es función de la μ_{EOF} y del campo eléctrico aplicado (E), como puede verse en la **ecuación 2**.

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (1)$$

$$v_{EOF} = \mu_{EOF} E \quad (2)$$

Un efecto a tener en cuenta, especialmente en la CE de proteínas, es que los grupos silanoles de la pared pueden dar lugar a fenómenos de adsorción electrostática con compuestos con carga total positiva o con zonas positivas de la molécula, dando lugar a peores resoluciones, peor reproducibilidad entre inyecciones o, incluso, impidiendo la detección del analito debido a una adsorción total e irreversible de éste sobre la pared del capilar. Existen diversas estrategias para evitar esta adsorción, como se describe a continuación.

2.2.1 Formas de evitar la adsorción de proteínas a la pared de sílice

Por tanto, uno de los problemas que presenta el uso de la CZE con capilares de sílice en la separación de proteínas es la adsorción de éstas a la pared del capilar mediante interacciones electrostáticas con los silanoles libres, que empeoran su resolución e incluso impiden su detección [33, 34]. Esta adsorción no es tan importante, por ejemplo, en pequeños péptidos con pocos grupos cargados [35]. Existen diversas estrategias para disminuir dicha adsorción y el principio de casi todas ellas es minimizar o enmascarar el número de silanoles libres de la pared, minimizando, por tanto, la adsorción de proteínas y disminuyendo el EOF. También existe la posibilidad de recubrir la pared del capilar de tal forma que las cargas de la pared sean positivas. Este recubrimiento invierte el sentido del EOF (que migrará hacia el ánodo) y evita la adsorción de proteínas con carga neta positiva. Estas estrategias podrían ordenarse en los siguientes grupos:

1. Trabajar con tampones de separación con $\text{pH} < 2,5$.

A valores de pH menores de 2,5 la ionización de los silanoles de la pared del capilar está prácticamente suprimida, por lo que apenas existe interacción electrostática con las proteínas de la muestra. Existen diversos trabajos en que esta aproximación se ha utilizado con éxito en la separación de proteínas [36, 37].

2. Añadir aditivos al tampón de separación (recubrimiento dinámico de la pared del capilar).

Los recubrimientos dinámicos del capilar se consiguen mediante la incorporación de un aditivo al tampón de separación, que tiene una gran afinidad por la pared del capilar. De esta forma, se establece un equilibrio de reparto del aditivo entre el tampón y la pared, compitiendo con la proteína en la adsorción a ésta. Estos aditivos pueden prácticamente suprimir el EOF o incluso invertirlo, si así se desea, y actúan mediante un recubrimiento dinámico y reversible. Esta alternativa es muy utilizada frente al recubrimiento estático (que se trata más adelante y en el que existe una modificación química de la pared del capilar), por su bajo coste y sencilla aplicación. Estos recubrimientos se eliminan con los lavados entre inyecciones, siendo necesario regenerar la pared del capilar con el tampón y el recubrimiento dinámico previamente a cada análisis. La posibilidad de regenerar el recubrimiento entre análisis permite conseguir que éstos sean más

reproducibles que con los recubrimientos estáticos. Dentro de los recubrimientos dinámicos cabe destacar cuatro estrategias y tipos de tampones:

2.1. Tampones de separación con alta fuerza iónica.

Estos tampones enmascaran los silanoles libres de la pared del capilar. Sin embargo, con tampones muy concentrados existe el riesgo de calentamiento excesivo del capilar y es necesario trabajar con voltajes más bajos de los habituales en CE [38].

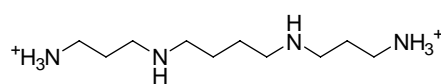
2.2. Tampones de separación con altas concentraciones de metales alcalinos monovalentes.

Green y Jorgeson [35] propusieron la adición de altas concentraciones de iones alcalinos monovalentes, como el Na^+ y el K^+ (mediante la adición de sales de éstos) para reducir la adsorción de proteínas. La idea de partida para este trabajo fue la cromatografía de intercambio iónico, en la que los compuestos retenidos son eluidos aumentando la fuerza iónica de la fase móvil. El inconveniente es que, nuevamente, estas sales provocan un aumento en la fuerza iónica que da lugar a un aumento de la temperatura del tampón.

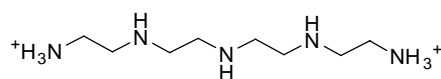
2.3. Tampones de separación con aminas y sales de amonio.

Las aminas y las sales de amonio cuaternarias están entre los tipos de compuestos más utilizados para recubrir dinámicamente el capilar. Las monoaminas comprenden un gran número de compuestos, como la trietilamina y la propilamina. Lo mismo sucede con las diaminas, con ejemplos como el 1,3-diaminopropano y el 1,4-diaminobutano (putrescina). Algunas oligoaminas importantes en el recubrimiento dinámico de los capilares son la $\text{N,N}'$ -bis(3-aminopropil)1,4-butanodiamina (espermina) y la dietilentriamina. Dentro de las sales cuaternarias, son habitualmente utilizadas el bromuro/cloruro de hexametonio y el bromuro/cloruro de decametonio. El mecanismo de acción de las aminas y sales de amonio cuaternario consiste en que estos compuestos nitrogenados se añaden al tampón de separación en condiciones tales que estén protonados. Tienen lugar entonces interacciones electrostáticas con los silanoles de la pared del capilar, adsorbiéndose los compuestos a la pared y enmascarando las cargas negativas de ésta, minimizando el EOF y la interacción proteína-silanol.

En general, las mono y diaminas son eficaces en evitar la adsorción de proteínas al capilar a concentraciones elevadas (del orden de milimolar) en el tampón de separación [33], lo que provoca un aumento de la fuerza iónica del tampón y por tanto puede impedir trabajar a voltajes suficientemente altos [39]. La eficacia de las aminas es función de su número de cargas positivas (cuantas más, más eficaz es la molécula) y de su hidrofobicidad (cuanto más hidrófoba, más se adsorbe a la pared del capilar). Sin embargo, existen casos en que, por ejemplo, una tetramina, a pesar de ser menos hidrófoba, es más eficaz en el recubrimiento de la pared que una pentamina. Esto se debe a que la eficacia no sólo es función número de grupos amina y de la hidrofobicidad de la molécula. Si los grupos amino de la molécula se encuentran muy cerca en la cadena (tal es el caso, por ejemplo, de la tetraetilenpentamina o TEPA), el pK de esos grupos baja drástica y progresivamente. Los cinco grupos amino de TEPA tienen pKs de 9,9, 9,1, 7,9, 4,3, y 2,7, respectivamente. Los pK tan bajos provocan que ciertos grupos amino no estén protonados a pHs del tampón de trabajo habituales. Por el contrario, la espermina, que es una tetramina, tiene los grupos amino dispuestos suficientemente separados para que los pKs de sus aminas se mantengan en la zona básica, y su carga efectiva total sea superior a la de la TEPA [39]. También se ha comprobado que, con las aminas, el EOF se reduce de forma proporcional a la relación de grupos CH_2/NH , al peso molecular, y al número total de CH_2 y CH_3 . Las estructuras moleculares de la espermina y de la TEPA, que se han utilizado como ejemplos, están representadas en la **Figura 1.8**.



Espermina. Peso molecular: 202



**Tetraetilenpentamina o TEPA.
Peso molecular: 192**

Figura 1.8. Fórmula y peso molecular de la espermina y la TEPA.

Las aminas presentan ciertas desventajas, como que la adición al tampón de separación provoca un aumento de la corriente de separación. También, el uso de aminas como recubrimientos dinámicos pierde eficacia en tampones básicos porque los grupos aminos pueden desprotonarse y dejar de interactuar con los grupos silanoles ionizados.

Con respecto a las sales de amonio cuaternario, Oda et al. [40] realizaron un estudio en el que se demostraba que éstas eran mucho más eficaces que sus diaminas correspondientes.

Además de las interacciones aditivo-capilar, y en el caso de la separación de proteínas, se ha sugerido que, en algunas ocasiones, la mejora de la resolución podría deberse no sólo a que las aminas minimizan la adsorción de las proteínas a la pared, sino a una interacción proteína-aditivo [40].

2.4. Otros recubrimientos dinámicos

Hay que mencionar otros recubrimientos dinámicos de la pared del capilar como polímeros cargados o neutros [41]. Estos últimos pueden ser hidrófilos o hidrófobos. También se han utilizado detergentes no poliméricos (neutros y aniónicos) para evitar la interacción de la proteína con la pared del capilar [33].

3. Recubrir el capilar de forma estática.

La modificación estática de la pared del capilar se produce cuando un recubrimiento se une covalentemente a ésta, y fue una de las primeras aproximaciones para eliminar o minimizar el EOF y la adsorción de proteínas a la pared del capilar [42]. También es posible recubrir estáticamente el capilar para conseguir invertir el sentido habitual del EOF. Este tipo de recubrimiento, frente al recubrimiento dinámico, presenta diversos inconvenientes. Así, el proceso de recubrimiento puede ser laborioso, la vida media del capilar puede ser muy corta, puede ser inestable fuera de unos límites de pH establecidos y la reproducibilidad entre capilares puede no ser la adecuada [39]. Una de las aplicaciones en las que este tipo de capilares todavía resultan muy utilizados es en el isoelectroenfoque capilar (CIEF).

El recubrimiento estático más común es polimérico y requiere dos pasos para su preparación: introducción de una capa intermedia (subcapa) entre la pared y el polímero y posterior unión del polímero a la capa intermedia. También hay casos en que el polímero puede, por medio de calor, unirse directamente a la pared [41].

En el caso en que la reacción se realiza en dos pasos, en el primero, un reactivo bifuncional se une covalentemente a la sílice a través de su primer grupo funcional, formando una subcapa con un grupo funcional expuesto y disponible para anclar una segunda capa. Por último, un monómero se une a ese grupo funcional expuesto y se polimeriza, dando lugar a la capa superficial del recubrimiento. El proceso está esquematizado en la **Figura 1.9**. Existen recubrimientos neutros e hidrófilos como la poli(acrilamida) (PAA), el polietilenglicol (PEG) y el alcohol polivinílico (PVA). Estos recubrimientos son útiles para eliminar o reducir el EOF y evitar la adsorción de proteínas por atracciones electrostáticas y por hidrofobicidad [41]. En ocasiones, puede interesar que el polímero sea hidrófilo y esté cargado. De este modo, introducir cargas positivas en la pared del capilar puede evitar la interacción de la pared con proteínas básicas. Es necesario tener en cuenta que, al igual que la sílice, este recubrimiento polimérico exhibirá diferente densidad de carga en función del pH del tampón de separación.

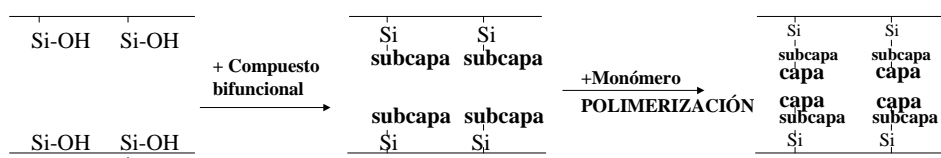


Figura 1.9. Representación gráfica de los pasos para recubrir un capilar.

2.3 Comparación con otras técnicas

Con respecto a la electroforesis convencional en gel, la CE permite una mayor disipación del calor generado por el efecto Joule debido a que, al emplear capilares, la relación superficie externa/volumen del medio de separación es muy elevada. Por tanto, es posible aplicar mayores voltajes de separación que dan lugar a análisis más rápidos y eficaces. Además, la detección en el propio capilar, sin la necesidad de tinción, permite la automatización de la técnica, simplificándola y facilitando el análisis cuantitativo.

Una comparación rigurosa entre la CE y la HPLC está fuera del alcance que debe tener esta Introducción. En términos generales, tanto el principio por el que se mueve el tampón en uno y otro modo son diferentes, como los tipos de columnas que se emplean son diferentes. En principio, si sólo se considera el empleo de columnas capilares

abiertas en ambas técnicas, el ensanchamiento de la banda de muestra debe ser menor en CE que en HPLC, ya que el perfil de velocidades originado por el campo eléctrico dentro del capilar es plano, mientras que el perfil de velocidades originado por diferencia de presión es parabólico. Por otra parte, generalmente, la CE utiliza menor volumen de muestra y menor volumen de tampón de separación que la HPLC, aunque la reproducibilidad del volumen de muestra inyectado es mejor en HPLC que en CE, lo que hace que la HPLC aventaje a la CE en lo que se refiere a precisión en el análisis cuantitativo.

2.4 Principales modos de CE para el análisis de proteínas

El análisis de proteínas puede abordarse utilizando diversos modos de CE. Cabe destacar la electroforesis capilar en zona libre (CZE), el isoelectroenfoco capilar (CIEF), la cromatografía electrocinética micelar capilar (MEKC), y la electroforesis capilar con geles (CGE) como los más utilizados actualmente. En esta Introducción General se describirán en detalle la CZE y el CIEF porque son los modos estudiados y utilizados en el trabajo que se presenta en esta Memoria.

2.4.1 Electroforesis capilar en zona libre (CZE)

El análisis por CZE consiste en la separación de los analitos en un capilar que sólo contiene el tampón de separación. En este modo de CE, la movilidad efectiva de los analitos, y por tanto la separación, depende fundamentalmente de la relación carga/masa de éstos, estando la masa (M), en proteínas, directamente relacionado con el radio(r) de éstas. Así, a cada analito en las condiciones de separación dadas le corresponde una movilidad electroforética efectiva determinada (μ_{eff}), que depende de su carga (q), de su radio hidrodinámico (r), y de la viscosidad del medio (η), como puede verse en la **ecuación 3**.

$$\mu_{eff} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad (3)$$

Es necesario comentar que la carga de un analito en un electrolito (la llamada carga efectiva (q_{eff})) es menor que su carga (q) debido a que las contracciones del medio apantallan la carga. Por tanto, estrictamente, la μ_{eff} es función de la q_{eff} del analito, que depende de la constante dieléctrica y de la concentración iónica del tampón de separación en que se encuentra [33]. Sin embargo, la simplificación reflejada en la **ecuación 3** es comúnmente aceptada.

Además de la relación carga/masa de los analitos, la movilidad del EOF es determinante en la separación y por lo general es de mayor magnitud que la μ_{eff} de los analitos cuando éstos son proteínas. El tiempo de migración de los analitos hasta el punto de detección se calcula mediante la suma vectorial de la movilidad del EOF y la μ_{eff} de los mismos. Esta suma vectorial da lugar a la movilidad electroforética aparente del analito (μ_{app}), como puede verse en la **ecuación 4**.

$$\vec{\mu}_{\text{app}} = \vec{\mu}_{\text{EOF}} + \vec{\mu}_{\text{eff}} \quad (4)$$

Así, las sustancias con la μ_{eff} del mismo sentido que el EOF (con carga total positiva para capilares sin recubrimiento interno) migrarán más rápido (tendrán una mayor movilidad electroforética aparente) y pasarán antes por el detector que las que tengan una μ_{eff} de signo opuesto al del EOF (con carga total negativa). Las sustancias con movilidad electroforética efectiva nula (carga cero) se desplazan con el flujo electroosmótico. Estas sustancias, en el caso de que absorban a la longitud de onda utilizada, son muy útiles para establecer la magnitud del flujo electroosmótico y poder así determinar la movilidad electroforética efectiva de cada analito. El mecanismo general de separación en CZE está representado gráficamente en la **Figura 1.10**.

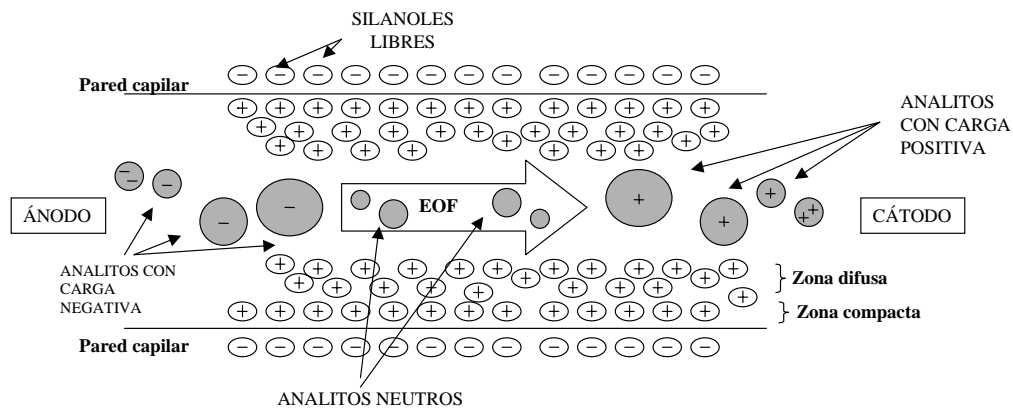


Figura 1.10. Esquema de los fenómenos electroforéticos y electroosmóticos que rigen la separación en CZE.

2.4.2 Isoelectroenfoque capilar (CIEF)

El isoelectroenfoque capilar (CIEF) mejora el alto poder de resolución del isoelectroenfoque (IEF) en geles y aporta las ventajas de la instrumentación de la CE. En IEF (y en CIEF), las proteínas se separan en función de su punto isoeléctrico en un gradiente de pH formado por unos anfólitos (electrolitos anfóteros) que se enfocan cuando se aplica un voltaje de separación. Por tanto, la base de esta separación es lo que se llama “enfoco”, entendiéndose por tal la consecución de una distribución estacionaria de los anfólitos a lo largo del capilar, obteniéndose así un gradiente estacionario de pH. El tipo de introducción de muestra más habitual consiste en mezclar la muestra con los anfólitos y rellenar con esta mezcla el capilar. Al comienzo de la separación en CIEF, antes de aplicar el voltaje, el capilar tiene un pH uniforme y los anfólitos y los analitos están uniformemente distribuidos a lo largo del capilar. Estos anfólitos son compuestos anfóteros, buenos conductores, buenos tampones en el pH igual a su punto isoeléctrico (pI), y cada uno de ellos presenta un determinado pI [43]. Al aplicar voltaje al capilar, comienza un proceso electroforético, en el que cada anfólitos migra en función de su carga y de su masa. Este movimiento diferencial de cada anfólitos bajo un campo eléctrico va estableciendo un gradiente de pH en el interior del capilar. Los anfólitos, por tanto, van creando ese gradiente con su propio movimiento electroforético. Cada anfólitos migra hasta que su carga es cero, fijando en ese punto un pH igual a su pI. Los analitos (como los péptidos y las proteínas), sufren el mismo

proceso que los anfolitos bajo la acción de un campo eléctrico y se enfocan en aquella zona del gradiente de pH igual a su pI. Los analitos de una muestra con diferente pI se separarán con esta técnica. Al estado en que los analitos y los anfolitos han perdido su movilidad electroforética en todo el intervalo de pH se le denomina estado estacionario. Durante el estado estacionario, la difusión de los anfolitos hacia el ánodo /cátodo está minimizada porque esta difusión hace que los anfolitos se encuentren a un pH más ácido/básico que su pI, por lo que se cargan positivamente/negativamente, lo que resulta en que vuelvan a desplazarse a su zona de enfoque. La difusión de los analitos se ve impedida por el mismo fenómeno que el descrito para los anfolitos.

Si el proceso de enfoque se realiza en un capilar sin EOF, el estado estacionario hace que, en teoría, el gradiente de pH y los analitos enfocados se queden inmóviles en el interior del capilar. Por ello, y excepto en casos especiales en que el detector está diseñado para leer a lo largo de todo el capilar, para la detección de los analitos es necesario desplazar todo el contenido del capilar hacia el detector. Este desplazamiento se denomina “movilización” y al tipo de CIEF que la requiere se la llama “two-step” CIEF o CIEF en dos pasos (enfoque y movilización).

Si el proceso de enfoque se realiza en un capilar con EOF, al mismo tiempo que se produce el enfoque de los anfolitos y la muestra, todo el contenido del capilar se desplaza hacia el detector. El EOF debe ser tal que permita a anfolitos y muestra alcanzar un cierto grado de enfoque antes de pasar por el detector. Este tipo de CIEF se denomina “one-step” CIEF o CIEF en un paso, porque el proceso de enfoque sucede a la par que la movilización del interior del capilar hacia el detector.

En CIEF, al igual que en CZE, al trabajar en capilares con una relación superficie externa/volumen interno elevada, es posible utilizar voltajes de enfoque elevados. Además, la detección en columna permite la automatización de la técnica y ahorra tiempo de análisis al no tener que teñir ni desteñir las bandas de proteína. Comparado con IEF en geles, el CIEF es más automatizable, requiere menos cantidad de anfolitos y da lugar a resultados cuantitativos.

Para los dos tipos de métodos descritos (“two-step CIEF” y “one-step CIEF”), la preparación de la muestra, la inyección, el papel de los anfolitos, del catolito, del anolito

y la detección son comunes a ambos, por lo que se describen a continuación antes de indicar las peculiaridades de cada uno de los modos de CIEF.

2.4.2.1 Preparación de la muestra e inyección

En CIEF, la muestra suele prepararse en una mezcla con los anfolitos (habitualmente suministrados por las casas comerciales para diferentes intervalos de pH) que normalmente se diluyen en un polímero específico para CIEF. En ocasiones, esta mezcla puede contener también urea u otros agentes solubilizadores o desnaturizantes. A esta mezcla de la muestra con los anfolitos y otros compuestos específicos de cada separación en el polímero se le denomina mezcla de muestra. Suele recomendarse que la fuerza iónica de la mezcla de muestra sea baja porque las sales interfieren en el proceso de enfoque y pueden elevar mucho las corrientes eléctricas iniciales, provocando un calentamiento excesivo del capilar e incluso la precipitación de proteínas [44]. Con respecto a la selección de los anfolitos, se realiza en función de los pI de los analitos objeto de estudio. El modo de inyección más habitual consiste en llenar con la mezcla de muestra todo el capilar mediante alta presión. En algunas ocasiones, la muestra puede inyectarse sin mezclarse con los anfolitos y el polímero. En estos casos, el capilar se llena de los anfolitos, el resto de compuestos disueltos en el polímero mientras que la muestra se inyecta hidrodinámicamente en un extremo del capilar.

2.4.2.2 Papel de los anfolitos y proceso de enfoque

Los anfolitos comerciales son mezclas de un gran número de compuestos sintéticos con pIs ligeramente diferentes entre sí. Normalmente, son ácidos poliamino-carboxílicos [43, 44]. Cuando un capilar se llena de una mezcla de anfolitos y un extremo del capilar se introduce en una disolución ácida (anolito) en la que está inmerso un electrodo que actúa como ánodo, y el otro extremo del capilar en una disolución básica (catolito) en la que un electrodo actúa como cátodo y se aplica voltaje, los anfolitos, cada uno con su carga, comienzan a migrar hacia el electrodo correspondiente. Como se ha explicado con anterioridad, el movimiento diferencial de cada especie de anfolito bajo el campo eléctrico provoca que, en lo que al principio era una solución homogénea con pH constante, vaya creándose un gradiente de pH. Durante

el enfoque, los anfólitos, en su migración, alcanzan carga cero y pierden su μ_{eff} , fijando un pH diferente a lo largo del capilar. Los anfólitos no salen del capilar porque el pH de los viales del ánodo (normalmente, ácido fosfórico diluido) y del cátodo (normalmente, hidróxido sódico diluido) son menores o mayores, respectivamente, que su pI. Cuando el enfoque finaliza en el interior del capilar se alcanza el llamado estado estacionario, en el que es característica la electroneutralidad a lo largo del capilar. Esta electroneutralidad se formula en la **ecuación 5**, donde $\sum C_{\text{NH}_3^+}$ y $\sum C_{\text{COO}^-}$ son los sumatorios de las concentraciones de grupos positivos y negativos de los anfólitos y C_{H^+} y C_{OH^-} son las concentraciones de protones e hidroxilos.

$$\sum C_{\text{NH}_3^+} + C_{\text{H}^+} = \sum C_{\text{COO}^-} + C_{\text{OH}^-} \quad (5)$$

Por otro lado, los analitos (normalmente, proteínas o péptidos, que también son compuestos anfóteros) migran con los anfólitos y se enfocan en la banda de pH (creada por los anfólitos) igual a su pI. De hecho, en ocasiones, es necesario considerar el efecto que los propios analitos provocan sobre el gradiente de pH al actuar como anfólitos. El proceso de formación del gradiente de pH viene acompañado con un descenso progresivo de la corriente eléctrica en el capilar, porque según van enfocándose, analitos y anfólitos pierden su carga. El enfoque suele considerarse concluido cuando la corriente observada es un 10-25% del valor inicial. En la **Figura 1.11**, está representado el proceso de enfoque.

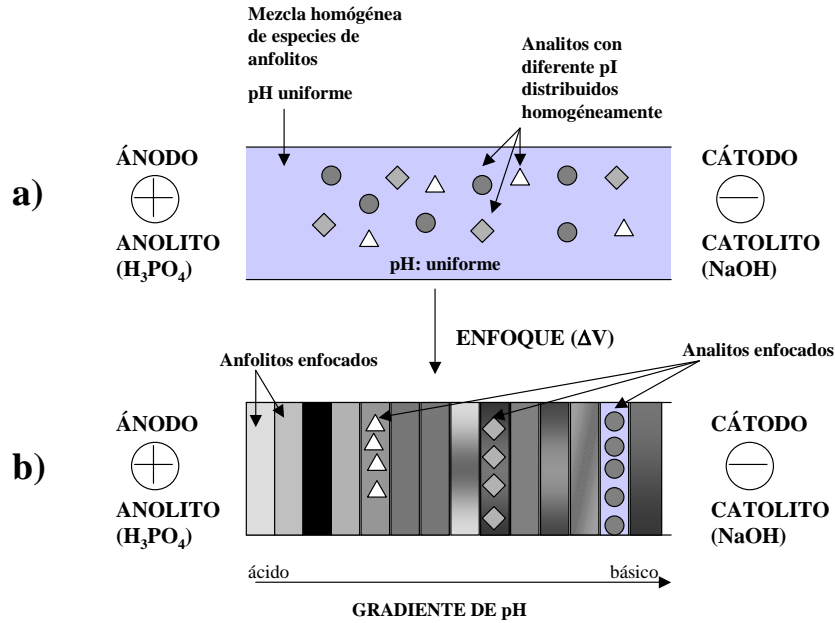


Figura 1.11. Representación gráfica del proceso de enfoque. **a)** Introducción de la mezcla de muestra en el interior del capilar. **b)** Debido al campo eléctrico aplicado, los anfolitos crean un gradiente de pH y los analitos se enfocan en la zona de pH igual a su pI.

2.4.2.3 Inestabilidades del gradiente de pH

El enfoque en CIEF se ha descrito como un proceso en el que se alcanza un estado estacionario o de electroneutralidad. Sin embargo, en la práctica, este estado se ve desestabilizado por diversos fenómenos. Los más estudiados y habituales son la deriva anódica y la deriva catódica. Estas derivas consisten en una pérdida progresiva de los anfolitos ácidos y básicos en el vial del ánodo y del cátodo, respectivamente. Se producen debido a un proceso isotacoforético [H, L]. La isotacoforesis (ITP) es un fenómeno electroforético en el que el capilar (normalmente, en ausencia de EOF) se llena con un ion frontal, cuya movilidad electroforética es mayor que la de cualquiera de los analitos de la muestra. Tras la inyección de la muestra, el extremo del capilar desde el que ha inyectado la muestra se introduce en una disolución del denominado ion terminal, que se caracteriza por tener una movilidad electroforética menor que la de cualquiera de los analitos. Al aplicar el voltaje de separación, los analitos se separan en el sándwich que queda entre el ion terminal y el frontal (ninguno de ellos tiene una movilidad electroforética que les permita atravesar ese sándwich). Durante este proceso, se produce un equilibrio que provoca que todo el interior del capilar migre a la misma velocidad que el ion frontal. Como se recuerda en la **ecuación 6**, la velocidad de un

analito (v) es función de la movilidad electroforética del mismo (μ_{eff}) y del campo eléctrico aplicado (E). Por otro lado, la isotacoforesis es un modo de separación en que la velocidad se mantiene constante (v_{ITP}) gracias al equilibrio entre la movilidad de cada analito (μ_i) y el campo eléctrico en la banda electroforética ocupada por ese analito (E_i), como puede verse en la **ecuación 7**.

$$v = \mu_{\text{eff}} E \quad (6)$$

$$v_{ITP} = \mu_1 E_1 = \mu_2 E_2 = \dots = \mu_n E_n \quad (7)$$

Además, el campo eléctrico es inversamente proporcional a la conductividad de la banda electroforética objeto de estudio. Así, y para que se cumpla el principio de la velocidad constante, en la ITP, cuanto más lento sea un analito (menor μ_{eff}), menor será la conductividad de esa zona y mayor será el campo eléctrico en esa zona. Por otro lado, cuanto más concentrado esté el ion frontal (y tenga más conductividad), a menos velocidad se moverá todo el interior del capilar.

En el caso de las inestabilidades de pH como procesos isotacoforéticos, en la deriva anódica, el anión del anolito actúa como un ion frontal para los anfolitos cargados negativamente en la región ácida del capilar, mientras que el catión del catolito actúa como ion frontal para los anfolitos cargados positivamente. Estas derivas son especialmente importantes cuando los analitos objeto de estudio están enfocados en los extremos del capilar, porque la pérdida de anfolitos ácidos y básicos puede ir acompañada de pérdidas de los analitos. Estas inestabilidades del gradiente de pH pueden minimizarse modificando la concentración del anolito y del catolito. Por ejemplo, si quiere minimizarse la deriva anódica, es recomendable que el anolito sea más concentrado que el catolito [44]. De este modo, disminuye el campo eléctrico en el anolito y por tanto la velocidad de la deriva anódica.

2.4.2.4 Detección

Casi siempre, la detección seleccionada es UV, y suele trabajarse a 280 nm debido a que los anfolitos dan lugar a absorbancias muy elevadas por debajo de los 240 nm. Los anfolitos que se utilizan en CIEF se concibieron para IEF convencional, por lo

que no están diseñados para presentar poca absorbancia en longitudes de onda típicas de detección de proteínas (214 nm). Este hecho disminuye la sensibilidad del método, ya que, normalmente, la máxima absorción de las proteínas se produce a longitudes de onda entorno a 214 nm [43, 44]. A pesar de que el CIEF presenta dificultades para acoplar a MS debido a la presencia de los anfolitos y a que constantemente el eluido del capilar tiene un pH diferente, existen trabajos en que ambas técnicas se han acoplado con éxito (revisión de Simpson y Smith [46]).

2.4.2.5. “Two step CIEF” o CIEF en dos pasos

El CIEF en dos pasos recibe su nombre porque su desarrollo implica el enfoque y, posteriormente, la movilización del contenido del capilar. Esta forma de llevar a cabo el CIEF parte de la base de que, tras el enfoque, el interior del capilar deja de desplazarse debido a la ausencia de EOF y a que los anfolitos y analitos han alcanzado su estado estacionario, en el que no presentan movilidad electroforética. Por tanto, es necesario llevar a cabo un proceso de movilización en el que el contenido del capilar atraviese el detector progresivamente para que las bandas de analitos puedan ser monitorizadas.

Para que esta estrategia de CIEF de lugar a buenas separaciones, es necesario que el EOF se haya eliminado o reducido al mínimo. Por el contrario, si se realiza con el EOF propio de un capilar no recubierto, el establecimiento de zonas enfocadas se ve perjudicado, dando lugar a un ensanchamiento de las bandas. Dado que el EOF es inversamente proporcional a la viscosidad en la doble capa de Stern, si el interior del capilar se recubre con un polímero neutro se consigue disminuir el EOF y minimizar la adsorción de las proteínas. Hjerten [42] fue el primero en conseguir un recubrimiento de la pared del capilar con PAA para su empleo en CIEF. Otro recubrimiento estático habitual en la CIEF es el alcohol polivinílico (PVA), debido a que es un polímero neutro e hidrófilo [42]. Los recubrimientos estáticos con estas características ya se han comentado brevemente en la sección **2.2.1**.

Con respecto a la movilización del interior del capilar ya enfocado existen dos formas muy habituales de operar: movilización química y movilización hidrodinámica.

1. Movilización química.

La movilización química consiste en desestabilizar la electroneutralidad alcanzada en el estado estacionario tras el enfoque mediante la adición al anolito o al catolito de una sal, un ácido o una base. También existe la alternativa de sustituir el anolito o el catolito por una sal, o ácido, o base en disolución. Ambas formas se realizan mientras se mantiene el voltaje de separación. Sin embargo, esta última opción provoca un aumento muy brusco de la corriente que puede estropear el enfoque y por tanto la separación. En esta página, se recuerda la **ecuación 5** (ya mencionada) que refleja el estado estacionario, donde $\sum C_{NH_3^+}$ y $\sum C_{COO^-}$ son el sumatorio de la concentración de grupos positivos y negativos de los anfolitos, respectivamente y C_{H^+} y C_{OH^-} son la concentración de protones e hidroxilos.

$$\sum C_{NH_3^+} + C_{H^+} = \sum C_{COO^-} + C_{OH^-} \quad (5)$$

Mediante la adición de cierta concentración de una sal (por ejemplo NaCl) al catolito, el ion Cl^- compite con el OH^- por migrar hacia el ánodo a través del capilar, como se indica en la **ecuación 8** (donde C_{Cl^-} es la concentración de iones cloruro).

$$\sum C_{NH_3^+} + C_{H^+} = \sum C_{COO^-} + C_{OH^-} + C_{Cl^-} \quad (8)$$

Una reducción de la concentración de hidroxilos disminuye el pH en el interior del capilar, porque la concentración de protones se mantiene. Tanto los anfolitos como las proteínas o péptidos objeto de estudio se cargan positivamente y se produce una migración general hacia el cátodo, atravesando los analitos separados el detector. Esta movilización se denomina catódica. Si la sal se añade en el anolito, el pH en el interior del capilar aumenta provocándose un movimiento generalizado hacia el ánodo. Este segundo tipo de movilización se denomina anódica.

El tipo de movilización (anódica o catódica), así como la concentración y el tipo de sal utilizada dependen de los analitos objeto de estudio y de las características del método desarrollado. Durante la movilización, la corriente aumenta progresivamente conforme el ion añadido penetra en el capilar. Manabe et al. [47] publicaron un estudio en el que comparaban el efecto de diferentes movilizaciones químicas sobre la

resolución de ciertas proteínas. En ese trabajo proponen la sustitución del catolito por un ácido orgánico débil (por ejemplo, ácido acético diluido) para mejorar la resolución de proteínas ácidas. Los ácidos débiles provocan un menor aumento en la corriente que las sales. En la experiencia de nuestro laboratorio, estos ácidos dan lugar a movilizaciones demasiado lentas.

La movilización química es una de las más utilizadas, a pesar de presentar diversos inconvenientes. En ella, el ion correspondiente de la sal entra progresivamente en el capilar, dando lugar a una movilización no homogénea y gradual de los anfolitos y la muestra (en la movilización catódica se movilizan antes y más eficazmente las proteínas o péptidos básicos y neutros que los ácidos). Además, el cambio de pH del gradiente formado en el capilar es función de la concentración del ion, de su movilidad y de la capacidad amortiguadora de los anfolitos. Por tanto, es un parámetro que requiere de una optimización exhaustiva.

2. Movilización por presión

Esta movilización, que dentro de las hidrodinámicas es la más habitual, consiste en aplicar presión desde uno de los extremos del capilar mientras se mantiene el voltaje de separación, para mantener los analitos enfocados y disminuir el ensanchamiento provocado por el flujo parabólico. Esta presión provoca un movimiento global del contenido del capilar hacia el detector. De nuevo, la corriente aumenta progresivamente porque el capilar va llenándose del anolito o del catolito, en función del extremo del capilar desde el que se esté aplicando la presión. El inconveniente de esta movilización es que se genera una distorsión de la banda electroforética debido al flujo parabólico originado al aplicar la presión. Hjerten y Zhu fueron los pioneros proponiendo este tipo de movilización [48]. En la actualidad, la mayoría de los trabajos de CIEF emplean con este tipo de movilización.

2.4.2.6 “One-step CIEF” o CIEF en un paso

Esta técnica consiste en realizar CIEF en capilares con EOF suficiente para que éste sea la fuerza movilizadora que transporte los analitos hacia el detector. En este tipo de CIEF, la muestra va enfocándose mientras todo el contenido del capilar se desplaza hacia el detector, evitando tener que realizar una movilización independiente al enfoque.

El CIEF en un paso puede realizarse en capilares con recubrimientos estáticos o mediante el empleo de un aditivo polimérico, como describe Schwer en su revisión sobre CIEF [49]. El EOF de un capilar de sílice sin tratar es generalmente demasiado rápido y no se alcanza un enfoque suficiente de la muestra antes de que ésta atraviese el detector. Además, el EOF es dependiente del pH del medio (la pared está más ionizada cuanto más aumenta el pH), por lo que no se obtiene un EOF homogéneo a lo largo del capilar. Este problema, aunque minimizado, también ocurre en los capilares recubiertos que mantienen cierto EOF.

El empleo de un aditivo polimérico se utiliza frecuentemente con este modo de CIEF y normalmente se basa en la adición de polímeros viscosos a la mezcla de muestra. Por ejemplo, Mazzeo y Krull utilizaron metilcelulosa [50, 51] para disminuir el EOF. Estos autores son escépticos con la técnica porque no creen que sea posible conseguir una resolución óptima en todo el intervalo de pH. Así, puede suceder que las proteínas o péptidos más básicos, que son los que menos tiempo pasan dentro del capilar, no se enfoquen antes de pasar por el detector [49].

Los capilares recubiertos estáticamente, pero que mantienen todavía un EOF residual, también se han utilizado para desarrollar métodos de CIEF de un paso [52]. En general, a pesar de que en casos excepcionales se han publicado buenas reproducibilidades con métodos de CIEF en un paso, es una técnica complicada y no muy reproducible. Cuenta con el inconveniente de la adsorción de las proteínas a los silanoles no enmascarados de la pared del capilar y con el inconveniente de no tener un EOF homogéneo a lo largo del capilar.

2.5 Falta de reproducibilidad en los tiempos de migración de los analitos en CE

Algunas causas de la falta reproducibilidad en los tiempos de migración de los análisis en capilares de sílice sin recubrir

Uno de los inconvenientes de la CE es que, en algunas separaciones, sufre de una falta de reproducibilidad en los tiempos de migración entre análisis [53, 54]. Este hecho es quizá uno de los mayores obstáculos para que la CE se popularice como método de análisis. Los tiempos de migración en CE suelen tener una RSD en torno al

1%, y existen ocasiones, como se describirá repetidamente en esta Memoria, en que esa reproducibilidad no es suficientemente buena para dar lugar a resultados fiables.

Existen múltiples factores que afectan a la reproducibilidad cualitativa y cuantitativa de la CE [53]. En esta Introducción, se describirán en detalle aquéllos que afectan a los tiempos de migración de los analitos porque ha sido la reproducibilidad que con más profundidad se ha estudiado en el trabajo recogido en esta Memoria. En las **ecuaciones 9, 10, y 11** se indican los factores que afectan al tiempo de migración en CZE, con el objeto de estudiar en detalle la importancia de éstos sobre la reproducibilidad de dicho tiempo de migración. En estas fórmulas, t_m corresponde al tiempo de migración, L a la longitud total del capilar, l a su longitud efectiva, V al voltaje de separación, μ_{eff} a la movilidad electroforética, μ_{EOF} a la movilidad electroosmótica, ε a la constante dieléctrica del medio, ζ al potencial zeta, η a la viscosidad del medio, y q y r a la carga y al radio del analito, respectivamente.

$$t_m = \frac{Ll}{V(\mu_{eff} + \mu_{EOF})} \quad (9)$$

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon\zeta}{\eta} \quad (10)$$

$$\mu_{eff} = \frac{q}{6\pi r\eta} \quad (11)$$

1. Variaciones en el EOF

Las diferencias en las características químicas de la superficie del capilar de sílice son uno de los factores más importantes que afectan a la reproducibilidad en cualquier modo de CE. Como se ha descrito anteriormente, a pHs superiores a 2,5, los silanoles de la pared del capilar se encuentran ionizados. El grado de ionización de la pared depende del pH de la solución acuosa que albergue el capilar [32]. Una variación de las características químicas de la superficie del capilar causa fluctuaciones en el EOF (a través de variaciones en ζ), y por tanto en el tiempo de migración de los analitos [55-57]. Estas variaciones en la pared del capilar pueden ocurrir entre distintos capilares o entre inyecciones en el mismo capilar. El EOF entre capilares de distintos lotes puede variar más de un 5% (RSD), debido a diferencias en la composición química de la pared

[53]. Por otro lado, uno de los motivos de la irreproducibilidad del EOF entre inyecciones es la lentitud a la que la sílice se equilibra cuando se le pasa de un tampón a otro. Esta lentitud causa variaciones en el grado de ionización de la pared entre inyecciones, y por tanto, en el EOF [32]. Esto obliga a que los re-equilibrados entre inyecciones de muestras de proteínas sean, habitualmente, largos.

El EOF también puede variar debido a la adsorción de las proteínas analizadas a la superficie del capilar. Si estas proteínas no son desorbidas adecuadamente en los lavados del capilar entre inyecciones, pueden dar lugar a irreproducibilidad en los tiempos de migración. La adsorción de las proteínas a la superficie del capilar y su efecto sobre el EOF ha sido estudiada por diversos autores [7, 58, 59]. En general, cualquier proteína con una región cargada positivamente puede interactuar con la pared de sílice desnuda, pues se ha demostrado que la adsorción de proteínas está dominada por interacciones electrostáticas [7]. Esta adsorción es proporcional a la concentración de proteína inyectada [59] y afecta al valor de ζ de la zona de la pared a la que se adsorbe. En la sección I.2.2 (La columna capilar) se han descrito algunas estrategias para minimizar la adsorción de proteínas.

El acondicionamiento del capilar para obtener buenas reproducibilidades es, por tanto, clave en CZE. En general, se recomienda acondicionar el capilar antes de su primer uso con NaOH 1 M para tratar de obtener superficies similares entre capilares [53]. Es habitual que el EOF se haga más lento conforme el capilar envejece [57]. Entre inyecciones es imprescindible, especialmente si se trabaja con proteínas, realizar un lavado exhaustivo del capilar que garantice que la pared de éste se encuentre en un estado lo más parecido posible de una inyección a otra. Para el caso de las proteínas, existen diversas estrategias de lavado del capilar. Por ejemplo, es posible lavar el capilar con una disolución de NaOH, con SDS o con ambas consecutivamente. Estos lavados han de optimizarse experimentalmente en el desarrollo de cada método de separación. En ocasiones, conllevan el mismo tiempo que el propio análisis.

2. Variaciones en la temperatura de la muestra y/o del capilar

Las variaciones en la temperatura de la muestra o en la temperatura del capilar pueden afectar a la viscosidad que, como se ha descrito, influye sobre la movilidad electroforética de los analitos (**ecuación 11**). Este problema se ve minimizado con los

sistemas de termostatación actuales con que cuentan los equipos de CE. Sin embargo, el diseño de éstos hace que una parte del capilar (los extremos) no esté termostatación [53].

3. Preparación del tampón y cambios del tampón durante su uso

Está descrito en la literatura cómo ligeras variaciones en el pH o la composición del tampón pueden dar lugar a cambios significativos en el tiempo de migración de los analitos, porque el pH influye en el grado de ionización de los silanoles de la pared del capilar y porque la composición del tampón afecta a la doble capa [60]. También está descrita la electrolisis del tampón de separación debido a su uso en separaciones electroforéticas [61], que se ve minimizada utilizando viales de tampón con el máximo volumen posible o renovando el tampón de separación cada cierto número de análisis.

Algunas causas de la falta de reproducibilidad en los tiempos de migración de los análisis en capilares recubiertos estáticamente

Un capilar con un recubrimiento estático puede eliminar o minimizar el EOF. En muchas ocasiones el recubrimiento tiene defectos y existen zonas del capilar que todavía pueden ionizarse y, por tanto, producirse interacciones electrostáticas entre los silanoles y las zonas de la proteína con cargas positivas. Por tanto, las variaciones en el EOF residual de los capilares recubiertos debidos a diferencias en la ionización de los silanoles libres entre inyecciones y la adsorción progresiva de proteína son dos de las principales causas de la irreproducibilidad en la CE con capilares recubiertos. Además, los recubrimientos van deteriorándose conforme el capilar envejece [62].

Estrategias para minimizar el efecto de la falta de reproducibilidad de los tiempos de migración en CE

Se han publicado distintas aproximaciones para la resolución del problema de la falta de precisión de un determinado parámetro de migración en electroforesis capilar (EC). Algunas publicaciones incluyen la comparación de distintos parámetros como el tiempo de migración, el tiempo de migración relativo al de un patrón interno, la movilidad electroforética efectiva, la movilidad electroforética aparente y la movilidad electroforética relativa a la de un patrón interno [55, 63-67]. Otros estudios hacen uso de

la movilidad electroforética efectiva de patrones conocidos para determinar la movilidad electroforética del compuesto de interés [56, 57]. Además, también se ha desarrollado un programa de ordenador para normalizar los tiempos de migración de los analitos en distintos análisis en los que varía el flujo electroosmótico o el voltaje aplicado. El programa normaliza electroforegramas con respecto a uno que toma como referencia. Para ello, hace falta que el electroforegrama normalizado y el de referencia cuenten con al menos dos patrones internos o picos electroforéticos correspondientes a analitos conocidos. Con estos dos picos de referencia, el programa calcula dos factores de corrección: el debido a cambios en el voltaje y el debido a variaciones en el flujo electroosmótico. Con estos factores de corrección, Reijenga et al. normalizan los tiempos de migración del resto de analitos en el electroforegrama [68]. Como puede verse, algunos de estos estudios requieren la adición a la muestra de al menos un patrón interno (PI) o de marcadores de EOF. Estos métodos, por tanto, presentan el inconveniente de tener que añadir un compuesto extraño a la muestra.

3. LA ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL ANÁLISIS DE GLICOPROTEÍNAS INTACTAS

En esta Introducción se ha apuntado la necesidad del análisis y caracterización de las glicoproteínas de interés clínico y farmacéutico. Existen múltiples técnicas analíticas que se han puesto al servicio de este requerimiento. Novotny y Mechref han revisado recientemente las metodologías actuales para el análisis de glicoproteínas [2]. En general, existen diferentes estrategias para abordar el análisis de glicoproteínas. De este modo, pueden analizarse las glicoproteínas intactas, los glicopéptidos procedentes de la digestión (normalmente, enzimática) de la proteína, o la parte glucídica de la glicoproteína. Frente a los estudios de hidrolizados de las glicoproteínas, la separación y el análisis de formas de una glicoproteína intactas presenta la ventaja de poder atribuir características o posibles cambios de glicosilación de la proteína a una forma concreta de la proteína.

Dentro de los métodos clásicos para el análisis de la glicosilación de glicoproteínas intactas cabe destacar la electroforesis convencional en geles de SDS-poliacrilamida (SDS/PAGE) y el isoelectroenfoco en geles. Estas dos técnicas

presentan los inconvenientes de ser laboriosas, lentas y, en ocasiones, no suficientemente reproducibles. Por otro lado, para el análisis de glicopéptidos u oligosacáridos de la glicoproteína digeridos enzimática o químicamente, puede utilizarse la cromatografía. Uno de las desventajas que interfieren con esta técnica es que el tipo de glicosilación puede afectar a la eficacia de la digestión, produciendo de ese modo distorsiones en la cuantificación de los glicanos de una proteína. Por otro lado, la resonancia magnética nuclear (NMR) es una técnica capaz de asignar una estructura a un oligosacárido desconocido, pero la masa de glicano necesaria es elevada. También la espectrometría de masas (MS) se utiliza cada vez más en el análisis de los glicanos o los glicopéptidos de las glicoproteínas. Sin embargo, y salvo excepciones, la técnica requiere una digestión de la proteína para liberar los glicanos o los glicopéptidos de la glicoproteína [1].

En esta Introducción, se presta un especial interés al uso de CE para el análisis y separación de formas de glicoproteínas intactas con detección ultravioleta, asunto revisado extensamente por Pantazaki et al [14], Kamoda y Kakehi [4], y Oda et al. [69], entre otros. La CE es una técnica analítica muy adecuada para el análisis, partiendo de la proteína intacta, de la heterogeneidad de las glicoproteínas. Frente al análisis por SDS/PAGE y al isoelectroenfoque convencional, la CE requiere menor cantidad de muestra, es más rápida, más reproducible y cuantitativa.

Debido a la variedad terminológica utilizada en este campo, es preciso aclarar ciertos términos que se utilizarán frecuentemente en esta Memoria. Como ya se ha mencionado, en un mismo individuo, una misma proteína puede presentar diferentes variantes moleculares en función de su composición glucídica. A estas variantes, a lo largo de la Memoria, se les denominará “glicoformas”. Por otro lado, en ocasiones, una glicoproteína puede presentar diferentes variantes no sólo en función de la composición glucídica, sino también en función de otras modificaciones post-traduccionales (PTM). El término “formas” se utilizará cuando se haga referencia a la heterogeneidad molecular presente en una glicoproteína, sin especificar si el origen es glucídico, procedente de la cadena polipeptídica o de alguna otra modificación post-traduccional. Estas formas de las glicoproteínas se separan en CE en función de diferentes características físico-químicas, según el modo de CE elegido. La separación de glicoproteínas por CE da lugar a varios picos o bandas. Todas las moléculas de una

glicoproteína que migran bajo el mismo pico o banda electroforético se denominarán “isoforma” en esta Memoria.

Dos de los modos de CE más habituales en la separación de formas de glicoproteínas son la CZE y la CIEF. En general, las características, variables analíticas y precauciones para el desarrollo de estas separaciones son las mismas que para la separación de proteínas en general. Por ejemplo, el riesgo de adsorción de una glicoproteína a la pared del capilar es el mismo que el de una proteína. Un reto extra en la separación de glicofomas de una glicoproteína es su similitud estructural, que hace imprescindible un método que presente una alta resolución. Las diferencias entre formas de una misma glicoproteína pueden dar lugar a pequeños cambios en la relación carga/masa, en la carga o en el punto isoeléctrico. Las variaciones en el punto isoeléctrico suelen venir dadas por el diferente número de ácidos siálicos por molécula, aunque no pueden excluirse otros orígenes, como cambios en la secuencia polipeptídica, y permiten su separación por CIEF [14].

Cabe distinguir diferentes objetivos en el desarrollo de métodos de CE para la separación de formas de glicoproteínas. Por un lado, se encuentran trabajos en los que la separación de formas de glicoproteínas por CE son una herramienta más para elucidar la estructura y las modificaciones post-traduccionales de cierta proteína [11]. Por otro, un gran número de publicaciones tiene que ver con el análisis de glicoproteínas recombinantes de interés farmacéutico [70-75]. El objetivo final de estos trabajos es el desarrollo de métodos que permitan y faciliten el control de calidad de la proteína fabricada, controlen la consistencia entre lotes, etc. Hay que destacar también la separación de glicoproteínas por CE al servicio de lo que podría llamarse glicobiología, la ciencia que estudia el papel de los azúcares (y por tanto, de las glicoproteínas) en los sistemas biológicos. Dentro de este campo, se incluye el estudio de las glicoproteínas y la distribución y/o presencia de sus formas como potenciales marcadores de enfermedad [52,76-78].

3.1 Separación de formas de glicoproteínas por CZE

Obviamente, las glicoproteínas presentan una peculiaridad frente a las proteínas no glicosiladas, la presencia de azúcares. El tampón borato es muy utilizado en la

separación de glicoproteínas por CZE porque forma complejos cargados negativamente con ciertos azúcares neutros con 1-2 dioles, especialmente en posición *cis* [79]. Esto confiere a las formas de la glicoproteína, en presencia de borato, una carga diferente en función de su composición en azúcares. El papel del borato en la separación por CZE se describe ampliamente en el Capítulo 3 de esta Memoria. Esta aproximación se ha utilizado con éxito, entre otras, en las separaciones por CZE de formas de la ovoalbúmina (OVA) [34] y el antígeno específico prostático (PSA) [30]. Existen también separaciones de glicoproteínas por CZE en que el tampón no contiene borato. En muchas ocasiones, las diferencias en la relación carga/masa entre formas de una glicoproteína en el tampón adecuado son suficientes para conseguir su separación sin la necesidad de formar complejos con el borato. A continuación, se describen algunas glicoproteínas de interés que han sido separadas por CE.

La EPO, una glicoproteína de interés farmacéutico, como se describe en el Capítulo 1 de esta memoria, ha sido ampliamente estudiada por nuestro laboratorio y otros grupos de trabajo, obteniéndose separaciones de hasta 8 isoformas de EPO a línea de base [70-72, 81]. Estos trabajos se realizaron en capilares de sílice sin recubrir, por lo que fue imprescindible el uso de recubrimientos dinámicos como, por ejemplo, el 1,4-diaminobutano (DAB) que minimizaran la adsorción de la proteína objeto de estudio.

Berkowitz et al. [36] consiguieron separar una glicoproteína modelo en 60 picos (atribuibles a glicofomas y otras heterogeneidades). Este trabajo es de interés debido a la aproximación utilizada. El método se desarrolló en capilares de sílice sin recubrir con tampones de separación de pH muy ácidos (en este caso, 2,5). A este pH, la sílice prácticamente no está ionizada y se evita la adsorción de la proteína a la pared del capilar.

Como ya se ha comentado con anterioridad, las formas menos glicosiladas de la transferrina (llamadas genéricamente CDT, “carbohydrate deficient transferrin”) son un marcador muy fiable de alcoholismo. La transferrina puede contener de cero a ocho ácidos siálicos [76], siendo la forma con cuatro ácidos siálicos la más abundante en individuos sanos. El interés por desarrollar un método para la separación y análisis por CZE de la transferrina se demuestra en los múltiples métodos publicados. Casi todos ellos parten de la necesidad de saturar la proteína de hierro, para evitar que las posibles

diferencias en la relación carga/masa se deban a formas de la transferrina con distinta saturación del catión hierro. Se han separado formas de transferrina en capilares sin recubrir empleando tampones basados en borato con diferentes aditivos catiónicos [76, 77]. También se han utilizado capilares recubiertos con tampones con metilcelulosa o con hidroxietil celulosa para reducir el EOF [78]. Algunos de estos métodos se han utilizado para comparar el perfil electroforético de la transferrina de individuos sanos y alcohólicos. En estos últimos, las formas con menos ácidos siálicos (CDT) aumentan considerablemente [27, 76].

3.2 Separación de formas de glicoproteínas por CIEF

Como ya se ha mencionado, en muchas ocasiones las glicofomas de una proteína pueden diferir en el número de ácidos siálicos, lo que da lugar a moléculas con diferente pI. Por tanto, el CIEF es una técnica muy valiosa para el análisis de glicoproteínas en sustitución al IEF en geles convencional. También permite estimar el pI de las glicoproteínas analizadas [71]. Cualquiera de los modos de CIEF descritos en el apartado correspondiente en esta Introducción son, en principio, válidos para el análisis de formas de glicoproteínas.

Uno de los trabajos pioneros del uso del CIEF para la separación de glicofomas fue el realizado por Kilar y Hjerten [82] con la transferrina, identificando glicofomas con siete, seis, cinco, cuatro, tres y dos ácidos siálicos. La EPO también se ha separado en 8 bandas por CIEF en dos pasos en capilares recubiertos [71, 83].

Otra glicoproteína importante, el rtPA (la forma recombinante del activador de plasminógeno de tejido) se analizó por CIEF con dos modos diferentes. Así, se utilizó un método de CIEF de un paso en capilares recubiertos de poliacrilamida en el que al menos se obtienen 8 bandas de rtPA en menos de 10 min [84]. Esa misma proteína se ha separado con un método de CIEF en dos pasos (mediante movilización por presión), obteniendo una separación de 8-9 bandas de rtPA en menos de 20 min [85].

Existe una publicación en la que se analiza por CIEF de un paso la fracción de bajo peso molecular del fluido cerebrospinal (CSF) [52]. En esta fracción, se encuentra una glicoproteína característica del CSF, la llamada “proteína β -traza” que se resuelve

en 4 picos. Los autores relacionaron cambios en la distribución cuantitativa de estas formas (que difieren en el número de ácidos siálicos) con el padecimiento de ciertas enfermedades neurológicas. Este artículo es uno de los pocos publicados hasta el momento en el que el CIEF se utiliza como método para comparar perfiles electroforéticos de glicoproteínas procedentes de individuos sanos y enfermos.

4 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jenkins, N., Curling, M.A. *Enzyme Microb. Technol.* 1994, 16, 354-364.
- [2] Novotny, M.V., Mercherf, Y. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 1956-1968.
- [3] Taylor, M.E., Drickamer, K. *Introduction to glycobiology*, Oxford University Press, USA, 2004. Capítulos 2 y 12.
- [4] Kamoda, S., Kakehi, K. *Electrophoresis* 2006, 27, 2495-2504.
- [5] Dwek, R.A., *Chem. Rev.* 1996, 96, 683-720.
- [6] Brockhausen, I., Kuhns, W. *Glycoproteins and human disease*, Springer-Verlag, Alemania, 1997, pp 3-4.
- [7] Egrie, J.C., Browne, J.K. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001, 16 [Suppl 3], 3-13.
- [8] Graf, M., Galera García, R., Watzig, H. *Electrophoresis* 2005, 26, 2409-2417.
- [9] Storrington, P.L., Tiplady, R.J., Gaines Das, R.E., Stenning, B. E., Lamikanra, A., Rafferty, B., Lee, J. *Br. J. Haematol.* 1998, 100, 79-89.
- [10] Wasley, L.C., Timony, G., Murtha, P., Stoudemire, J., Dorner, A.J., Caro, J., Krieger, M., Kaufman, R. *J. Blood* 1991, 77, 2624-2632.
- [11] Rudd, P.M., Scaragg, I. G., Coghill, E., Dwek, R.A. *Glycoconj. J.* 1992, 9, 86-91.
- [12] Neuss, C., Demlbauer, U., Pelzing, M. *Electrophoresis*, 2005, 26, 1442-1450.
- [13] Fournier, T., Medjoubi-N. N., Porquet, D. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1482, 157-171.
- [14] Pantazaki, A., Taverna, M., Vidal-Madjar, C. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 383, 137-156.
- [15] Walsh, G. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003, 55, 3-10.
- [16] Walsh, G. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004, 58, 185-196.
- [17] Jung, E., Williams, K.L. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 1997, 25, 3-8.
- [18] Imai, N., Kawamura, A., Higuchi, M., Oh-eda, M., Orita, T., Kawaguchi, T., Ochi, N. *J. Biochem.* 1990, 107, 352-359.
- [19] Gianazza, E., *J. Chromatogr. A* 1995, 705, 67-87.
- [20] Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D, Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewik, R., Fritsch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T., Miyake, T. *Nature* 1985, 313, 806-810.
- [21] Younes, H.M., Amsden, B.G. *J. Pharm. Sci.* 2002, 91, 2-19.
- [22] Walsh, G., *Trends Biotech.* 2005, 23, 553-558.

- [23] Generic Biologicals Poised to Enter US and EU. A Strategic Outlook on Emerging Market Genetic Engineering News 2004 24 (12)10-12.
- [24] Wadman, M. *Nature* 2000, 404, 532.
- [25] Durand, G., Seta. *Clin. Chem.* 2000, 46, 795-805.
- [26] Butler, M., Quelas, D., Critchley, A.J., Carchon, M., Hebestreit, H.F., Hibbert, R.G., Vilarinho, L., Teles, E., Matthijs, G., Schollen, E., Argibay, I., Harvey, D.J., Dwek, R.A., Jaeken, J., Rudd, P.M. *Glycobiol.* 2003, 13, 601-622.
- [27] Legros, F.J., Nuyens, V., Baudoux, M., Boudjeltia, K.M. *Clin. Chem.* 2003, 49, 440-449.
- [28] Kim, Y.J., Varki, A. *Glycoconj. J.* 1997, 14, 569-576.
- [29] Das, T., Sen, A., Kempf, T., Pramanik, S.R., Mandal, C., Mandal, C. *Biochem. J.* 2003, 373, 345-355.
- [30] Dabrio, M.V., Blanch, G.P., Cifuentes, A., Diez-Masa, J.C., de Frutos, M., Herraiz, M., Martinez Castro, I., Sanz Perucha, J. *Cromatografía y electroforesis en columna*. Springer-Verlag Ibérica, España, 2000. pp 223-245.
- [31] Oda, R.P., Landers, J.P. *Handbook of capillary electrophoresis*. Ed: Landers, J. P. CRC Press, USA, 1993. pp 9-42.
- [32] Chiari, M., Nessi, M., Righetti, P.G. *Capillary electrophoresis in analytical biotechnology*. Ed: Righetti, P. G., CRC Press, USA, 1996. pp 2-36.
- [33] Righetti, P.G., Gelfi, C., Verzola, B., Castelleti, L. *Electrophoresis* 2001, 22, 603-611.
- [34] Landers, J.P., Oda, R.P., Madden, B.J., Selsberg, T.C. *Anal. Biochem.* 1992, 205, 115-124.
- [35] Green, J.S., Jorgeson, J. C., *J. Chromatogr.* 1989, 478, 63-70.
- [36] Berkowitz, S.A., Zhong, H., Berardino, M., Sosic, Z., Siemiatkoski, J., Krull, I.S., Marte, R. *J. Chromatogr. A* 2005, 1079, 254-265.
- [37] Towns, J. K., Regnier, F.E. *Anal. Chem.* 1992, 64, 2473-2478.
- [38] Watzig, H., Dette, C. *J. Chromatogr.* 1993, 636, 31-38.
- [39] Verzola, B., Gelfi, C., Righetti, P.G. *J. Chromatogr. A* 2000, 868, 85-99.
- [40] Oda, R.P., Maden, B.J., Spelsber, T.C., Landers, J.P. *J. Chromatogr. A* 1994, 680, 85-92.
- [41] Horvath, J., Dolnik, V. *Electrophoresis* 2001, 22, 644-655.
- [42] Hjerten, S. *J. Chromatogr.* 1985, 347, 191-198.
- [43] Righetti, P.G., Gelfi, C., Conti, M. *J. Chromatogr.* 1997, 699, 91-104.

- [44] Wehr, T., Rodriguez-Díaz, Zhu, M. *Capillary electrophoresis of proteins, chromatographic science series, Vol 80*. Marcel Dekker, USA, 1999. pp 49-234.
- [45] Mosher, R.A., Thormann, W. *Electrophoresis* 1990, 11, 717-723.
- [46] Simpson, D.C., Smith, R.D. *Electrophoresis* 2005, 26, 1291-1305.
- [47] Manabe, T., Miyamoto, H., Iwasaki, A. *Electrophoresis* 1997, 18, 92-97.
- [48] Hjerten, S., Zhu, M. *J. Chromatogr.* 1985, 346, 265- 270.
- [49] Schwer, C. *Electrophoresis* 1995, 16, 2121-2126.
- [50] Mazzeo, J.R., Krull, I.S. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2852-2856.
- [51] Mazzeo, J.R., Krull, I.S. *J. Chromatogr.* 1992, 589, 321-327.
- [52] Hiroaka, A., Seiki, K., Oda, H., Eguchi, N. , Urade, Y., Tominaga, I., Baba, K. *Electrophoresis* 2001, 22, 3433-3437.
- [53] Mayer, B.X. *J. Chromatogr. A* 2001, 907, 21-37.
- [54] Shihabi, Z.K. *J. Chromatogr. A* 1998, 807, 27-36.
- [55] Boone, C.M., Franke, J.P., de Zeeuw, R.A., Ensing, K. *Electrophoresis* 2000, 21, 1545-1551.
- [56] Siren, H., Jumpanen, J.H., Manninen, K., Riekkola, M.L. *Electrophoresis* 1994, 15, 779-784.
- [57] Jumpanen, J.H., Riekkola, M.L. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1060-1066.
- [58] Hjerten, S., Kubo, K. *Electrophoresis* 1993, 14, 390-395.
- [59] Bonvent, J.J., Barberi, R., Bartolino, R., Capelli, L., Righetti, P.G. *J. Chromatogr. A* 1996, 756, 233-243.
- [60] Thomas, B.R., Ghodbane, S. *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 1983-2006.
- [61] Strege, M.A., Lagu, A.L. *J. Liq. Chromatogr.* 1993, 16, 51-68.
- [62] Wehr, T., Zhu, M., Rodriguez-Diaz, R. *Methods in enzymology*, Vol 270, part A. Ed: Karger, B.L., Hancock, W. S. Academic Press, USA, 1996. pp.358-374.
- [63] Lee, T.T., Yeung, E.S., *Anal. Chem.* 1991, 63, 2842-2848.
- [64] Palmer, C.P., Vandeginste, B.G.M., *J. Chromatogr. A* 1995, 718, 153-165.
- [65] Chen, N., Wang, L., Zhang, Y., *J. Liquid. Chromatogr.* 1993, 16, 3609-3622.
- [66] Yang, J., Bose, S., Hage, D.S., *J. Chromatogr. A* 1996, 735, 209-220.
- [67] Li, X.F., Ren, H., Le, X., Qi, M., Ireland, I.D., Dovichi, N.J., *J. Chromatogr. A* 2000, 869, 375-384.
- [68] Reijenga, J.C., Martens, J.H.P.A., Giuliani, A., Chiari, M. *J. Chromatogr. B* 2002, 770, 45-51.

- [69] Oda, R.P., Madden, B.J., Landers, J. P. *Advances in chromatography*, Vol 36. Ed: Brown, P.R., Grushka, E. 1996. Marcel Dekker, Inc. USA. pp163-200.
- [70] Watson, E., Yao, F. *Anal. Biochem.* 1993, 210, 389-393.
- [71] Cifuentes, A., Moreno-Arribas, M.V., de Frutos, M., Diez-Masa, J.C. *J. Chromatogr. A* 1999, 830, 453-463.
- [72] Lopez-Soto-Yarritu, P., Diez-Masa, J.C., de Frutos, M., Cifuentes, A. *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 1-6.
- [73] Tran, A. D., Sungae, P., Lisi, P.J. *J. Chromatogr.* 1993, 542, 459-471.
- [74] Bietlot, H. P., Girard, M. *J. Chromatogr. A* 1997, 759, 177-184.
- [75] James, D.C., Freeman, R.B., Hoare, M., Jenkins, N. *Anal. Biochem.* 1994, 222, 315-322.
- [76] Crivellente, F., Fracasso, G., Valentini, R., Manetto, G., Riviera, A. P., Tagliaro, F. *J. Chromatogr. B*, 2000, 739, 81-93.
- [77] Oda, R.P., Landers, J.P. *Electrophoresis* 2000, 739, 81-93.
- [78] Oda, R.P., Prasad, R. Stout, R.L., Coffin, D., Patton, W.P., Kraft, D.L, O'Brien, J. F., Landers, J.P. *Electrophoresis* 1997, 18, 1819-1826.
- [79] Paulus, A., Klockow-beck, A. *Chromatographia CE series, analysis of carbohydrates by capillary electrophoresis*, Vieweg, Alemania, 1998. pp 49-92.
- [80] Donohue, M. J., Satterfield, M. B., Dalluge, J. J., Welch, M.J., Girard, J. E., Bunk, D. M. *Anal. Biochem.* 2005, 339, 318-327.
- [81] de Frutos, M., Cifuentes, A., Diez-Masa, J.C., *Electrophoresis* 2003, 24, 678-680.
- [82] Kilar, F., Hjerten, S. *J. Chromatogr.* 1989, 480, 351-357.
- [83] López-Soto-Yarritu, P., Díez-Masa, J.C., Cifuentes, A., de Frutos, M. *J. Chromatogr. A* 2002, 968, 221-228.
- [84] Moorhouse, K.G., Eusebio, C.A., Hunt, G., Chen, A.B. *J. Chromatogr. A* 1995, 717, 61-69.
- [85] Thorne, J., Goetzinger, W.K., Chen, A.B., Moorhouse, K.G. *J. Chromatogr. A* 1996, 744, 155-165.

OBJETIVO GENERAL

OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de la Tesis Doctoral a la que corresponde esta Memoria es el desarrollo de métodos de electroforesis capilar en zona libre (CZE) y de isoelectroenfoque capilar (CIEF) que sean robustos y precisos para el análisis de formas algunas glicoproteínas de interés clínico (la alfa-1-glicoproteína ácida o AGP y la proteína C-reactiva o CRP) y farmacéutico (la eritropoyetina o EPO).

CAPÍTULO 1
DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA ASIGNACIÓN
FIDEDIGNA DE ISOFORMAS DE ERITROPOYETINA (EPO) ANALIZADAS
POR ELECTROFORESIS CAPILAR

CAPÍTULO 1. DESARROLLO DE UNA METODOLOGÍA PARA LA ASIGNACIÓN FIDEDIGNA DE ISOFORMAS DE ERITROPOYETINA (EPO) ANALIZADAS POR ELECTROFORESIS CAPILAR

1.1 INTRODUCCIÓN.....	54
1.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO.....	59
1.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	61
1.3.1 Reactivos.....	61
1.3.2 Muestras.....	61
1.3.3 Dispositivos e instrumentación.....	62
1.3.4 Procedimientos.....	63
1.3.4.1 Preparación de las muestras.....	63
1.3.4.2 Separación por electroforesis capilar.....	64
1.3.5 Procedimientos para la asignación de bandas electroforéticas de EPO.....	65
1.3.5.1 Parámetros de migración.....	65
1.3.5.2 Comparación entre parámetros.....	66
1.3.5.3 Comparación entre hipótesis de asignación.....	70
1.3.6 Metodologías de comparación.....	72
1.3.6.1 Aproximación externa.....	73
1.3.6.2 Aproximación interna.....	74
1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	76
1.4.1 Modificación del método de análisis.....	76
1.4.2 Exactitud obtenida con los distintos parámetros de migración	77
1.4.2.1 Exactitud para el grupo de muestras estándar.....	77
1.4.2.2 Aproximación externa.....	84
1.4.2.3 Aproximación interna.....	87
1.4.2.4 Comparación entre aproximaciones externa e interna..	89
1.4.2.5 Análisis de fármacos que contienen proteínas estimuladoras de eritropoyesis.....	93
1.5 CONCLUSIONES.....	95
1.6 BIBLIOGRAFÍA.....	97

1.1 INTRODUCCIÓN

La eritropoyetina (EPO) es una glicoproteína, sintetizada principalmente en el riñón, que regula la eritropoyesis, el proceso que controla la producción de eritrocitos en mamíferos [1]. La síntesis de EPO es estimulada por presiones bajas de oxígeno en sangre. El aumento de EPO provoca la formación de nuevos eritrocitos, dando lugar a un aumento de la capacidad de transportar oxígeno [2].

La EPO tiene una cadena polipeptídica de 166 aminoácidos con dos puentes disulfuro [2]. Su peso molecular es de 30400 Da, del que el 39,5% corresponde a cadenas de azúcares ancladas a la cadena peptídica como modificación post-traduccional. Estos azúcares están dispuestos en 4 cadenas (3 unidas a la cadena polipeptídica por nitrógeno y 1 unida por oxígeno). La proteína presenta diversas formas dependiendo de la composición de estas cadenas. Los distintos monosacáridos de la molécula son neutros, excepto el ácido siálico, que está cargado negativamente a pH fisiológico. Las diferentes moléculas de EPO producidas por la misma célula difieren sólo en la estructura de los azúcares unidos a la cadena peptídica. Como ya se ha descrito en la Introducción General de esta Memoria, a estas moléculas de una misma proteína que difieren en la composición de sus azúcares se les denomina glicofomas.

La EPO fue el primer factor de crecimiento hematopoyético clonado [3]. La clonación del gen humano de la EPO en células de otros mamíferos (generalmente en células de ovario de hámster china o CHO) ha permitido la producción industrial de la proteína para su uso terapéutico [4, 5]. La eritropoyetina recombinante (EPOr) es muy efectiva en el tratamiento de la anemia, empleándose como un sustituto a la transfusión. Otro uso habitual, aunque prohibido, de la EPOr es su consumo como producto dopante entre los deportistas. Estas aplicaciones de la EPOr han hecho que sea una de las proteínas con mayor interés económico en Estados Unidos y el resto del mundo [6, 7]. Esta hormona recombinante, al ser expresada en otras células de mamíferos, presenta diferente glicosilación a la humana [2, 3, 8]. Por otra parte, las posibles diferencias en la glicosilación entre las diferentes EPOr del mercado pueden deberse a la línea celular en la que se produce la proteína, a las condiciones de cultivo de ésta y a la forma de purificación, siendo posible encontrar incluso variaciones entre lotes de un mismo

fármaco comercial. Dentro de las EPOr que se comercializan se encuentran la EPO α y la EPO β , ambas producidas en células de CHO pero que difieren en su patrón de glicosilación [9].

La actividad biológica de EPO es función de su vida media en sangre y de su afinidad por el receptor. Esta actividad está influida por el número de ácidos siálicos que presente cada glicofoma. Así, cuantos más ácidos siálicos tenga la molécula, mayor es su actividad biológica. Parece que los ácidos siálicos terminales de la EPO le protegen de la eliminación hepática de proteínas; la EPO se sintetiza en el riñón y tiene su diana en la médula ósea, luego es necesario que su vida media en sangre implique un compromiso entre su eliminación y su capacidad para alcanzar la diana [9].

El descubrimiento de que existe una relación directa entre el número de ácidos siálicos y la actividad biológica de la molécula y su vida media hizo que se creara, mediante técnicas de ingeniería genética, una molécula estimuladora de la eritropoyesis con mayor actividad biológica, la “nueva proteína de estimulación de la eritropoyesis” o NESP. Esta proteína puede administrarse menos frecuentemente a los pacientes. El gen de la EPO fue modificado para dar lugar a una cadena polipeptídica análoga a la de la EPO, pero con 5 aminoácidos diferentes, de modo que la nueva cadena tiene dos nuevos sitios de unión para N-glicanos, lo que aumenta el número de ácidos siálicos que puede albergar. Por tanto, frente a la rEPO, la NESP tiene, además de una mayor actividad biológica, un mayor peso molecular, un mayor máximo de residuos de ácidos siálicos y una mayor carga negativa [9].

El hecho de que la composición de azúcares de cada glicofoma determine su actividad biológica hace necesaria la identificación y caracterización de las distintas formas de EPO existentes en una muestra con diversas finalidades: caracterización de los diversos fármacos presentes en el mercado, controles de calidad para comparar diferentes lotes del mismo fármaco o estudios de relación entre la glicosilación y la actividad biológica. Además, las diferencias encontradas entre la EPO humana y la EPOr son la base del control de dopaje actual y de las líneas de investigación abiertas en torno a éste.

La eritropoyetina intacta, es decir, sin una etapa de hidrólisis previa, se ha caracterizado mediante el uso de diversas técnicas analíticas. Lasne y de Ceaurriz lo han hecho mediante isoelectroenfoque en geles tanto para EPOr expresada en CHO como para EPO humana [10], describiendo además diferencias en los puntos isoeléctricos de las bandas encontradas en ambas (la EPOr presenta bandas más básicas que la EPO endógena humana). La técnica propuesta en este trabajo, descrita en detalle por Lasne en [11], es la que se utiliza en la actualidad para el control directo de dopaje con esta hormona. Por otro lado, Schlags et al. [12] han propuesto la electroforesis bidimensional como un método analítico para el análisis de calidad de EPOr. La EPOr desglicosilada también se ha analizado por MALDI-TOF-MS [13]. La CE se ha utilizado para caracterizar EPOr intacta, tanto en modo CZE [14-20] como en CIEF [17, 21]. Recientemente, Neuss et al. han desarrollado y mejorado un método basado en CE-MS [22, 23], en el que se determina la masa de hasta un total de 44 glicofomas diferentes y más de 135 isoformas (teniendo en cuenta otras modificaciones de la proteína tales como acetilación de la misma) de EPOr intacta. Existe bibliografía abundante sobre técnicas analíticas para el estudio de EPO hidrolizada. Rush et al. [24] han utilizado la CE para el análisis de asialoglicopéptidos (glicopéptidos a los que se les ha eliminado el ácido siálico) y péptidos procedentes de EPOr. La EPOr digerida con endoproteinasas también puede analizarse por cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (LC-MS) [25]. Por otra parte, la composición de los azúcares de la EPO humana se ha caracterizado en detalle a partir de los carbohidratos liberados enzimáticamente de la cadena aminoacídica por LC [26].

El fundamento de la separación en bandas electroforéticas de la EPO mediante CZE se basa en que las diversas moléculas de la hormona presentan diferencias en el contenido en ácido siálico, lo que les confiere diferencias en la carga eléctrica, mientras se mantiene prácticamente constante el peso molecular para todas ellas. Esto hace que la CZE sea una técnica capaz de separar eficazmente hasta 8 bandas de EPOr, que presentan diferente relación carga/masa [14, 17, 18, 27]. En la **Figura 1.1**, puede verse una representación de una separación de EPOr por CZE con el método propuesto con anterioridad a este trabajo por nuestro laboratorio [18]. En ella se ha indicado el sentido del aumento de la actividad biológica con el número de residuos de ácido siálico. Una consideración importante a tener en cuenta es que, como se ha mencionado, se han descrito hasta 44 glicofomas y más de 135 formas de EPOr [22]. Por tanto, en una

misma banda electroforética (o isoforma, como se ha indicado en la Introducción General de esta Memoria) de la **Figura 1.1** debe de existir más de una glicofoma o forma de EPO.

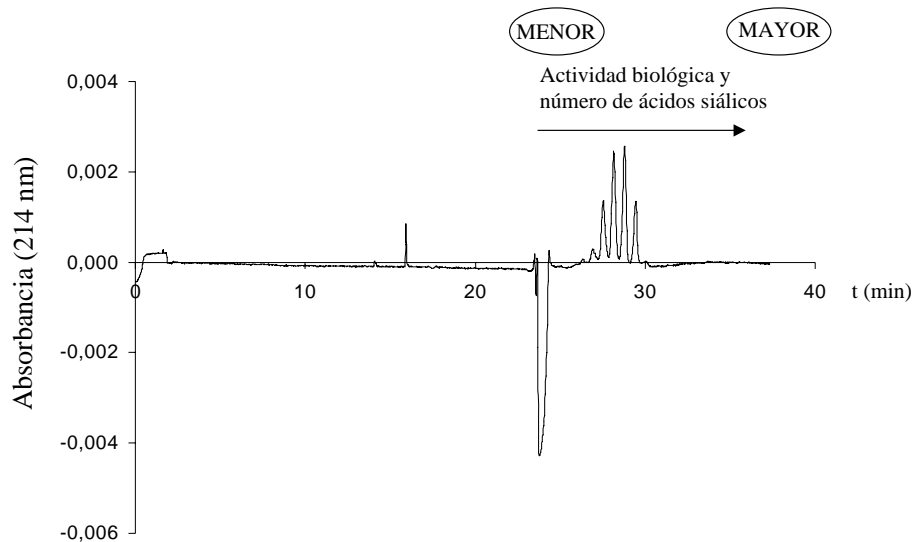


Figura 1.1. Electroforegrama de EPOr analizada por CZE. Relación de la migración de sus bandas con el número de ácidos siálicos y con la actividad biológica. Condiciones analíticas: capilar no recubierto; L (longitud total del capilar): 107 cm; l (longitud efectiva o longitud hasta el detector): 100 cm; diámetro interno: 50 μm ; tampón de separación: tricina 0,01 M, NaCl 0,01M, acetato de sodio 0,01 M, urea 7 M y putrescina 3,9 mM, pH 5,5; temperatura 35 $^{\circ}\text{C}$; voltaje: 30 kV; inyección por presión 30 segundos; detección a 214 nm.

La CZE resulta muy útil y prometedora para el análisis y caracterización de EPO intacta con distintos objetivos. De hecho, un método de análisis por CZE de EPOr es el utilizado por la *Pharmacoepa Europea* para la caracterización de sus estándares de EPOr, y el recomendado por ésta para los fabricantes de EPOr que quieran compararla con su estándar, junto con otros métodos como ensayos biológicos *in vivo*, etc [28] Por otro lado, y debido a la relación actividad biológica/número de ácidos siálicos por molécula, la distribución cuantitativa de isoformas de EPOr, una vez validada, podría utilizarse en el futuro como alternativa a los actuales estudios *in vivo* para determinar la actividad biológica de la hormona [29]. La posibilidad de utilizar la distribución de formas de una glicoproteína separada por CZE para la determinación de la actividad biológica en sustitución de los ensayos *in vivo* habituales ya ha sido sugerida para otras

hormonas como la hormona recombinante estimuladora del folículo (FSHr) [30]. Además, el potencial uso de esta técnica analítica en el control antidopaje también se ha apuntado en un artículo en que se comparan las formas de EPO humana de orina y EPOr de CHO separadas por CZE [27].

Como puede observarse en la **Figura 1.1**, con el método arriba mencionado de CZE se obtiene una buena resolución. Sin embargo, los tiempos de migración de las diferentes bandas son muy cercanos y sus diferencias pueden ser de la misma magnitud que la dispersión del tiempo de migración para una determinada banda en unas condiciones experimentales dadas. Este hecho puede dificultar, o incluso impedir, la correcta asignación de cada isoforma de EPOr, entendiéndose por asignación a la correlación entre picos de EPOr de diferentes muestras de una misma glicoproteína a los que se les supone la misma composición. Existen diversos factores que afectan a la repetibilidad de los tiempos de migración en las separaciones de CZE. Como se ha descrito detalladamente en la Introducción General de esta Memoria, en buena medida, la falta de reproducibilidad en los tiempos de migración de los analitos se debe a variaciones en el flujo electroosmótico (EOF), lo que hace que el tiempo de migración, en muchos casos, no sea fiable como parámetro de asignación de una banda. Todas las aplicaciones del análisis de EPO y EPOr por CZE descritas requieren de una asignación fidedigna de isoformas.

Por tanto, con el objetivo de asignar inequívocamente bandas de EPOr, es necesario disponer de un parámetro de migración adecuado. Por parámetro de migración se entiende aquél que define el desplazamiento de una determinada banda electroforética a lo largo del capilar, y que, en general, se sostiene sobre una base teórica que incluye las variables que afectan a dicho desplazamiento. Algunos ejemplos de parámetros de migración típicos en electroforesis capilar (CE) son el propio tiempo de migración del analito, su movilidad electroforética, el tiempo de migración respecto de un patrón interno, etc.

1.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo es la comparación de parámetros de migración y la selección de los que sean suficientemente robustos para llevar a cabo la asignación de bandas en muestras de EPOr separadas por electroforesis capilar.

Para llevar a cabo este objetivo se ha realizado el plan de trabajo siguiente:

1. Puesta a punto de métodos de CZE para el análisis de EPOr.
2. Comparación de la resolución de las bandas de EPOr obtenida con los dos métodos y selección del más adecuado.
3. Análisis por CZE de distintas concentraciones del estándar de la Farmacopea Europea de EPOr.
4. Análisis por CZE de diferentes lotes de producción experimentales de EPOr de un mismo fabricante.
5. Análisis por CZE de distintos fármacos conteniendo proteínas estimuladoras de eritropoyesis ($EPO\alpha$, $EPO\beta$ y NESP) como principio activo.
6. Selección bibliográfica de parámetros de migración que serán objeto de estudio en este capítulo.
7. Cálculo de dichos parámetros y sus precisión en los análisis realizados en 1, 3, 4 y 5.
8. Desarrollo de un programa estadístico que permita: a) comparar la exactitud de dichos parámetros en la asignación de bandas de EPOr y b) comparar la robustez de los parámetros de migración seleccionados en la asignación de bandas de EPOr al variar las condiciones analíticas de separación.

9. Selección del parámetro o parámetros más exactos y robustos para la correcta asignación de isoformas de EPOr.

10. Mediante el parámetro adecuado, asignación de isoformas de rEPO de las diferentes eritropoyetinas analizadas por CZE.

1.3. PARTE EXPERIMENTAL

1.3.1 Reactivos

- Agua Milli-Q (Millipore, Molsheim, France).
- Acetato sódico (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Ácido acético (Merck).
- Ácido clorhídrico (HCl) (Merck).
- Cloruro potásico (KCl) (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Cloruro sódico (NaCl) (Merck).
- Hidróxido sódico (NaOH) (Merck).
- Péptido lisina-fenilalanina (Lys-Phe) (Sigma).
- Putrescina (Sigma).
- Tricina (Sigma).
- Urea (Sigma).

1.3.2. Muestras

Las muestras patrón de EPOr producidas en CHO fueron suministradas por la Farmacopea Europea (P.E.) como producto biológico de referencia. Este producto es una mezcla de dos EPOr, eritropoyetina alfa y beta, y diferentes excipientes de bajo peso molecular [31].

El Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana (Cuba) proporcionó muestras de EPOr producidas en CHO. El método de producción de estas muestras se encuentra actualmente en desarrollo. Trece de estas muestras, nombradas en adelante como A, D, E, G, H, I, J, K, L, M, N, S y U, estaban formuladas en tampón citrato. Otras ocho muestras, nombradas en adelante como B, C, F, O, P, Q, R y T, estaban formuladas en tampón fosfato. Los excipientes de bajo peso molecular de las 21 muestras se eliminaron con el mismo procedimiento indicado más adelante para la EPO de la P.E.

Los fármacos de EPO α , EPO β y NESP son muestras comerciales y estaban formulados, de acuerdo con la información de los fabricantes, con excipientes de bajo peso molecular. Estos excipientes se eliminaron con el mismo procedimiento que el utilizado para la EPO de la P.E, con ligeras variaciones que se especifican en el apartado de preparación de muestra (1.3.4.1).

1.3.3 Dispositivos e instrumentación

La separación de diferentes bandas de la EPO r se llevó a cabo en cuatro instrumentos distintos de electroforesis capilar (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). El modelo de dos de ellos era PACE 2050, el de otro PACE 5000 y el del último PACE 5500. Todos ellos estaban equipados con detector ultravioleta. El instrumento utilizado se indicará en cada caso. Los instrumentos estuvieron alojados en tres laboratorios distintos. El trabajo se realizó mayoritariamente por la autora de esta Memoria pero, ocasionalmente, se solicitó la cooperación de otras dos personas para estudiar el efecto del operador sobre los resultados.

La adquisición y análisis de datos se realizó en todos los instrumentos con un ordenador AMC 486 con la versión 8.1 del software System Gold (Beckman Instruments).

Los capilares empleados fueron de sílice fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ) de dos longitudes totales (L) diferentes: 107 y 87 cm, con una longitud efectiva hasta el detector (l) de 100 y 80 cm, respectivamente. El diámetro externo del capilar fue de 375 μm y diámetro interno de 50 μm .

Los sistemas de microconcentración que se usaron fueron de un tamaño de corte de 10 kDa (Microcon 10, Amicon, Beverly, MA, USA).

Los filtros utilizados fueron de Nylon de 0,22 μm (Tracer, Teknokroma, Barcelona, España).

La centrífuga utilizada fue una Biofuge Strato (Heraeus, Hanau, Alemania).

1.3.4 Procedimientos

1.3.4.1 Preparación de las muestras

La EPOr fue suministrada por la Farmacopea Europea con un contenido de esta hormona de 0,250 mg/vial. Cada uno de estos viales se disolvió en 325 μ L de agua Milli-Q y los excipientes de bajo peso molecular se eliminaron con una versión modificada y mejorada del procedimiento indicado en [18]. Brevemente, el procedimiento inicial sobre el que se realizaron las modificaciones consistía en una filtración de la muestra a través de un sistema de microconcentración con una membrana de tamaño de corte de 10 kDa (Microcon 10). La muestra se centrifugaba en ese dispositivo a 2700 g durante 65 min. Después, el retenido se lavaba tres veces con 200 μ L de agua Mili-Q mediante centrifugación durante 40 min con la misma fuerza centrífuga. El retenido obtenido tras estos lavados se recuperaba del Microcón mediante inversión del mismo y centrifugación durante 5 min a 350 g. El retenido así recuperado se llevaba a 250 μ L con agua Milli-Q.

Las modificaciones a este protocolo para la eliminación de excipientes, desarrolladas en este trabajo, se realizaron con el objetivo de disminuir el tiempo necesario para preparar la muestra, pero sin disminuir la recuperación de EPOr. Con este protocolo, los excipientes de bajo peso molecular fueron eliminados empleando también un dispositivo Microcon 10, pero se variaron los tiempos y velocidades de centrifugación. La muestra se centrifugó a 14000 g durante 20 min y el retenido se lavó tres veces con 150 μ L de agua durante 20 min también a 14000 g. Finalmente, el retenido se recuperó invirtiendo el cartucho y centrifugándolo a 1000 g durante 3 min. Para aumentar la recuperación de la EPOr, este paso de inversión y centrifugación se repitió cuatro veces, añadiendo 10 μ L de agua en cada ocasión. La EPOr, una vez eliminados los excipientes, se llevó a un volumen final de 250 μ L (con una concentración final de proteína de 1 mg/mL). Todo este proceso de eliminación de excipientes se llevó a cabo a una temperatura controlada de 4°C para evitar la degradación de la muestra. Con este procedimiento la preparación de la muestra se llevó a cabo en 110 minutos menos que con el protocolo anterior (que requería 190 min).

Respecto a los fármacos de EPO α , EPO β y NESP, la única variación a este nuevo protocolo fue que se usaron 2 μ L de agua en lugar de 10 μ L en los pasos de recuperación del retenido. El motivo fue que las muestras tuvieron que llevarse a volúmenes finales de 10 μ L para obtener concentraciones de proteína de 1 mg/mL.

1.3.4.2 Separación por electroforesis capilar

Los métodos de separación utilizados están basados en el método anteriormente publicado [18], con algunas modificaciones. Brevemente, el método sobre el que se realizaron las modificaciones consistía en la separación de eritropoyetina en un capilar de 107 cm, termostatzado a 35°C y con detección a 214 nm. El voltaje aplicado era de 30 kV y el tampón de separación consistía en tricina 0,01M, NaCl 0,01 M, acetato sódico 0,01M, urea 7 M y putrescina 3,9 mM. El pH del tampón se ajustaba a 5,5 con ácido acético 2M. Este tampón se filtraba a través de un filtro de nylon de 0,22 μ m. Los lavados entre inyecciones consistían en 5 min de lavado a alta presión con agua Milli-Q, 10 min con NaOH 0,1 M, 5 min con agua Milli-Q y 10 min de acondicionamiento con el tampón de separación. Al final del día el capilar se lavaba del mismo modo que entre inyecciones, pero el lavado con tampón se sustituía por un secado del capilar con nitrógeno durante 3 min. Por otro lado, cada nuevo capilar se acondicionaba dos veces con la siguiente secuencia: 30 min con NaOH 1M, 5 min con agua Milli-Q y 10 min con tampón de separación. Después se realizaban separaciones sucesivas hasta lograr una situación de estabilidad en el capilar. Para ello, en las mismas condiciones de separación de rEPO y con detección a una longitud de onda de 254 nm, se comprobaba la velocidad del EOF empleando acetona como marcador. Cuando el valor de RSD del tiempo de migración del pico de acetona en tres inyecciones consecutivas era menor del 0,5% se consideraba acondicionado el capilar.

En el primer método utilizado en este trabajo se varió, respecto al método arriba descrito, el protocolo de limpieza entre inyecciones. Así, los 10 min de tratamiento con NaOH 0,1 M se aumentaron a 15, con el fin de realizar una mejor limpieza del capilar y mejorar así la reproductibilidad de los análisis.

En el segundo método utilizado, además de ese cambio en la limpieza, el capilar se acortó a 87 cm y el voltaje se redujo a 25 kV, manteniendo así un campo eléctrico muy similar en ambos métodos. La longitud del capilar y el voltaje aplicado se especificarán en cada ocasión.

El efecto de la concentración de EPO en la separación se estudió en el intervalo de 0,06-1 mg/mL (concretamente: 0,06; 0,1; 0,2; 0,5 y 1 mg/mL). El dipéptido Lys-Phe se estudió como patrón interno, empleándose a una concentración final en la muestra de 0,02 mg/mL.

1.3.5. Procedimientos para la asignación de bandas electroforéticas de EPO

1.3.5.1 Parámetros de migración

La migración de las bandas en electroforesis capilar se describe habitualmente mediante el tiempo de migración (t_m), entendiendo por tal el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que pasa por el detector el máximo de un pico correspondiente a un determinado analito. Sin embargo, este parámetro depende de muchas variables experimentales y es difícil de reproducir en diferentes laboratorios. Por ello, se han definido en este trabajo otros parámetros de migración que pudieran mejorar la reproducibilidad de t_m . Así, se han considerado el tiempo de migración relativo que tiene en cuenta, además de los tiempos de migración de las bandas de los analitos, los tiempos de migración de un patrón interno (t_{PI}) o del marcador de flujo electroosmótico (t_{EOF}). Este marcador es un compuesto neutro que absorbe a la longitud de onda a la que se realiza la detección. También se ha tenido en cuenta la movilidad electroforética efectiva de cada analito (μ_{eff}).

Por tanto, en este estudio, se han utilizado los siguientes parámetros con la intención de asignar bandas de EPO correctamente:

- Parámetro 1 (P1): Tiempo de migración (t_m).
- Parámetro 2 (P2): Tiempo de migración relativo al patrón interno (t_m/t_{PI}).
- Parámetro 3 (P3): Tiempo de migración relativo al marcador de flujo electroosmótico (t_m/t_{EOF}).
- Parámetro 4 (P4): Movilidad electroforética efectiva (μ_{eff}).

1.3.5.2 Comparación entre parámetros

La probabilidad de error en la asignación de bandas de EPOr está directamente relacionada con la dispersión en el parámetro de migración de la banda, causada, a su vez, por variaciones en las condiciones de operación. Además, está inversamente relacionada con la diferencia entre los tiempos de migración de las bandas de EPOr adyacentes. Es decir, para una misma dispersión de una hipotética banda electroforética, la asignación será tanto más fácil de hacer cuanto más alejadas se encuentren las bandas electroforéticas adyacentes. En este trabajo se ha definido el término “exactitud” de asignación de una banda determinada como la probabilidad, expresada en porcentaje, de su asignación correcta. Las asignaciones se establecen tomando como referencia las 8 isoformas que se obtienen en la separación por CZE de la EPOr de la P.E.

Si a la dispersión en el parámetro de migración se le supone un comportamiento de distribución gaussiana, puede realizarse un estudio comparativo de la exactitud en la asignación de bandas de eritropoyetina a la que dan lugar. Para ello, se ha desarrollado un programa en Visual Basic para Windows, versión 4.5, que a partir de los valores de media y desviación típica para cada parámetro de migración en un grupo de muestras determinado calcula la probabilidad, en porcentaje, de que una banda sea asignada correctamente usando ese determinado parámetro de migración. Para ello, el programa determina un intervalo de valores para cada parámetro e isoforma que se denomina “ventana”. Una vez calculados los intervalos, el programa estima la probabilidad (%) de asignación correcta o exactitud, como el cociente entre el área de la distribución que se encuentra dentro de la ventana y el área total. Tanto el valor de dicha área como los límites de las ventanas para cada banda se calculan mediante una aproximación numérica a la distribución gaussiana [32] a través de la función de error (erf).

En la **Figura 1.2** se da una representación gráfica de la forma en que funciona el programa para dos hipotéticos parámetros de migración, A y B. Para cada parámetro de migración e isoforma de EPO, se representan los valores de la media (líneas continuas) y de las desviaciones estándar (curvas de Gauss). A partir de estos datos, el programa calcula los límites máximo y mínimo del parámetro, formando las “ventanas” (representadas por líneas discontinuas) dentro de las cuales la asignación de la isoforma es correcta. El cálculo de los límites de la ventana se realiza de modo que las áreas fuera

de las ventanas de cada isoforma sean mínimas. Es decir, con la intención de que el porcentaje de asignación incorrecta para cada isoforma y parámetro sea mínimo. En la **Figura 1.2** están representadas las ventanas, calculadas por el programa, dentro de las cuales tienen que encontrarse los valores de los parámetros A y B respectivamente para una correcta identificación de la isoforma 3 de una muestra de EPOr. El porcentaje de asignación correcta corresponde al área de la curva de Gauss dentro de la ventana (sombreado en gris claro en la figura). El área fuera de la ventana, calculada de acuerdo a [32] indica el porcentaje de identificación incorrecta (en la **Figura 1.2**, el área correspondiente a una falsa asignación de la isoforma 3 usando los parámetros A y B está indicada por las zonas sombreadas en gris oscuro). Como puede observarse, el parámetro A sería más exacto que el B en la identificación de la isoforma 3, porque el área de la curva de Gauss dentro de la ventana es mayor para el parámetro A que para el B. Este mismo razonamiento podría aplicarse para el resto de isoformas.

Cuando la media del parámetro de una determinada isoforma está fuera de las ventanas establecidas para ese parámetro e isoforma, el programa estadístico considera la asignación incorrecta para esa isoforma. Un ejemplo práctico de esta posibilidad se describe en la sección de Resultados y Discusión “Comparación entre aproximación externa e interna”.

El programa expresa los resultados en forma de tabla. Un ejemplo de la forma de mostrarlos para un parámetro A puede verse en la **Tabla 1.1**. En ella, se indica el tanto por ciento de área de la curva de Gauss fuera de la ventana a izquierda y derecha, cuya suma corresponde al porcentaje de asignación incorrecta, y el tanto por ciento de área dentro de la ventana, que corresponde al porcentaje de asignación correcta. Además, para una comparación más sencilla de los diferentes parámetros de migración, el programa proporciona para cada parámetro un porcentaje total de identificación correcta para las ocho isoformas de rEPO correspondiente a la media de todas ellas. Esta tabla refleja además las medias y desviaciones para el parámetro en estudio para cada isoforma, y los límites de las ventanas.

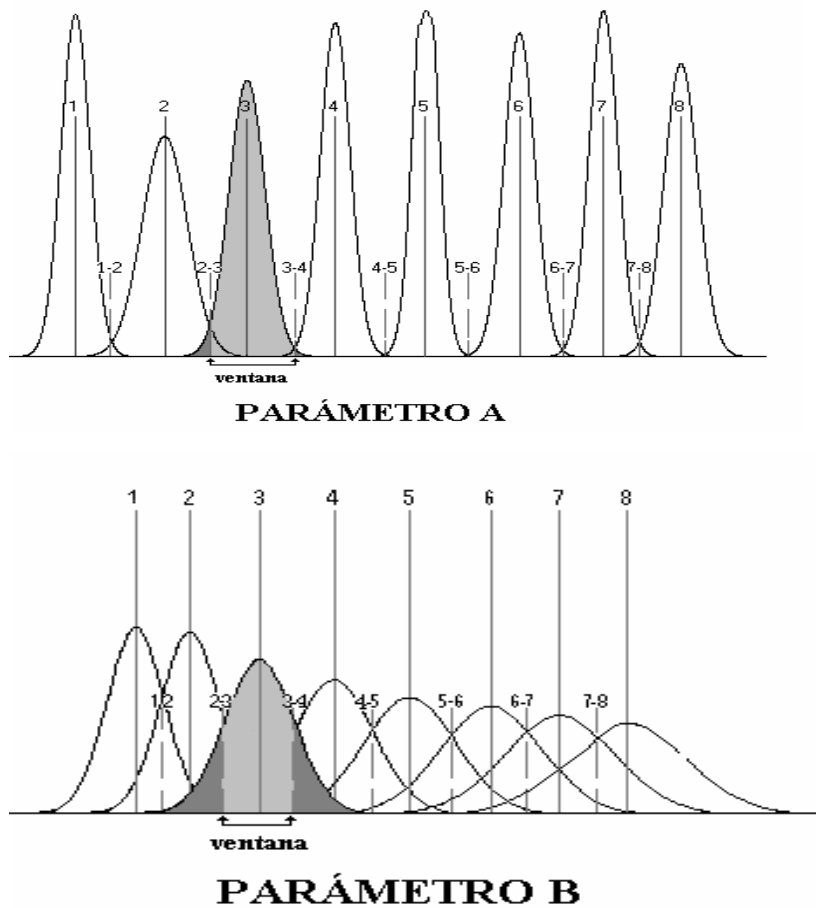


Figura 1.2. Ejemplo de la comparación de la exactitud en la asignación de bandas proporcionada por dos hipotéticos parámetros de migración. Para cada parámetro de migración e isoforma de EPO, las líneas verticales continuas corresponden a la media del valor y las discontinuas indican el límite mínimo y máximo de las ventanas. Las curvas de Gauss corresponden a la desviación estándar. El sombreado gris claro representa el porcentaje correcto de asignación y el sombreado gris oscuro el porcentaje de identificación incorrecta

Tabla 1.1. Ejemplo de resultados calculados por el programa para un parámetro hipotético A con un grupo de muestras de EPOr determinado.

Parámetro estudiado: parámetro A				
Medias parámetro e isoforma: 1.62 2.21 2.72 3.25 3.8 4.27 4.69 5.08				
Desviación. 0.110 0.169 0.138 0.116 0.089 0.093 0.067 0.065				
Ventanas 0.956 1.85 2.49 3.01 3.56 4.03 4.51 4.88 5.47				
% de asignaciones incorrectas a la izquierda de la ventana	ISOF1	0	1,742	98,258
	ISOF2	1,742	5,05	93,208
	ISOF3	4,947	2,117	92,936
	ISOF4	2,067	0,39	97,543
	ISOF5	0,39	0,538	99,072
	ISOF6	0,523	0,466	99,011
	ISOF7	0,466	0,169	99,365
	ISOF8	0,169	0	99,831
% medio corr: 97,4				
Media de asignaciones correctas con parámetro A				

Valores de los límites superiores e inferiores para cada una de las ventanas

% de asignaciones incorrectas a la derecha de la ventana

% de asignaciones correctas

En adelante, cuando se indique el porcentaje de asignación correcta de isoformas de un parámetro, este porcentaje corresponderá a la media de asignaciones correctas que con dicho parámetro se obtiene para cada grupo de inyecciones de EPOr objeto de estudio.

Si la asignación de una o más isoformas es incorrecta, el programa determina que la asignación global es incorrecta. Un estudio más detallado de los resultados del programa permite determinar cuál o cuáles son las isoformas cuya media está fuera de las ventanas y, por tanto, cuya asignación es incorrecta. En la **Tabla 1.2** puede verse un ejemplo hipotético para un parámetro C. Para el grupo de muestras del ejemplo, el programa determina una asignación media incorrecta. Las isoformas que el programa marca con cuatro asteriscos (isoformas 3 y 7) son aquellas cuya media no está dentro de las ventanas para ellas especificadas; es decir, aquellas que se asignan incorrectamente.

Tabla 1.2. Ejemplo de resultados calculados por el programa para un parámetro hipotético C. Isoforma n^{****} significa que la asignación es incorrecta.

Parámetro estudiado: parámetro C			
Medias: 1.84 2.45 3.02 3.48 3.98 4.47 4.92 5.33			
Desviación: 0 .037 0.022 0.096 0.064 0.052 0.049 0.045 0.053			
Ventanas: 0.956 1.85 2.49 3.01 3.56 4.03 4.51 4.88 5.47			
ISOF1	0	42,074	57,926
ISOF2	0	2,067	97,933
ISOF3****	0	45,62	54,38
ISOF4	0	11,314	88,686
ISOF5	0	19,766	80,234
ISOF6	0	18,673	81,327
ISOF7****	0	24,825	75,175
ISOF8	0	0,638	99,362
% medio corr: Mala asignación			

1.3.5.3 Comparación entre hipótesis de asignación

Cuando se analizan muestras de origen desconocido, no resulta fácil hacer una asignación de sus bandas comparando sus perfiles electroforéticos con el del patrón (por ejemplo, la EPOr de P.E.) pues éstos pueden diferir en los tiempos de migración de cada uno de los picos y/o en el número de picos. En estos casos, para llevar a cabo la asignación es necesario hacer hipótesis sobre qué bandas de la muestra corresponden con las del patrón. El programa permite, además de seleccionar los parámetros de migración más adecuados, seleccionar la hipótesis de asignación más probable entre las formuladas.

La manera de operar para determinar la hipótesis más probable se muestra a continuación con un ejemplo (**Figura 1.3**), en el que el electroforegrama de una muestra de EPOr de origen desconocido da lugar a 4 picos (W, X, Y, Z).

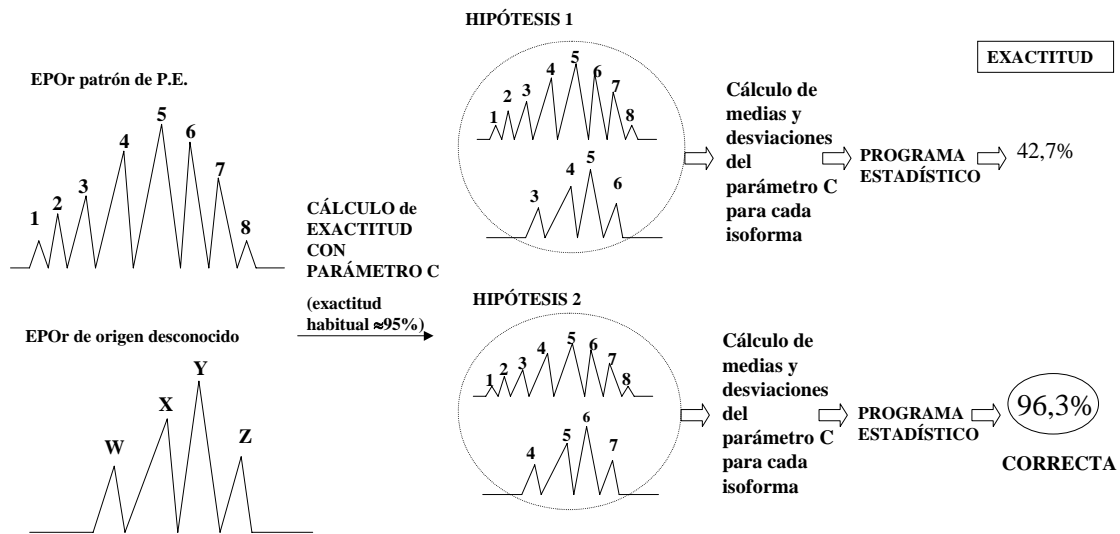


Figura 1.3. Ejemplo gráfico de la comparación de hipótesis de asignación con el programa estadístico. Las medias y desviaciones estándar del parámetro C para cada isoforma, requeridas por el programa estadístico, se calculan para cada hipótesis teniendo en cuenta la asignación de bandas supuesta. Se considera como hipótesis correcta aquella con la que se obtenga una exactitud comparable a la obtenida con el parámetro C para grupos de muestras de EPOr patrón de la P. E.

Se realizan n_1 análisis de la EPOr de origen desconocido y n_2 análisis de la EPOr patrón. Se selecciona un parámetro de migración para la asignación (por ejemplo, parámetro C) que ha resultado exacto para los análisis de EPOr patrón y del que se conoce el porcentaje de asignación correcta obtenido habitualmente en el análisis de este patrón. Se elaboran una o varias hipótesis de asignación. Por ejemplo, en la hipótesis 1 de la figura, la primera isoforma (W) de la EPOr de origen desconocido se asigna a la isoforma 3 de la EPOr de la P.E., la siguiente (X) a la 4, y así sucesivamente. La media y la desviación del parámetro C para la primera isoforma se calculan con el conjunto de los valores de ese parámetro C para la isoforma 3 en los n_2 análisis de la muestra de la P.E. y los de la isoforma W en los n_1 análisis de la muestra problema. De la misma manera se calculan la media y la desviación de ese parámetro para las otras isoformas. Sin embargo, en la hipótesis 2, la isoforma W de la muestra desconocida se asigna a la isoforma 4 de la EPOr de la P.E., la siguiente a la 5, y así sucesivamente. En esta hipótesis, la media y desviación del parámetro C para la primera isoforma se

calculan con el conjunto de los los valores de ese parámetro para la isoforma 4 en la muestra de la P.E. y los de la isoforma W en la muestra problema. Cada una de las hipótesis formuladas da lugar a una exactitud de asignación. Las diferencias en el porcentaje de asignación correcta obtenida para cada una de las hipótesis se deben a las diferentes maneras de agrupar los valores experimentales del parámetro C, en cada una de las bandas de los $n_1 + n_2$ análisis realizados, para el cálculo de las medias y las desviaciones estándar de cada una de las isoformas. De las dos hipótesis se elige como más probable aquélla con la que se consiguen los valores de exactitud habitualmente obtenidos con el parámetro C para el patrón.

En esta Memoria, en los casos en los que se requiera asignar isoformas en muestras desconocidas, sólo se mencionará la comparación entre hipótesis en las ocasiones en las que se haya requerido el uso de más de una, al no ser correcta la primera hipótesis planteada.

1.3.6 Metodologías de comparación

El programa estadístico desarrollado en este trabajo se utilizó desde dos aproximaciones distintas que se detallan en este apartado.

Para ambas aproximaciones, se consideró como muestra de referencia la muestra patrón de la P.E., que da lugar a 8 isoformas. Además, todos los grupos de análisis de muestras de este trabajo se analizaron con las dos aproximaciones, con el objeto de poder comparar su utilidad.

El primer grupo de muestras (grupo 1) consistió en análisis consecutivos de EPOr de la P.E. Se inyectó durante tres días, seis veces al día. Las condiciones para estos análisis fueron: 30 segundos de inyección de la muestra por presión (0,5 p.s.i.), concentración de EPOr de 1 mg/mL, longitud total del capilar de 87 cm, voltaje de 25 kV, operador 1, el instrumento 1 ó 2 (ambos PACE 2050) y el laboratorio 1 ó 2.

En los siguientes grupos de análisis, las condiciones cambiaron. Así, las muestras de EPOr fueron de distintos orígenes y formuladas con distintos excipientes, con distinta concentración, analizadas usando capilares del mismo lote con distintas

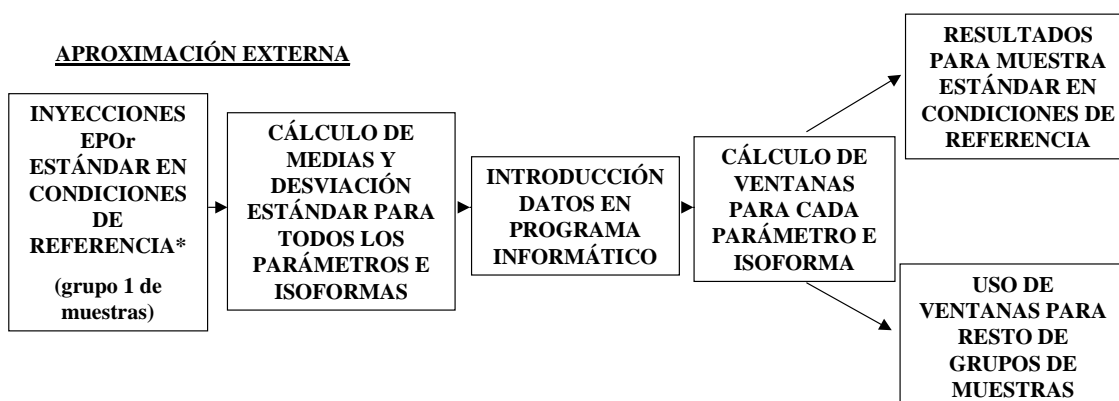
longitudes y aplicando diferentes voltajes; también se usaron diferentes equipos en distintos laboratorios y con diferentes operadores. Los distintos laboratorios podrían introducir variaciones en la temperatura ambiente (afectando así a la temperatura de los extremos del capilar, de los tampones, de las soluciones de lavado y de la muestra) y los distintos operadores variaciones inconscientes en la preparación del tampón (dando lugar a ligeras variaciones en el pH del tampón que afectarían a la velocidad del flujo electroosmótico) y de las soluciones de lavado (afectando al acondicionamiento de la pared del capilar entre inyecciones y por tanto al flujo electroosmótico). La exactitud en la identificación correcta de bandas de rEPO en cada grupo de análisis objeto de estudio se evaluó para cada parámetro de migración arriba descrito (de P1 a P4).

Las dos aproximaciones distintas, consideradas en el estudio de exactitud de los parámetros de migración, se han llamado aproximación externa y aproximación interna.

1.3.6.1. Aproximación externa

En la aproximación externa, se tomaron como referencia las ventanas que el programa calculó para el grupo de muestras 1 (grupo 1), que fueron utilizadas en las condiciones descritas en el epígrafe anterior, y que para la aproximación externa se ha llamado grupo estándar y condiciones estándar, respectivamente.

Así, el porcentaje de asignación correcta del resto de grupos de muestras se calculó comparando el valor del parámetro de migración de cada isoforma de una muestra, analizada bajo condiciones dadas, con los valores de referencia obtenidos con el grupo de muestras y condiciones estándar para esta aproximación. Dicho de otra forma, los límites inferior y superior de cada ventana para cada isoforma y parámetro calculados en el grupo estándar son los que se utilizan para el resto de grupos. En la **Figura 1.4** se resume cómo realiza el programa la aproximación externa.

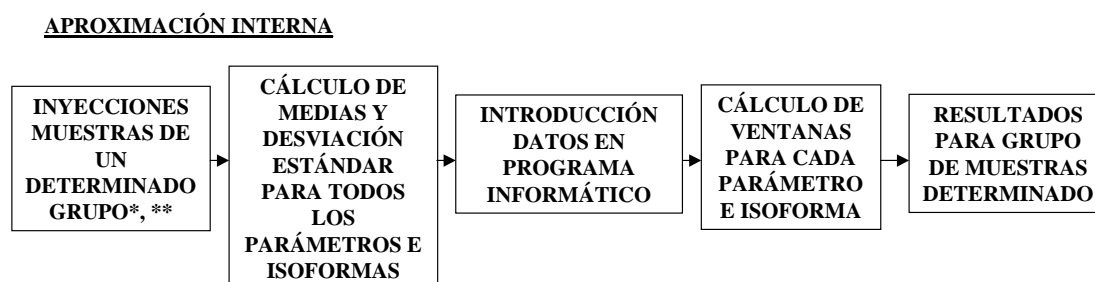


*: Condiciones analíticas de referencia: longitud capilar 87 cm, voltaje: 25 kV; operador 1. Inyección de 30 segundos de EPOr de Farmacopea Europea, concentración 1mg/ml.

Figura 1.4. Esquema del procedimiento para efectuar aproximación externa.

1.3.6.2. Aproximación interna

En la aproximación interna también se usaron los valores de los parámetros de migración de la muestra patrón de la Farmacopea Europea como referencia. Sin embargo, en este caso, la muestra patrón se analizó en el mismo día y bajo las mismas condiciones (operador, instrumento, laboratorio, capilar, voltaje) que el grupo de muestras que se estudió ese día. Los valores de los límites inferior y superior de cada ventana se calculan para cada grupo analizado en el mismo día y bajo las mismas condiciones, y teniendo en cuenta la muestra patrón así analizada. Un esquema de la forma de funcionamiento de la aproximación interna, se puede ver en la **Figura 1.5**.



*: Condiciones analíticas mantenidas: día de análisis, capilar, equipo y operador.

Condiciones analíticas variables: origen de la muestra, concentración.

** : Inyección de EPOr de referencia bajo las mismas condiciones analíticas como referencia.

Figura 1.5. Esquema de procedimiento para efectuar aproximación interna.

Estas dos aproximaciones se emplearon con quince grupos de muestras correspondientes a muestras de EPOr de la Farmacopea Europea (muestra patrón) y a 21 muestras suministradas por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de la Habana. Cada grupo corresponde a muestras analizadas en el mismo día.

1.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.4.1 Modificación del método de análisis

Tal y como se indicó en la Parte Experimental de este capítulo, el tiempo de preparación de la muestra se disminuyó a la mitad, sin encontrar pérdida en la recuperación de la proteína. La muestra se preparó en unos 90 min, frente a los 190 min iniciales.

Las modificaciones efectuadas en la longitud del capilar (se acortó a 87 cm, frente a los 107 cm iniciales), manteniendo el campo eléctrico de separación, permitieron acortar el análisis alrededor de 10 min sin perder resolución de bandas de EPOr. El análisis se llevó a cabo en un tiempo inferior a 25 min (ver **Figura 1.6**).

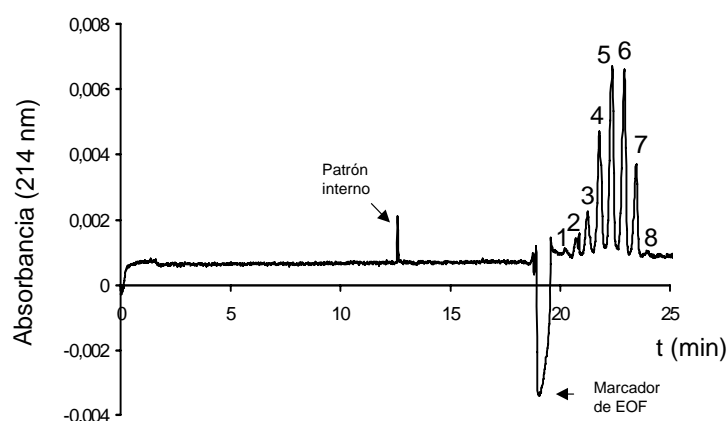


Figura 1.6. Electroforegrama de EPOr analizada por CZE. Capilar no recubierto, L: 87cm; l: 80cm; diámetro interno: 50 μ m; tampón de separación: 0,01 M tricina, 0,01M NaCl, 0,01 M acetato de sodio, 7 M urea y 3,9 mM putrescina, pH 5,5; temperatura: 35 °C; voltaje: 25 kV; inyección por presión 30 segundos; detección a 214 nm. Patrón interno: lisina-fenilalanina (Lys-Phe).

1.4.2 Exactitud obtenida de los distintos parámetros de migración

En este apartado se estudia en primer lugar la exactitud de los parámetros de migración para el grupo 1 de muestras, llamado grupo estándar en la **Tabla 1.3** y considerado como grupo independiente en la **Tabla 1.4**. A continuación se estudia la exactitud obtenida con estos parámetros en el resto de grupos de muestras mediante la aproximación externa (**Tabla 1.3**) y la interna (**Tabla 1.4**).

1.4.2.1. Exactitud para el grupo de muestras estándar

Tiempo de migración (t_m)

El tiempo de migración de las bandas de isoformas de las muestras patrón de EPOr analizadas en las llamadas condiciones estándar mostraron una buena repetibilidad dentro del mismo día. El valor de RSD estuvo en el intervalo de 0,29-0,56% para 6 inyecciones dentro del mismo día, valores adecuados en CZE (donde suele estar en torno al 1%). Esta buena repetibilidad es resultado del efectivo acondicionamiento que se aplica al capilar entre análisis y al utilizarlo por primera vez. Además, es posible que este valor de RSD se deba al hecho de que los análisis son de la misma muestra, con la misma concentración, realizadas el mismo día y de forma consecutiva. Esta misma explicación se da al hecho de que la exactitud en la asignación de las bandas de isoformas obtenida con el tiempo de migración para cada uno de los días de estudio por separado esté entre el 86 y el 99% dependiendo del día. De hecho, cuando se consideran tres días diferentes de análisis (18 inyecciones en total), el RSD de los tiempos de migración aumenta a un intervalo entre 0,98 y 1,72%. Avala también esta hipótesis el hecho de que cuando se introducen muestras de distintos orígenes, los tiempos de migración no son suficientemente reproducibles para asignar bandas de eritropoyetina con seguridad (ver **Figura 1.7**).

Debido a la gran similitud de composición entre las diferentes bandas de formas de EPO, los tiempos de migración de bandas adyacentes son muy cercanos (la diferencia en tiempos de migración de bandas consecutivas está en torno al medio minuto). Por ello, es necesario comprobar la fiabilidad del tiempo de migración como

un parámetro de asignación de bandas de rEPO. El uso del programa estadístico desarrollado en este trabajo mostró que la exactitud del tiempo de migración (P1) era inferior al 65% para muestras patrón de rEPO analizadas bajo las mismas condiciones en tres días diferentes y usando dos equipos distintos (ver en la **Tabla 1.3** el resultado para el grupo de muestras 1).

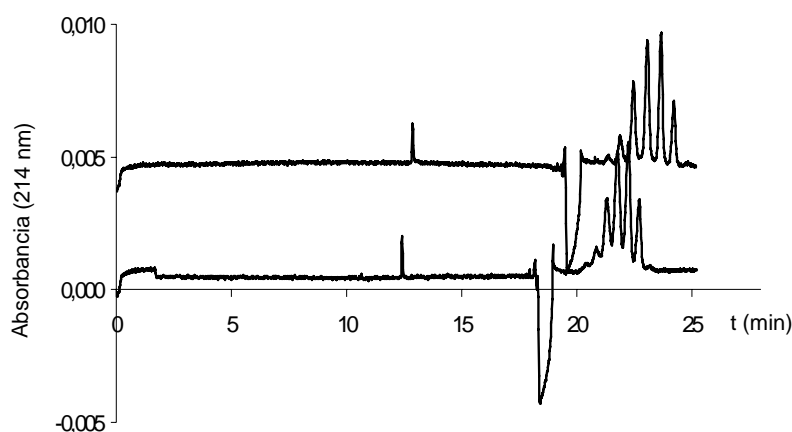


Figura 1.7. Electroforegramas de EPOr analizadas por CZE correspondientes a dos muestras de distintos orígenes y estudiadas en el mismo grupo (analizadas el mismo día, con el mismo capilar, el mismo operador y equipo). Condiciones analíticas de separación como en **Figura 1.6**.

El tiempo de migración se puede expresar como:

$$t_m = \frac{Ll}{V(\mu_{\text{eff}} + \mu_{\text{EOF}})} \quad (1.1)$$

donde L es la longitud del capilar, l es la longitud desde el punto de inyección hasta la ventana del detector (longitud efectiva), V es el voltaje aplicado, $\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{EOF}}$, siendo μ_{eff} la movilidad electroforética efectiva, μ_{app} la movilidad electroforética aparente del analito y μ_{EOF} la movilidad electroosmótica. Es importante recordar que, como se ha indicado en la Introducción General de esta Memoria, la relación entre μ_{eff} , μ_{EOF} y μ_{app} consiste en una suma vectorial, donde el signo de cada sumando puede ser negativo o positivo en función del sentido de su movimiento: anódico o catódico. Como

ya se ha indicado, una de las causas más importantes en los cambios en los tiempos de migración es la variación del flujo electrosmótico entre análisis [33-35].

En la ecuación 2 se describen los factores que intervienen en la movilidad del flujo electrosmótico, donde ϵ_r es la constante dieléctrica del medio de separación, ϵ_0 la permitividad en el vacío, ζ el potencial zeta y η la viscosidad del medio.

$$\mu_{EOF} = \frac{\epsilon_r \epsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (1.2)$$

TABLA 1.3. EXACTITUD OBTENIDA PARA LOS DIFERENTES GRUPOS DE MUESTRAS Y PARÁMETROS APLICANDO LA APROXIMACIÓN EXTERNA

GRUPO DE MUESTRAS	INST. ^{a)}	LAB. ^{b)}	OP. ^{c)}	CAP. ^{d)}	L (cm) ^{e)}	Voltaje Aplicado (kV)	Muestras incluidas en el grupo	Número de inyecciones	EXACTITUD (%)			
									t_m (P1)	t_m/t_{PI} (P2)	t_m/t_{EOF} (P3)	μ_{eff} (P4)
1 Estándar	1,2	1,2	1	1	87	25	EPO (P.E.) 1 mg/mL	18	64,39	92,75	98,88	97,40
2	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra A Muestra B	8	68,61	87,51	100	99,95
3	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra C Muestra D	8	Incorrecto	97,33	99,45	98,42
4	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra E Muestra F Muestra G	10	Incorrecto	92,23	94,77	Incorrecto
5	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra H Muestra I Muestra J	10	Incorrecto	83,95	90,59	89,5
6	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra K Muestra L	8	Incorrecto	Incorrecto	99,36	97,73
7	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra M Muestra N	6	Incorrecto	Incorrecto	96,78	95,12
8	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra O Muestra P	8	Incorrecto	Incorrecto	Incorrecto	Incorrecto
9	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra Q Muestra R	8	Incorrecto	Incorrecto	96,85	Incorrecto
10	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra S Muestra T	8	Incorrecto	Incorrecto	Incorrecto	Incorrecto
11	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra U	4	Incorrecto	Incorrecto	Incorrecto	Incorrecto
12	1	1	1	1	87	25	EPO (P.E.) ^{f)}	6	Incorrecto	92,81	Incorrecto	Incorrecto
13	1	1	1	1	87	25	EPO (P.E.) ^{f)}	6	Incorrecto	Incorrecto	97,69	Incorrecto
14	3	3	1	3	107	30	EPO (P.E.)	18	Incorrecto	76,43	94,95	99,66
15	3	3	1	3	107	30	EPO (P.E.) ^{f)}	6	Incorrecto	Incorrecto	99,05	Incorrecto

^{a)} INST. (instrumento), 1: Instrumento 1; 2: Instrumento 2; 3: Instrumento 3. ^{b)} LAB. (laboratorio), 1: Laboratorio 1; 2: Laboratorio 2. ^{c)} OP. (operador), 1: Operador 1; 2: Operador 2; 3: Operador 3. ^{d)} CAP. (capilar), 1: Capilar 1; 2: Capilar 2; 3: Capilar 3. ^{e)} L(cm) (longitud del capilar en cm). ^{f)} Concentraciones de EPO inyectadas: 0,06; 0,1; 0,2; 0,5; 1 mg/ml.

El potencial zeta corresponde a la diferencia de potencial entre la capa de Stern y el del tampón de separación. La capa fija o de Stern la forman los cationes fijados sobre la superficie del capilar. A pesar de la limpieza exhaustiva a la que se somete el capilar entre inyecciones, el potencial zeta puede variar de unos análisis a otros, debido a la dificultad de mantener la pared interna del capilar en condiciones constantes, perfectamente limpia y con el mismo número de silanoles a lo largo del tiempo. Esta diferencia en el número de silanoles libres en la pared del capilar determina el número de cationes que se quedan fijados a la misma, es decir, determina la composición de la capa fija entre inyecciones y por tanto del potencial zeta.

Los cambios en las condiciones experimentales, como por ejemplo la temperatura del capilar, que afecta a la viscosidad, también deben tenerse en cuenta. Aunque teóricamente, el equipo de CE mantiene constante la temperatura, los extremos de entrada y salida del capilar no están termostatizados, por lo que los cambios en la temperatura ambiente en un mismo día o distintos días pueden afectar al tiempo de migración.

Tiempo de migración relativo al tiempo de migración de un patrón interno (t_m/t_{PI})

Como se ha descrito en el epígrafe anterior, la variación en el flujo electroosmótico puede originar una elevada incertidumbre en la asignación de los picos. Una forma de compensar estos cambios en el flujo electroosmótico es refiriendo el tiempo de migración al tiempo de migración de otro compuesto presente la muestra. Algunos autores han descrito una mejora de la precisión cuando la referencia se hacía a un patrón interno con una estructura y movilidad similar a la del compuesto de interés [36]. Sin embargo, el problema es encontrar un patrón interno adecuado [37]. La migración relativa a un patrón interno (PI) es prácticamente independiente de la temperatura. El tiempo de migración relativo depende del potencial zeta, como puede verse en la ecuación 1.3, donde q y r son la carga y el radio de un compuesto respectivamente y los indicados con subíndice PI , las del patrón interno. Sin embargo, y como indicaron Palmer y Vandeginste [38] este factor está incluido en el numerador y el denominador, lo que debería limitar este efecto.

$$\frac{t_m}{t_{PI}} = \frac{(6\pi\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta) + \frac{q}{r}}{(6\pi\varepsilon_r\varepsilon_0\zeta) + \frac{q_{PI}}{r_{PI}}} \quad (1.3)$$

Entre los compuestos ensayados como patrón interno, el dipéptido Lys-Phe fue elegido en este trabajo porque no interfería con el análisis de las bandas de EPOr. Se puede observar en la **Tabla 1.3**, en el grupo de muestras estándar, que el porcentaje de asignación correcta aumentó sustancialmente cuando el tiempo de migración se refería al tiempo de migración del dipéptido (P2), pasando de 64,39 a 92,75%.

Como puede observarse en la **Figura 1.6**, Lys-Phe migra antes que el marcador de flujo electroosmótico (que corresponde al pico negativo en la figura), indicando que el signo de su movilidad electroforética es contrario al de las bandas de EPO. Es sabido que dentro de las características que debe tener una sustancia para ser considerada un buen patrón interno, se encuentra la de que sus propiedades electroforéticas sean similares a las del analito, para así compensar mejor los efectos de falta de reproducibilidad de la movilidad electroforética. De hecho, cuanto más diferente sea la movilidad de un compuesto respecto a la del patrón interno, peor es la precisión [38, 39]. Lo ideal habría sido emplear un patrón interno con una relación carga/masa media intermedia entre las distintas bandas de EPOr y que no interfiriera en el análisis, pero no se consiguió.

Tiempo de migración relativo al tiempo de migración del flujo electroosmótico

(t_m/t_{EOF})

Otra opción para compensar las variaciones del flujo electroosmótico es utilizar como parámetro de migración la relación de los tiempos de migración del pico electroforético del analito con el del marcador de flujo electroosmótico (el pico negativo que se observa en la **Figura 1.6** y que está originado por el agua presente en la muestra). Es importante recordar que el marcador de flujo electroosmótico corresponde al pico de un compuesto neutro en el análisis. La movilidad de este compuesto neutro sólo depende de la magnitud del flujo electroosmótico, pues no se encuentra cargado y no tiene movilidad electroforética efectiva en un campo eléctrico. Aunque algunos autores encontraron una precisión baja con este parámetro, esto se debió posiblemente a

la gran diferencia en la movilidad del analito y del marcador de flujo electroosmótico existente en esos casos [40]. De hecho, otros autores [41] obtuvieron una mejor precisión con este parámetro que con el tiempo de migración, indicando que compensa las fluctuaciones del flujo electroosmótico.

En el caso objeto de estudio en este capítulo, el porcentaje de asignación correcta cuando se usó el tiempo de migración relativo al tiempo de migración del flujo electroosmótico (parámetro P3) para el grupo 1 de muestras fue de 98,88% (ver **Tabla 1.3**). Este resultado indica que la exactitud es ligeramente mejor cuando el tiempo de migración de cada banda de EPO se refiere al del pico que corresponde al marcador de flujo electroosmótico que al patrón interno. Aunque la diferencia en la exactitud obtenida es poco notable, este resultado podría interpretarse como una mayor similitud en tiempos de migración de las bandas de EPO con el marcador de flujo electroosmótico que con el péptido Lys-Phe, cumpliendo mejor por tanto las características de un buen patrón interno.

Movilidad electroforética efectiva (μ_{eff})

La movilidad electroforética efectiva también se estudió como parámetro de migración. La ecuación más simple para el cálculo de la movilidad electroforética efectiva es [38]:

$$\mu_{eff} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad (1.4)$$

Como puede comprobarse, la movilidad electroforética efectiva depende de las características del analito en el tampón (carga y radio) y del tampón (viscosidad), y también varía con la temperatura, pues este factor afecta a la viscosidad. En la práctica, y de acuerdo con la ecuación 1, la movilidad electroforética efectiva se calcula como:

$$\mu_{eff} = \mu_{app} - \mu_{EOF} = \frac{Ll}{t_m V} - \frac{Ll}{t_{EOF} V} = \frac{Ll}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right) \quad (1.5)$$

El porcentaje de asignación correcta cuando se usó la movilidad electroforética efectiva (parámetro P4) para el grupo 1 de muestras (ver **Tabla 1.3**) indicó que la

exactitud era ligeramente menor que con P3. Quizá esto sea debido a las variaciones en la temperatura en el capilar durante los diferentes análisis, que afectan a la viscosidad y por tanto a la movilidad electroforética de las bandas de eritropoyetina.

Boone et al. [33] compararon la reproducibilidad intra e inter-instrumento de una misma marca empleando distintos parámetros de migración: la movilidad electroforética efectiva, el tiempo de migración y la movilidad electroforética corregida con respecto a un patrón interno. Encontraron que la movilidad electroforética efectiva era mucho más reproducible que el tiempo de migración, y que el uso de patrones internos para calcular el parámetro llamado “movilidad efectiva corregida” no daba lugar a ninguna mejora significativa al ser comparada con μ_{eff} .

Por otro lado, utilizar la movilidad aparente de las bandas de EPOr con respecto a la movilidad del flujo electroosmótico produciría la misma exactitud que P3, porque ambos parámetros (t_m/t_{EOF} y $\mu_{\text{app}}/\mu_{\text{EOF}}$) son recíprocos [41], como se desprende de las ecuaciones para calcular ambas movilidades:

$$\mu_{\text{app}} = \frac{Ll}{t_m V} \quad (1.6)$$

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{Ll}{t_{\text{EOF}} V} \quad (1.7)$$

$$\frac{\mu_{\text{app}}}{\mu_{\text{EOF}}} = \frac{t_{\text{EOF}}}{t_m} \quad (1.8)$$

Una vez establecido el porcentaje de asignación correcta obtenido con cada uno de los cuatro parámetros para las muestras analizadas bajo las llamadas condiciones estándar, se estudió la exactitud obtenida con esos parámetros para el resto de grupos de muestras con la aproximación externa y la aproximación interna.

1.4.2.2 Aproximación externa

Una vez establecido el porcentaje de asignación correcta obtenido con cada uno de los cuatro parámetros para las muestras analizadas bajo las llamadas condiciones

estándar, se estudió la exactitud obtenida con esos parámetros para el resto de grupos de muestras con la aproximación externa.

En la **Tabla 1.3** se muestra el porcentaje de asignación correcta (exactitud) de las bandas de EPO obtenido cuando el valor del parámetro de migración de cada isoforma de una muestra se comparó con los valores de referencia obtenidos con el grupo de muestras y condiciones estándar (grupo 1). Esta aproximación se utilizó para tratar de asignar bandas de EPO en muestras con distinta concentración que en el grupo 1 (grupos 12, 13 y 15), o analizadas por distinto operador (grupos 2-11), o en distintos instrumentos (grupos 2-11 y 15), o con capilares de distinta longitud y con distinto voltaje aplicado (grupos 14 y 15). El término “incorrecto” en esta Tabla significa que al menos una de las bandas se asignó por error a otra isoforma. Esto sucede, como se ha indicado en la Parte Experimental, cuando la media del parámetro para esa isoforma está fuera de las ventanas dentro de las cuales la asignación se considera correcta. En la representación gráfica de la media y las desviaciones estándar de dichos casos pudo apreciarse cómo lo que tuvo lugar fue un desplazamiento de la media de los valores de cada parámetro en cada isoforma. A pesar de los cambios en las condiciones de operación, como puede verse en la **Tabla 1.3**, en algunas ocasiones, salvo con el tiempo de migración, los parámetros de migración fueron válidos para asignar bandas de isoformas en electroforegramas obtenidos en distintos días, para muestras de distintos orígenes, analizadas en distintos instrumentos e incluso en capilares de distinta longitud y con distinto voltaje aplicado. A pesar de las posibles variaciones en el potencial zeta de la pared del capilar, el parámetro de migración más robusto fue el P3, es decir, el tiempo de migración de las bandas de EPO con respecto al tiempo de migración del marcador de flujo electroosmótico. Como se indicó anteriormente, esta robustez puede deberse al hecho de que en este parámetro relativo, el potencial zeta está incluido en el numerador y el denominador de la ecuación 3. Por tanto, pequeñas variaciones en el potencial zeta de la superficie a lo largo del análisis tendrán un efecto muy pequeño sobre el valor de P3.

Aunque la diferencia entre la exactitud obtenida con P3 y P4 no es muy grande, merece la pena destacar que ésta podría indicar que uno de los factores que influye en las variaciones de grupo a grupo de análisis estudiado es la temperatura ambiente. Como se desprende de la ecuación 4, μ_{eff} se ve afectada por la viscosidad del tampón, que

depende directamente de la temperatura de análisis [38, 41]. Aunque la temperatura a la que se encuentra el capilar se regula en cada análisis por el equipo, puede que existan ligeras variaciones en el control de esta variable entre equipos. Además, y como ya se dijo anteriormente, los dos extremos del capilar no están termostatizados y la temperatura de estos segmentos depende de la temperatura ambiente, que puede variar en los diferentes laboratorios. La influencia de la temperatura en estos segmentos sin termostatar del capilar depende de la longitud de éste, pues el porcentaje del capilar que está bajo control de temperatura varía con su longitud [38].

La viscosidad del tampón, de la que depende μ_{eff} , también se ve alterada con cambios en los aditivos del mismo, mientras que el tiempo de migración relativo es prácticamente independiente. Hay que tener en cuenta que en este trabajo han intervenido distintos operadores, que, como se ha mencionado, han podido introducir cierta variación inconsciente en la preparación del tampón. Este factor también puede haber intervenido en la falta de exactitud observada en algunos casos cuando P4 se utilizó en distintos grupos de análisis. El mayor número de casos en los que P3 puede ser usado con exactitud para la asignación de bandas en comparación con P4 concuerda con los resultados de otros autores, que encontraron que en términos de precisión el tiempo de migración relativo al flujo electroosmótico es una medida más consistente de la migración del soluto que la movilidad electroforética [41].

Aunque algunos de los parámetros de migración, especialmente el P3, proporcionaron una buena exactitud para muchos grupos de muestras cuando se utilizó la llamada aproximación externa, en otros casos, los valores de los parámetros calculados en las condiciones analíticas llamadas condiciones estándar para el grupo 1 en las **Tabla 1.3**, no sirvieron para identificar correctamente bandas de EPOr analizadas en otras condiciones. Por tanto, un enfoque más realista sería comparar la exactitud de los mismos parámetros, pero usando como referencia los valores obtenidos para una muestra patrón de EPOr analizada el mismo día bajo las mismas condiciones establecidas para cada grupo de muestras distinto. Esto es lo que se ha denominado aproximación interna, en la que el grupo 1 de muestras no se usa como grupo estándar.

1.4.2.3. Aproximación interna

La **Tabla 1.4** muestra el porcentaje de asignaciones correctas obtenidas para cada parámetro de migración con esta aproximación. Puede observarse en la tabla cómo en algunos casos se obtuvo una buena exactitud con el tiempo de migración (93 % en el grupo 14, por ejemplo). Sin embargo, algunos autores han descrito que la buena repetibilidad en los tiempos de migración asociada con esta exactitud en la asignación de bandas puede ser accidental ya que no es el comportamiento general [34]. De hecho, en general, este parámetro es con el que menos exactitud se obtiene en este trabajo. Al igual que se ha indicado anteriormente para la aproximación externa, la ligera mejora en la exactitud obtenida cuando el tiempo de migración de cada isoforma se refirió al tiempo de migración del flujo electroosmótico (la media de P3 de los grupos 1-15 es de 99,70%) que cuando se refirió al tiempo de migración del patrón interno (la media de P2 de los grupos 1-15 es de 94,50%), puede deberse a que el marcador del flujo electroosmótico migra más cerca de las bandas de EPOr que el patrón interno, es decir, tienen un comportamiento electroforético más parecido.

Ciertos resultados previos de nuestro laboratorio apuntaban a que la concentración de la muestra inyectada puede afectar al tiempo de migración. Se realizó un estudio para comprobar la posibilidad de usar los parámetros de migración seleccionados en muestras con diferentes concentraciones. Los grupos 12, 13 y 15 de la **Tabla 1.4** corresponden a los análisis realizados en los que la concentración de EPO se varió en el intervalo de 0,06 a 1 mg/ml. Puede verse en la **Tabla 1.4** que la exactitud de P1 es muy baja. Sin embargo, aun variando la concentración, la exactitud de los parámetros P2, P3 y P4 seguía siendo casi del 100%. Este hecho tiene importancia en casos en que se desconozca la concentración de la muestra analizada, como se discutirá y mostrará extensamente en el Capítulo 2 de esta Memoria.

Tal y como se refleja en la **Tabla 1.4**, el uso de los parámetros de migración P3 y P4, usados con la aproximación interna hizo posible la asignación correcta de isoformas de EPO en muestras de distintos orígenes, formuladas con distintos excipientes y/o con distintas concentraciones que la muestra patrón. Así, mediante la aproximación interna, las bandas de EPOr de las muestras de los diferentes lotes analizados se asignaron con una exactitud cercana al 100%.

TABLA 1.4. EXACTITUD OBTENIDA PARA LOS DIFERENTES GRUPOS DE MUESTRAS Y PARÁMETROS APLICANDO LA APROXIMACIÓN INTERNA

GRUPO DE MUESTRAS	INST. ^{a)}	LAB. ^{b)}	OP. ^{c)}	CAP. ^{d)}	L (cm) ^{e)}	Voltaje aplicado (kV)	Muestras incluidas en el grupo	Número de inyecciones	EXACTITUD (%)			
									t_m (P1)	t_m/t_{mIS} (P2)	t_m/t_{EOF} (P3)	μ_{eff} (P4)
1	1,2	1,2	1	1	87	25	EPO (P.E.) 1 mg/ml	18	64,39	92,75	98,88	97,40
2	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra A Muestra B	8	69,06	96,76	100	100
3	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra C Muestra D	8	68,24	99,63	99,85	99,59
4	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra E Muestra F Muestra G	10	78,69	95,40	99,87	99,94
5	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra H Muestra I Muestra J	10	59,87	84,73	99,72	99,98
6	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra K Muestra L	8	47,12	96,94	99,99	99,69
7	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra M Muestra N	6	50,23	87,69	99,07	99,63
8	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra O Muestra P	8	57,68	99,91	100	96,58
9	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra Q Muestra R	8	32,36	96,97	98,69	94,77
10	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra S Muestra T	8	69,63	88,96	99,94	99,47
11	3	3	2	2	87	25	EPO (P.E.) Muestra U	4	92,16	99,96	99,99	99,89
12	1	1	1	1	87	25	EPO (P.E.) ^{f)}	6	52,77	95,88	99,55	99,10
13	1	1	1	1	87	25	EPO (P.E.) ^{f)}	6	49,28	82,41	99,99	99,89
14	3	3	1	3	107	30	EPO (P.E.)	18	93,26	99,48	100	100
15	3	3	1	3	107	30	EPO (P.E.) ^{e)}	6	86,09	100	100	100

^{a)} INST.(Instrumento), 1: Instrumento 1; 2: Instrumento 2; 3: Instrumento 3. ^{b)} LAB. (laboratorio)1: Laboratorio 1; 2: Laboratorio 2. ^{c)} OP. (operador) 1: Operador 1; 2: Operador 2; 3: Operador 3. ^{d)} CAP (capilar), 1: Capilar 1; 2: Capilar 2; 3: Capilar 3. ^{e)} L (cm) (longitud del capilar en cm). ^{f)} Concentraciones de EPO inyectadas: 0,06; 0,1; 0,2; 0,5; 1mg/ml.

Existe una limitación en los parámetros de migración relativos que suelen utilizarse habitualmente, que consiste en tener que añadir un estándar a la muestra que no interfiera con la misma [38]. Una ventaja adicional que presenta este estudio es que el parámetro 3 (tiempo de migración relativo al tiempo de migración del marcador de flujo electroosmótico) evita este problema, puesto que el marcador utilizado es el pico negativo del electroferograma, que corresponde al agua en que se disuelve la EPOr.

1.4.2.4. Comparación entre aproximaciones externa e interna

Como puede deducirse de la comparación de los resultados con ambas aproximaciones, resulta menos exacta la aproximación externa que la interna. En esta última, los límites de las ventanas dentro de las cuales la asignación de una banda es correcta para cada parámetro se calcula con los datos de los análisis de cada grupo, usando como referencia una separación de EPOr de la P.E. inyectada en las mismas condiciones. Por el contrario, con la aproximación externa estas ventanas son invariables y se han calculado con los datos de los análisis del grupo de muestras 1, es decir, con los análisis de la EPOr de la P.E. en las condiciones analíticas que se han definido como estándar. Un ejemplo gráfico del modo de operar en ambas aproximaciones se muestra en las **Figuras 1.8 y 1.9**. En la **Figura 1.8** se representa el funcionamiento del programa informático para el estudio de la exactitud de la movilidad electroforética efectiva como parámetro de asignación de bandas de EPO en los grupos de muestras 1, 3 y 4 mediante la aproximación externa. En la **Figura 1.8.a** están representados los resultados de la movilidad electroforética en las condiciones de referencia. Así, los límites de las ventanas entre las cuales la asignación de banda es correcta han sido calculados mediante las medias y las desviaciones estándar de dicho parámetro para cada banda de EPOr estándar y en las condiciones de referencia. El porcentaje de asignación en este grupo de análisis es del 97,40.

En la **Figura 1.8.b**, puede observarse cómo esas mismas ventanas son utilizadas para otro grupo de inyecciones de EPOr (grupo 3). A pesar de ser EPOr de otros orígenes e inyectadas en otro equipo y día, y por otro operador, las ventanas establecidas en el grupo y condiciones de referencia sirven en este caso, con un porcentaje de acierto de 98,42%.

Sin embargo, en la **Figura 1.8.c**, esas ventanas no sirven para el grupo de inyecciones de EPOr objeto de estudio (grupo 4) porque la media del parámetro para cada isoforma se ha desplazado ligeramente hacia la derecha, impidiendo la correcta asignación de varias isoformas. En la figura está señalada la media y la desviación estándar de la isoforma 7, que por su desplazamiento hacia la derecha hace que se encuentre fuera de las ventanas asignadas para ella, dando lugar a una identificación incorrecta.

En la **Figura 1.9** puede compararse la exactitud obtenida con ambas aproximaciones para el grupo de muestras 4. Mientras que en la aproximación externa (**Figura 1.9.a**) las ventanas preestablecidas para cada isoforma impiden la asignación correcta de bandas, las ventanas calculadas mediante la aproximación interna (**Figura 1.9.b**) para el grupo de inyecciones objeto de estudio sí permiten la asignación de bandas con gran exactitud.

APROXIMACIÓN EXTERNA

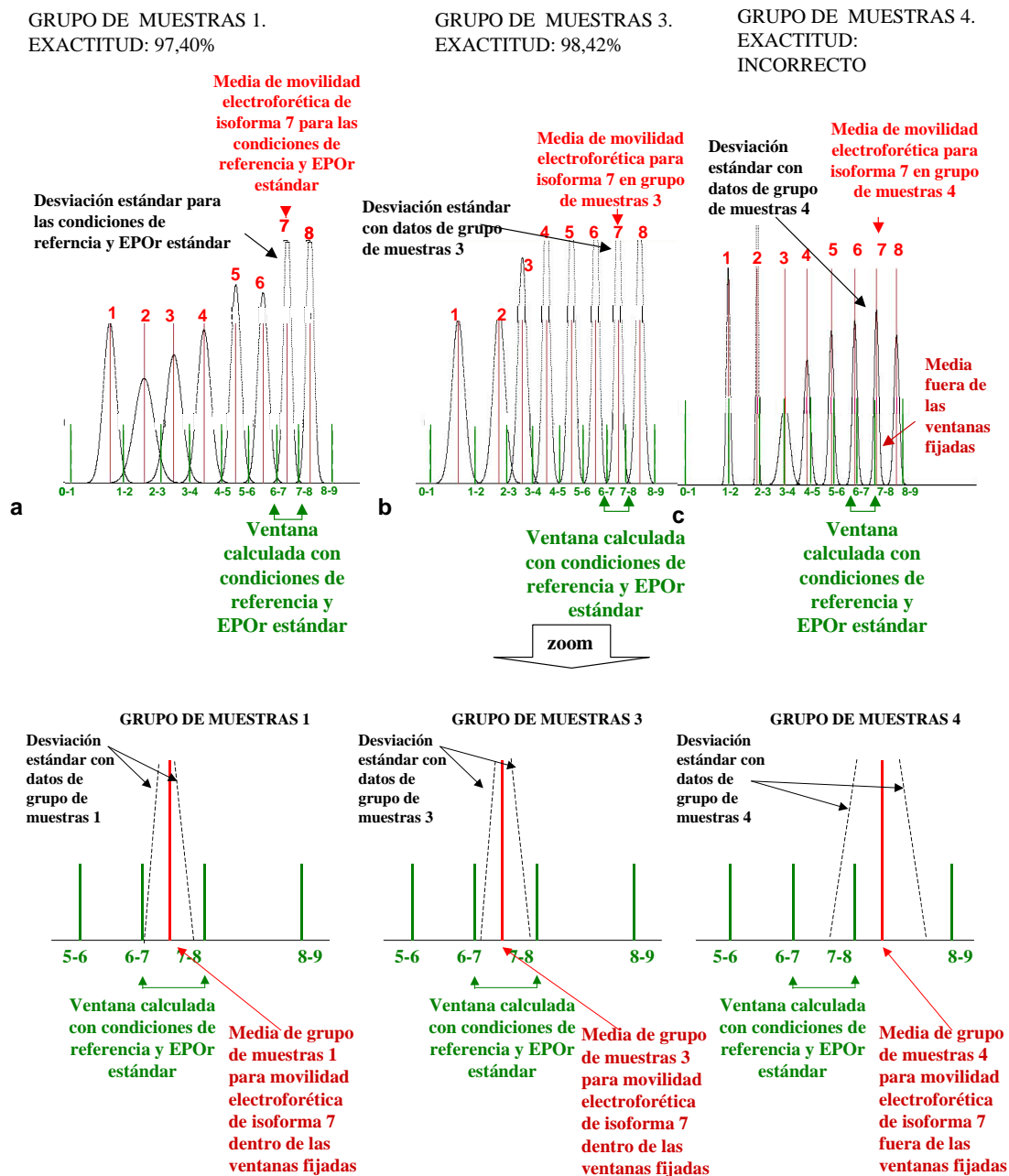


Figura 1.8. Representación de forma de operar del programa estadístico mediante aproximación externa. Parámetro de migración estudiado: movilidad electroforética efectiva (P4). Grupos de muestras 1, 3 y 4. **a)** Representación de ventanas, media y distribución estándar de las bandas para inyecciones de EPOr en condiciones de referencia. **b) y c).** Representación de uso de ventanas establecidas a través de las inyecciones de EPOr en condiciones de referencia para cálculo de la exactitud en muestras de EPOr de otros orígenes y estudiadas bajo diferentes condiciones analíticas. Grupo de muestras 3 y 4, respectivamente.

COMPARACIÓN APROXIMACIÓN EXTERNA E INTERNA

GRUPO DE MUESTRAS 4. APROXIMACIÓN EXTERNA. EXACTITUD: INCORRECTO

GRUPO DE MUESTRAS 4. APROXIMACIÓN INTERNA. EXACTITUD: 99,94%

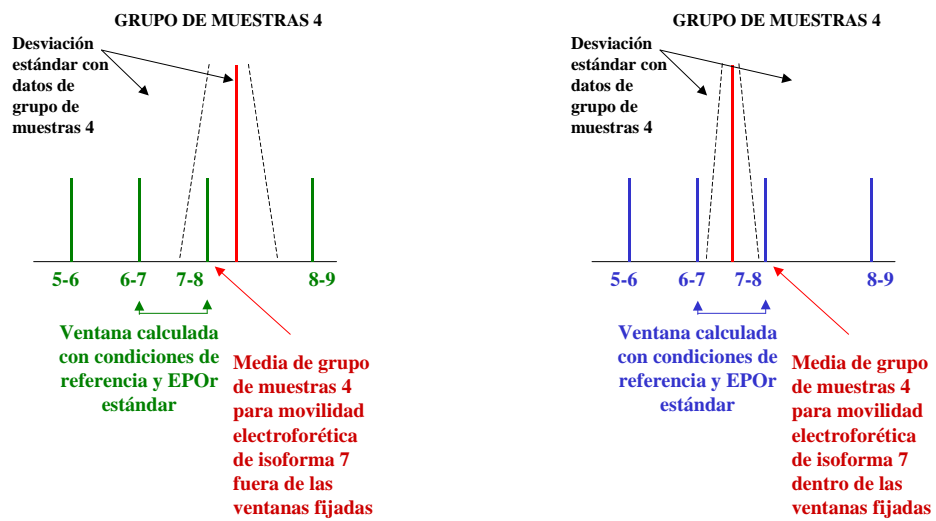
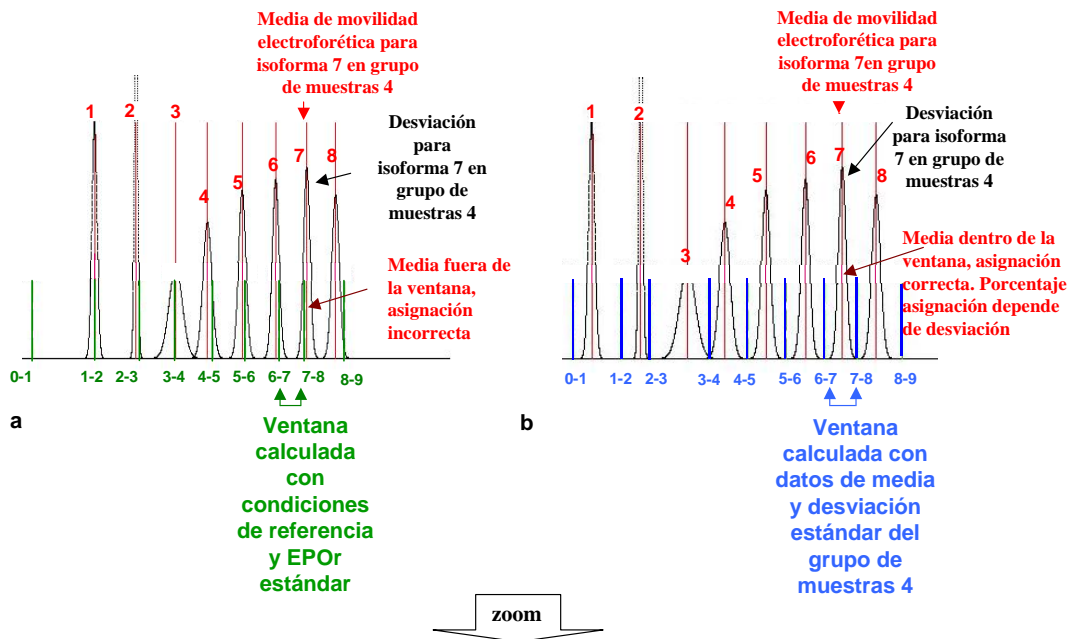


Figura 1.9. Representación de forma de trabajo del programa estadístico mediante aproximación externa (a) e interna (b). Parámetro de migración estudiado: movilidad electroforética efectiva (P4). Grupo de muestras 4.

1.4.2.5 Análisis de fármacos comercializados que contienen proteínas estimuladoras de eritropoyesis

Una vez demostrada la utilidad y exactitud de los parámetros P3 (t_m/t_{EOF}) y P4 (μ_{EFF}) para asignar bandas (mediante la aproximación interna) de EPOr en muestras de EPOr estándar de la P.E. analizada en diferentes concentraciones y en muestras de EPOr de diferentes lotes experimentales de producción de un mismo fabricante, estos dos parámetros se usaron también para asignar bandas de EPO en diferentes fármacos comerciales. Las exactitudes obtenidas con dichos parámetros y con la aproximación interna en la asignación de isoformas en preparaciones de EPO α y EPO β fue de 99,97% para P3 y de 99,82% para P4. La **Figura 1.10** muestra el resultado del análisis de una muestra de eritropoyetina α y de otra de eritropoyetina β . En la eritropoyetina α , y tomando como referencia las bandas de la EPOr de la P.E., se identificaron las bandas 3, 4, 5, 6, 7 y 8. En la eritropoyetina β se identificaron las bandas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8. Por tanto, la eritropoyetina β mostró más bandas con menor relación carga/masa que la α , lo que confirma y mejora los resultados publicados utilizando isoelectroenfoque convencional, en los que se apreciaban ciertas bandas más básicas en la EPO β [42].

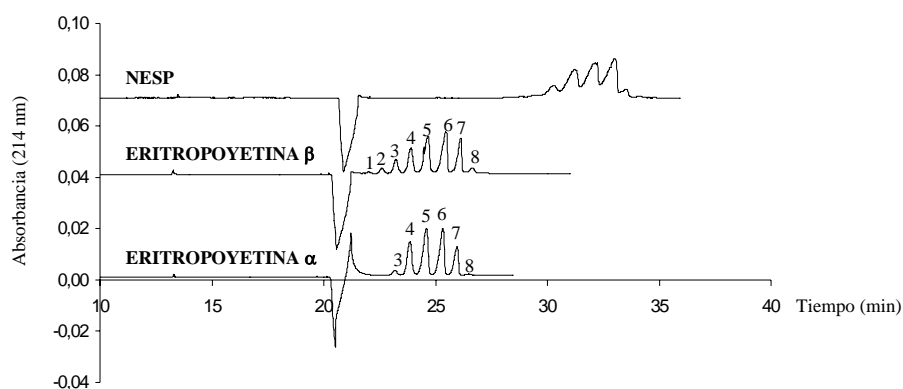


Figura 1.10. Electroforegramas de CZE de 3 proteínas estimuladoras de eritropoyesis (Eritropoyetina α , Eritropoyetina β y NESP) y asignación de bandas. Condiciones analíticas como en la **Figura 1.5**.

En la figura también se muestra el perfil electroforético de la NESP. Como se ha descrito en la Introducción, la cadena aminoacídica de esta proteína se ha modificado para hacer posible el anclaje de dos nuevas cadenas de oligosacáridos. Cada una de estas nuevas cadenas contribuye en hasta cuatro ácidos siálicos al total de la molécula y

aumentan el peso molecular de la proteína en aproximadamente 3300 Da. Mientras que el máximo número de residuos de ácido siálico de la EPOr fabricada en células CHO es de 14, en la NESP llega a 22 residuos [9]. Por un lado, el aumento de peso molecular disminuiría la μ_{eff} de la proteína comparada con el de la EPO. Al ser la μ_{EFF} de esta proteína opuesto al EOF, esa disminución provocaría unos tiempos de migración de NESP menores que los de la EPOr. Sin embargo, el aumento en el número de ácidos siálicos confiere a la NESP una carga negativa mucho mayor que la que tiene la EPOr. Esta carga negativa aumenta considerablemente la μ_{eff} de la proteína, lo que retrasa, como se muestra en la figura, los tiempos de migración de ésta. Por tanto, la influencia del aumento de residuos de ácido siálico es superior al aumento de masa que suponen los dos glicanos extra.

1.5 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este capítulo puede concluirse que:

1. Las modificaciones, introducidas respecto al método anteriormente desarrollado, en la preparación de la muestra de la EPOr para eliminar sus excipientes de bajo peso molecular han permitido que dicha preparación se acorte a 90 min, frente a los 190 min iniciales.

2. Las modificaciones introducidas respecto al método de separación anteriormente desarrollado han permitido que el análisis por CZE de la EPOr se realice en 25 min, lo que supone un aumento notable de la velocidad de análisis frente a los 35 min iniciales y una ventaja aun mayor frente a los 60 min necesarios en el método descrito por la Farmacopea Europea [28].

3. El programa estadístico desarrollado en el laboratorio permite elegir los parámetros de migración que proporcionan mayor exactitud para la asignación de bandas de eritropoyetina. De los parámetros estudiados, los más adecuados para llevar a cabo la asignación de bandas son el tiempo de migración relativo al flujo electroosmótico y la movilidad electroforética.

4. La aproximación interna permite, empleando los parámetros de migración seleccionados, una asignación correcta con una exactitud cercana al 100% en todos los casos analizados, incluyendo los fármacos Eritropoyetina α y Eritropoyetina β . Se demuestra así que inyectando una muestra patrón cada día bajo las mismas condiciones analíticas (mismo voltaje, longitud de capilar, instrumento, operador y día) que las muestras de eritropoyetina objeto de estudio, es posible asignar bandas con los parámetros propuestos con una elevada exactitud, que no se alcanza con el tiempo de migración.

5. Los métodos de preparación de muestras y de separación por electroforesis capilar propuestos en este capítulo y el programa desarrollado para la selección de parámetros de migración que permite la asignación correcta de isoformas de

eritropoyetina deben facilitar la metodología de análisis de eritropoyetina con fines de caracterización de fármacos, control de calidad, estudios de correlación de actividad biológica-glicosilación y control de dopaje.

6. El método seguido para la elección de parámetros de migración válidos, no tiene por qué limitarse al estudio aquí descrito. Podrían ser válidos para la asignación de bandas electroforéticas de diferentes compuestos existentes en distintas muestras, siempre que se disponga de una muestra patrón con los mismos compuestos. Si el flujo electrosmótico no estuviese marcado por algún compuesto en la matriz de la muestra, debería añadirse un compuesto neutro que no interfiriera con la muestra.

1.6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Jacobson, L.O., Goldwasser, E., Fried, W., Plzak, L. *Nature* 1957, 179, 633-634.
- [2] Choi, D., Kim, M., Park, J. *J. Chromatogr. B* 1996, 687, 189-199.
- [3] Skibeli, V., Nissen-Lie G., Torjesen, P. *Blood* 2001, 98, 3626-3634.
- [4] Lin, F.-K., Suggs, S., Lin, C.-H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Marin, F., Stabinsky, Z., Badrawi, S.M., Lai, P.-H., Goldwasser, E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1985, 82, 7580-7584.
- [5] Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufmann, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F., Kawakita, M., Shimizu, T., Miyake, T. *Nature* 1985, 313, 806-810.
- [6] Generic Biologicals Poised to Enter US and EU. A Strategic Outlook on Emerging Market. *Genetic Engineering News* 2004 24 (12)10-12.
- [7] Wadman, M. *Nature* 2000, 404, 532.
- [8] Sasaki, H., Bothner, B., Dells, A., Fukuda, M. *J. Biol. Chem.* 1987, 262, 12059-12076.
- [9] Egrie, J.C., Browne, J.K. *Nephrol. Dial. Transplant.* 2001, 16, 3-13.
- [10] Lasne, F., De Ceaurriz, J. *Nature* 2000, 405, 635.
- [11] Lasne, F. *J. Immunol. Methods* 2003, 276, 223-226.
- [12] Schlags, W., Lachmann, Walther, M., Kratzel, M., Noe, C. R. *Proteomics* 2002, 2, 679-682.
- [13] Stanley, S. M.R., Poljack, A. *J. Chromatogr. B* 2003, 785, 205-218.
- [14] Watson, E., Yao, F. *Anal. Biochem.* 1993, 210, 389-393.
- [15] Tran, A. D., Sungae, P., Lisi, P.J. *J. Chromatogr.* 1993, 542, 459-471.
- [16] Bietlot, H. P., Girard, M. *J. Chromatogr. A* 1997, 759, 177-184.
- [17] Cifuentes, A., Moreno-Arribas, M.V., de Frutos, M., Diez-Masa, J.C. *J. Chromatogr. A* 1999, 830, 453-463.
- [18] Lopez-Soto-Yarritu, P., Diez-Masa, J.C., de Frutos, M., Cifuentes, A. *J. Sep. Sci.* 2002, 25, 1-6.
- [19] Nieto, O., Hernández, P., Hernández, L. *Anal. Comm.* 1996, 33, 425-427.
- [20] Yu, B., Cong, H., Liu, H., Yuanzong, L., Liu, F. *J. Sep. Sci.* 2005, 28, 2390-2400.
- [21] Lopez-Soto-Yarritu, P., Diez-Masa, J.C., Cifuentes, A., de Frutos, M. *J. Chromatogr. A.* 2002, 968, 221-228.
- [22] Neususs, C., Demlbauer, U., Pelzing, M. *Electrophoresis*, 2005, 26, 1442-1450.

- [23] Balaguer, E., Neussuss, C. *Anal. Chem.* 2006, 78, 5384-5393.
- [24] Rush, R. S., Derby, P. L., Strickland, T. W., Rohde, M. F. *Anal. Chem.* 1993, 65, 1834-1842.
- [25] Ohta, M., Kawasaki, N., Hyuga, S., Hyuga, M. Hayakawa, T. *J. Chromatogr. A* 2001, 910, 1-11.
- [26] Skibelli, V., Nissen-Lie, G., Torjesen, P. *Blood* 2001, 98, 3626-3634.
- [27] de Frutos, M., Cifuentes, A., Diez-Masa, J.C. *Electrophoresis* 2003, 24, 678-680.
- [28] Erythropoietin concentrated solution. *European Pharmacopoeia 4th Edition*. 2002, 1316, 1123-1128
- [29] Bistrow, A., Charton, E. *Pharmaeuropa*, 1999, 11, 290-415.
- [30] Storrington, P., Gaines Das, R. E., Mulders, J. W. M., Halder, M. *Biologicals*, 2002, 30, 217-234.
- [31] *Pharmaeuropa BIO 2* 1997, 31-48.
- [32] Abramovitz, M., Stegun, I.A. *Handbook of mathematical functions*, Dover Publications, USA, 1965. pp. 297-299.
- [33] Boone, C.M., Franke, J.-P., de Zeeuw, R.A., Ensing, K. *Electrophoresis* 2000, 21, 1545-1551.
- [34] Siren, H., Jumpanen, J.H., Manninen, K., Riekkola, M.-L. *Electrophoresis* 1994, 15, 779-784.
- [35] Jumpanen, J.H., Riekkola, M.-L. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1060-1066.
- [36] Shihabi, Z.K., Hinsdale, M.E. *Electrophoresis* 1995, 16, 2159-2163.
- [37] Lee, T.T., Yeung, E.S. *Anal. Chem.* 1991, 63, 2842-2848.
- [38] Palmer, C.P., Vandeginste, B.G.M. *J. Chromatogr. A* 1995, 718, 153-165.
- [39] Li, X.F., Ren, H., Le, X., Qi, M., Ireland, I.D., Dovichi, N.J. *J. Chromatogr. A* 2000, 869, 375-384.
- [40] Chen, N., Wang, L., Zhang, Y. *J. Liquid. Chromatogr.* 1993, 16, 3609-3622.
- [41] Yang, J., Bose, S., Hage, D.S. *J. Chromatogr. A* 1996, 735, 209-220.
- [42] Storrington, P.L., Tiplady, R.J., Gaines Das, R.E., Stenning, B.E., Lamikanra, A., Rafferty, B., Lee, J. *British J. Haematol.* 1998, 100, 79-89.

CAPÍTULO 2

DESARROLLO DE MÉTODOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL ANÁLISIS DE FORMAS DE LA ALFA 1-GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (AGP)

CAPÍTULO 2

DESARROLLO DE MÉTODOS DE ELECTROFORESIS CAPILAR PARA EL ANÁLISIS DE FORMAS DE ALFA 1-GLICOPROTEÍNA ÁCIDA (AGP)

2.1 INTRODUCCIÓN.....	102
2.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO.....	108
2.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	109
2.3.1 Reactivos.....	109
2.3.2 Muestras.....	110
2.3.3 Preparación de las muestras.....	110
2.3.4 Dispositivos e instrumentación.....	113
2.3.5 Procedimientos para la separación de formas de AGP por CZE y por CIEF.....	115
2.3.6 Asignación de bandas de AGP separadas por CZE y por CIEF	116
2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	118
2.4.1 Análisis de AGP por CZE.....	118
2.4.1.1 Desarrollo de un método de separación de AGP patrón por CZE.....	118
2.4.1.2 Análisis de AGP de muestras preparadas por el método “cloroformo-metanol completo”.....	119
2.4.1.3 Análisis de AGP de muestra de suero de un donante sano preparada con el método “cloroformo-metanol corto”.....	121
2.4.1.4 Análisis de muestras preparadas con el método “perclórico”.....	123
2.4.1.5 Exactitud obtenida en la asignación de bandas de AGP patrón con los distintos parámetros de migración.....	127
2.4.1.6 Exactitud obtenida en la asignación de bandas de AGP de muestras preparadas con el método “cloroformo-metanol completo”.....	129
2.4.1.7 Exactitud obtenida en la asignación de bandas de AGP de muestras preparadas con el método “perclórico”.....	135
2.4.1.8 Comparación cuantitativa de la AGP de las muestras preparadas mediante los diferentes métodos de extracción....	140
2.4.2 AGP analizada por CIEF.....	145

2.4.2.1 Desarrollo de un método “one-step CIEF” para la separación de formas de AGP.....	145
2.4.2.2 Desarrollo de un método “two-step CIEF” para la separación de formas de AGP.....	153
2.4.2.3 Exactitud obtenida con los distintos parámetros de migración en la asignación de bandas de AGP patrón.....	164
2.4.2.4 Exactitud obtenida con los distintos parámetros de migración en la asignación de bandas de AGP de muestras preparadas con el método “cloroformo-metanol completo”...	166
2.4.2.5 Precisión del análisis cuantitativo para muestras de AGP patrón.....	168
2.4.2.6 Comparación cuantitativa de la AGP de muestras de suero preparadas con el método “cloroformo-metanol completo”...	170
2.4.3 Consideraciones finales y perspectivas del análisis de AGP por CE.....	172
2.5 CONCLUSIONES.....	173
2.6 BIBLIOGRAFÍA.....	176

2.1 INTRODUCCIÓN

La alfa 1-glicoproteína ácida (AGP u orosomucoide) es una proteína sintetizada principalmente por el hígado (aunque está descrita su expresión extra-hepática). Pertenece a las proteínas de fase aguda, lo que significa que su concentración en el suero aumenta en respuesta a lesiones tisulares, inflamación, infección y cáncer [1, 2]. La función biológica de AGP sigue siendo desconocida, aunque suele atribuírsele efectos inmunomoduladores y anti-inflamatorios. Además, es una proteína que puede unirse a numerosos fármacos básicos o neutros y a compuestos endógenos lipófilos, como las hormonas esteroideas, para facilitar su transporte por el torrente sanguíneo.

La AGP es una proteína de 41-43 kDa [1] con punto isoelectrico entre 1,8 y 3,8 [1, 3]. Además, su contenido en azúcares es muy alto, contribuyendo con el 45 % de la masa de la proteína. La cadena aminoacídica tiene 183 residuos y presenta dos puentes disulfuro. Es extremadamente soluble en agua, incluso a pHs cercanos a su pI.

Los azúcares de esta glicoproteína se unen a la cadena aminoacídica en forma de cinco oligosacáridos anclados por un átomo de nitrógeno cada uno (N-oligosacáridos). Dichos oligosacáridos pueden ser bi, tri, tetra e incluso pentaantenarios. Dentro de ellos, la diversidad de oligosacáridos que pueden encontrarse unidos a la cadena polipeptídica es muy amplia, dando lugar a una variedad tal que, en suero, pueden encontrarse entre 12-20 glicofomas de AGP [1]. Los azúcares de los extremos de las antenas suelen ser ácidos siálicos y representan entre el 10-12% en peso de los azúcares, lo que contribuye a la extrema acidez de esta glicoproteína [1]. La heterogeneidad de formas de AGP que se encuentran en el suero de un mismo individuo no sólo procede de la diversidad en la composición de los azúcares que da lugar a glicofomas, sino que también existe una heterogeneidad que se debe a que la AGP es una proteína codificada por varios alelos en dos *loci* diferentes [4], por lo que la composición de la cadena aminoacídica también varía entre las diferentes moléculas de AGP.

La glicosilación de la AGP es clave en sus funciones biológicas. Así, la inhibición de la proliferación de los linfocitos (parte de la actividad inmunomoduladora de la AGP) depende del grado de ramificación de sus glicanos. También, la inhibición

de la agregación de plaquetas (otro de las funciones de la AGP) se ve favorecida cuando la AGP está libre de ácidos siálicos [1].

El tipo de glicosilación de la AGP, así como la distribución de las diferentes formas aminoácidas de la proteína se han asociado a distintos estados patológicos como el cáncer [4-7], la artritis reumatoide [8,9], y otros tipos de inflamación [2, 5, 10]. Algunos de estos trabajos se resumen en esta introducción, debido al interés que tiene revisar las técnicas analíticas utilizadas hasta el momento en el estudio del uso de las formas de la AGP como potencial biomarcador.

Mackiewicz y Mackiewicz [5], utilizaron inmunoelectroforesis de afinidad cruzada (CAIE) para estudiar AGP de diferentes orígenes (individuos sanos, pacientes con diferentes cánceres, entre otros hepatocarcinomas y leucemias, pacientes con inflamación aguda y con inflamación crónica). Su técnica se basó en el grado de afinidad de muestras de AGP de distintos orígenes por la Concanavalina A (Con A), una lectina que se une selectivamente a oligosacáridos biantenarios. Primero, en el proceso electroforético, las diferentes formas de AGP se separaron en función de su afinidad por la Con A y, después, estas formas se detectaron mediante anticuerpos anti-AGP marcados. Las diferencias en las AGP de diferentes orígenes se establecieron por el grado de afinidad por la Con A, es decir, por la abundancia de azúcares biantenarios. Uno de los resultados obtenidos, por ejemplo, fue que en cánceres pancreáticos, hepatocarcinomas y cánceres del conducto biliar, la reactividad de AGP por Con A es menor que la de AGP de donantes sanos.

Duché et al. [4] eliminaron enzimáticamente los ácidos siálicos de las muestras de AGP estudiadas (de donantes sanos y de pacientes con diversos cánceres) para poder estudiar el fenotipo de cada muestra mediante IEF convencional. Sus resultados apuntan a que pueden ocurrir cambios en la expresión de las variantes genéticas de la AGP dependiendo del tipo de cáncer.

Kremmer et al. [6] estudiaron los oligosacáridos liberados enzimáticamente de la cadena polipeptídica de la AGP por RP-HPLC y MALDI-TOF. Sus muestras de AGP procedieron de sueros de pacientes con diversos tipos de cáncer además de donantes

sanos. Entre sus resultados se encuentra, por ejemplo, un aumento significativo del número de fucosas en las muestras de AGP de pacientes con cáncer de ovario.

Hashimoto et al. [7] también utilizaron CAIE con Con A y con otra lectina, Aleuria aurantia (AAL), para estudiar las diferencias en la ramificación de los oligosacáridos de AGP y su grado de fucosilación en muestras procedentes de pacientes con diferentes tipos de cáncer. Los resultados apuntan a que los pacientes con diversos cánceres (gástricos, de pulmón y otros) que presentaban formas de la AGP fuertemente fucosiladas y con azúcares tri y tetra-antenarios eran susceptibles de tener un peor pronóstico que los pacientes cuya AGP no presentaba estas características.

Por otro lado, como se ha descrito en la Introducción General de esta memoria, la CE es una técnica adecuada para el análisis de glicoproteínas. Las diferencias en la relación carga/masa entre las bandas que se obtienen al separar una glicoproteína por CE suelen ser atribuibles a la parte glicosídica de la proteína. En el caso de la AGP, sin embargo, la complejidad es aún mayor porque ha de tenerse en cuenta la influencia que las diferentes variantes genéticas (presentes en un mismo individuo) tienen sobre la separación de formas de AGP en CE. Como se discute a continuación, se han realizado algunos trabajos para separar formas de AGP tanto por CZE como por CIEF, aunque en ninguno de ellos, hasta la fecha, se había obtenido resolución a línea de base ni se habían comparado los perfiles electroforéticos de la AGP de individuos sanos y enfermos.

Respecto a la separación de AGP por CZE, Páková et al. [11] obtuvieron una separación con una resolución parcial de hasta 8 bandas de AGP en un capilar no recubierto y usando putrescina para minimizar la adsorción de AGP a la pared del capilar. Por otro lado, el grupo de Kakehi abordó la separación de formas de AGP usando diferentes tampones en un capilar recubierto DB-1 [12, 13, 14]. Obtuvieron una resolución parcial de 10 bandas de AGP, y realizaron un estudio sobre la relación entre las cadenas de oligosacáridos de las distintas formas de la AGP y el comportamiento electroforético de estas en CZE. Sin embargo, no realizaron estudios cuantitativos de AGP ni compararon el comportamiento electroforético de muestras de diferentes orígenes.

Los trabajos sobre separación de bandas de AGP por CIEF son muy escasos. Wu et al. [15] usaron AGP humana comercial como proteína modelo para optimizar ciertos parámetros de CIEF y obtuvieron una separación parcial de 6 bandas de AGP. Probablemente, esta escasez de trabajos con AGP en CIEF se deba a las dificultades inherentes de trabajar con proteínas muy ácidas en este modo de electroforesis capilar. Se ha descrito cómo, en CIEF, las proteínas ácidas (enfocadas en el extremo del capilar más alejado del detector) se movilizan con menor eficacia que las proteínas básicas y neutras [16]. Además, las proteínas ácidas pueden experimentar deriva anódica, provocando una peor resolución o incluso haciendo que no se detecten [17].

La AGP es una proteína presente, entre otros fluidos biológicos, en el suero. El suero es un sistema muy complejo tanto por el número de compuestos que alberga (entre ellos, proteínas) como por el amplio intervalo de concentraciones en que estos compuestos pueden encontrarse [18]. Los niveles de AGP en suero de individuos sanos suele estar entorno a 1 g/L (2×10^{-5} M) y puede aumentar entre dos y cinco veces durante las reacciones de fase aguda [1]. Por tanto, desde el punto de vista de su detección por UV en un análisis por CE, no es una proteína que presente dificultades. Aún así, es necesario aislar la proteína del resto de interferentes del suero, porque un análisis directo del suero por CZE sólo da lugar a la detección de las proteínas mayoritarias (seroalbúmina humana, γ -globulina, transferrina, haptoglobina, β -lipoproteínas y otras) que ocultan las minoritarias [19]. Además, la presencia de proteínas como la seroalbúmina humana (HSA) puede dificultar o incluso impedir el análisis por CE de otras proteínas [20].

Existen en la bibliografía diferentes métodos de purificación de AGP de suero, algunos de los cuales se describen en esta introducción. En general, estos métodos son tediosos o caros. Kremmer et al. [21] desarrollaron un método de extracción de AGP de suero que consistió en mezclar el suero con cloroformo-metanol para, tras una centrifugación, extraer la AGP en la fase metanol-agua. Fue necesario pasar la fase metanol-agua por diversas columnas cromatográficas para separar la proteína de interés de otras proteínas coextraídas, principalmente la HSA. Posteriormente, se eliminaron las sales de la muestra en una columna apropiada.

Elliot et al. [9] aislaron la AGP de plasma humano con tres pasos cromatográficos de baja presión, 2 columnas con dos sefarosas diferentes y una cromatografía de intercambio aniónico. La recuperación de AGP con este método fue del 90%.

Higai et al. [10] purificaron AGP de suero fabricando una columna anti-AGP humana. A pesar de la supuesta especificidad de la columna, el eluido de esta columna tuvo que ser purificado mediante HPLC de intercambio iónico.

Uno de los métodos más sencillos encontrados en la bibliografía para la extracción de AGP (en este caso, de plasma de neonatos) ha sido el revisado recientemente por Stumpe et al. [22]. Aprovechando la solubilidad de AGP incluso a pHs cercanos a su pI, precipitaron el resto de proteínas y componentes del plasma acidificándolo con HClO_4 . A pesar de que, en el posterior análisis de AGP por HPLC, el pico de esta proteína no fue el único (también parece haber un pico menor, correspondiente a HSA) el porcentaje de purificación de AGP fue del 79%.

Debido al interés clínico que presentan las múltiples formas de AGP, este capítulo se ha dedicado al estudio mediante electroforesis capilar de esta proteína. La hipótesis de trabajo ha sido que los cambios en la cadena aminoacídica y en la parte glicosídica de la AGP en diversos estados patofisiológicos descritos en la literatura podrían afectar al perfil electroforético de la proteína, siempre que los métodos desarrollados sean suficientemente selectivos para detectar esos cambios. Si esto ocurriera, la CE sería una técnica para estudiar el posible uso de las formas de AGP como marcadores de diversas enfermedades. Como ya se ha descrito, la CE es una técnica que, frente a las técnicas antes discutidas, presenta muchas ventajas como la automatización, el pequeño volumen de muestra requerido y la posibilidad de cuantificar los resultados.

En este capítulo, se ha abordado la purificación de AGP de suero humano mediante diferentes métodos, comparándose su efectividad en función de su validez para realizar el análisis de AGP por CE. Las muestras se han analizado por diferentes modos de CE (CZE y CIEF), que se han desarrollado también en este trabajo. Se sabe que las isoformas de glicoproteínas separadas por CE, normalmente, migran muy cerca

las unas de las otras porque las diferencias en su relación carga/masa son pequeñas. Cuando esto ocurre, como ya se ha descrito en el Capítulo 1, las diferencias en el tiempo de migración entre bandas consecutivas pueden estar en el mismo intervalo que la dispersión del tiempo de migración para una banda dada. Por tanto, la asignación de bandas podría realizarse incorrectamente. Este hecho es particularmente importante cuando se estudia el papel de las isoformas de una glicoproteína como marcadores de cierta enfermedad. En ese caso, la asignación correcta de bandas resulta crucial porque es el paso previo para la comparación de los perfiles electroforéticos entre muestras. Por tanto, en este capítulo, además de desarrollar métodos de separación de AGP por CZE y CIEF, se ha utilizado el programa estadístico, descrito en el Capítulo 1 de esta Memoria, para elegir los parámetros de migración más fiables en cada método para asignar las bandas de AGP inequívocamente. Este paso es fundamental antes de la comparación cualitativa y cuantitativa entre muestras.

2.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo del trabajo descrito en este capítulo es el desarrollo de un método de CZE y un método de CIEF para la separación de formas de AGP que permita comparaciones fiables cualitativas y cuantitativas de AGP procedente de diferentes muestras de suero humano, purificadas mediante diferentes métodos. Esta separación de formas de AGP puede ser útil para estudiar la validez del perfil electroforético de esta proteína como marcador de ciertas enfermedades.

Para llevar a cabo este objetivo se diseñó el siguiente plan de trabajo:

1. Desarrollo de un método de CZE para la separación de bandas de AGP patrón.
2. Aplicación a la separación de formas de AGP procedente de muestras de suero y purificadas con diferentes métodos de extracción.
3. Selección de parámetros de migración exactos para la asignación de bandas de AGP analizadas por CZE.
4. Comparación cuali y cuantitativa de muestras de AGP extraídas con los diferentes métodos y separadas por CZE. Selección del mejor método de extracción de AGP de suero.
5. Desarrollo de un método de CIEF para la separación de bandas de AGP patrón.
6. Selección de parámetros de migración exactos para la asignación de bandas de AGP analizadas por CIEF.
7. Comparación cualitativa y cuantitativa de muestras de AGP extraídas con el método seleccionado en el punto 4 del plan de trabajo y analizadas mediante CIEF.

2.3 PARTE EXPERIMENTAL

2.3.1. Reactivos

1,4-diaminobutano (putrescina) (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Acetato sódico (AcNa) (Merck, Darmstadt, Alemania).

Acetona (Merck).

Ácido acético (AcH) (Merck).

Ácido fosfórico (H_3PO_4) (Merck, Darmstadt, Alemania).

Ácido perclórico ($HClO_4$) (Merck).

Agua Milli-Q (Millipore, Molsheim, France).

Alanina (Sigma, St. Louis, MO, USA).

Albúmina de suero humana (HSA) (Sigma).

Anfolitos en intervalo de pH 2,5-5 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Suecia).

Anfolitos en intervalo de pH 2-4 (Serva, Heidelberg, Alemania).

Anfolitos en intervalo de pH 3-10 (Pharmacia Biotech).

Anfolitos en intervalo de pH 3-5 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Brij 35® (Merck).

Cloruro sódico (NaCl) (Merck).

Gel de isoelectroenfoque capilar (cIEF gel) (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA).

Hidróxido sódico (NaOH) (Merck).

Inhibidor de tripsina (TI) (Sigma).

Pepsina (Fluka, Buchs, Suiza).

Pepsinógeno (Sigma).

Péptido CCK (Bachem, Weil am Rhein, Alemania).

Tetrametiletilendiamina, TEMED (Schwarz, Mann Biotech, Cleveland, Ohio, USA).

Tricina (Sigma).

Urea (Sigma).

2.3.2 Muestras

Para el desarrollo de los métodos de CZE y CIEF, se usó AGP humana comercial (Sigma), extraída de plasma humano. Esta muestra comercial se denominará “patrón” a lo largo del capítulo.

Se utilizaron cuatro muestras de AGP de diferentes sueros, que fueron purificadas y generosamente donadas por el Profesor Tibor Kremmer (Instituto Nacional de Oncología, Budapest, Hungría). La purificación se realizó siguiendo el método descrito en la sección de Preparación de las muestras de este apartado. Las muestras correspondieron a la AGP extraída del suero de dos donantes sanos (a partir de ahora, AGP de sano (I) y AGP de sano (II)), de una mezcla de sueros de pacientes con cáncer de ovario (a partir de ahora, AGP de cáncer de ovario) y de una mezcla de sueros de pacientes con leucemia (a partir de ahora, AGP de leucemia). Para el análisis de la AGP por CZE, se contó con 1 muestra de AGP del individuo sano y las 2 muestras de cáncer de ovario y leucemia. Para el análisis de la AGP por CIEF, se contó con las 2 muestras de los sanos y las 2 muestras de cáncer de ovario y leucemia, respectivamente.

Además, se utilizaron 6 muestras de AGP obtenidas, purificadas y generosamente donadas por la Dra. M. Val Toledo del Hospital Ramón y Cajal (Madrid) con los métodos que se detallan en la sección Preparación de las muestras de este Capítulo. Los sueros procedían de 3 donantes sanos (2 hombres, 1 mujer) y 3 pacientes con cáncer de vejiga (2 hombres, 1 mujer). Estas muestras se analizaron por CZE.

2.3.3 Preparación de las muestras

Extracción de AGP de suero

Las muestras donadas por el Profesor Tibor Kremmer fueron preparadas siguiendo el procedimiento que se describe a continuación [21]. El suero se diluyó en agua a 0°C y se extrajo con cloroformo-metanol mediante agitación vigorosa y centrifugación. La fase metanol-agua (en la que se encontraba la AGP) se precipitó con 2 volúmenes de etanol a 0°C, y el precipitado se disolvió en un buffer de bis-tris-propano 25 mM, pH 7,5. Esta disolución se pasó por una columna de intercambio

iónico. A la fracción eluída de esta columna que contenía la AGP se le eliminaron las sales en una columna de Sephadex. Las trazas de otras proteínas, principalmente albúmina, se eliminaron en una columna Fractogel-Blue. Las muestras se liofilizaron y guardaron a 4 °C. La pureza de las muestras se controló mediante su análisis por SDS-PAGE. Las muestras llegaron a nuestro laboratorio en forma liofilizada. Este método de extracción se ha denominado en este capítulo método “cloroformo-metanol completo”. Para el análisis por CZE se pesaron y disolvieron en agua hasta concentraciones de 2 mg/mL. Para su análisis por CIEF, la concentración de la AGP de muestras de sanos y enfermos en la denominada mezcla de muestra fue de 1,5 mg/mL.

Con respecto a las muestras procedentes del Hospital Ramón y Cajal, se llevaron a cabo dos métodos diferentes de extracción con dos alícuotas del suero de uno de los donantes sanos. La comparación de las muestras obtenidas con ambos métodos se realizó mediante el análisis de éstas por el método desarrollado de CZE. El resto de muestras procedentes del Hospital Ramón y Cajal se purificaron con el método seleccionado como más adecuado entre estos dos, como se detallará en Resultados y Discusión.

El primer método utilizado con este suero control es una versión simplificada del método de extracción “cloroformo-metanol completo”. De ese modo, 1 mL de suero se diluyó con 3,5 mL de agua a 0°C y se extrajo con 15 volúmenes (67,5 mL) de cloroformo-metanol (2:1) mediante agitación vigorosa en frío (0°C) durante 40 min. Tras centrifugar a 1000 g a 4°C, se recuperó la fase metanol-agua. La AGP se precipitó entonces con 2 volúmenes de etanol a 0°C, y el precipitado obtenido se resuspendió en 100 µL de PBS 100 mM a pH 5,8. Este método se ha denominado en este capítulo método “cloroformo-metanol corto”.

El segundo método de extracción de AGP del suero control se llevó a cabo añadiendo, a 3 mL de suero, 5 mL de HClO₄ 0,5 M. Esta mezcla se agitó en un vórtex durante 20 segundos y se centrifugó a 3000 g durante 20 min a temperatura ambiente. El sobrenadante, se almacenó a 4°C hasta que se lavó y concentró para su análisis por CZE (con un tiempo máximo de almacenamiento, salvo que se indique lo contrario, de 2 horas). Este método se ha denominado en este capítulo método “perclórico”.

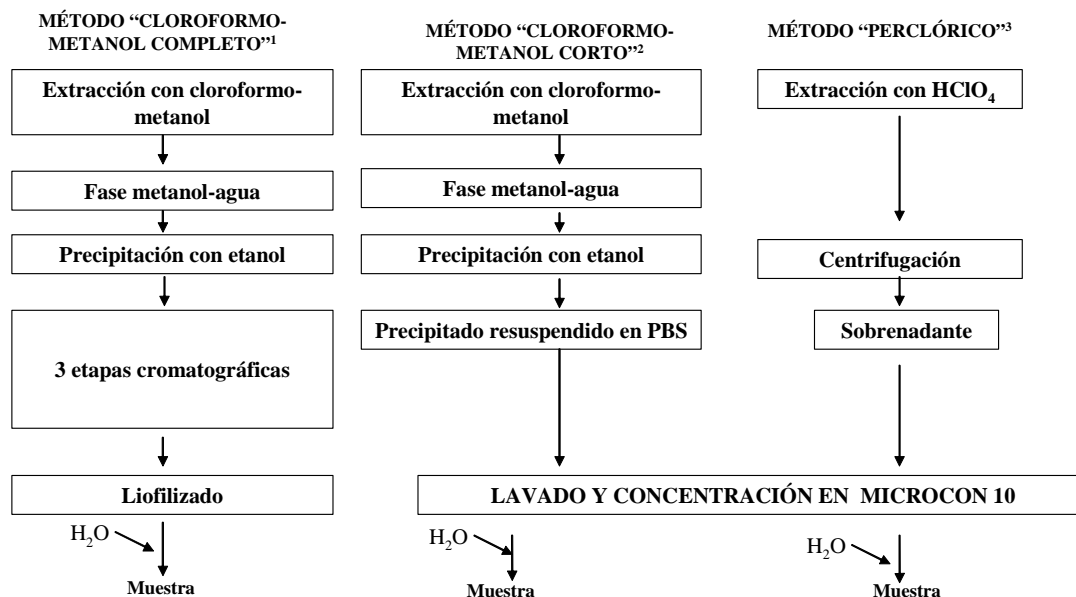
Lavado y concentración de las muestras

Las muestras preparadas en el Hospital Ramón y Cajal (mediante los métodos “cloroformo-metanol corto” y “perclórico”) se lavaron y concentraron en Microcones 10 previamente pasivados. La pasivación se realizó para evitar la adsorción no específica de las proteínas a las paredes de plástico de los dispositivos [23]. Para ello, se añadió al dispositivo de filtración una disolución de Brij 35 al 5% (p/v) y se mantuvo en el Microcon durante 12 horas [24]. Pasado ese tiempo se eliminó el exceso de pasivante enjuagando por duplicado el Microcon con 500 μL de agua. Por último, se pasaron 500 μL de agua a través de la membrana centrifugando a 14000 g durante 30 min, invirtiendo posteriormente el dispositivo y centrifugando a 1000 g durante 3 min para eliminar el agua que quedaba en la membrana.

El lavado y concentración de la muestra se realizó partiendo de un volumen inicial de muestra de 1 mL (excepto para la muestra de AGP extraída con el método del “cloroformo-metanol corto”, de la que se disponía sólo de 150 μL procedentes de los 100 μL de PBS más el precipitado). Así, inicialmente se centrifugaron a 14000 g durante 50 min 500 μL de cada una de las muestras (volumen máximo del Microcon). Después, se añadieron los otros 500 μL de cada extracto y se centrifugaron durante 50 min adicionales. Para lavar la muestra, se añadieron 200 μL de agua al Microcon y se centrifugó durante 30 min. Para recuperar la muestra (lavada y concentrada), se invirtió el Microcon y se centrifugó a 1000 g durante 3 min. Para aumentar la recuperación de proteína, se añadieron a la membrana del Microcon 5 μL de agua, se invirtió y se centrifugó a 1000 g durante 3 min. Al volumen de muestra recuperado se le añadió el agua Milli-Q necesaria para llegar a un volumen final de 20 μL . Estas muestras así preparadas se analizaron posteriormente por CZE.

En el caso de la AGP extraída con el método “cloroformo-metanol corto”, la muestra se centrifugó durante 50 min a 14000 g, se lavó con 200 μL de agua Milli-Q y se centrifugó durante 30 min a 14000 g. El proceso de recuperación por inversión del dispositivo fue el mismo que el descrito para las muestras extraídas con HClO_4 . Esta muestra se analizó posteriormente por CZE.

Un resumen de los protocolos de preparación de muestra realizados y comparados en este capítulo puede verse en la **Figura 2.1**.



¹ Muestras: 2 sueros de individuos sanos y 2 mezclas de sueros de pacientes con cáncer de ovario y pacientes de leucemia, respectivamente.

² Muestras: 1 suero de individuo sano.

³ Muestras: 4 sueros de individuos sanos y 4 sueros de pacientes con cáncer de vejiga.

Figura 2.1. Esquema de los protocolos de extracción de AGP de suero.

2.3.4 Dispositivos e instrumentación

El equipo de electroforesis capilar utilizado fue un PACE 5500 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). La adquisición y análisis de datos se realizó en un ordenador AMC 486 con la versión 8.1 del software System Gold (Beckman Instruments).

En el caso del desarrollo del método de separación de AGP por CZE, los capilares empleados en este trabajo fueron de sílice fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ), sin recubrimiento interno, con una longitud total (L) de 77 y 87 cm, y una longitud efectiva (l) de 70 y 80 cm, respectivamente. El diámetro externo del capilar fue de 375 μm y el diámetro interno (i.d.) de 50 μm .

El acondicionamiento inicial de los capilares de sílice fue el mismo que el descrito en el Capítulo 1 de esta memoria. Por otro lado, el lavado entre inyecciones

consistió en 5 min de lavado (20 p.s.i.) con agua Milli-Q, 15 min con NaOH 0,1M, 5 min con agua Milli-Q y 10 min con el tampón de separación. Al final del día de trabajo, esta secuencia de lavado se repitió, sustituyendo el lavado con tampón de separación por una etapa de secado del capilar durante 3 min con N₂. La temperatura del capilar durante la separación fue de 35°C, la detección se llevó a cabo a 214 nm y el voltaje de separación, que se indicará en cada caso, dependió de la longitud del capilar.

En el desarrollo del método de separación de AGP por CIEF, se utilizaron capilares recubiertos de poliacrilamida (PAA) (Beckman) y dos capilares recubiertos de alcohol polivinílico (PVA) de distintas casas comerciales (Beckman y Agilent Technologies (Palo Alto, CA, USA)). En adelante, los capilares recubiertos de PVA procedente de estas dos casas comerciales se denominarán capilar recubierto de PVA de tipo 1 y capilar recubierto de PVA de tipo 2, respectivamente. En todos los casos, la longitud de los capilares fue de 27 cm (l=20 cm) y el i.d. de 50 µm. La temperatura del capilar durante la separación se fijó en 20°C y la longitud de onda de detección en 280 nm.

Los acondicionamientos previos de los capilares se realizaron siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Así, todos ellos se lavaron por alta presión (20 p.s.i.) durante 2 min con H₃PO₄ 10 mM y 10 min con agua Milli-Q.

Los lavados entre inyecciones fueron los mismos para los tres tipos de capilares: se lavaron (20 p.s.i.) durante 2 min con H₃PO₄ 10 mM, 2 min con agua Milli-Q y 3 min con CIEF gel.

Al final de cada jornada de trabajo, cada capilar se lavó y almacenó con un protocolo distinto, según las instrucciones del fabricante. Los capilares de PAA (Beckman) se lavaron durante 2 min con H₃PO₄ 10 mM, 10 min con agua Milli-Q y 3 min con CIEF gel. Los extremos del capilar se introdujeron en CIEF gel y se almacenó a 4 °C. Los capilares de PVA de tipo 1 se lavaron durante 2 min con H₃PO₄ 10 mM y 10 min con agua Milli-Q. Los extremos del capilar se introdujeron en agua y se almacenó a 4°C. El capilar de PVA de tipo 2 se lavó durante 2 min con H₃PO₄ 10 mM, 10 min con agua Milli-Q y 3 min con N₂ y se almacenó a temperatura ambiente.

Los sistemas de microconcentración que se usaron fueron de un tamaño de corte de 10 kDa (Microcon 10, Amicon, Beverly, MA, USA).

La centrífuga utilizada fue una Biofuge Strato (Heraeus, Hanau, Alemania).

2.3.5 Procedimiento para la separación de formas de AGP por CZE y por CIEF

Separación de formas de AGP por CZE

El tampón de separación inicial fue el mismo que el utilizado para la separación de EPO por CZE descrito en el Capítulo 1 de esta memoria. El tampón estuvo compuesto de Tricina 0,01 M, NaCl 0,01 M, AcNa 0,01M, urea 7 M y putrescina 3,9 mM. El pH se fijó en 5,5 mediante adición de AcH 2M. Este tampón se filtró con un filtro Millex LCR (Millipore, Bedford, MA, USA) de 0,5 μ m. A lo largo del estudio se realizó una optimización de distintos parámetros que afectan a la separación electroforética, tales como la concentración de putrescina como recubrimiento dinámico, el pH del tampón y la longitud del capilar.

Separación de formas de AGP por CIEF

Se realizó un estudio y optimización de distintos parámetros que afectan a la separación por CIEF de formas de AGP. Se estudiaron dos modos diferentes de CIEF: “one-step CIEF” y “two-step CIEF”, descritos en la Introducción General de esta Memoria.

En esta Memoria se ha llamado “mezcla de muestra” al conjunto de AGP, anfolitos y demás compuestos que puedan añadirse (urea, NaCl, patrones internos y prolongadores de pH) disueltos en CIEF gel con que se llena el capilar antes de aplicar el voltaje de enfoque. Para su preparación, al gel se le añadió la urea y se filtró (0.22 μ m, Millex-GV, Millipore, Bedford, MA, USA). Tras la filtración, se añadieron el resto de componentes de la mezcla de muestra. Ésta se inyectó siempre a 20 p.s.i. durante 2 min para que el capilar se llenara por completo.

En el caso del desarrollo del método de “one-step CIEF” se aplicó 20 kV cuando la mezcla de muestra estaba en el capilar y se esperó a que las bandas de AGP

atravesaran la ventana de detección. Para este método, se estudió el efecto de diversos “gradient extenders” o “prolongadores de gradiente”, además de la influencia de la polaridad sobre la separación de AGP y el efecto de la naturaleza del catolito. Se utilizaron capilares recubiertos de PAA.

En el caso del desarrollo del método de “two-step CIEF”, se realizó un enfoque (para el que se optimizó el tiempo) a 20 kV y transcurrido el tiempo de enfoque se llevó a cabo la etapa de movilización mediante aplicación de presión (0,5 p.s.i.) en el lado del ánodo mientras se mantuvo el voltaje. Además, se estudió la influencia de la naturaleza del catolito, de la presencia de urea y NaCl en la muestra, de los anfolitos (intervalo de pH, porcentaje total, y proporción de cada uno), del tiempo de enfoque, y del comportamiento de los capilares recubiertos de PVA de los dos tipos sobre la separación de bandas de AGP. La precisión del análisis cualitativo se estudió mediante la separación de AGP con distintos patrones internos incluyendo como referencia el frente del anolito (AF). El AF corresponde al salto pronunciado en la absorbancia que se produce cuando el anolito atraviesa el detector.

2.3.6 Asignación de bandas de AGP separadas por CZE y por CIEF

El programa estadístico desarrollado y descrito detalladamente en el Capítulo 1 se utilizó para seleccionar los parámetros de migración más adecuados en la asignación de bandas electroforéticas de AGP separadas en un método de CZE y en un método de CIEF. La forma de utilización del programa fue la “Aproximación interna” porque, como quedó descrito en ese capítulo, esta aproximación resultó más robusta que la “Aproximación externa”. En la “Aproximación Interna” se comparan inyecciones realizadas el mismo día y con las mismas variables en el método de separación y las muestras son analizadas en el mismo capilar y equipo.

Los parámetros de migración estudiados en la separación de bandas de AGP por CZE fueron el tiempo de migración y aquéllos con los que se obtuvieron mejores exactitudes en la asignación de bandas de EPO:

P1: Tiempo de migración de cada forma de AGP (t_m)

P2: Movilidad electroforética de cada forma de AGP (μ_{eff})

P3: Tiempo de migración de cada forma de AGP relativo al tiempo de migración del flujo electroosmótico (t_m/t_{EOF})

Los parámetros de migración estudiados con el programa estadístico para la separación de bandas de AGP por CIEF fueron:

P1: Tiempo de migración de cada banda de AGP (t_m). Se entiende por tal al tiempo que transcurre desde la aplicación de voltaje hasta que un determinado pico electroforético atraviesa el detector, e incluye el tiempo transcurrido en el enfoque y en la movilización. Rigurosamente, en CIEF no debería hablarse de tiempo de migración porque los analitos, en el enfoque, pierden su movilidad y en la movilización hidrodinámica son empujados hasta el detector mediante presión.

P2: Tiempo de migración de cada banda de AGP relativa al tiempo de migración del inhibidor de tripsina (t_m/t_{TI}).

P3: Tiempo de migración de cada banda de AGP relativa al tiempo de migración del péptido CCK (t_m/t_{CCK}).

P4: Tiempo de migración de cada banda de AGP relativa al tiempo de migración del frente del anolito (AF) (t_m/t_{AF}).

Recuérdese que, en esta metodología de asignación, el término “exactitud” se refiere al porcentaje de asignaciones correctas obtenidas con cada parámetro de migración. Además, para simplificar la comparación de resultados, el programa calcula una media de la exactitud obtenida con cada parámetro de migración para todas las bandas de AGP de una muestra dada.

2.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.4.1 Análisis de AGP por CZE

2.4.1.1 Desarrollo de un método de separación de AGP patrón por CZE

El tampón inicial para tratar de separar formas de AGP fue el utilizado para la separación de EPO (ver Capítulo 1 de esta Memoria). El motivo de ello fue que ambas proteínas tienen algunas propiedades físico-químicas muy similares. Ambas son ácidas (pI AGP: 1,8-3,8 [1, 3] y pI EPO: 3,8-4,7 [25]) y con pesos moleculares similares (AGP: 41-43 kDa [1] y EPO: 34-39 kDa [26]). De la misma manera, tanto la longitud del capilar (L= 87 cm) como el voltaje (25 kV) empleados inicialmente fueron los mismos que en la separación de EPO. Como puede verse en el electroforegrama **a**) de la **Figura 2.2**, este tampón no permitió separar formas de AGP. Este resultado indicó que, aunque algunas características de las dos proteínas eran similares, sus diferencias conducían a comportamientos diferentes en unas mismas condiciones de separación. Por tanto, fue necesario realizar modificaciones en el tampón para conseguir resolver isoformas de AGP.

Se incrementó la concentración de putrescina en el tampón para reducir el flujo electroosmótico y tratar de disminuir la adsorción de la proteína a los silanoles libres de la pared del capilar, sin conseguir una mejora de la separación. Sin embargo, al bajar el pH del tampón de 5,5 a 4,5 se obtuvo una separación a línea de base de 8 isoformas de AGP patrón (electroforegrama **b** de la **Figura 2.2**). Continuando con la optimización del método de separación, se aumentó la intensidad del campo eléctrico acortando el capilar a 77 cm. Esta modificación permitió acortar el tiempo de análisis sin una pérdida importante de la resolución (electroforegrama **c** de la **Figura 2.2**). Estas condiciones analíticas fueron las utilizadas en los siguientes experimentos.

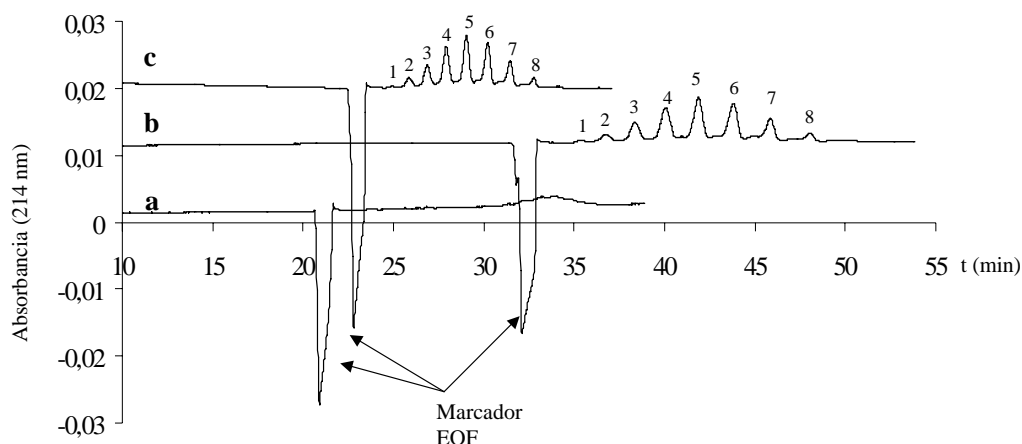


Figura 2.2. Electroforegramas de CZE del patrón de AGP humana. Condiciones analíticas: Electroforegrama **a**) capilar no recubierto, $L=87\text{cm}$ ($l=80\text{ cm}$), i.d. $50\ \mu\text{m}$. Tampón de separación: Tricina $0,01\ \text{M}$, NaCl $0,01\ \text{M}$, AcNa $0,01\ \text{M}$, urea $7\ \text{M}$, putrescina $3,9\ \text{mM}$, pH : $5,5$. Temperatura de separación: 35°C ; voltaje: 25kV ; inyección por presión ($0,5\ \text{p.s.i.}$) durante $30\ \text{segundos}$ ($\text{AGP}:1\text{mg/mL}$); detección: $214\ \text{nm}$. Electroforegrama **b**) pH del tampón de separación: $4,5$. Resto de condiciones analíticas como en electroforegrama a. Electroforegrama **c**) $L=77\text{cm}$ ($l=70\ \text{cm}$). Resto de condiciones analíticas como en electroforegrama b.

Si se tienen en cuenta las múltiples glicofomas de AGP existentes, además de las diferentes variantes genéticas de la misma, la combinación de ambas heterogeneidades da lugar a múltiples formas de AGP. Como se ha mencionado en la introducción, en un suero normal pueden detectarse entre 12 y 20 glicofomas (sin tener en cuenta las variantes genéticas) [1]. Por tanto, es muy probable que en una misma banda electroforética o isoforma de las obtenidas con este método de CZE exista más de una forma de AGP.

2.4.1.2 Análisis de AGP de muestras preparadas por el método “cloroformo-metanol completo”

La separación de bandas de AGP en las muestras de AGP de sano, AGP de cáncer de ovario y AGP de leucemia dio lugar a un perfil electroforético similar al obtenido para la AGP patrón, pero en las tres muestras procedentes de sanos (1 muestra) y enfermos (2 muestras) se obtuvieron 11 bandas en lugar de las 8 separadas en AGP patrón. Estas diferencias pueden deberse a que el método de purificación utilizado para la AGP patrón [27] no fue el mismo que el utilizado para las muestras procedentes de

sanos y pacientes con cáncer [21]. Una de las causas de los distintos patrones de glicosilación observados en muestras diferentes son los procedimientos de extracción [28, 29]. Por tanto, es muy importante destacar aquí que las muestras procedentes de individuos sanos y pacientes con cáncer que van a compararse en este capítulo se han agrupado para dicha comparación según su protocolo de extracción, eliminando así, en lo posible, la influencia de la preparación de la muestra sobre los resultados obtenidos. Los electroforegramas de las tres muestras extraídas con este método se dan en la **Figura 2.3**. Las concentraciones de AGP para las muestras estuvieron próximas a los 2 mg/mL. Posiblemente, la diferente composición del liofilizado de cada una de las muestras originó absorbancias ligeramente distintas para las tres muestras.

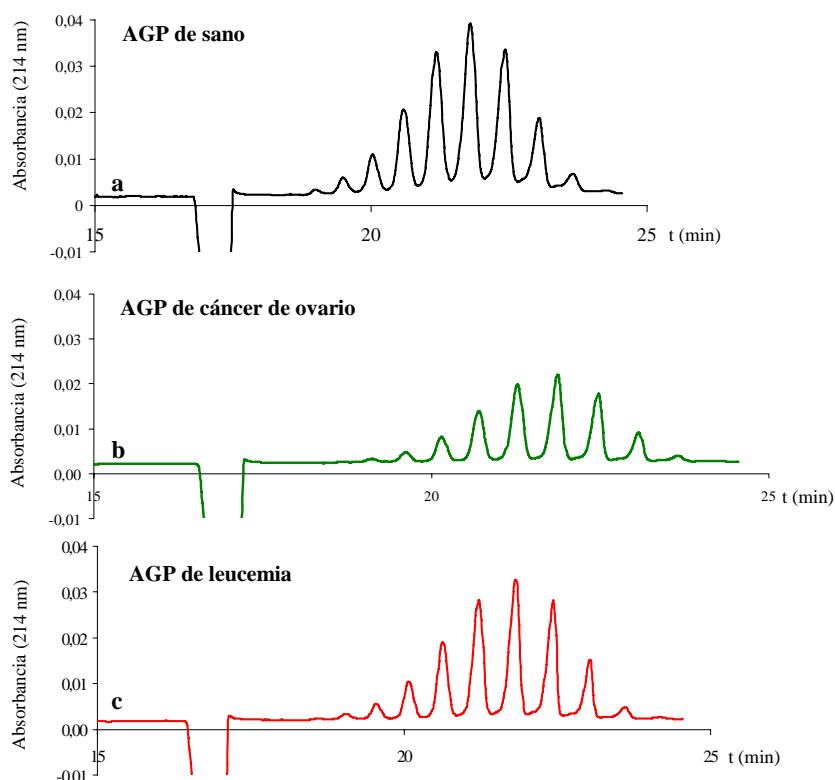


Figura 2.3. Electroforegramas de CZE obtenidos de muestras de AGP purificadas con el método “cloroformo-metanol completo”. Electroforegrama **a)** suero de un donante sano, electroforegrama **b)** sueros de pacientes con cáncer de ovario y electroforegrama **c)** sueros de pacientes con leucemia. Condiciones analíticas como en **Figura 2.2.c**.

2.4.1.3 Análisis de AGP de muestra de suero de un donante sano preparada con el método “cloroformo-metanol corto”

Como se ha descrito en la Parte experimental de este capítulo, el suero del donante sano utilizado en esta sección se sometió a un protocolo similar al realizado en el método “cloroformo-metanol completo” [21], pero prescindiendo de los pasos cromatográficos que se realizaban en ese método para eliminar otras proteínas, sobre todo la albúmina humana, y las sales. Por tanto, era de esperar que la muestra preparada según el método “cloroformo-metanol corto”, además de AGP, contuviera HSA y otras proteínas. El objetivo de esta preparación fue acortar el tiempo requerido para la preparación de la muestra.

El primer análisis de la muestra purificada según este método no dio lugar a ningún pico en 60 min (ni siquiera el marcador de EOF) (**Figura 2.4.a**). La experiencia en nuestro laboratorio para la separación de EPO por CZE es que, en presencia de HSA en la muestra, el tiempo de migración del EOF y de las bandas de EPO se retrasan de forma proporcional a la concentración de albúmina en la muestra [20]. Hasta concentraciones de HSA de 2 mg/mL, este retraso en el tiempo de migración de las bandas de EPO no impide la asignación correcta mediante el uso de la μ_{eff} como parámetro de migración. La interpretación que se dio a este fenómeno en nuestro laboratorio fue que, en esas condiciones de separación, la HSA se adsorbe a la pared del capilar, retrasando el EOF [20] pero no interfiriendo en la μ_{eff} de las bandas. Esta experiencia, junto con la sospecha de que con este método de preparación la muestra iba a contener HSA hizo que la muestra se diluyera a 1/5, primero, y a 1/6, después, de su concentración inicial para tratar de disminuir la influencia de la posible HSA. Como puede verse en la **Figura 2.4.b** y **2.4.c**, esta dilución permitió detectar el marcador de EOF en un tiempo de análisis cercano al de la separación de AGP sin HSA (**Figura 2.2**) y también permitió detectar las que probablemente son las bandas mayoritarias de AGP. Sin embargo, parece que con este método corto de extracción, la supuesta concentración de HSA es tal que impide el análisis de todas las isoformas de AGP. La relación AGP/HSA en la muestra hace que sea necesario diluir ésta demasiado para que la HSA no impida el análisis, llevando de ese modo la AGP a concentraciones demasiado bajas.

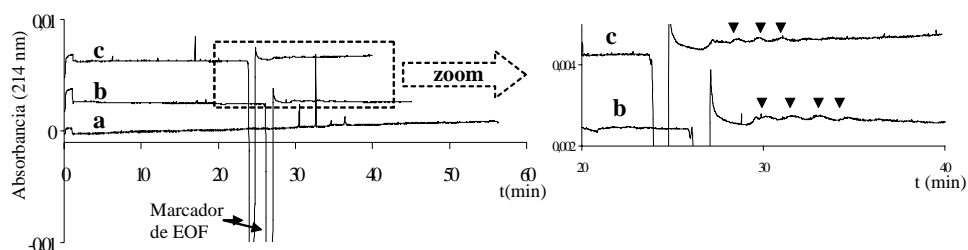


Figura 2.4. Electroforegramas de CZE de la muestra de AGP obtenida del suero de un donante sano con el método “cloroformo-metanol corto”. Electroforegrama **a**) muestra concentrada a 20 μ L. Electroforegrama **b**) Muestra de electroforegrama a diluida a 1/5. Electroforegra **c**) muestra de electroforegrama a diluida a 1/6. Resto de condiciones analíticas como en Figura 2.2.c. En el gráfico de la derecha se muestra una ampliación de los electroforegramas **b**) y **c**). Las flechas indican las posibles bandas de AGP detectadas.

Para apoyar experimentalmente la hipótesis de que la HSA retrasaba el análisis, debido a una disminución de EOF, se prepararon 3 muestras con distinta concentración de HSA y AGP patrón y se analizaron por CZE:

Muestra 1: 1 mg/mL AGP patrón.

Muestra 2: 0,5 mg/mL AGP patrón y 0,25 mg/mL HSA patrón.

Muestra 3: 1 mg/mL AGP patrón y 0,5 mg/mL HSA patrón.

Como puede verse en la **Figura 2.5**, la presencia de HSA retrasa los tiempos de análisis y dificulta la resolución de las bandas de AGP. Cuando la muestra contiene 0,5 mg/mL de HSA, el último pico de AGP tarda alrededor de 160 min. Por otro lado, la comparación de los electroforegramas de las muestras 2 y 3 parece indicar que no es la relación AGP/HSA lo que determina el análisis, sino la concentración total de HSA. En la muestra 2 y 3 dicha relación es la misma y sin embargo, la concentración de HSA en la muestra 2 es menor, permitiendo una separación más corta y mejor resuelta, comparándola con la muestra 3. Sin embargo, la resolución de la muestra 2 es ligeramente peor que la obtenida para la muestra 1, que no tiene HSA. Estos resultados son acordes con los obtenidos con la muestra de la **Figura 2.4**, donde se observó que una misma muestra diluída reduce los tiempos de análisis y mejora la resolución.

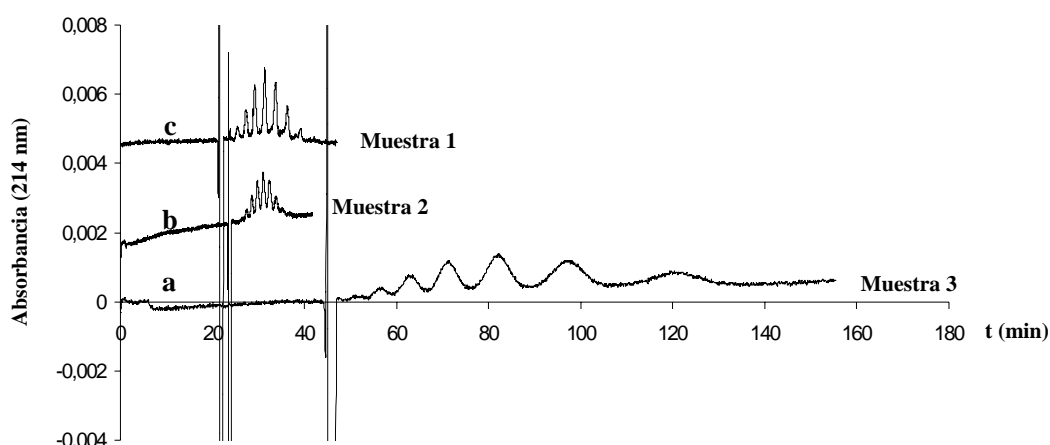


Figura 2.5. Electroforegramas de CZE que muestran el efecto de la HSA en la separación de AGP. Electroforegrama a), análisis de muestra de AGP 1 mg/mL y HSA 0,5 mg/mL. Electroforegrama b), análisis de muestra de AGP 0,5 mg/mL y HSA 0,25 mg/mL. Electroforegrama c), análisis de muestra de AGP patrón (1 mg/mL). Resto de condiciones analíticas como en Figura 2.2.c.

Además, en la publicación en la que se describe el método “cloroformo-metanol completo” [21], se menciona que en la extracción con cloroformo metanol se extrae, además de AGP, HSA. Sin embargo, los experimentos presentados en esta Memoria no han demostrado que en la muestra existe HSA de forma inequívoca. Por eso, al efecto de peor resolución de bandas de AGP y al aumento de los tiempos de análisis en ciertas muestras purificadas a partir del suero se le denominará a partir de ahora “efecto matriz”. En este efecto está incluida la posibilidad de que el retraso se deba a la HSA o a la coextracción del suero de otras proteínas o componentes del suero que disminuyan el EOF.

2.4.1.4 Análisis de AGP de muestras preparadas con el método “perclórico”

El método de extracción de AGP de suero utilizado en esta sección está basado en un método de extracción de AGP de plasma de neonatos publicado recientemente [22], basado en la precipitación de todas las proteínas del plasma en medio ácido (HClO_4) excepto la AGP. Este método, además de ser rápido, sencillo y requerir poco volumen de plasma (en nuestro caso, suero), es bastante específico para AGP. Los autores del artículo afirman que la HSA se elimina casi completamente en el paso de la precipitación de las proteínas con el perclórico (no así la AGP, que es extremadamente soluble en agua incluso cerca de su pI [22]).

Nuevamente, el análisis directo de la muestra dio lugar a largos tiempos de análisis (el marcador de EOF no se detectaba en más de 40 min) y en los que no consiguió detectarse AGP (**Figura 2.6.a**). Con la experiencia del retraso y empeoramiento de la resolución de las bandas de EPO y AGP separadas por CZE en presencia de HSA, se decidió diluir la muestra a 1/2, 1/3, 1/4, y 1/6 de la concentración inicial. Como puede observarse en la **Figura 2.6**, las diluciones dieron lugar a análisis más cortos conforme más diluida estaba la muestra (ver marcador de EOF) y a mejores resoluciones de AGP. Por tanto, se comprobó que, el método “perclórico” extrae AGP en cantidad suficiente (partiendo de 1 mL de suero) para ser analizada por CZE con detección UV. Es decir, el efecto matriz en este método no impide, como en el método “cloroformo-metanol corto”, el análisis de AGP en ciertas condiciones, a pesar de que es necesario diluir la muestra.

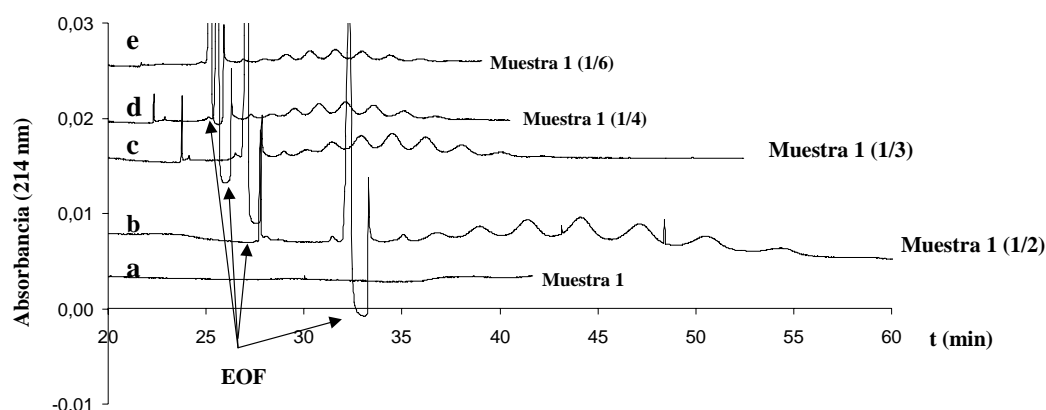


Figura 2.6. Electroforegramas de CZE de la muestra de AGP obtenida del suero de un donante sano con el método “perclórico”. Electroforegrama **a**) Muestra lavada y concentrada a 20 µL. Electroforegramas **b**), **c**), **d**) y **e**) Diluciones de la muestra de 1/2, 1/3, 1/4 y 1/6, respectivamente. Resto de condiciones analíticas como en Figura 2.2.c.

El análisis de AGP procedente del suero de un individuo sano preparada con este método dio lugar a 8 bandas de AGP. Sin embargo, como se ha descrito ya, la AGP de muestras preparadas mediante el método “cloroformo metanol completo” dio lugar a 11 bandas. Esta diferencia en el número de bandas de AGP puede deberse a varios factores. Por un lado, el resultado apunta de nuevo a la importancia del método utilizado para la purificación de las glicoproteínas, porque diferentes métodos de extracción pueden

purificar la misma glicoproteína pero con diferentes patrones de glicosilación [28, 29]. Otra posibilidad que debe tenerse en cuenta respecto al diferente número de bandas de AGP extraídas con ambos métodos, es que la concentración de AGP extraída con el método “perclórico” sea ligeramente menor que la obtenida con el método “cloroformo-metanol completo” y por tanto, el número de bandas observadas sea función de la concentración. Esta posibilidad no puede comprobarse con la muestra del método “perclórico” porque concentrar más la muestra impediría su resolución debido al efecto matriz. Por otro lado, cabe también la posibilidad de que esta separación de AGP en 8 bandas en lugar de 11 se deba a que el suero del individuo sano del que se ha purificado la proteína no es el mismo que el suero utilizado para extraer AGP con el “método cloroformo-metanol completo”. Por tanto, las diferencias en el perfil electroforético podrían deberse también a diferencias en la glicosilación de AGP entre individuos. Más adelante, en este capítulo, se estudiará si esta pérdida de bandas de AGP impide la comparación de AGP procedente de diferentes donantes.

Una vez comprobado que con el método “perclórico” era posible analizar AGP por CZE, el método se utilizó para purificar las muestras de suero de los 3 donantes sanos y los 3 pacientes con cáncer de vejiga disponibles. El tiempo en que este sobrenadante se almacenó a 4°C antes de lavarse y concentrarse en el Microcon 10 no sobrepasó las dos horas. En la **Figura 2.7** se muestran los electroforegramas obtenidos para cada uno de los sueros. Todos los análisis se realizaron diluyendo las muestras a 1/4 de su concentración inicial para minimizar el efecto matriz.

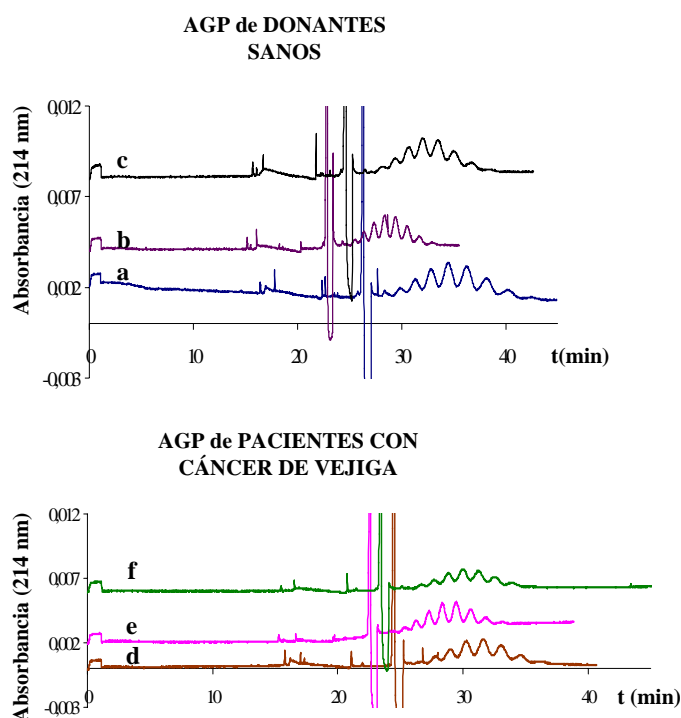


Figura 2.7. Electroforegramas de CZE de AGP purificada de suero mediante el método “perclórico”. Todas las muestras están diluidas a 1/4 de su concentración inicial. Electroforegramas **a)** y **b)** AGP de 2 donantes sanos hombres. Electroforegrama **c)** AGP de 1 donante sana. Electroforegramas **d)** y **e)** AGP de 2 pacientes con cáncer de vejiga hombres. Electroforegrama **f)** AGP de una paciente con cáncer de vejiga. Condiciones analíticas como en **Figura 2.2.c**.

En las muestras se observaron 8 bandas de AGP, en lugar de las 11 que se observan cuando ésta se extrae mediante el método “cloroformo-metanol completo”. La posibilidad de haber inyectado una muestra con concentración insuficiente para la detección de las 11 bandas y la imposibilidad de comprobarlo sin eliminar previamente la HSA de la muestra ya se ha discutido. Por otro lado, es interesante incidir en el hecho de que la matriz de cada una de las muestras puede ser diferente, y por tanto, el efecto matriz en cada una de las muestras ejerce una influencia distinta sobre la resolución y el tiempo de análisis. Los tiempos de análisis varían en cada muestra y las variaciones de EOF entre muestras también son notables. Esto podría deberse a la coextracción de diferentes concentraciones de HSA u otros componentes del suero en cada muestra. Por ejemplo, los niveles de HSA en sangre varían en cada paciente y lo mismo ocurre con la AGP, por lo que no es extraño que la concentración y la relación entre ambas afecte a la muestra obtenida. Este mismo razonamiento es válido para la coextracción de otras proteínas del suero. La importancia de este hecho sobre la

separación electroforética y la comparación entre muestras se discute en el apartado 2.4.1.8 de este capítulo.

2.4.1.5 Exactitud obtenida en la asignación de bandas de AGP patrón con los distintos parámetros de migración

Para estudiar cuál de los parámetros de migración seleccionados era el más robusto y proporcionaba la mejor exactitud en la asignación de bandas de AGP, se utilizó el programa estadístico desarrollado en el Capítulo 1. Este estudio se realizó con AGP patrón. Se compararon los tres parámetros de migración descritos en la Parte experimental de este capítulo en términos de la exactitud en la asignación obtenida con cada uno de ellos. Para ello, se analizaron cinco muestras de AGP con distintas concentraciones (0,25; 0,5; 1; 2 y 4 mg/mL) con el método de CZE desarrollado para su separación. Cada muestra se inyectó una vez al día y el ensayo se realizó tres días seguidos. El orden de las inyecciones de las muestras fue distinto cada día. El primer día, las diferentes muestras de AGP se analizaron en orden decreciente de concentraciones, el segundo día en orden creciente de concentraciones y en el tercero al azar. La razón de estudiar la exactitud obtenida con distintos parámetros de migración con muestras con distintas concentraciones de AGP tiene que ver con el uso futuro de este método de separación. Es posible que las muestras de AGP de sueros de pacientes y donantes sanos tengan diferentes concentraciones de la proteína. Es necesario, por tanto, estudiar si la concentración de la muestra influye sobre la exactitud de asignación con los distintos parámetros de migración. Por otro lado, el motivo de realizar las inyecciones en diferente orden de concentración cada día se debe a que el orden de inyección de las diferentes concentraciones de AGP podría afectar a la reproducibilidad del tiempo de migración de las diferentes isoformas de AGP. Se ha descrito que el grado de adsorción de proteínas a la pared del capilar es proporcional a la concentración de las mismas en las muestras analizadas [30], lo que modifica el potencial zeta también de forma proporcional a la cantidad de proteína adsorbida [31]. Si los lavados entre inyecciones no eliminaran completamente las moléculas de AGP potencialmente adsorbidas a la pared del capilar, el orden de inyecciones podría afectar a la reproducibilidad de los tiempos de migración.

En la **Tabla 2.1** se muestran los resultados de exactitud de asignación obtenidos con cada parámetro de migración para cada día de trabajo. Al igual que en los estudios con EPO, el tiempo de migración (parámetro P1) no fue un parámetro de migración exacto. La media de la exactitud obtenida en los tres días de trabajo estuvo entre 59,24 y 87,07%. Estas exactitudes tan bajas corresponden con valores de RSD (%) medios de entre 1,0 y 1,9% que son mejores que el 2% publicado por Kinoshita et al. [12] para su método de separación de AGP por CZE. Sin embargo, a pesar de que la reproducibilidad del tiempo de migración no es peor que la habitual, las exactitudes de asignación obtenidas con este parámetro de migración son más bajas de lo que sería deseable. Como se ha descrito ampliamente en el Capítulo 1, las variaciones que impiden que el tiempo de migración no sea un parámetro adecuado para la asignación de bandas electroforéticas suelen ser atribuidas a cambios en la movilidad del EOF [28, 32, 33]. A su vez, dichos cambios en el EOF pueden deberse a variaciones en el potencial zeta de la pared del capilar, en la viscosidad del medio y en la constante dieléctrica del medio de separación.

La exactitud obtenida con P2 (t_m/t_{EOF}) y P3 (μ_{eff}) fue cercana al 100% en los tres días de trabajo, el orden de inyección de las diferentes concentraciones no afectó a ninguno de los dos parámetros. Estos resultados muestran que ambos parámetros de migración son muy exactos para la asignación de bandas de AGP como se ha discutido en el Capítulo 1. La influencia de las variaciones en la movilidad electroosmótica sobre t_m/t_{EOF} están notablemente disminuidas porque esta variación afecta por igual a los dos términos del cociente (t_m y t_{EOF}) [28]. Por otro lado, la μ_{eff} sólo depende de las características del analito, del tampón, y de la temperatura (a través de su influencia sobre la viscosidad del medio) como puede verse en la ecuación 2.1, donde q es la carga del compuesto, r el radio del compuesto y η es la viscosidad del medio.

$$\mu_{eff} = \frac{q}{6\pi\eta r} \quad (2.1)$$

Tabla 2.1. Exactitud de asignación para cada banda de AGP y su media con los tres parámetros de migración estudiados para muestras de AGP patrón de diferentes concentraciones.

Banda de AGP	Día 1. Muestras de AGP analizadas en orden decreciente de concentración ^{a)}			Día 2. Muestras de AGP analizadas en orden creciente de concentración ^{b)}			Día 3. Muestras de AGP analizadas en orden de concentración al azar ^{c)}		
	P1 (t _m)	P2 (t _m /t _{EOF})	P3 (μ _{eff})	P1 (t _m)	P2 (t _m /t _{EOF})	P3 (μ _{eff})	P1 (t _m)	P2 (t _m /t _{EOF})	P3 (μ _{eff})
1	75,18	100	99,86	87,9	100	99,99	94,41	100	100
2	54,28	100	99,56	58,44	100	98,83	88,82	100	100
3	56,14	100	99,60	41,77	100	94,84	86,03	100	100
4	53,46	100	99,80	42,79	100	89,32	82,27	100	100
5	52,23	100	99,65	43,47	100	84,94	79,93	100	100
6	51,92	100	98,67	41,41	100	90,52	79,58	100	99,99
7	53,45	100	97,47	66,18	100	98,90	87,82	100	99,75
8	77,34	99,99	98,54	96,33	100	100	97,67	100	99,76
Media	59,24	99,99	99,14	59,78	100	94,66	87,07	100	99,93

^{a)} Orden de inyección: 4,0; 2,0; 1,0; 0,5; 0,25 mg/mL AGP.

^{b)} Orden de inyección: 0,25; 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/mL AGP.

^{c)} Orden de inyección: 4,0; 0,25; 1,0; 2,0; 0,5 mg/mL AGP.

2.4.1.6 Exactitud obtenida en la asignación de bandas de AGP de muestras preparadas con el método “cloroformo-metanol completo”

En el epígrafe anterior quedó demostrado la validez de los parámetros de migración P2 (t_m/t_{EOF}) y P3 (μ_{eff}) en la asignación de bandas de AGP independientemente de la concentración de ésta en la muestra (en el intervalo 0,25-4,0 mg/mL) y del orden de inyección de las muestras. Tras confirmar la utilidad de dichos parámetros de migración para patrones de AGP, éstos se utilizaron en la asignación de bandas de AGP de muestras preparadas con el método “cloroformo-metanol completo”. Estas muestras son desconocidas, por lo que el perfil electroforético de una muestra patrón no sirve para asignar las bandas de AGP como sucedía con las muestras de patrón de AGP con diferentes concentraciones. Este desconocimiento de la composición de las muestras estudiadas procedentes de individuos sanos y enfermos hizo que se

estudiara la exactitud de asignación obtenida con dos hipótesis distintas. La comparación entre hipótesis de asignación ha sido descrita en la sección 1.3.5.3 del Capítulo 1 de esta Memoria. En este caso, el electroforegrama de AGP procedente del suero del individuo sano se tomó como muestra de referencia.

En la primera hipótesis (hipótesis 1), se asumió que las once bandas de AGP obtenidas en cada una de las tres muestras procedentes de individuos sanos y enfermos eran las mismas. Es decir, el primer pico detectado en el electroforegrama de AGP de sano correspondería con el primer pico de las muestras de AGP de cáncer, el segundo con el segundo, y así sucesivamente. Los resultados de exactitud obtenidos con cada parámetro con esta hipótesis están reflejados en la **Tabla 2.2**.

Tabla 2.2. Exactitud obtenida para cada banda de AGP y exactitud media para todas las bandas en muestras de AGP de sano, AGP de cáncer de ovario y AGP de leucemia. Todas las muestras se inyectaron el mismo día y bajo las mismas condiciones analíticas.

Hipótesis 1: Todas las muestras tienen las mismas 11 bandas de AGP.

Banda de AGP	P1 (t_m)	P2 (t_m/t_{EOF})	P3 (μ_{eff})
A	84,14	83,65	81,33
B	76,92	77,94	73,25
C	71,02	60,94	55,98
D	58,19	48,50	43,16
E	58,19	65,52	58,78
F	55,86	67,78	59,63
G	52,51	68,29	59,06
H	48,08	66,78	56,44
I	43,79	63,70	52,83
J	40,03	61,01	49,71
K	69,15	79,96	72,22
Media	59,80	67,63	60,39

La exactitud con esta hipótesis empleando los parámetros P2 y P3 es mucho más baja que la obtenida con estos mismos parámetros para la AGP patrón, lo que apuntó hacia una asignación incorrecta de bandas de AGP, es decir, hacia una hipótesis

incorrecta. Además, en la bibliografía están descritos cambios en la parte glicosídica y aminoacídica de la AGP de pacientes con cáncer [4, 5, 7, 21], lo que daría lugar, posiblemente, a perfiles electroforéticos distintos de AGP en CZE. Estos dos hechos provocaron que se formulara una nueva hipótesis de asignación (hipótesis 2).

La hipótesis 2 consistió en asumir que las dos muestras de AGP de cáncer presentaban una banda extra de AGP (con mayor relación carga/masa) mientras que la AGP de sano presentaba otra banda de AGP extra distinta (con menor relación carga/masa). Como se observa en la Tabla 2.3, esta hipótesis da lugar a exactitudes de asignación muy elevadas cuando se utilizan P2 y P3 como parámetros de migración (medias mayores del 95%). Los valores de exactitud son muy similares a los obtenidos en la Tabla 2.1 para varias inyecciones de AGP patrón (para las cuales se tiene la certeza de estar asignando correctamente). Por tanto, esta hipótesis fue la que se consideró más adecuada para la asignación de bandas de AGP de estas muestras.

Como se puede observar en la Tabla 2.3, tanto el parámetro P2 (t_m/t_{EOF}) como el P3 (μ_{eff}) son parámetros de migración más eficaces en la asignación correcta de bandas de AGP que el tiempo de migración. Para ilustrar más claramente la implicación de la μ_{eff} , en la Figura 2.8 se han representado los electroforegramas de AGP de sano y AGP de leucemia con la movilidad electroforética en el eje de abcisas en lugar del tiempo de migración. Con esta representación, es posible observar diferencias en los perfiles electroforéticos de ambas muestras (ver zoom en **Figura 2.8**).

Tabla 2.3. Exactitud obtenida para cada banda de AGP y exactitud media para todas las bandas en muestras de AGP de sano, AGP de cáncer de ovario y AGP de leucemia. Todas las muestras se inyectaron el mismo día y bajo las mismas condiciones analíticas.

Hipótesis 2: Las muestras presentan algunas bandas de AGP diferentes entre sí.

Banda de AGP	P1 (t_m)	P2 (t_m/t_{EOF})	P3 (μ_{eff})
A	N.P.	N.P.	N.P.
B	69,21	98,17	99,70
C	68,71	88,45	92,07
D	66,80	83,38	88,36
E	67,29	92,50	96,00
F	68,27	98,72	100
G	68,75	98,95	100
H	68,27	99,05	100
I	67,04	98,73	100
J	65,53	97,09	99,99
K	61,47	95,65	99,80
L	79,10	97,73	99,81
Media	70,87	95,31	97,79

N.P.: No procede porque la banda A sólo existe en el donante sano.

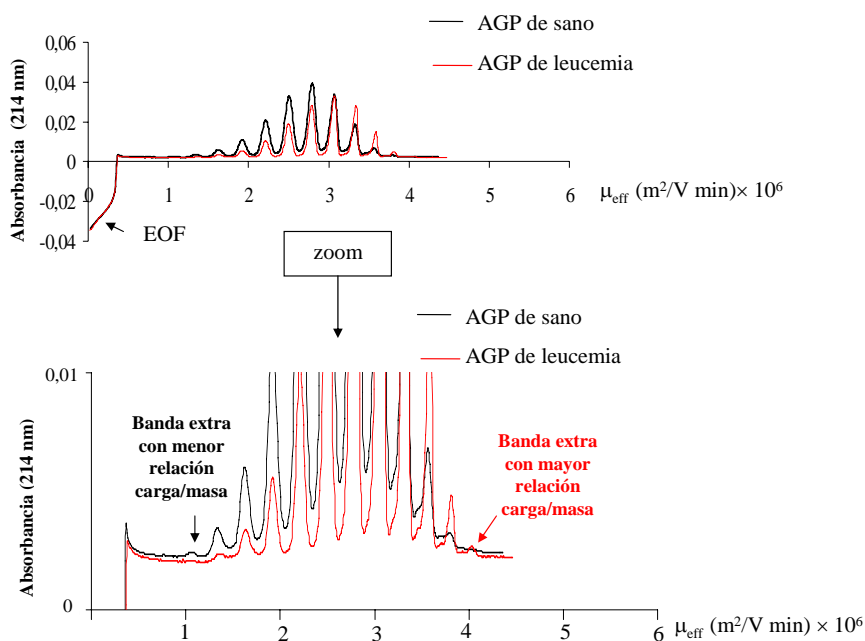


Figura 2.8. Electroforegramas de muestras de AGP de sano (línea negra) y de AGP de leucemia (línea roja). El eje de abcisas corresponde a la movilidad electroforética. Condiciones analíticas como en **Figura 2.2.c.**

En la **Figura 2.9** están representadas las muestras de AGP de sano y de cáncer de ovario con la μ_{eff} en el eje de abcisas. Como puede observarse, al igual que ocurre para el otro tipo de cáncer, los perfiles electroforéticos son distintos.

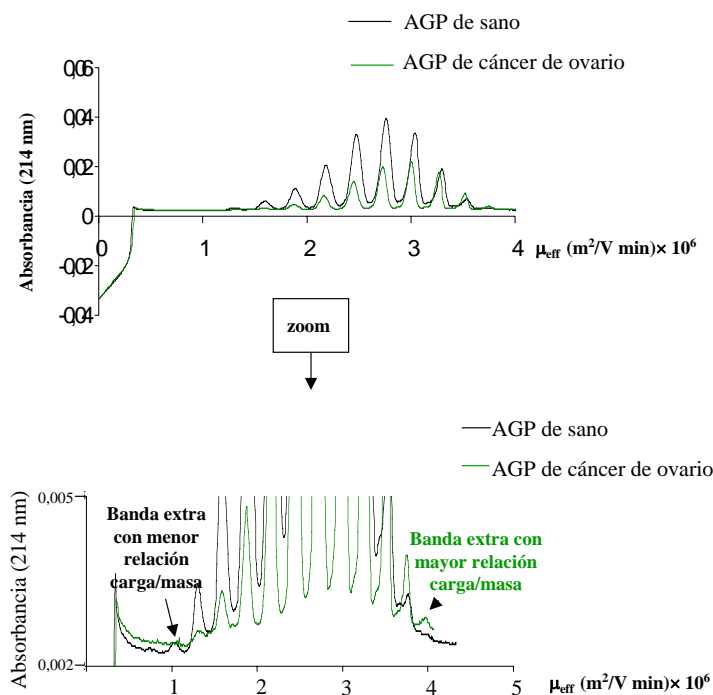


Figura 2.9. Electroforegramas de muestras de AGP de sano (línea negra) y de AGP de cáncer de ovario (línea verde). El eje de abcisas corresponde a la movilidad electroforética. Condiciones analíticas como en **Figura 2.2.c**.

En la **Figura 2.10** se representa un resumen de la forma de operar con AGP de muestras de distintos orígenes para realizar asignaciones fiables de bandas. Las tres muestras de AGP utilizadas en este apartado tienen bandas de AGP no asignadas con fiabilidad hasta que se utiliza el programa estadístico con los parámetros de migración adecuados y la hipótesis de asignación adecuada.

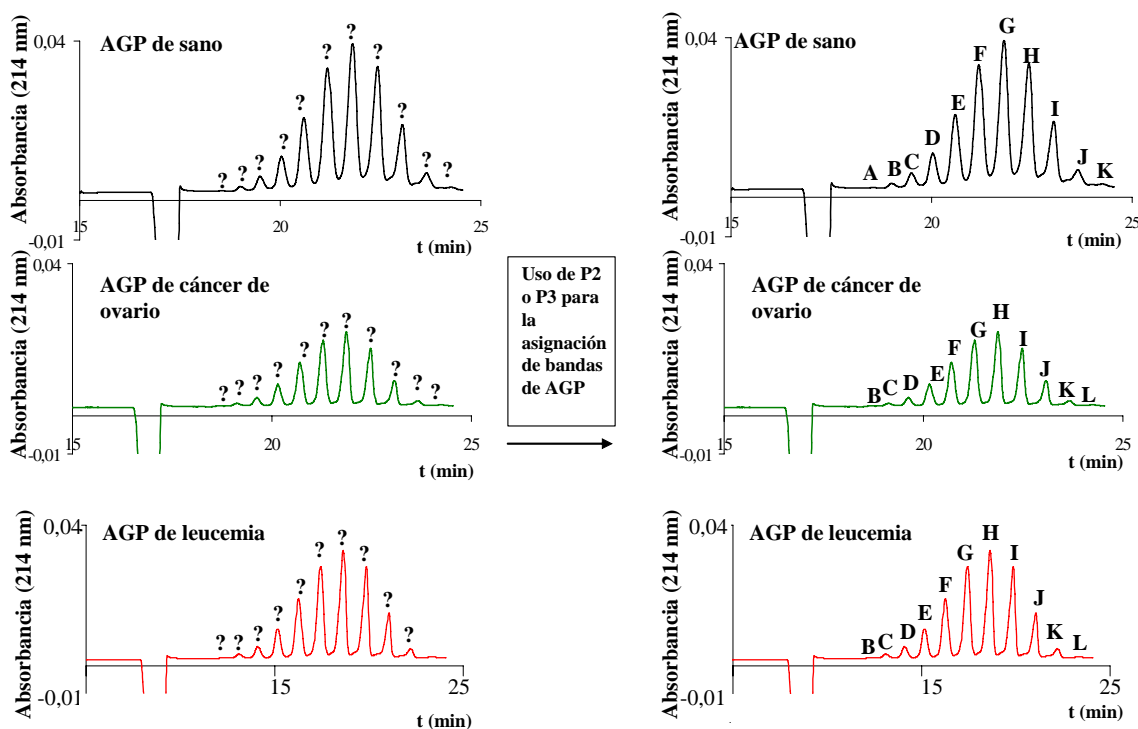


Figura 2.10. Representación esquemática de la forma de operar del programa de asignación en el caso de muestras de AGP de diferentes orígenes mediante P2 y P3.

Estos resultados están de acuerdo con lo publicado en diferentes artículos. Así, como ya se ha mencionado, se ha descrito que la glicosilación de AGP, y también la proporción de las variantes genéticas, experimentan cambios en los pacientes con cáncer frente a los individuos sanos [4, 5, 21]. Además, algunos artículos también describen aumento en el número de ácidos siálicos o de fucosas de las glicoproteínas en ciertos tipos de cáncer [34-37]. Un aumento en el número de ácidos siálicos en las formas de AGP daría lugar a formas más ácidas, observación que concuerda con los resultados de este trabajo para las dos muestras de AGP de distintos cánceres analizadas. La banda de AGP extra que se observa en ambas muestras de AGP de cáncer tiene una mayor relación carga/masa, lo que probablemente se debe a una mayor carga negativa total de la proteína, que a su vez podría relacionarse con un aumento de los ácidos siálicos en las formas de AGP. Por otro lado, la banda de AGP extra que se observa en la muestra del donante sano corresponde con una relación carga/masa menor, que podría estar relacionada con un menor grado de sialización de AGP.

2.4.1.7 Exactitud obtenida en la asignación de bandas de AGP de muestras preparadas con el método “perclórico”

Antes de poder comparar cualitativamente las muestras preparadas con este método, fue necesario realizar ciertas comprobaciones sobre la influencia del método “perclórico” en los electroforegramas obtenidos. Así, se realizaron varios experimentos para comprobar si el contacto de la AGP con el HClO_4 afectaba al perfil electroforético de la proteína. Además, se estudió si el efecto matriz de las muestras afectaba a la asignación correcta de bandas de AGP. Tras resolver estas incertidumbres, se procedió a la asignación de bandas de AGP de las diferentes muestras con el parámetro de migración adecuado.

Efecto del contacto de la AGP con HClO_4 sobre el perfil electroforético de la proteína

Se realizaron experimentos para estudiar el efecto del tiempo que la AGP permanece en contacto con ácido perclórico sobre su perfil electroforético. Para ello, una disolución de AGP patrón (1mg/mL, 1 mL) se acidificó con 2 mL de HClO_4 0,5 M, se agitó en el vortex durante 20 segundos, se centrifugó a 3000 g durante 20 min a temperatura ambiente (mismo tratamiento que se le realiza al suero con el método “perclórico”). Esta solución se dividió en dos alícuotas y una de ellas se almacenó a 4°C durante 2 horas antes de someterla al lavado y concentración en el Microcon 10, mientras que la otra se almacenó durante 96 horas antes de lavarla y concentrarla. Se seleccionó este tiempo tan prolongado para forzar la posible hidrólisis del ácido siálico, porque se quería observar el posible efecto de dicha hidrólisis en el perfil electroforético de AGP. En este caso, y debido a que la concentración de AGP en la muestra de partida era de 1 mg/mL, no fue necesario concentrar la muestra a 20 μL , sino que se llevó a 300 μL con agua Milli-Q.

El análisis por CZE de la muestra que había estado en presencia de HClO_4 durante dos horas se comparó con un análisis de AGP patrón disuelta en agua realizado el mismo día. Se estudió la exactitud obtenida en la asignación empleando como parámetros de migración t_m y μ_{eff} para la hipótesis de que las bandas de AGP de ambas muestras eran las mismas. La exactitud media de t_m para esa hipótesis fue de 81,34% y

la exactitud media para μ_{eff} fue de 99,74%. Por tanto, se consideró que el HClO_4 no afectaba a la distribución cualitativa de bandas de AGP cuando el contacto entre ambos fue de 2 horas, es decir, la AGP patrón que había permanecido en HClO_4 presentaba las mismas 8 bandas que la AGP patrón disuelta en agua.

El mismo análisis y comparación con una separación de AGP patrón en agua se realizó para la alícuota de AGP en HClO_4 almacenada a 4°C durante 96 horas, lavada y llevada a 300 μL con agua Milli-Q en un Microcon 10. De nuevo, se calculó la exactitud obtenida empleando t_m y μ_{eff} y la misma hipótesis de asignación (las ocho bandas observadas en la AGP almacenada 96 horas en perclórico eran las mismas 8 bandas que presentaba el patrón de AGP en agua). Los resultados de exactitud media con esta hipótesis para los parámetros de migración t_m y μ_{eff} fueron de 42,84% y 53,55%, respectivamente. Esta baja exactitud obtenida con μ_{eff} , que se ha demostrado como parámetro de migración exacto y robusto en otros análisis, hizo que se estudiara la exactitud obtenida con otra hipótesis: la muestra de AGP patrón en agua presentaba una banda más ácida que la muestra que ha estado con HClO_4 96 horas, mientras que esta última presenta una banda menos ácida. Los resultados para esta hipótesis para t_m y μ_{eff} fueron de 30,59 y 94,9%, respectivamente. La exactitud obtenida para μ_{eff} entra dentro de lo observado normalmente cuando la asignación de bandas se realiza correctamente. Por tanto, parece que un contacto prolongado de AGP en HClO_4 puede influir en su perfil electroforético, dando lugar a una banda más básica y, en general, una mayor proporción de bandas básicas que la AGP patrón en agua. La preparación de muestras de AGP de sueros con este método debería realizarse, según estas observaciones, evitando que la AGP esté en un medio con HClO_4 más de 2 horas. La hidrólisis ácida de las uniones glicosídicas de los ácidos siálicos ha sido descrita como una forma de liberar el ácido siálico de las glicoproteínas para su posterior estudio [38]. Es posible que dicha hidrólisis se produzca cuando la AGP está en contacto prolongado con HClO_4 , dando lugar a de AGP con menor número de ácidos siálicos y, por tanto, dando lugar en CZE a isoformas con menor relación carga/masa.

Influencia del efecto matriz sobre el perfil electroforético de AGP y sobre la asignación de bandas de la proteína

Como se ha comentado en el epígrafe 2.4.1.3, se ha observado un acusado efecto matriz (que afecta a los tiempos de análisis y a la resolución de las bandas de la muestra) en la AGP preparada mediante este método. Por tanto, es necesario comprobar si las variaciones en el efecto matriz, que posiblemente existen al comparar muestras de diferentes orígenes, interfieren en la exactitud de asignación de bandas utilizando parámetros de migración. Para ello, una muestra de AGP de un donante sano extraída con este método se analizó en diferentes diluciones (1, 1/2, 1/3, 1/4 y 1/6) (**Figura 2.6**). Al ser la misma muestra analizada en diferentes concentraciones, la asignación de bandas puede realizarse gracias al perfil electroforético (del mismo modo en que se realiza con la AGP patrón). De esta forma, la propia muestra sirvió de control para estudiar cómo influye la matriz en la exactitud de la asignación obtenida con los diferentes parámetros de migración. La exactitud media para t_m , t_m/t_{EOF} y μ_{eff} fue de 22,14%, 58,28% y 99,77%, respectivamente. El efecto matriz afectó a la exactitud del t_m/t_{EOF} , pero la μ_{eff} mantuvo una buena exactitud a pesar de que el tiempo de análisis de las diferentes diluciones de la muestra varió de 60 a 35 min (**Figura 2.6**). Un efecto similar se estudió en nuestro laboratorio para EPO en presencia de diferentes concentraciones de HSA. Sólo la μ_{eff} mantuvo la buena exactitud en la asignación de bandas de EPO en muestras con diferentes concentraciones de HSA [20]. El efecto matriz influye sobre el tiempo de migración del marcador de EOF, lo que puede ser atribuible a variaciones en la μ_{EOF} (el resto de parámetros: longitud del capilar (L), longitud efectiva (l) y voltaje aplicado (V) se mantuvieron constantes), como puede verse en la ecuación 2.2.

$$t_{EOF} = \frac{L}{V\mu_{EOF}} \quad (2.2)$$

Por su parte, la μ_{EOF} (ecuación 2.3) depende de la constante dieléctrica del medio de separación (ϵ_r), la permitividad en el vacío (ϵ_0), el potencial zeta (ζ) y la viscosidad del medio (η). Por tanto, el parámetro más susceptible de sufrir variación al variar la concentración de la muestra (y variar el efecto matriz) es el potencial zeta. Tampoco hay que descartar variaciones en la viscosidad en la interfase líquido-sólido de la pared del capilar debido a una adsorción de proteína que, a su vez, es función de la concentración de ésta en la muestra.

$$\mu_{EOF} = \frac{\varepsilon_r \varepsilon_0 \zeta}{\eta} \quad (2.3)$$

Por tanto, el potencial zeta puede variar entre muestras con distinta concentración de matriz. Esto explica que con t_m/t_{EOF} la exactitud con distintas diluciones de una misma muestra sea muy baja (el parámetro depende de μ_{EOF} , como puede verse en la ecuación 2.4). Sin embargo, con μ_{eff} , el porcentaje de asignación se mantiene cercano al 100% porque es independiente del μ_{EOF} , como puede verse en la ecuación 5.

$$t_m / t_{EOF} = \frac{V\mu_{EO}}{V(\mu_{eff} + \mu_{EO})} \quad (2.4)$$

$$\mu_{eff} = \frac{q}{6\pi r \eta} \quad (2.5)$$

Por tanto, para la asignación de bandas de AGP en las 6 muestras de suero extraídas con este método se utilizó μ_{eff} como el parámetro más exacto de asignación.

Asignación de bandas de AGP en las muestras preparadas con el método “perclórico”.

Para llevar a cabo la asignación de bandas de AGP preparadas por este método, se realizó un estudio de varias hipótesis de asignación. De entre las hipótesis de asignación estudiadas para estas 6 muestras (3 de sanos y 3 de enfermos), cabe destacar dos de ellas. La primera consistió en asumir que las 8 bandas de AGP observadas en las 6 muestras son las mismas (hipótesis A). En la segunda hipótesis (hipótesis B) se asumió que 5 de las muestras tenían las mismas bandas y la otra (la muestra de AGP de suero de un paciente con cáncer de vejiga) tenía una banda más básica y una menos ácida que el resto. En la Tabla 2.4 se detallan las exactitudes obtenidas para cada banda de AGP y la media de todas las bandas con cada hipótesis y utilizando μ_{eff} .

Las exactitudes obtenidas con la hipótesis B son cercanas al 100%, sin embargo, los resultados obtenidos no son tan fáciles de interpretar como los obtenidos con las muestras purificadas con el método “cloroformo-metanol completo”. Todas las muestras extraídas con perclórico presentan las mismas bandas, salvo una de las muestras de

AGP de un individuo con cáncer de vejiga, que carece de la banda más ácida y tiene una más básica que el resto de las muestras. Existen varias posibles explicaciones para estos resultados. La primera, que ya se ha comentado a lo largo de este capítulo, consiste en considerar que las muestras no están suficientemente concentradas y que por tanto, no se observan las bandas minoritarias, en las que en otras muestras (ver muestras extraídas con el “método cloroformo-metanol completo”) se han observado diferencias entre sanos y pacientes con cáncer. Desafortunadamente, comprobar esta hipótesis requiere

Tabla 2.4. Exactitudes de asignación obtenidas para las muestras preparadas con el método “perclórico” con dos hipótesis de asignación de bandas de AGP diferentes.

Banda de AGP	Hipótesis A (1)	Hipótesis B (2)
1	90,32	(4)
2	81,63	99,99
3	82,93	99,99
4	83,84	100
5	84,87	100
6	85,43	99,98
7	85,29	99,92
8	92,50	99,92
9	(3)	99,97
Media	85,85	99,97

(1) Todas las muestras tienen las mismas 8 bandas de AGP.

(2) Una de las muestras tiene una banda más básica y otra más ácida.

(3) En esta hipótesis sólo hay 8 bandas.

(4) No procede, sólo una de las muestras presenta esa banda.

eliminar previamente el efecto matriz de las muestras, pues concentrar la AGP en las muestras preparadas por el método “perclórico” supone acentuar el efecto matriz, que impide el análisis de la proteína de interés. La segunda posible explicación consiste en aceptar los resultados obtenidos, es decir, sólo una de las muestras de AGP de cáncer es significativamente distinta que las muestras de AGP de controles. La tercera explicación consiste en admitir que la preparación de la muestra haya purificado de forma selectiva ciertas bandas de AGP frente a otras, eliminando así las posibles diferencias entre muestras. Probablemente, los resultados obtenidos se deben a la combinación de varias de estas posibilidades. Se podrá conocer la explicación en el futuro, cuando se realice

una comparación más detallada de las muestras de AGP obtenidas con los diferentes métodos de extracción desarrollados en esta memoria.

2.4.1.8 Comparación cuantitativa de la AGP de las muestras preparadas mediante los diferentes métodos de extracción

Como se ha indicado, las diferencias cualitativas, cuando se han observado, entre muestras de AGP de sanos y pacientes afectados por cánceres se limitan a bandas minoritarias, que presentan poca absorbancia. Estas diferencias son tan sutiles que esas bandas podrían no haberse detectado. Con el fin de conseguir pruebas más sólidas de las diferencias entre muestras, el siguiente paso en este trabajo fue estudiar posibles diferencias cuantitativas entre las tres muestras de AGP. A simple vista, y una vez asignadas las bandas de AGP de forma exacta con el parámetro de migración adecuado, parecen existir diferencias cuantitativas entre las muestras. Como puede apreciarse, por ejemplo, en las Figuras 2.8 y 2.9, parece que, para las muestras de AGP purificadas según el método “cloroformo-metanol completo”, en las AGP de cánceres la proporción de las bandas de AGP con mayor relación carga/masa es mayor que en la AGP del donante sano. Sin embargo, para estudiar las diferencias cuantitativas es necesario determinar la variabilidad de las áreas entre inyecciones, para estudiar si esas diferencias entre muestras se deben realmente a variaciones significativas o simplemente a falta de reproducibilidad del método. Posteriormente, se compararán cuantitativamente las muestras analizadas y preparadas con los métodos “cloroformo-metanol completo” o “perclórico”.

Precisión del análisis cuantitativo para muestras de AGP patrón

El estudio de la reproducibilidad cuantitativa del método de CZE desarrollado para la separación de bandas de AGP se realizó con el porcentaje de área de cada banda de AGP frente al área total. De ese modo, es posible comparar directamente AGP en muestras de diferentes orígenes y por tanto, con distinta concentración. La reproducibilidad cuantitativa se estudió con los mismos análisis de AGP patrón realizados para el cálculo de la exactitud de asignación con distintos parámetros de migración. Recuérdese que se analizaron las mismas muestras con diferentes concentraciones de AGP durante 3 días en distinto orden de inyección.

Los resultados de la media del porcentaje de área y el RSD (%) para cada banda de AGP y día se detallan en la Tabla 2.5. El RSD fue menor del 8% para aquellas bandas con un porcentaje de área superior al 5%. Los RSD más altos corresponden a las bandas de AGP más pequeñas, lo que hace pensar que la dificultad para integrar picos pequeños sea el origen de una menor precisión.

Como la cantidad de muestras de AGP procedentes de donantes sanos y pacientes con cáncer era muy limitada, cada una de ellas sólo pudo analizarse por duplicado. Por tanto, para poder comparar los RSD obtenidos con las muestras de sanos y enfermos con la AGP patrón, esta se analizó por duplicado. La muestra se preparó con una concentración de 2 mg/mL, que es la concentración aproximada que se estimó que presentaban las muestras de donantes obtenida a partir de la absorbancia de sus electroforegramas. El RSD obtenido para AGP patrón inyectada dos veces estuvo en el intervalo de 0,01 a 2,31% para las bandas de AGP con un porcentaje de área superior al 10%. Nuevamente, el mayor RSD (24,81%) fue el obtenido para la banda de AGP con el menor porcentaje de área (0,17%). La información obtenida en este apartado, que permite conocer la precisión cuantitativa del método de CZE desarrollado, es importante para poder comparar cuantitativamente muestras de AGP de diferentes orígenes.

Tabla 2.5. Media y RSD (%) del porcentaje de área de AGP patrón para tres días de trabajo diferentes.

Banda de AGP	Día 1. Muestras de AGP analizadas en orden de concentraciones decreciente ^{a)}		Día 2. Muestras de AGP analizadas en orden de concentraciones creciente ^{b)}		Día 3. Muestras de AGP analizadas en orden de concentración al azar ^{c)}	
	Media	RSD (%)	Media	RSD (%)	Media	RSD (%)
1	1,70	27,56	1,13	16,45	1,71	24,46
2	16,60	5,05	16,12	7,90	17,28	6,07
3	30,71	1,09	30,56	1,01	29,63	4,40
4	28,36	4,43	28,59	3,45	28,60	4,54
5	16,03	1,44	16,97	1,93	15,96	2,74
6	5,62	1,29	5,40	3,20	5,70	5,40
7	1,03	9,81	1,10	10,38	1,04	13,25
8	0,20	36,85	0,12	22,80	0,09	25,19

^{a)} Orden de inyección: 4,0, 2,0, 1,0, 0,5, 0,25 mg/mL AGP. ^{b)} Orden de inyección: 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 mg/mL AGP. ^{c)} Orden de inyección: 4,0, 0,25, 1,0, 2,0, 0,5 mg/mL AGP.

Comparación cuantitativa de AGP de muestras preparadas mediante el método “cloroforo-metanol completo”

Para medir la reproducibilidad de la distribución de áreas en las muestras de AGP de los pacientes con cáncer y el individuo sano, cada una de las muestras se analizó por duplicado. El RSD obtenido para estos duplicados fue similar al obtenido para un duplicado de AGP patrón. Por tanto, se consideró que el RSD para 6 análisis de las muestras de sanos y enfermos sería comparable con el obtenido para n=6 de la AGP patrón. En la Figura 2.11 están representados los valores medios de la distribución del porcentaje de área para las bandas obtenidas en los electroforegramas de la AGP del donante sano y la AGP de los pacientes de cáncer de ovario y de leucemia. Así mismo, en la figura también se muestra, para cada banda, la desviación estándar del porcentaje de área estimada para seis inyecciones a partir de los datos obtenidos con la AGP patrón. En la **Figura 2.11** puede observarse cómo el porcentaje de área de las bandas con mayor relación carga/masa aumenta significativamente en las muestras de AGP de cáncer comparado con la muestra de AGP del individuo sano. Como ya se ha mencionado, estos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura [34-37], en la que se han publicado que ciertos glicoconjugados pueden aumentar su grado de sialización en pacientes con cáncer, lo que daría lugar a isoformas de AGP con mayor relación carga /masa.

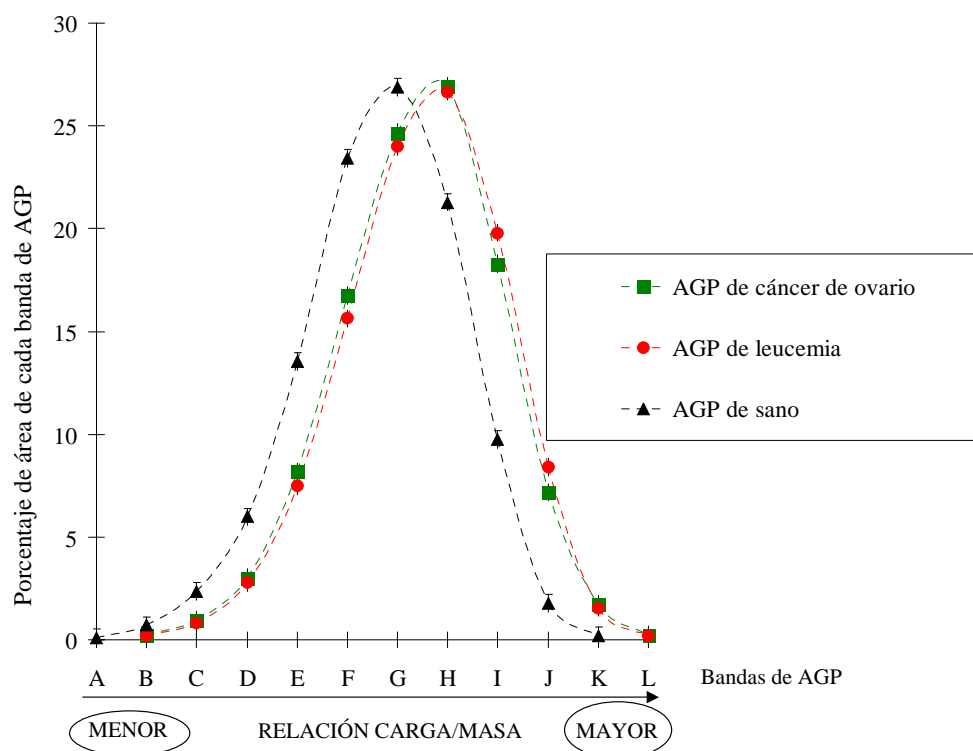


Figura 2.11. Medias y desviaciones estándar (indicadas con la barra vertical “I” y calculadas con AGP patrón, n=6) de las bandas de AGP en las muestras del donante y los pacientes con cáncer (2 análisis por muestra). Los nombres de cada banda son los mismos que en la Figura 2.10. Las líneas discontinuas se han usado para unir las medias de porcentaje de área de cada banda para facilitar la comprensión del gráfico, pero no tienen ningún significado experimental.

Comparación cuantitativa de AGP de muestras preparadas mediante el método “perclórico”

Se utilizó el mismo método que en el epígrafe anterior para la comparación cuantitativa entre las diferentes muestras. El cálculo de áreas y la distribución de bandas se llevó a cabo siguiendo la hipótesis B de asignación de bandas que asume que todas las muestras presentan las mismas bandas excepto una muestra de AGP de suero de un paciente de cáncer de vejiga (ver epígrafe 2.4.1.8). Los resultados pueden observarse en la Figura 2.12. La desviación estándar representada corresponde de nuevo a la estimada mediante 6 inyecciones de la AGP patrón. Excepto la distribución del porcentaje de área de las bandas de AGP de dicho paciente, el resto de distribuciones no presentó diferencias significativas. Los perfiles electroforéticos de AGP no fueron función del estado fisiológico de los donantes, como lo fue en el caso de las muestras purificadas

mediante el método “cloroformo-metanol completo”. Estos resultados tienen los mismos posibles motivos que los ya descritos en la comparación cualitativa de estas muestras (sección 2.4.1.7)

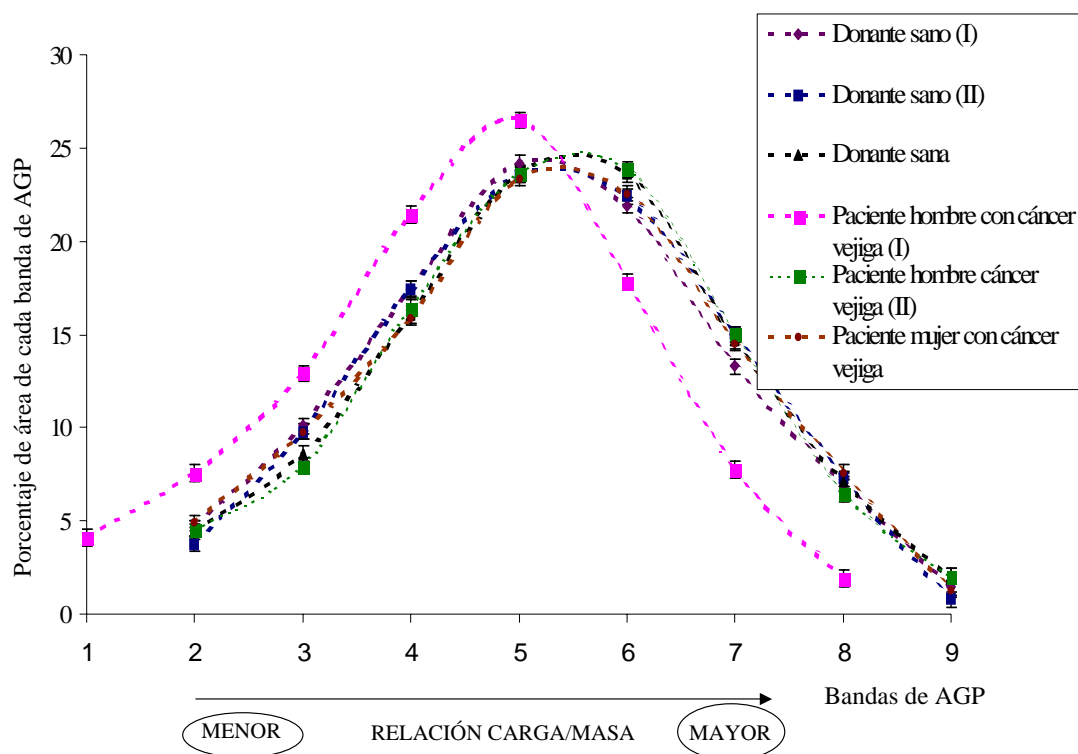


Figura 2.12. Medias y desviaciones estándar (indicadas con la barra vertical “I” y calculadas con AGP patrón, n=6) de las bandas de AGP en las muestras preparadas con el método “perclórico”. Las líneas discontinuas se han usado para unir las medias de porcentaje de área de cada banda para facilitar la comprensión del gráfico, pero no tienen ningún significado experimental.

2.4.2 AGP analizada por CIEF

2.4.2.1 Desarrollo de un método “one-step CIEF” para la separación de formas de AGP

Como ya se ha explicado en la introducción de este capítulo, están descritos cambios en la parte glucídica y aminoacídica de la AGP en pacientes con diversas enfermedades. Esos cambios pueden afectar de distinta forma al comportamiento de la proteína en CZE y CIEF, por lo que es interesante estudiar la proteína por ambos métodos. Para el análisis por CIEF, como prueba de concepto, se utilizarán las muestras de AGP para las que se han confirmado diferencias cuali y cuantitativas en CZE, es decir, las muestras de AGP extraídas con el método “cloroformo-metanol completo”. El objetivo del análisis de estas muestras será estudiar si con el método de CIEF se confirman las diferencias para muestras de AGP que ya se han puesto de manifiesto en su análisis por CZE.

Ya se ha mencionado que la AGP es una proteína extremadamente ácida. Esta característica hace que su análisis por CIEF presente diversos inconvenientes. En primer lugar, si se trabaja con polaridad normal (ánodo situado en el extremo del capilar más alejado del detector), las proteínas ácidas se enfocan en la zona del capilar más alejada del detector, lo que hace que su movilización química presente más dificultades que las proteínas neutras o básicas, dando lugar a picos muy anchos o incluso provocando que no se detecten [16]. Además, las proteínas ácidas son muy susceptibles de sufrir deriva anódica, que puede ser la causa de la peor resolución de las proteínas ácidas que la de las neutras o básicas o que puede provocar que las proteínas ácidas no se detecten [17].

Estos antecedentes hicieron que en el primer modo de separación por CIEF que se trató de desarrollar en este trabajo la polaridad utilizada fuera inversa (con el ánodo en el extremo más cercano a la ventana de detección). De este modo, la AGP se enfocó en el extremo corto del capilar ($l = 7$ cm), disminuyendo la distancia que tiene que recorrer hasta el detector y el ensanchamiento de las bandas enfocadas. Para asegurarse de que la AGP se enfoca en tan corta distancia del capilar sin sobrepasar la ventana de detección, es recomendable utilizar un “gradient-extender” o prolongador de gradiente.

Estos compuestos “bloquean” cierta longitud del capilar, impidiendo el enfoque de **los** analitos en esa región. El prolongador de gradiente más utilizado es la tetrametiletilendiamina (TEMED), un compuesto orgánico extremadamente básico. El uso más habitual del TEMED es bloquear el extremo corto del capilar, impidiendo así que los analitos básicos se enfoquen tras el detector y no sean detectados en la movilización. El instrumento de CE utilizado en este trabajo cuenta con la limitación de que la movilización por presión, mientras se sigue aplicando voltaje, sólo se puede realizar aplicando presión desde el extremo del capilar más alejado del detector. Por tanto, no es posible movilizar AGP (enfocada al utilizar polaridad inversa en el extremo corto del capilar) mediante presión. De entre las opciones de movilización restantes, se optó por el “one-step CIEF” o CIEF en un paso. Para ello, es necesario comprobar que los capilares recubiertos utilizados en el trabajo tienen EOF residual que, como se ha descrito en la Introducción General de esta memoria, es el factor de movilización en “one-step CIEF”.

Por tanto, antes de desarrollar un método “one-step”, es necesario comprobar si los capilares recubiertos que van a utilizarse presentan o no EOF. Aunque la forma más correcta de comprobar la presencia de EOF hubiese sido utilizar dichos capilares en el modo CZE y tratar de detectar algún compuesto marcador de EOF, se prefirió comprobarlo en las condiciones más similares posibles a como iban a utilizarse los capilares, es decir, en CIEF. Además, el movimiento de los compuestos del interior del capilar en CIEF puede deberse a más fenómenos, además de al EOF residual. Las derivas anódicas y catódicas pueden provocar movimientos del líquido en los extremos del capilar que den lugar al paso por el detector UV de los analitos.

Para comprobar si la AGP atravesaba el detector en ausencia de una etapa de movilización, se preparó una mezcla de muestra que contenía AGP, anfolitos, urea y TEMED. El anolito consistió en H_3PO_4 91 mM y el catolito en NaOH 20 mM. Esta diferencia de concentraciones entre anolito y catolito se debe a la recomendación de que, para evitar la deriva anódica es necesario incrementar la concentración del H_3PO_4 en el anolito frente a la concentración de NaOH en el catolito [16]. Se trabajó con polaridad reversa y a 20 kV. Este experimento se realizó en un capilar de PAA. Como puede comprobarse en la **Figura 2.13**, aproximadamente a los 15 min comienza a detectarse un pico de AGP muy mal resuelto. Este movimiento en el interior del capilar

se puede deber a la presencia de EOF residual o a una deriva catódica. En cualquier caso, quedó confirmado que el enfoque en los capilares utilizados y con las condiciones experimentales establecidas no es estático, y que, por el contrario, el contenido del capilar sufre un movimiento hacia el cátodo, que permite el empleo de CIEF en el modo “one-step”.

Una vez comprobada la posibilidad de desarrollar un método de CIEF “one-step”, se pasó a tratar de optimizar la separación de AGP. Aprovechando la experiencia del laboratorio en la separación de EPO por CIEF, se añadió al catolito H_3PO_4 1 M hasta conseguir un pH de 11,85 [39]. Como puede observarse en la Figura 2.13, esta adición mejoró sensiblemente la resolución de las bandas de AGP. Es importante destacar que esta adición de H_3PO_4 no sólo mejoró la resolución de AGP, sino que acortó el tiempo de análisis. Otro efecto que provocó sobre la separación fue que la corriente durante el enfoque disminuyó en menor grado que en ausencia de H_3PO_4 .

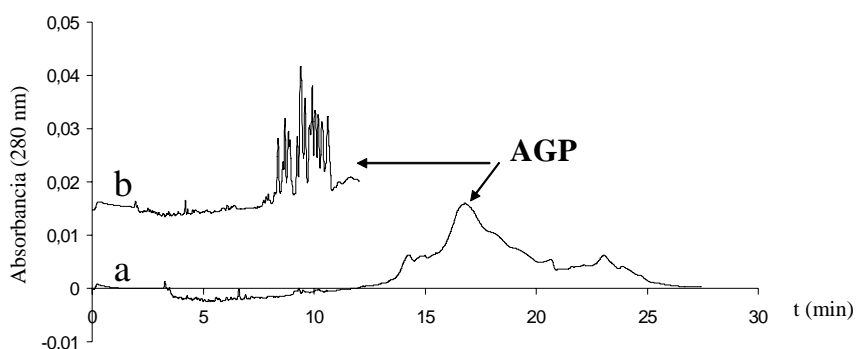


Figura 2.13. Separación de bandas de AGP por el método “one-step” de CIEF. Capilar recubierto de PAA. $L = 27$ cm ($l = 7$ cm), i.d: $50 \mu\text{m}$, voltaje: 20 kV (polaridad inversa), temperatura: 20 °C, detección: 280 nm. Mezcla de muestra: $5,6$ M urea, $1,7\%$ (v/v) TEMED, $9,7\%$ (v/v) de anfolitos en la siguiente distribución de intervalo de pH: $3-10$; $2,5-5$; $2-4$; $3-5$ ($2:2:3:3$) y 1mg/mL AGP disuelto en gel de CIEF. Electroforegrama a) anolito: 91 mM H_3PO_4 en gel de CIEF, catolito: 20 mM NaOH. Electroforegrama b) anolito: 91 mM H_3PO_4 , catolito: 20 mM NaOH + H_3PO_4 hasta pH $11,85$.

Una posible explicación para estas observaciones está representada gráficamente en la Figura 2.14. Mediante la adición de H_3PO_4 al catolito desde el comienzo del enfoque, éste no se produce totalmente. Teóricamente, el enfoque en CIEF se produce cuando se alcanza el estado estacionario en el que

$$\sum C_{NH_3^+} + C_{H^+} = \sum C_{COO^-} + C_{OH^-} \quad (2.6)$$

donde, C_{H^+} , C_{OH^-} , $\sum C_{NH_3^+}$, $\sum C_{COO^-}$ son las concentraciones de protones e hidroxilos y las concentraciones de grupos positivos y negativos de los anfólitos, respectivamente. Este enfoque puede desestabilizarse (y por tanto, provocarse la movilización) mediante la adición de un ion al anólito o al católito. En el caso de la adición de H_3PO_4 al católito, la ecuación 6 pasa a tener un término más, donde $C_{\text{aniones fosfato}}$ es la concentración de iones fosfato que entran en el capilar (ecuación 2.7).

$$\sum C_{NH_3^+} + C_{H^+} = \sum C_{COO^-} + C_{OH^-} + C_{\text{aniones fosfato}} \quad (2.7)$$

De esta forma, el exceso de protones que circula por el capilar en relación a la concentración de hidroxilos provoca que los analitos y los anfólitos se carguen positivamente, generando un movimiento global hacia el cátodo. En el esquema de separación propuesto (**Figura 2.14**), esta movilización sucede probablemente desde el comienzo del enfoque. Este movimiento inicial hacia el cátodo evita o minimiza la deriva anódica, que puede ser un problema en el caso del enfoque de proteínas muy ácidas como la AGP. Este mecanismo explicaría que el tiempo de análisis disminuya en presencia de H_3PO_4 (**Figura 2.13**) en el medio, al tener lugar una movilización catódica y que la separación mejore debido a que se contrarresta el efecto de la deriva anódica sobre la separación. Este mecanismo de enfoque con movilización concurrente incluye un proceso isotacofóretico [40].

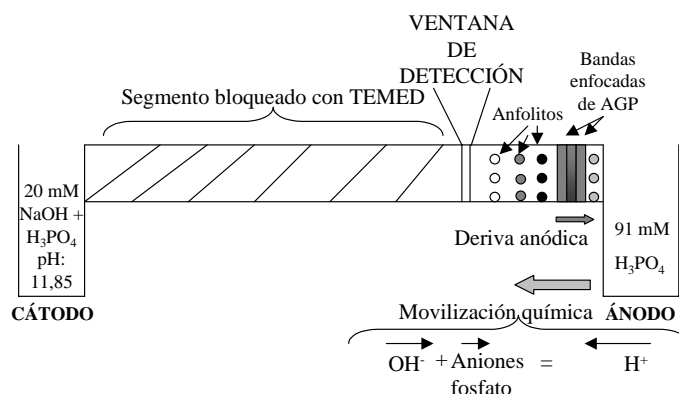


Figura 2.14. Esquema del mecanismo propuesto para la separación “one-step CIEF” de AGP. El desequilibrio en la concentración de protones e hidroxilos provoca un movimiento hacia el cátodo.

Sin embargo, el método desarrollado, que resuelve un número elevado de bandas de AGP, provoca una degradación de la pared del capilar en pocos análisis (en ocasiones incluso en 6 ó 7 análisis). Esta degradación da lugar a un aumento en el EOF que impide el correcto enfoque de las bandas de AGP antes de atravesar el detector. Además, la degradación continua del capilar es también una causa más de la falta de reproducibilidad de los análisis. El fabricante del capilar establece como intervalo de pH en el que el recubrimiento de PAA es estable entre 3 y 10, siendo el TEMED mucho más básico [41]. A pesar de que existen publicaciones en las que se trabaja con TEMED y capilares de PAA (tanto recubiertos en el laboratorio como de la misma casa comercial que los empleados en este trabajo) [42-44], en nuestros experimentos, como se ha mencionado, el TEMED degrada en muy pocos análisis la pared del capilar. Por eso, los siguientes experimentos tuvieron por objeto resolver el problema que suponía usar TEMED como “gradient extender”.

Para comprobar si era necesario añadir TEMED a la mezcla de muestra para obtener una buena resolución de AGP, se realizó un experimento en que este compuesto se eliminó de la mezcla de muestra. Al ser AGP una proteína tan ácida cabía la posibilidad de que, aún sin un bloqueante del extremo largo del capilar, ésta siguiera enfocándose en el extremo corto. Por tanto, la mezcla de muestra se preparó sin TEMED y se analizó con la polaridad invertida y en “one-step CIEF”. Como puede verse en la Figura 2.15, la AGP no se resuelve si no se utiliza TEMED, aunque da lugar a cierta señal, mientras que se resuelve y aumenta la señal añadiendo TEMED a la mezcla de muestra (**Figura 2.15**).

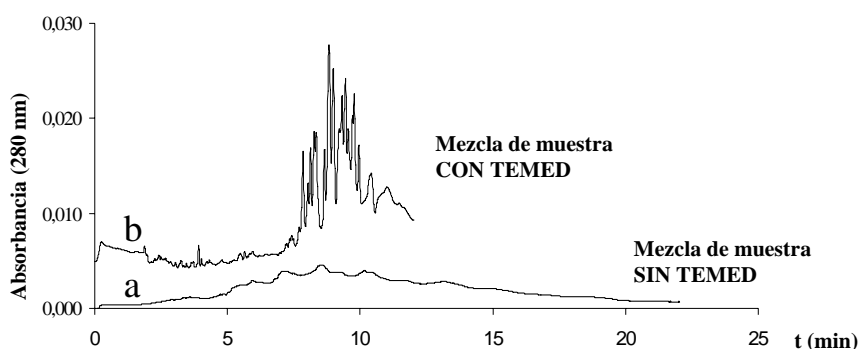


Figura 2.15. Efecto del TEMED sobre la separación de AGP con un método de CIEF “one-step”. Capilar recubierto PAA, L= 27 cm (l= 7 cm), voltaje: 20 kV (polaridad invertida), temperatura: 20 °C, detección: 280 nm. Anolito: 91 mM H₃PO₄ en gel de CIEF, catolito: 20 mM NaOH + H₃PO₄ 1M hasta pH 11,85. Mezcla de muestra: electroforegrama a) 1 mg/mL AGP, urea 5,6 M; 9,4% (v/v) de anfólitos en

la siguiente distribución de intervalos de pH: 3-10; 2,5-5; 2-4; 3-5 (2:2:3:3)(v/v) y electroforegrama b) igual que en a) salvo que la mezcla de muestra contiene 1.7% (v/v) de TEMED.

Una vez descartada la idea de poder trabajar sin un “gradient-extend”, se trató de sustituir el TEMED por otro menos básico. Ya que para la optimización de este método no se necesitaba todo el gradiente de pH (sólo se pretenden separar bandas de AGP), se optó eliminar los anfolitos más básicos y por utilizar alanina ($pI= 6,02$) para bloquear el extremo largo del capilar. La alanina, como aminoácido, es un compuesto anfótero que se enfocará en un proceso de isoelectroenfoque. En concreto, se sustituyó el TEMED de la mezcla de muestra por alanina 0,21 M, que se seleccionó como concentración óptima entre las estudiadas (0; 0,07; 0,13; 0,21 y 0,35 M) (**Figura 2.16**). En la figura se observa cómo un aumento de la concentración de alanina afecta a la separación de AGP, tanto en su resolución como en el tiempo de análisis. El tiempo de análisis aumenta con la concentración de alanina, probablemente porque su acción bloqueante provoca que el enfoque del resto de anfolitos y de la proteína se realice en menor espacio, quedando cada vez más próximo al extremo del capilar y, por tanto, más alejado del detector. El enfoque de la proteína en menos espacio también da lugar a un aumento de la concentración.

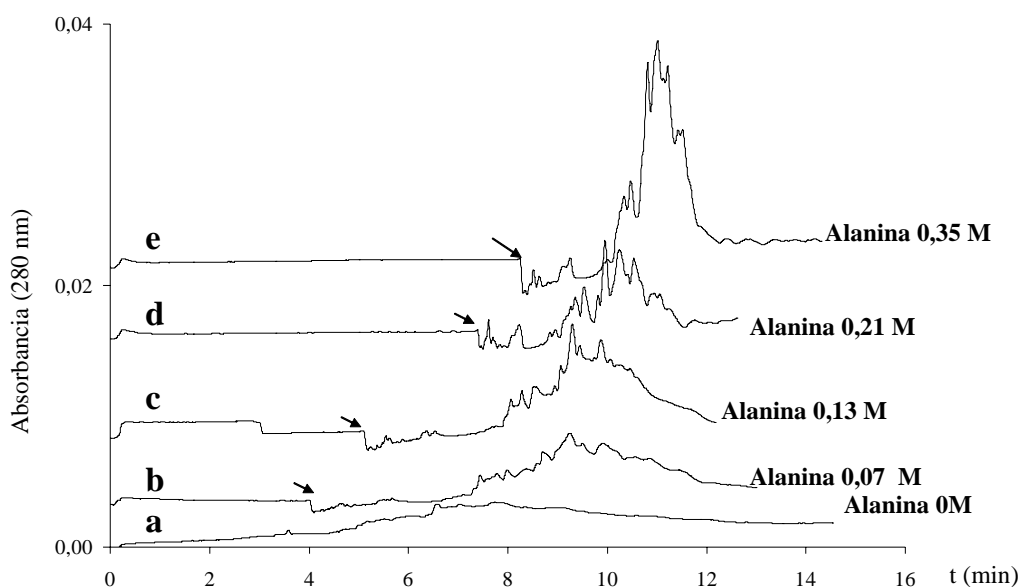


Figura 2.16. Efecto de la concentración de alanina sobre la separación de AGP en un método de CIEF “one-step”. Capilar recubierto de PAA. Condiciones analíticas como en Figura 2.15 salvo en la mezcla de muestra: 1 mg/mL AGP, urea 5.6 M; 9,4% (v/v) de anfolitos en la siguiente distribución de intervalos de pH: 2,5-5; 2-4; 3-5 (2:4:4) (v/v), y alanina en las siguientes concentraciones: **a)** 0 M, **b)**

0,07 M, **c**) 0,13 M, **d**) 0,21 M, **e**) 0,35 M. Las flechas indican el cambio en la absorbancia que se interpreta como el paso por el detector de la interfase entre la alanina y los anfolitos y la muestra.

La sustitución de TEMED por alanina prolongó sustancialmente la vida media de los capilares recubiertos de poliacrilamida, pudiendo trabajar con ellos durante semanas.

En la separación por CIEF en un paso, parece tener influencia la longitud del capilar ya que los analitos se desplazan hacia el detector con una movilidad electroforética propia y pueden no llegar a enfocarse completamente si la longitud del capilar hasta el detector no es suficientemente grande [45]. Por tanto, se trató de mejorar la separación trabajando con polaridad normal (ánodo en el extremo más alejado del capilar). Como se desprende de la Figura 2.17, en este caso, el aumento de la distancia desde el extremo del capilar hasta el detector provocó un aumento considerable en la resolución de las bandas de AGP.

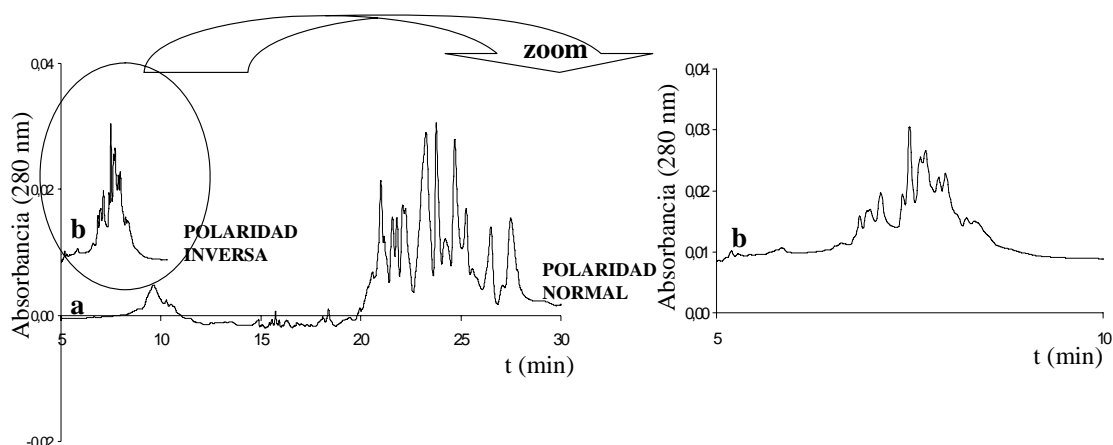


Figura 2.17. Efecto de la polaridad en la separación de AGP con un método de “one-step CIEF. **a**) Polaridad normal ($L=27\text{cm}$, $l=20\text{cm}$) **b**) Polaridad invertida ($L=27\text{ cm}$, $l=7\text{cm}$). Resto de condiciones analíticas como en Figura 2.16.d.

Sin embargo, se observó que el método con polaridad normal, que dio lugar a tan buenos resultados en cuanto a resolución de bandas de AGP, era muy poco reproducible. En la **Figura 2.18** se pueden observar dos inyecciones consecutivas de la misma muestra.

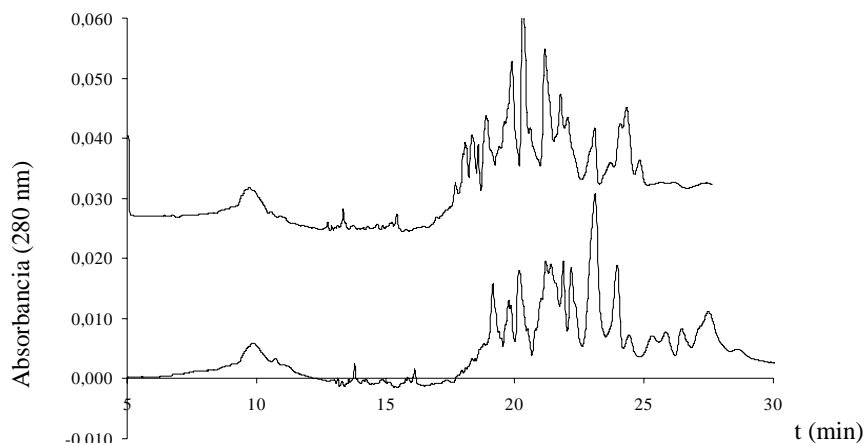


Figura 2.18. Electroforegramas correspondientes a dos análisis de AGP con un método de “one-step CIEF”. Los electroforegramas corresponden a dos análisis consecutivos de la misma muestra. Condiciones analíticas como en la Figura 2.16.d excepto que la polaridad del campo eléctrico está en el modo normal.

Para explicar esta falta de reproducibilidad, mientras que existen en la literatura algunos artículos (ver la revisión de Schwer [45]) en los que se han obtenido buenas reproducibilidades utilizando “one-step CIEF”, hay que tener en cuenta que son muchos los factores que intervienen en la separación en “one-step CIEF”. Así, es sabido que la magnitud del EOF depende del número de silanoles libres de la pared del capilar que, a su vez, depende del pH del tampón en el capilar. En el caso de CIEF, cada tramo del capilar tiene el pH que se ha establecido en el enfoque de los anfólitos. Por tanto, la magnitud del EOF no es homogénea, varía en los distintos tramos del capilar. Además, si existen zonas del capilar en que las proteínas hayan podido adsorberse, los lavados pueden no ser suficientes para desorberlas y la magnitud del EOF no se recupera. Esto puede contribuir a la falta de reproducibilidad del método. Este fenómeno se ha descrito en el análisis de proteínas en capilares recubiertos con dimetilpolisiloxano, en los que el EOF disminuía en cada análisis [45]. La preparación del catolito en el método estudiado es también clave ya que ligeras variaciones en la concentración de ácido fosfórico en el catolito podrían influir de forma notable en el desplazamiento de los analitos, pues son los aniones fosfato (en función de su concentración) los que causan la movilización química.

A pesar de no conseguir un método suficientemente reproducible para la separación de bandas de AGP mediante “one-step CIEF”, los resultados mostraron que

la AGP puede movilizarse hasta el detector cuando está enfocada en el extremo más alejado del detector.

El siguiente paso fue desarrollar un método de CIEF en dos pasos con la polaridad en modo normal para separar formas de AGP.

2.4.2.2 Desarrollo de un método “two-step CIEF” para la separación de formas de AGP

En esta parte del trabajo, se estudió el efecto de varios factores que permiten poner a punto un método “two-step CIEF” para la separación de formas de AGP. Las bases del CIEF en dos pasos han sido descritas extensamente en la Introducción General.

Efecto del catolito

Al igual que en el desarrollo del método “one-step CIEF”, en esta ocasión también se empleó un anolito más concentrado (H_3PO_4 91 mM en gel CIEF) que el catolito (20 mM NaOH) para minimizar la deriva anódica. El análisis de AGP con estos anolitos y catolitos no dio lugar a una buena resolución de AGP (ver **Figura 2.19.b**). La experiencia previa en el desarrollo del método “CIEF one-step” hacía indicar que se consigue una mejor resolución si el catolito contiene también H_3PO_4 . Por tanto, se estudio el efecto de la adición de ciertas cantidades de H_3PO_4 al catolito. Se prepararon diferentes catolitos, todos ellos 20 mM de NaOH pero con distintos pH fijados con distintos volúmenes de H_3PO_4 1 M: 12,20, 12,00 y 11,85.

La mejor separación se obtuvo cuando el pH se ajustó a 11,85, aunque no se encontraron grandes diferencias entre los catolitos que tenían distintas cantidades H_3PO_4 . Al igual que en “one-step CIEF”, el efecto del H_3PO_4 se puede interpretar como una lenta movilización química desde el inicio del enfoque (**Figura 2.14**). Esta interpretación se basa en la observación de que cuanto más ácido fosfórico se puso en el catolito menos disminuyó la corriente eléctrica durante el enfoque, probablemente debido a que los iones fosfato impidieron el enfoque completo. La entrada de fosfatos en el capilar ha de contrarrestarse con la entrada de protones desde el cátodo. Cuantos más iones fosfato y más protones entran en el capilar, menos baja la corriente **eléctrica**

durante el enfoque. Además, cuanto más ácido fosfórico se adicionó en el catolito más rápido fue el aumento de la corriente durante la movilización. La explicación a esta observación es nuevamente la movilización química.

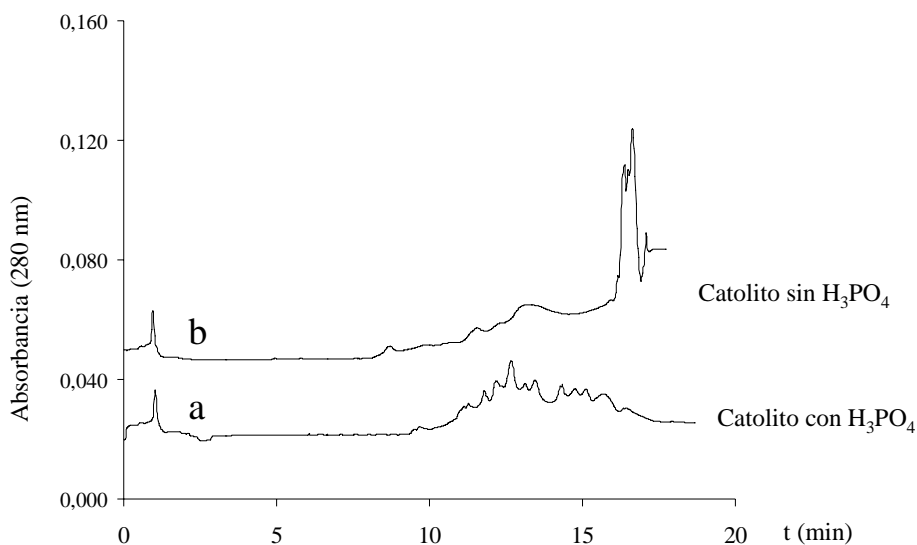


Figura 2.19. Efecto de la presencia de H₃PO₄ en el catolito sobre la separación de bandas de AGP con un método de CIEF “two-step”. Capilar recubierto de PVA del tipo 2, L= 27 cm (l=20 cm). Mezcla de muestra: AGP 1 mg/mL, NaCl 10 mM, anfolitos 1,6% (v/v) en la distribución de intervalos de pH: 3-10, 3-5, 2.5-5, 2-4 (1:1:1:1) (v/v). Tiempo de enfoque: 6 min a 20 kV y movilización por presión anódica (0,5 p.s.i.) manteniendo voltaje. Anolito: 91 mM H₃PO₄ en gel. Catolito: **a**) 20 mM NaOH y H₃PO₄ hasta pH 11,85; **b**) 20 mM NaOH. Temperatura de análisis: 20 °C. Detección: 280 nm.

Efecto del NaCl y de la urea en la separación de bandas de AGP

El efecto beneficioso o perjudicial de las sales en la mezcla de muestra ha sido revisado [46] y no existe acuerdo sobre ello. Mientras que algunos autores afirman que la fuerza iónica de la muestra debe ser tan baja como sea posible [17], otros autores encuentran que, en algunos casos, cierta concentración de sal ayuda al enfoque y evita la precipitación de la proteína [15, 25, 47].

Con el fin de explorar el efecto del NaCl en la separación de la AGP, se probaron diferentes concentraciones finales de NaCl en la mezcla de muestra (0, 10, 20 y 30 mM). Como era de esperar, el aumento del NaCl en la mezcla de muestra incrementó la corriente inicial durante el enfoque. Se obtuvieron corrientes de 5, 6, 22 y 40 μ A para las mezclas de muestras con concentraciones finales de 0, 10, 20 y 30 mM de NaCl, respectivamente. Además, se observó una mejora en la resolución de bandas

de AGP en presencia de NaCl (**Figura 2.20**). Se seleccionó la concentración de 20 mM de NaCl como valor óptimo para obtener una buena resolución de las bandas.

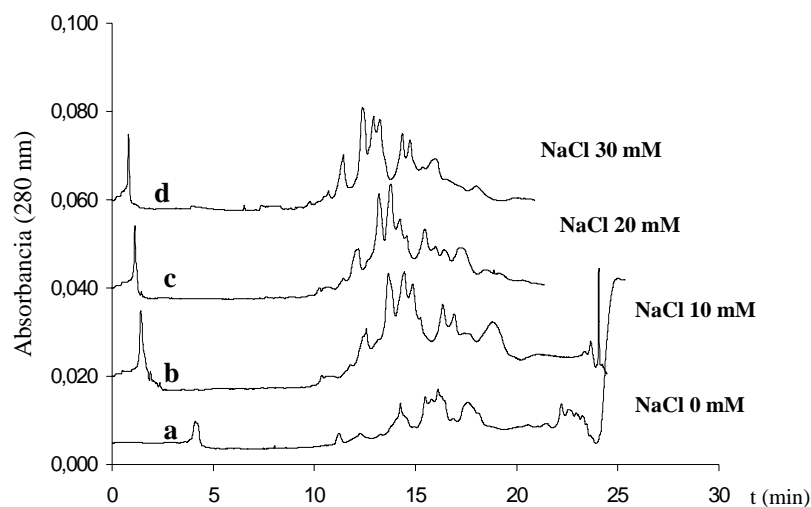


Figura 2.20. Efecto de la concentración de NaCl en la mezcla de muestra sobre la separación de bandas de AGP en un método de CIEF “two-step”. De electroforegrama **a-d**: 0, 10, 20 y 30 mM NaCl, respectivamente. Resto de mezcla de muestra: 5,6 M urea, 4,2% (v/v) anfolitos en los intervalos de pH: 3-10, 3-5, 2,5-5, 2-4 (1:1:1:1) (v/v), AGP 1 mg/mL. Resto de condiciones analíticas como en **Figura 2.19.a**.

Se estudió también el efecto de la presencia de urea en la muestra. Suelen recomendarse concentraciones de urea de hasta 6 M para evitar precipitaciones y agregaciones de la proteína analizada [46, 48]. En este sentido, Wu *et al.* [15] han descrito una mejora en la resolución de bandas de AGP cuando se añade urea 6 M a la mezcla de muestra, aunque sólo resuelven parcialmente 6 bandas de AGP.

En el trabajo recogido en esta Memoria, se prepararon dos mezclas de muestra, una con urea 5,6 M y otra sin urea. Como puede observarse en la **Figura 2.21**, la mezcla de muestra sin urea da lugar a “spikes” (caídas y subidas bruscas en la absorbancia, correspondientes al paso de partículas sólidas o burbujas de aire por el detector) y a una falta de resolución que puede interpretarse como una precipitación de la proteína analizada. Cuando una proteína está cerca de su pI presenta una carga total mínima y próxima a cero y por tanto, también una mínima solvatación [48], siendo menos soluble y pudiendo dar lugar a precipitados. La precipitación de las proteínas en CIEF da lugar “spikes” en la separación, que se producen cuando estas partículas sólidas atraviesan el

detector. La urea en este caso, mejora a la solubilización de la proteína y mejora, por tanto, su separación.

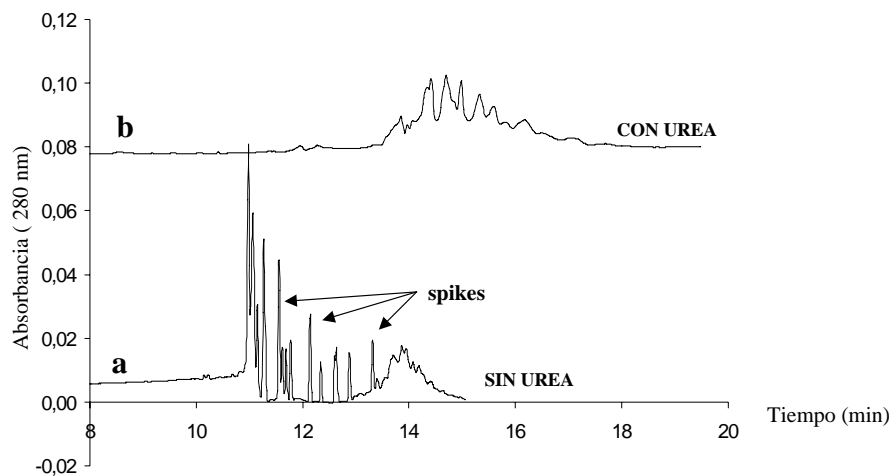


Figura 2.21. Efecto de la urea en la mezcla de muestra sobre la separación de bandas de AGP en un método de CIEF “two-step”. Electroforegrama **a)** sin urea y **b)** urea 5,6 M. Resto de mezcla de muestra: 1mg/mL de AGP, anfolitos 6,2 % (v/v), intervalo de pH: 3-10, 3-5, 2,5-5, 2-4, (1:1:1:1) (v/v), NaCl 20 mM. Tiempo de enfoque: 10 min. Resto de condiciones analíticas como en Figura 2.19.a.

Efecto del tipo y concentración de anfolitos en la separación de bandas de AGP

Los anfolitos de diferentes fabricantes tienen una naturaleza y composición diferente entre sí debido a la presencia de compuestos anfotéricos con diferente pI [49]. Cuando se necesita separar analitos con pI muy cercanos, se recomienda utilizar una mezcla de anfolitos de diferentes fabricantes, porque refuerza el intervalo de pI de interés [16, 25, 50, 51]. Este refuerzo da lugar a mejores resoluciones de la proteína que las obtenidas con un solo anfolito. Por tanto, en este trabajo, se estudió el efecto sobre la separación de la presencia de anfolitos de distintos intervalos de pH en la mezcla de muestra. También se estudió el efecto en la separación de la concentración total de anfolitos. Se utilizaron 4 tipos de anfolitos con diferentes intervalos de pH (**Figura 2.22**). La mejor resolución se obtuvo cuando se utilizó la mezcla de los 4 tipos de anfolitos.

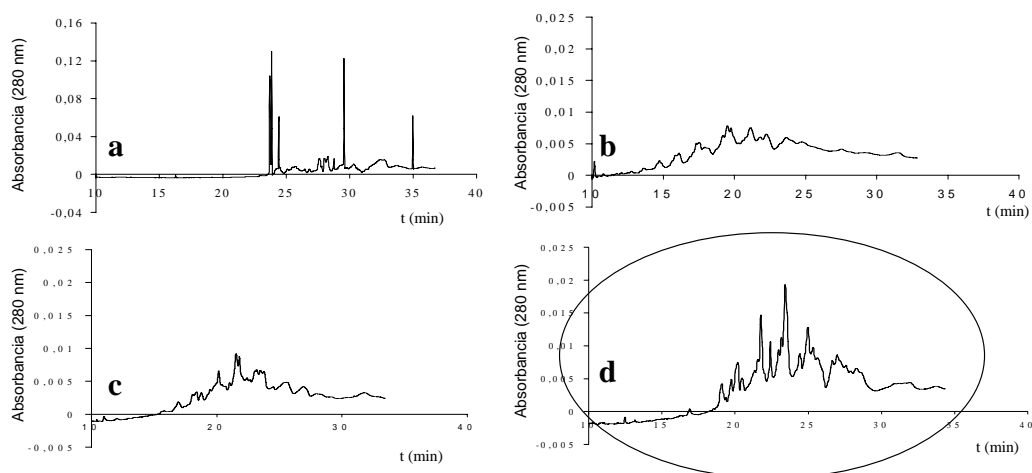


Figura 2.22. Efecto de los tipos de anfolitos sobre la separación de bandas de AGP en un método de CIEF "two-step". Mezcla de muestra: 1 mg/mL de AGP, 6,3 % (v/v) de anfolitos, 5,6 M urea, 20 mM NaCl. Distribución de anfolitos: **a**) intervalo de pH de 3-10, **b**) intervalos de pH de 3-10 y de 2,5-5 (1:1) (v/v), **c**) intervalos de pH de 3-10, 2,5-5 y 2-4 (1:1:1) (v/v) y **d**) intervalos de pH de 3-10, 2,5-5, 2-4 y 3-5 (1:1:1:1) (v/v). Resto de condiciones analíticas como en **Figura 2.19.a**. El electroforegrama señalado corresponde con la mezcla de anfolitos que da lugar a la mejor resolución.

Tras comprobar que la mezcla de los cuatro anfolitos seleccionados daba lugar a la mejor separación de AGP, se trató de mejorar la separación estudiando el efecto de la proporción de cada tipo de anfolito sobre la misma. La mejor resolución se obtuvo utilizando los anfolitos en la distribución siguiente: 3-10, 3-5, 2,5-5, 2-4 (1:1:1:3), es decir, empleando una mayor proporción de los anfolitos con pI próximos a los de AGP (v/v) (**Figura 2.23**).

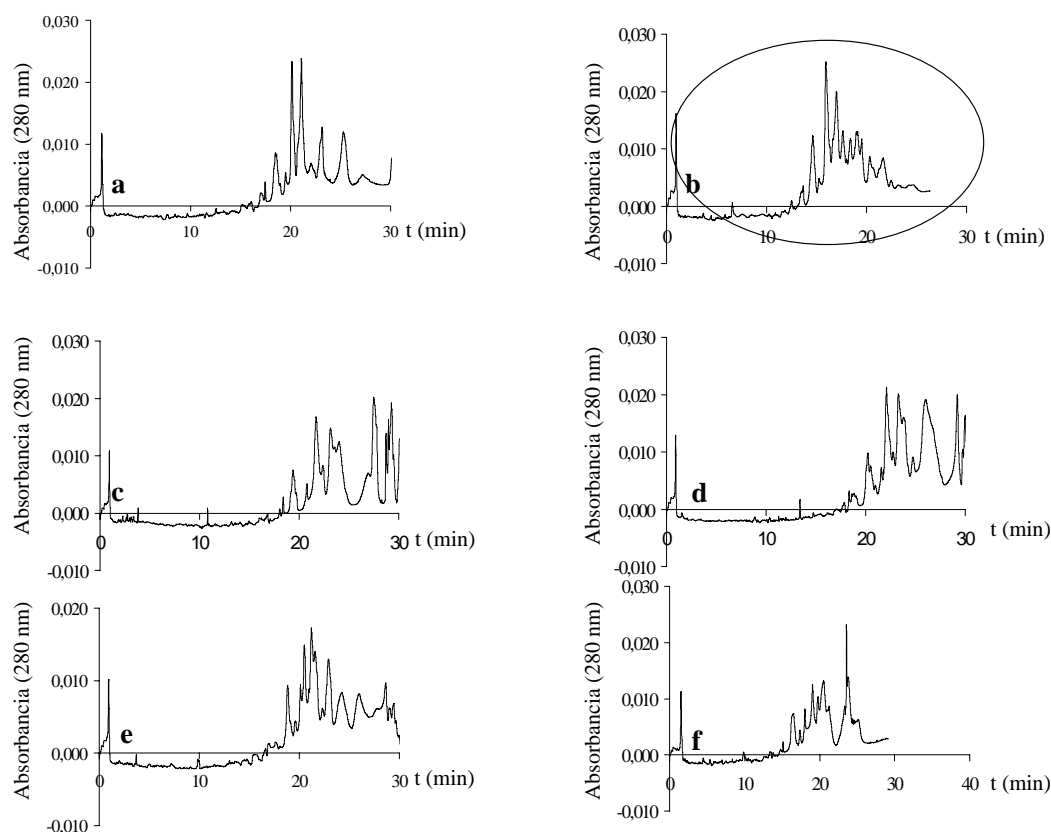


Figura 2.23. Efecto de la distribución de los anfolitos sobre la separación de bandas de AGP en un método de CIEF “two-step”. Electroforegrama **a**) intervalos de pH 3-10, 3-5, 2,5-5, 2-4 (1:1:1:1). Electroforegrama **b**) intervalos de pH 3-10, 3-5, 2,5-5, 2-4 (1:1:1:3). Electroforegrama **c**) intervalos de pH 3-10, 3-5, 2,5-5, 2-4 (1:3:1:1). Electroforegrama **d**) intervalos de pH 3-10, 3-5, 2,5-5, 2-4 (3:1:1:1) Electroforegrama **e**) intervalos de pH 3-10, 3-5, 2,5-5, 2-4 (1:1:3:1) Electroforegrama **f**) intervalos de pH 3-10, 2,5-5, 2-4 (2:1:1). Resto de condiciones analíticas como en Figura 2.22. El electroforegrama señalado corresponde a la mejor distribución de anfolitos encontrada.

En general, un aumento de la concentración de anfolitos supone un aumento en la resolución [39, 52]. Sin embargo, debería también tenerse en cuenta que, debido a que la mayoría de las mezclas de anfolitos contienen sustancias que absorben a 280 nm, una mayor concentración de anfolitos da lugar a una disminución de la sensibilidad. Así, de los diversos porcentajes (v/v) de anfolitos en la mezcla de muestra que se exploraron (1,6; 4,2; 6,3 y 8,4%), se seleccionó 6,3% de anfolitos porque mejoró la resolución sin disminuir la sensibilidad apreciablemente (**Figura 2.24**).

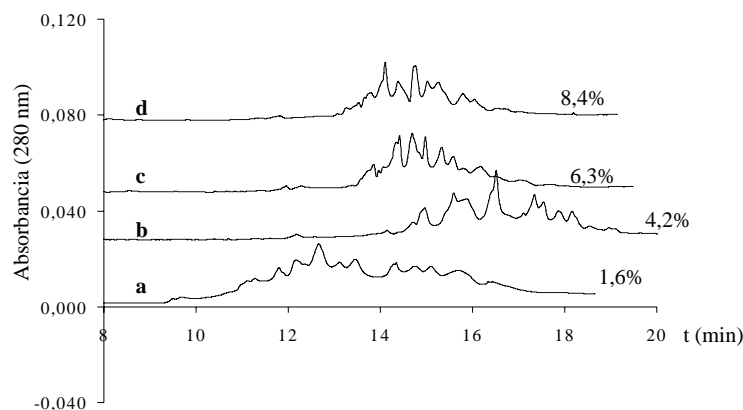


Figura 2.24. Efecto del porcentaje de anfilitos sobre la resolución de AGP en un método de CIEF “two-step”. Condiciones analíticas igual que en Figura 2.23.b, salvo en el porcentaje total de anfilitos. Electroforegrama **a)**, **b)**, **c)**, y **d)**: 1,6, 4,2, 6,3, y 8,4% (v/v) de anfilitos, respectivamente.

Efecto del tiempo de enfoque

Normalmente, el enfoque suele considerarse completo cuando la corriente disminuye hasta un 10-25% de la inicial [48]. Se estudió la influencia del tiempo de enfoque en la separación de bandas de AGP. Se compararon tiempos de enfoque de 1, 6, 10 y 15 min. La corriente inicial en los cuatro experimentos estuvo en torno a los 25 μA . La corriente tras el tiempo de enfoque fue de 15,4 μA para 1 min, 2,4 μA para 6 y 10 min y 2,9 para 15 min. Como puede verse en la **Figura 2.25**, una relación resolución de AGP/tiempo de análisis aceptable se obtuvo con un enfoque de 10 min. Sin embargo, incluso con 1 min de enfoque se obtiene una buena resolución de AGP, a pesar de que la corriente no desciende al 10-25% de la inicial. De hecho, la corriente al min de comenzar el enfoque alcanzó un valor en torno al 50% de la inicial. Probablemente, el enfoque de AGP continúa durante la movilización (recuérdese que, durante la movilización, el voltaje se mantiene). En la revisión de Schwer sobre CIEF [45] se describe cómo las proteínas ácidas (en polaridad normal, las más alejadas del detector) siguen enfocándose durante la etapa de movilización. Además, la experiencia en nuestro laboratorio con la separación por CIEF de EPO (pI 3,8-4,7) [25] es que no es necesario esperar al enfoque completo para conseguir una buena resolución de isoformas de la glicoproteína. Se observó también que en el análisis en que el tiempo de enfoque era de 15 min, las bandas de AGP estaban más cerca del frente del anolito o AF (señal producida por la interfase del anolito atravesando el detector). Esto podría deberse a la deriva anódica, que provoca que cuanto mayor es el tiempo transcurrido desde la inyección de la muestra hasta que comienza la etapa de movilización, más cerca está la

AGP del extremo anódico del capilar. De hecho, no es recomendable prolongar el tiempo de enfoque más de lo necesario por dos motivos: el calor producido en el capilar incrementa el riesgo de precipitación de la proteína y aumenta la posibilidad de la deriva anódica o catódica [16].

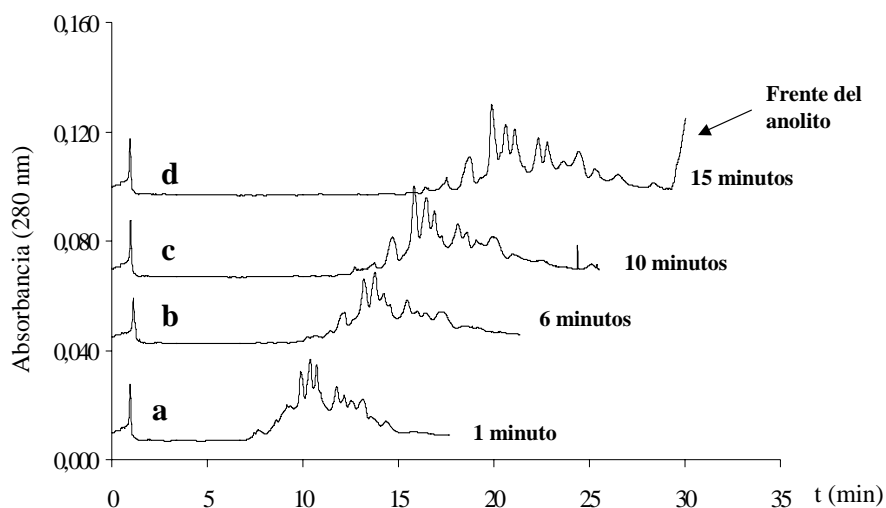


Figura 2.25. Efecto del tiempo de enfoque en la separación de bandas de AGP con un método de CIEF “two-step”. Tiempos de enfoque: **a)** 1 min, **b)** 6 min, **c)** 10 min y **d)** 15 min. Mezcla de muestra: 1 mg/mL AGP, urea 5,6 M, NaCl 20 mM, 6,3% (v/v) de anolitos, intervalo de pH 2-4, 3-10, 3-5, 2,5-5 (3:1:1:1). Resto de condiciones analíticas como en la **Figura 2.19.a**.

Utilidad de diferentes patrones internos

Debido a que la reproducibilidad en tiempos de migración en CIEF es peor que en otros modos de CE, se estudiaron, además del AF, diversos compuestos como posibles patrones internos (pepsinógeno, pepsina, inhibidor de tripsina o TI, y CCK). A través del uso de parámetros de migración en los que se utilicen los tiempos de migración de los patrones internos, es posible mejorar la reproducibilidad. Así, por ejemplo, se han usado parámetros de migración referentes a un patrón interno [39] o a las señales producidas por la interfase del anolito o el catolito al pasar por el detector [53].

La pepsina y el pepsinógeno dieron lugar a un solo pico cuando se analizaron en ausencia de AGP. Sin embargo, cuando la pepsina o el pepsinógeno se mezclaron con AGP en la mezcla de muestra inmediatamente antes de su inyección, no se observó ningún pico y el ruido del electroforegrama aumentó considerablemente. Estas

observaciones podrían deberse a que ambos compuestos degradan la AGP. La pepsina digiere proteínas en un medio ácido, siendo 2 su pH ideal. El pepsinógeno es convertido, por proteolisis, a pepsina a pH inferior a 5 [54].

Con respecto al resto de patrones internos, el AF migra después que las bandas de AGP. El TI lo hace antes y CCK comigra con una de las bandas minoritaria de AGP. Estos tres últimos patrones internos se utilizaron en los estudios de reproducibilidad. En la **Figura 2.26** pueden verse los electroforegramas de AGP con los tres patrones internos.

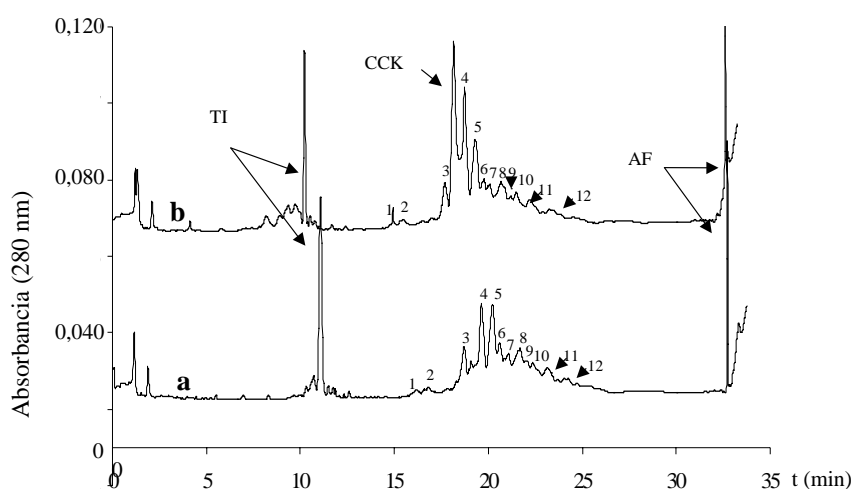


Figura 2.26. Uso de patrones internos en el análisis de bandas de AGP con un método de CIEF “two-step”. Dos análisis consecutivos. **a)** sin CCK y **b)** con CCK (0,15 mg/mL). TI: 0,25 mg/mL en la mezcla de muestra. Resto de condiciones analíticas como en **Figura 2.25.c**. Las bandas de AGP tenidas en cuenta en los estudios de reproducibilidad se han numerado en la figura.

Evaluación de los capilares con recubrimiento de PVA

Los capilares recubiertos pueden evolucionar debido a la degradación progresiva de su recubrimiento con el uso y, por tanto, influir sobre los tiempos de migración de los analitos [16, 45]. Este fenómeno se ha observado en los capilares recubiertos de PVA de las dos casas comerciales utilizados en este trabajo. A modo de ejemplo, en la **Figura 2.27.1** puede verse cómo los tiempos de análisis de las bandas de AGP se acortan con el número de análisis. Cuando el recubrimiento se degrada, el EOF aumenta y por tanto disminuye el tiempo de migración de los analitos. Es importante destacar que, cuando el recubrimiento del capilar estaba estropeado, las diferencias en la

magnitud del EOF causaron ligeras diferencias en el perfil electroforético obtenido para AGP.

Se comparó la separación de AGP obtenida en capilares de las dos casas comerciales. Como puede observarse en la **Figura 2.27.2**, a pesar de que existen diferencias en el tiempo de análisis, las separaciones de AGP son comparables. Estas diferencias en el tiempo de migración pueden deberse a que el número de análisis llevado a cabo previamente en cada tipo de capilar era distinto. Una vez comprobado que los capilares de ambas casas comerciales se comportaban de forma similar, el estudio se continuó con los capilares del tipo 1 por motivos de disponibilidad.

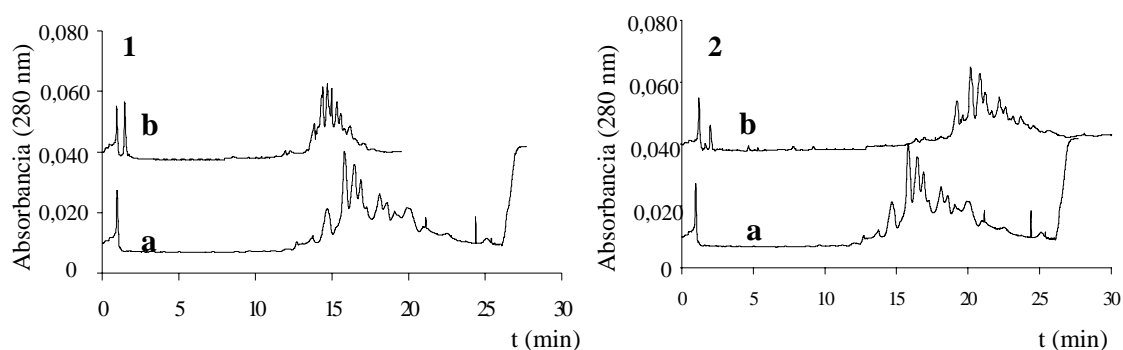


Figura 2.27. Evolución de capilares recubiertos de PVA en la separación de bandas de AGP con un método de CIEF “two-step”. Los electroforegramas **1a** y **1b** corresponden a los análisis número 24 y 42, respectivamente, llevados a cabo en un capilar recubierto de PVA del tipo 2. Los electroforegrama **2a** y **2b** corresponden al análisis número 24 de un capilar recubierto de PVA llevado a cabo en un capilar del tipo 2 y al análisis número 4 llevado a cabo en un capilar recubierto de PVA del tipo 1, respectivamente. Condiciones analíticas como en **Figura 2.25.c**.

Como se muestra en la **Figura 2.28**, la reproducibilidad en la separación de AGP fue buena para análisis llevados a cabo el mismo día. Los electroforegramas de las **Figuras 2.28.1** y **2.28.2** muestran la reproducibilidad en el mismo día para dos capilares distintos del mismo lote. Por otro lado, los electroforegramas de distintos capilares del mismo lote también fueron comparables (**Figura 2.28.3**).

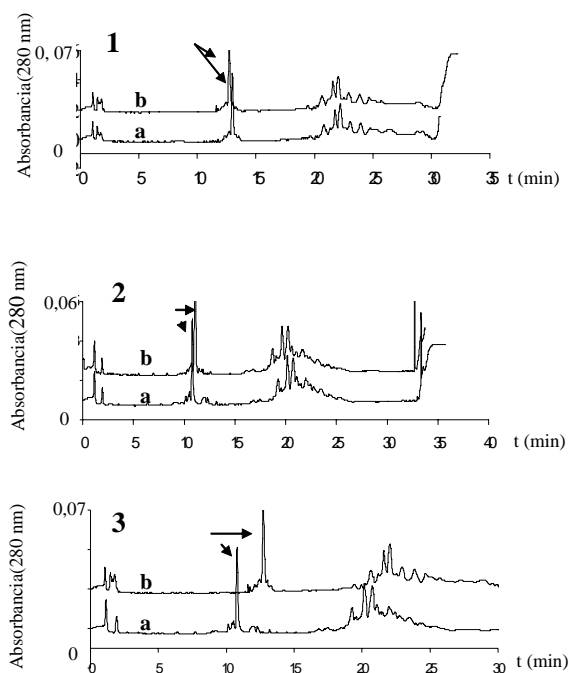


Figura 2.28. Reproducibilidad de la separación de formas AGP con un método de CIEF “two-step” en capilares recubiertos de PVA del tipo 1. Los electroforegramas de **1** corresponden a dos análisis consecutivos en un capilar recubierto de PVA. Los electroforegramas de **2** corresponden a dos análisis consecutivos en otro capilar recubierto de PVA del mismo lote que el anterior. Los electroforegramas de **3** corresponden a dos análisis en dos capilares diferentes recubiertos de PVA del mismo lote. Condiciones analíticas como en **Figura 2.26.a**. Las flechas indican los picos correspondientes al TI.

En resumen, las condiciones analíticas que se seleccionaron como óptimas en la separación de AGP fueron las que siguen. La mezcla de muestra se compuso de: 1 mg/mL AGP; 6,3% anfolitos (v/v) en los siguientes intervalos de pH: 2-4, 3-10, 3-5, 2,5-5 (3:1:1:1) (v/v); 5,6 M urea; 20 mM NaCl; 0,25 mg/mL TI y 0,25 mg/mL de CCK (en los casos en que se añadió a la muestra). La composición del catolito fue 20 mM NaOH con adición de 1M H₃PO₄ para llevar la disolución a un pH de 11,85. El anolito consistió en 91 mM H₃PO₄ en CIEF gel. El tiempo de enfoque fue de 10 min a 20 kV seguido de una movilización por baja presión (0,5 p.s.i.) manteniendo el voltaje.

2.4.2.3 Exactitud obtenida con los distintos parámetros de migración en la asignación de bandas de AGP patrón

El objetivo de los experimentos descritos en esta sección fue comprobar si alguno de los parámetros de migración seleccionados era útil para asignar con exactitud bandas de AGP patrón separadas por el método “two-step” CIEF.

Como se ha mencionado en la parte experimental, los parámetros de migración estudiados fueron:

P1: tiempo de migración de cada banda de AGP (t_m).

P2: tiempo de migración de cada banda de AGP relativo al tiempo de migración de TI (t_m/t_{TI}).

P3: tiempo de migración de cada banda de AGP relativo al tiempo de migración de CCK (t_m/t_{CCK}).

P4: tiempo de migración de cada banda de AGP relativo al AF (t_m/t_{AF}).

Se emplearon dos capilares recubiertos de PVA del tipo 1 y del mismo lote (capilar A y B) para calcular la exactitud en la asignación de bandas de AGP obtenidas con cada parámetro de migración. En ambos capilares, se analizó 3 veces la misma mezcla de muestra conteniendo AGP (1,25 mg/mL) y TI (0,25 mg/mL). Esa muestra se analizó 3 veces más, tras haberle añadido CCK (0,15 mg/mL) como patrón interno.

Por otra parte, se analizaron mezclas de muestra con diferentes concentraciones de AGP, con el objeto de comprobar el efecto de la concentración de la proteína sobre el porcentaje de asignaciones correctas de bandas de AGP (exactitud). En el capilar A, las concentraciones de AGP que se estudiaron fueron 0,32, 0,63 y 1,25 mg/mL. En el capilar B, las concentraciones de AGP analizadas fueron 1, 2 y 3 mg/mL. Cada muestra se analizó sin CCK una vez y después se analizó con CCK como patrón interno. Estas diferencias en las concentraciones de AGP analizadas en cada capilar se seleccionaron para estudiar la influencia de la concentración de proteína en la muestra sobre los tiempos de migración. Como se sabe, las proteínas son compuestos anfóteros, y es posible que su concentración en la muestra influya sobre su propio enfoque, y por tanto sobre su propio tiempo de migración [55]. Este experimento es importante porque el método se desarrolla con vistas a su uso en laboratorios clínicos, donde las diferentes

muestras analizadas pueden tener diferentes concentraciones que podrían influir sobre la asignación correcta de las bandas de AGP.

En la **Tabla 2.6** se muestran los valores medios de la exactitud en la asignación de bandas de AGP obtenidos con cada parámetro de migración para cada grupo de experimentos y capilar. Cuando se añade CCK a la muestra, éste comigra entre las bandas 3 y 4 (**Figura 2.24**).

Tabla 2.6. Exactitud media para las bandas de AGP (%) obtenida con cada uno de los 4 parámetros de migración en los experimentos de CIEF con AGP patrón.

PARÁMETRO	Capilar A		Capilar B	
	Día 1. Misma muestra de AGP (1,25 mg/mL)	Día 2. Distintas concentraciones de AGP*	Día 1. Misma muestra de AGP (1,25 mg/mL)	Día 2. Distintas concentraciones de AGP**
P1 (t_m)	84,71	91,34	94,77	Asignación incorrecta
P2 (t_m/t_{TI})	80,08	98,93	81,46	40,16
P3 (t_m/t_{CCK})	99,00	99,54	100	99,06
P4 (t_m/t_{AF})	94,65	96,20	77,41	90,20

*Concentración de AGP: 0,31; 0,63 y 1,25 mg/mL; ** Concentración de AGP: 1, 2 y 3 mg/mL.

Como puede observarse en la tabla, t_m/t_{CCK} es el parámetro de migración más robusto de entre los estudiados y además es con el que se obtienen mejores exactitudes (por encima del 99% en todos los grupos de experimentos). Es un parámetro de migración que no se ve afectado por la concentración de AGP. El resto de parámetros, sin embargo da lugar a exactitudes bajas en alguno de los grupos de experimentos. Es sabido que cuanto más cerca esté el patrón interno del analito, mejor será la reproducibilidad del parámetro de migración. Por tanto, no es extraño comprobar que CCK se presenta como el mejor patrón interno para las bandas de AGP. El tiempo de migración fue el parámetro de migración menos exacto, dando lugar incluso a asignaciones incorrectas. Mientras que la variación de concentración de AGP en el intervalo 0,31-1,25 mg/mL no afecta a la exactitud de los parámetros, las variaciones de concentración de AGP en el intervalo 1-3 mg/mL parecen influir sobre P2 (t_m/t_{TI}). Por tanto, el parámetro de migración seleccionado como el más robusto y exacto fue P3

y fue el utilizado para la asignación de bandas de AGP de muestras de individuos sanos y enfermos, que se describe más adelante.

2.4.2.4 Exactitud obtenida con los distintos parámetros de migración en la asignación de bandas de AGP de muestras de suero preparadas con el método “cloroformo-metanol completo”

Las muestras de AGP de sanos y enfermos se analizaron en un tercer capilar recubierto de PVA del tipo 1 del mismo lote que los empleados en los experimentos que se acaban de describir. El primer día de trabajo se analizaron por duplicado con TI en la mezcla de muestra. El segundo día de trabajo se analizaron las mismas muestras con TI y CCK, analizándose una vez cada una. La limitada cantidad de muestra disponible no permitió realizar un mayor número de análisis.

Un electroforegrama de cada una de las muestras (con TI) puede verse en la **Figura 2.29**. El perfil electroforético de las muestras de sanos y enfermos difiere del perfil obtenido para AGP patrón con el mismo método (ver **Figura 2.26.a**). Probablemente, el motivo de esta diferencia procede de que los dos tipos de muestras (las de sanos y enfermos y la patrón) han sido purificadas de sueros mediante diferentes métodos. Se sabe que el método de purificación es uno de los factores que puede afectar al perfil electroforético observado para una proteína determinada [28, 29].

En los análisis obtenidos para las muestras de individuos sanos y pacientes con cáncer por CIEF se plantea la misma necesidad que para esas mismas muestras analizadas por CZE, pues es necesario asignar las bandas de AGP con exactitud para poder realizar comparaciones cuali y cuantitativas de los correspondientes electroforegramas. Por ello, se utilizaron los parámetros de migración estudiados en CIEF para poder llevar a cabo una asignación fidedigna de las bandas. Es importante detallar la forma de trabajo para poder calcular las exactitudes de asignación con P3 (t_m/t_{CCK}). En el caso de las muestras de sanos y enfermos, CCK comigra con una de las bandas principales, al contrario de lo que ocurre al analizar AGP patrón con CCK, en las que migraba entre dos bandas principales de AGP. Por tanto, en esos análisis, la exactitud media aportada por el programa estadístico no tiene en cuenta dicha banda.

Sin embargo, puede considerarse que esa banda está asignada con una exactitud del 100% porque es la que comigra con CCK.

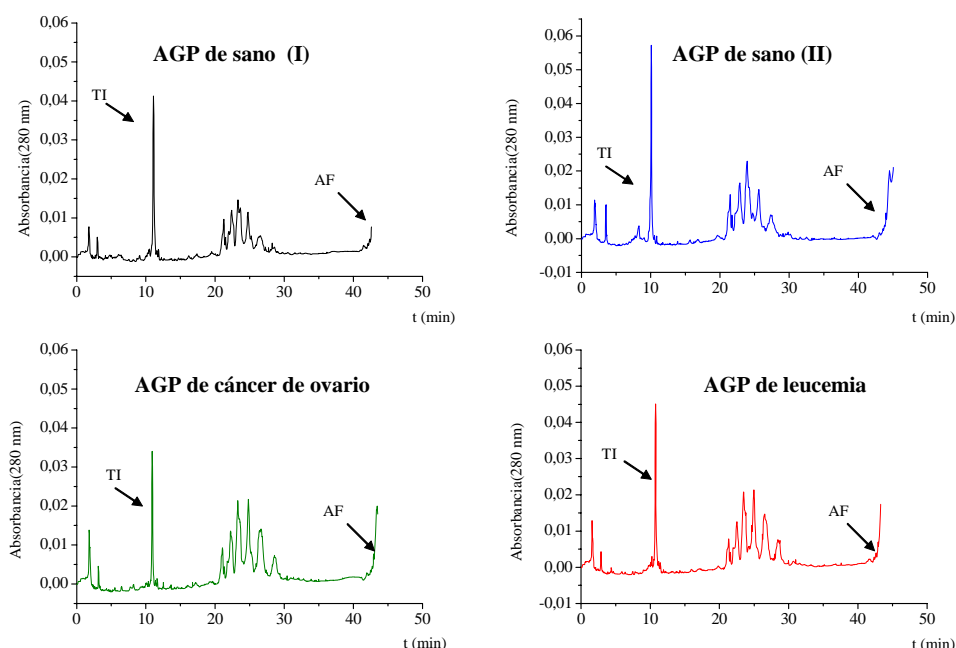


Figura 2.29. Electroforegramas de muestras de AGP extraída de suero de individuos sanos y enfermos obtenidos con un método de CIEF “two-step”. Condiciones analíticas como en **Figura 2.26.a**.

La hipótesis de asignación de bandas de AGP que se estableció fue que todas las muestras presentaban las mismas bandas. Los resultados obtenidos para todos los parámetros con esta hipótesis están reunidos en la **Tabla 2.7**.

Tabla 2.7. Exactitud media (%) en la asignación de bandas obtenida para las muestras de AGP procedentes de individuos sanos y con cáncer.

PARÁMETRO	Día 1. Muestras con TI (n=8)	Día 2. Muestras con TI y CCK (n=4)
P1 (t_m)	77,28	46,56
P2 (t_m/t_{TI})	65,99	36,39
P3 (t_m/t_{CCK})	N.P.	94,98
P4 (t_m/t_{AF})	94,75	81,74

N.P. No procede porque no se inyectó con CCK

Se obtuvo una exactitud media del 94,98% cuando se utilizó P3 (t_m/t_{CCK}), un valor similar al obtenido con ese parámetro con la AGP patrón. Por tanto, esta hipótesis

se asumió como correcta. La asignación de bandas de AGP se realizó numerándolas de la 1 a la 6 (**Figura 2.30**). Mediante CIEF no se encontraron diferencias cualitativas entre las muestras, todas presentaron las mismas 6 bandas. Sin embargo, en la figura parecen observarse diferencias cuantitativas entre las AGP de sano y de enfermos de cáncer. Es necesario comprobar si esas diferencias se deben realmente a una diferente distribución de bandas entre sanos y enfermos o, por el contrario, se deben a variaciones inherentes al método.

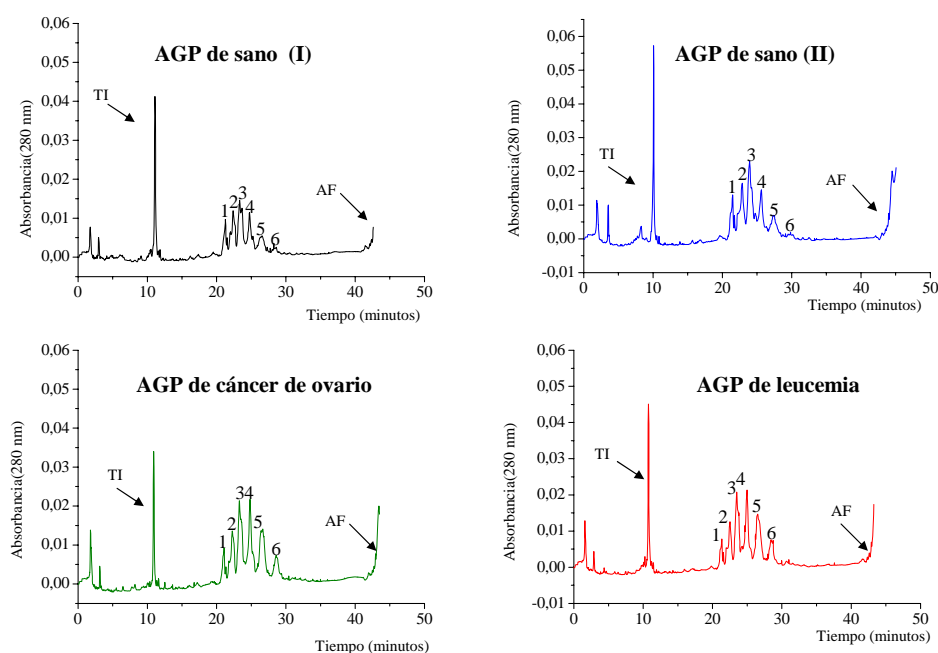


Figura 2.30. Asignación de bandas de AGP de sanos y enfermos tras confirmar la hipótesis de asignación de bandas mediante la exactitud obtenida con t_m/t_{CCK} . Condiciones analíticas como en Figura 2.26.a.

2.4.2.5 Precisión del porcentaje de área de cada zona en muestras de AGP patrón

Los mismos grupos de muestras de patrón de AGP que se utilizaron para estudiar la exactitud obtenida con diferentes parámetros de migración se utilizaron en el estudio de la reproducibilidad de las áreas. Debido a que en dos de los cuatro grupos de muestras se analizaron AGP de diferentes concentraciones, se seleccionó el porcentaje de área como parámetro más estable. En este caso, sin embargo, no se tuvieron en cuenta los análisis realizados con CCK porque éste interfiere en la integración de las bandas. Debido a que no se consiguió una resolución a línea de base de las bandas de

AGP, se decidió establecer áreas o zonas de integración, con el objeto de simplificar el perfil electroforético de la AGP patrón. Siguiendo este criterio, se dividió el electroforegrama en 6 zonas, como está representado en la **Figura 2.31**.

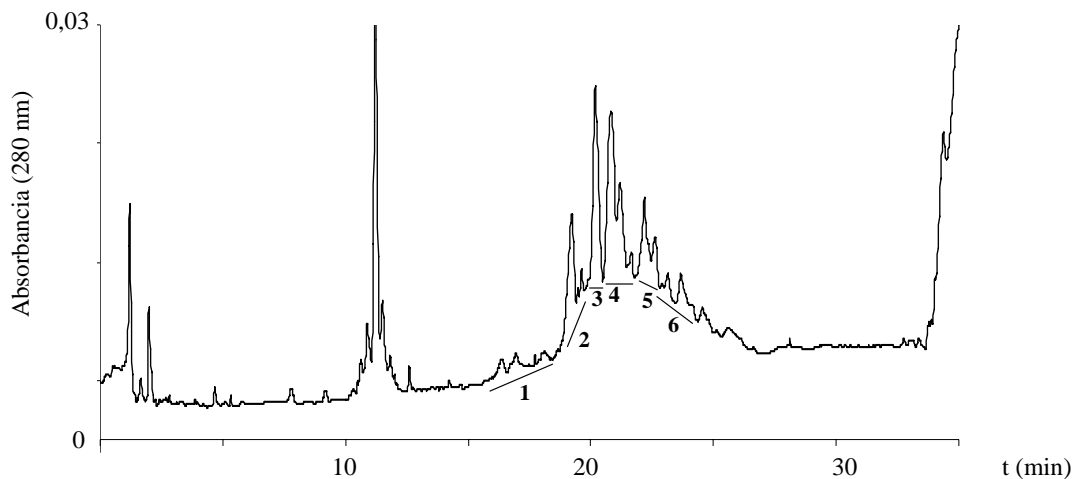


Figura 2.31. Representación gráfica de zonas de integración establecidas para AGP patrón. Condiciones analíticas como en Figura 2.26.a.

Los resultados de reproducibilidad obtenidos para los cuatro grupos de muestras y las 6 zonas de integración de la AGP patrón están reflejados en la **Tabla 2.8**. Considerando el conjunto de todos los grupos de muestras estudiados, el valor de la RSD está en el intervalo de 1,1-22,7% en las zonas de AGP que suponen más del 10% del total. Los valores de RSD más elevados son los correspondientes a las zonas de AGP más pequeñas, probablemente debido a la dificultad de integración. Estos valores de RSD son similares a los publicados para reproducibilidades de áreas en CIEF, donde los valores oscilan entre 6% y 28,1% [56- 58].

Tabla 2.8. Valores medios y reproducibilidad de áreas intra-día para la misma muestra de AGP patrón (AGP: 1,25 mg/mL) inyectada 3 veces y para muestras con diferentes concentraciones.

Zona de AGP	Capilar A				Capilar B			
	Día 1. Misma muestra de AGP (n=3)		Día 2. Diferentes concentraciones de AGP* (n=3)		Día 1. Misma muestra de AGP (n=3)		Día 2. Diferentes concentraciones de AGP* (n=3)	
	Media	RSD (%)	Media	RSD (%)	Media	RSD (%)	Media	RSD (%)
1	6,59	18,2	7,2	14,9	2,66	5,4	7,01	11,3
2	15,31	7,8	13,2	19,4	18,46	14,0	17,89	3,6
3	22,54	1,1	21,2	16,7	28,89	6,7	21,99	2,7
4	38,09	6,6	35,8	10,7	25,15	11,5	27,87	5,7
5	11,64	13,3	17,5	22,7	17,88	14,0	17,80	16,8
6	5,84	15,2	5,2	54,4	6,95	32,0	7,43	22,5

* Concentración de AGP en las muestras: 0,3, 0,63, y 1,25 mg/mL.

** Concentración de AGP en las muestras: 1, 2, y 3 mg/mL.

2.4.2.6 Comparación cuantitativa de la AGP de muestras de suero preparadas con el método “cloroformo-metanol completo”

En las muestras de AGP de sanos y enfermos no fue necesario establecer zonas de integración que comprendieran más de una banda electroforética, como en la AGP patrón, porque el perfil electroforético es más sencillo y está mejor resuelto. Las bandas electroforéticas integradas fueron las mismas que las asignadas en la comparación cualitativa de las muestras (Figura 2.30). Desafortunadamente, el bajo número de análisis que se pudieron realizar de cada muestra impidió calcular valores reales de la media y la RSD de las áreas de cada banda. Por ello, se calcularon la media estimada (e-media) y RSD estimado (e-RSD), que corresponden a los valores calculados del análisis por duplicado de la muestra. Estos valores no carecen de significado con fines comparativos. Los resultados están reflejados en la Tabla 2.9, donde se observa que las RSD fueron mejores que los RSD para la AGP patrón, muy probablemente porque estas muestras dan lugar a perfiles mejor resueltos.

Tabla 2.9. e-Medias y e-RSD (%) para cada banda de AGP de muestras de sanos y enfermos (n=2)

Banda de AGP	AGP de sano(I)		AGP de sano(II)		AGP de cáncer de ovario		AGP de leucemia	
	e-Media	e-RSD (%)	Media	e-RSD (%)	Media	e-RSD (%)	Media	e-RSD (%)
1	14,79	2,5	14,68	9,4	9,21	2,2	8,31	1,7
2	24,52	3,2	21,66	1,9	16,94	4,7	16,36	0,2
3	30,66	2,4	25,59	3,2	25,68	2,7	25,0	0,4
4	15,37	19,2	11,08	3,6	20,09	1,0	20,34	1,9
5	11,92	10,9	10,40	1,8	20,05	7,6	22,7	0,2
6	2,73	7,6	2,070	2,7	8,03	5,4	7,29	0,9

En la **Figura 2.32** están representadas gráficamente estas medias y sus desviaciones estándar, donde puede observarse cómo dichas desviaciones son menores que las diferencias encontradas entre las muestras. El porcentaje de área de las isoformas más ácidas aumenta en las dos muestras de AGP de cáncer. Estos resultados están de acuerdo los obtenidos en este capítulo para estas mismas muestras analizadas por CZE y además, concuerdan con lo descrito en la literatura, en la que se ha indicado la hipersialización de ciertas glicoproteínas en diversos tipos de cáncer [34-36]. Este aumento de número de ácidos siálicos por molécula conferiría a ésta un pI menor (o más abundancia de las bandas de AGP con pI menores).

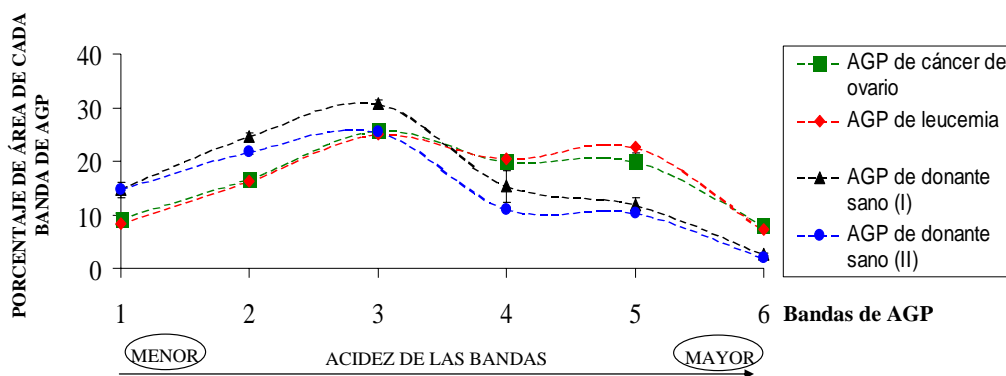


Figura 2.32. e-Media y desviación estándar estimada (indicada con una barra vertical, “I”) del porcentaje de área de cada banda de AGP en las diferentes muestras procedentes de individuos sanos y pacientes con cáncer.

2.4.3 Consideraciones finales y perspectivas del análisis de AGP por CE

Como continuación del trabajo recogido en esta Memoria, es necesario determinar si el método de extracción de AGP influye sobre los perfiles electroforéticos obtenidos. Para ello, es necesario disponer de un volumen elevado de diferentes muestras de suero para someter cada muestra a los diferentes métodos de extracción descritos en este capítulo y comparar los perfiles electroforéticos de AGP obtenidos con cada método de extracción.

Es necesario insistir en el bajo número de muestras analizadas en el presente estudio. Dichas muestras se han utilizado como prueba de concepto para estudiar la aplicabilidad de los métodos de CE desarrollados, junto con el programa estadístico desarrollado en nuestro laboratorio, para el análisis y comparación de muestras de AGP de individuos sanos y enfermos. Los resultados obtenidos con las muestras preparadas con el método “cloroformo-metanol completo” son esperanzadores, pero en ningún caso pueden sacarse conclusiones definitivas sobre la utilidad de las bandas de AGP como marcadores tumorales.

2.5 CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este capítulo puede concluirse que:

1. De los dos métodos de CE desarrollados en este trabajo, el método de análisis de bandas de AGP por CZE permite separar hasta 11 bandas de la proteína con resolución a línea de base, mientras que por CIEF se pueden separar hasta 12 bandas sin resolución a línea de base.
2. El programa estadístico diseñado es útil para para la selección de parámetros de migración que permiten la asignación exacta de bandas de AGP separadas por CZE y por CIEF.
3. El tiempo de migración relativo al flujo electroosmótico y la movilidad electroforética son los parámetros más exactos de entre los estudiados para llevar a cabo la asignación fidedigna de bandas de AGP separadas por CZE.
4. El parámetro de migración más exacto de entre los estudiados en la asignación de bandas de AGP separadas por CIEF es el tiempo de migración relativo al tiempo de migración del patrón interno CCK.
5. Los métodos de separación de formas de AGP por CZE y por CIEF, junto con el programa estadístico de elección de parámetros de migración, permiten la asignación fidedigna de bandas de AGP, imprescindible para realizar comparaciones cualitativas y cuantitativas entre muestras de AGP de diferentes orígenes.
6. El método de preparación de muestra con el que se detecta un mayor número de bandas de AGP al analizarse ésta por CZE es el denominado método “cloroformo-metanol completo”. Por el contrario, las condiciones en que se obtiene la muestra de AGP al prepararse con un método más corto, el método perclórico, impiden analizarla en concentración suficiente para determinar si con este método se podría extraer el mismo número de bandas que con el primero.

7. Las muestras de AGP (preparadas mediante el “método perclórico”) procedentes de sueros de pacientes con cáncer de vejiga y las de sueros de donantes sanos analizados con el método de CZE presentan las mismas bandas de AGP y también la misma distribución cuantitativa. Sólo uno de los casos, el de un paciente con cáncer de vejiga, presenta una distribución diferente de bandas de AGP.
8. Las muestras de AGP (preparadas mediante el “método cloroformo-metanol completo”) de un conjunto de sueros de pacientes con leucemia y de un conjunto de sueros de pacientes con cáncer de ovario, respectivamente, presentan una banda más con mayor relación carga/masa que la muestra de AGP del suero de un donante sano en su análisis por CZE. La muestra de AGP de un donante sano separada por CZE presenta una banda con menor relación carga/masa que las dos muestras de AGP de cáncer de ovario y de leucemia. El bajo número de muestras analizadas impide extraer datos concluyentes para el diagnóstico clínico.
9. Las muestras de AGP analizadas por CIEF (preparadas mediante método “cloroformo-metanol completo”) no presentan diferencias cualitativas; todas dan lugar a las mismas bandas electroforéticas.
10. La distribución cuantitativa de las bandas de AGP (preparadas mediante método “cloroformo-metanol completo”) separadas tanto en CZE como en CIEF es diferente en las muestras de donantes sanos que en las muestras de pacientes con cáncer de ovario y pacientes con leucemia. Las muestras de AGP procedentes de pacientes con cáncer presentan una mayor proporción de bandas con mayor carga negativa/masa en CZE y con un pI más ácido en CIEF. El bajo número de muestras analizadas impide extraer datos concluyentes para el diagnóstico.
11. Los métodos de preparación de muestra y de análisis por CE de AGP, junto con el programa estadístico de selección de parámetros de migración, se han demostrado útiles y fiables en la comparación de AGP de diferentes

orígenes. Por tanto, abren el camino para ser utilizados como métodos de análisis rápidos en estudios con un elevado volumen de muestras de diferentes patologías, que permitan extraer conclusiones significativas sobre el posible uso de las formas de AGP como marcador de enfermedad.

2.6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Fournier, T., Medjoubi-N.N., Porquet, D. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1482, 157-171.
- [2] Iijima, S., Shiba, K., Kimura, M., Nagai, K., Iwai, T. *Electrophoresis* 2000, 21, 753-759.
- [3] James, D.C., Freedman, R.B., Hoare, M., Jenkins, N. *Anal. Biochem.* 1994, 22, 315-322.
- [4] Duché, J-C., Urien, S., Simon, N., Malaurie, E., Monnet, I., Barré, J. *Clin. Biochem.* 2000, 33, 197-202.
- [5] Mackiewicz, A., Mackiewicz, K. *Glycoconj. J.* 1995, 12, 241-247.
- [6] Kremmer, T., Szöllösi, É., Boldizsár, M., Vincze, B., Ludanyi, K., Imre, T., Schlosser, G., Vékey, K. *Biomed. Chromatogr.* 2004, 18, 323-329.
- [7] Hashimoto, S., Asoa, T., Takahashi, J., Yagihashi, Y., Nishimura, T., Saniabadi, A. R., Poland, D.C.W., van Dijk, W., Kuwano, H., Kochibe, N., Yazawa, S. *Cancer* 2004, 101, 2825-2836.
- [8] Hrycaj, P., Sobieska, M., Mackiewicz, S., Muller, W. *Ann. Rheum. Dis.* 1993, 52, 138-141.
- [9] Elliott, M.A., Elliott, H.G., Gallagher, K., McGuire, J., Field, M., Smith, K.D. *J. Chromatogr. B* 1997, 688, 229-237.
- [10] Higai, K., Aoki, Y., Azuma, Y., Matsumoto, K. *Biochim. Biophys. Acta* 2005, 1725, 128-135.
- [11] Pácaková, V., Hubená, S., Tichá, M., Madera, M., Stulik, K. *Electrophoresis* 2001, 22, 459-463.
- [12] Kinoshita, M., Murakami, E., Oda, Y., Funakubo, T., Kawakami, D., Kakehi, K., Kawasaki, N., Morimoto, K., Hayakawa, T. *J. Chromatogr. A.* 2000, 866, 261-271.
- [13] Kakehi, K., Kinoshita, M., Kawakami, D., Tanaka, J., Sei, K., Endo, K., Oda, Y., Iwaki, M., Masuko, T. *Anal. Chem.* 2001, 73, 2640-2647.
- [14] Sei, K., Nakano, M., Kinoshita, M., Masuko, T., Kakehi, K. *J. Chromatogr. A* 2002, 958, 273-281.
- [15] Wu, J., Li, S-C., Watson, A. *J. Chromatogr. A* 1998, 817, 163-171.
- [16] Wehr, T., Zhu, M., Rodriguez-Diaz, R. Karger, B. L., Hancock, W. S. (Eds.), *Methods in Enzymology*, Vol 270, part A. Academic Press, USA, 1996. pp. 358-374.

- [17] Mazzeo, J.R., Krull, I.S. *J. Chromatogr.* 1992, 606, 291- 296.
- [18] Anderson, N. L., Anderson, N. G. *Mol. Cell. Proteom.* 2002, 1, 845-867.
- [19] Reif, O. W., Lasuch, R., Freitag, R. *Adv. Chromatogr.* 1994, 34, 1-7.
- [20] Lara-Quintanar, P., Lacunza, I., Sanz, J., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M. J. *Chromatogr. A*, 2006, doi: 10.1016/j.chroma.2006.07.079
- [21] Kremmer, T., Szöllösi, E., Boldizsár, M., Vincze, B., Ludanyi, K., Imre, T., Schlosser, G., Vékey, K. *Biomed. Chromatogr.* 2004, 18, 323-329.
- [22] Stumpe, M, Miller, C., Morton, N.S., Bell, G., Watson, D.G. *J. Chromatogr. B* 2006, 831, 81-84.
- [23] Millipore, 1999. Application Note: Passivation of Microcon®, Centricon®, and Ultrafree Concentrators for Improved recovery.
- [24] Puerta, A., Diez-Masa, J. C., de Frutos, M. *J. Immunol. Methods* 2004, 289, 225.
- [25] Cifuentes, A., Moreno-Arribas, M.V., de Frutos, M., Diez-Masa, J.C. *J. Chromatogr. A* 1999, 830, 453-463.
- [26] Hokke, C.H., Bergwerff, A.A., Vand Dedem, G.W.K., Kamerling, J.P. Vliegthart, J.F.G. *Eur. J. Biochem.* 1995, 228, 981-1008.
- [27] Hao, Y-L., Wickerhauser, M. *Biochim. Biophys. Acta* 1973, 322, 99-108.
- [28] Lacunza, I., Lara-Quintanar, P., Moya, G., Sanz, J., Diez-Masa, J.C., de Frutos, M. *Electrophoresis* 2004, 25, 1569-1579.
- [29] Storrington, P.L., Tiplady, R.J., Gaines Das, R.E., Stenning, B.E., Lamikanra, A., Rafferty, B., Lee, J. *Br. J. Haematol.* 1998, 100, 79-89.
- [30] Bonvent, J.J., Barberi, R., Bartolino, R., Capelli, L., Righetti, P.G. *J. Chromatogr. A* 1996, 756, 233-243.
- [31] Hjertén, S., Kubo, K. *Electrophoresis* 1993, 14, 390-395.
- [32] Boone, C.M., Franke, J.P., de Zeeuw, R.A., Ensing, K. *Electrophoresis* 2000, 21, 1545-1551.
- [33] Jumpanen, J.H., Riekkola, M.L. *Anal. Chem.* 1995, 67, 1060-1066.
- [34] Turner, G.A., Skillen, A., Buamah, P., Guthrie, D., Welsh, J., Harrison, J.W., Kowalski, A. *J. Clin. Pathol.* 1985, 38, 588-592.
- [35] Patel, P.S., Adhvaryu, S.G., Balar, D.B., Parikh, B.J., Shah, P.M. *Anticancer Res.* 1994, 14, 747-752.
- [36] Raval, G.N., Patel, D.D., Parekh, L.J., Shah, M.H., Patel, P.S. *Oral Dis.* 2003, 9, 119-128.

- [37] Ma, Y., Liu, Y., Du, M. *Electrophoresis* 2004, 25, 1473-1484.
- [38] Shauer, R., *Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.* 1982, 40, 131.
- [39] López-Soto-Yarritu, P., Diez-Masa, J.C., Cifuentes, A., de Frutos, M. *J. Chromatogr. A*. 2002, 968, 221-228.
- [40] Thorman, W., Mosher, R.A. *Electrophoresis* 2006, 27, 968-983.
- [41] Mohan, D., Lee, C. S. *J. Chromatogr. A* 2002, 979, 271-276.
- [42] Hiroaka, A., Tominaga, I., Hori, H. *J. Chromatogr. A* 2002, 961, 147-153.
- [43] Jin, Y., Luo, G., Oka, T., Manabe, T. *Electrophoresis* 2002, 23, 3385-3391.
- [44] Hiroaka, A., Seiki, K., Oda, H., Eguchi, N., Urade, Y., Tominaga, I., Baba, K. *Electrophoresis* 2001, 22, 3433-3437.
- [45] Schwer, C. *Electrophoresis* 1995, 16, 2121-2126.
- [46] Shimura, K. *Electrophoresis* 2002, 23, 3847-3857.
- [47] Clarke, N.J., Tomlinson, A.J. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2786-2792.
- [48] Righetti, P.G., Gelfi, C., Conti, M. *J. Chromatogr. B* 1997, 699, 91-104.
- [49] Righetti, P.G., Gelfi, C., Chiari, M. en: Righetti, P. G. (Ed.) *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*, CRC Press, Boca Raton, Florida, 1996. pp 509-539.
- [50] Molteni, S., Frischknecht, H., Thormann, W. *Electrophoresis* 1994, 15, 22-30.
- [51] Hjerten, S en: Grossman, P. D., Colburn, J.C. (Eds.), *Capillary Electrophoresis*, Academic Press, USA, 1992, pp.207-209.
- [52] Kuroda, Y., Yukinaga, H., Kitano, M., Noguchi, T., Nemati, M., Shibukawa, A., Nakagawa, T., Matsuzaki, K. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2005, 37, 423-428.
- [53] Chen, S-M., Wiktorowicz, J. E. *Anal. Biochem.* 1992, 206, 84-90.
- [54] Stryer, L. *Biochemistry, 4th Edition*, Freeman, New York, 1995. pp 237-262.
- [55] Righetti, P.G. *J. Chromatogr. A* 2004, 1037, 491-499.
- [56] Lasdun, A.M., Kurumbail, R. R., Leimgruber, N. K., Rathore, A. S. *J. Chromatogr. A* 2001, 917, 147-158.
- [57] Mario, N., Baudin, B., Aussel, C., Giboudeau, J. *Clin. Chem.* 1997, 43, 2137-2142.
- [58] Palm, A., Zaragoza-Sundqvist, M., Marko-Varga, G. *J. Sep. Sci.* 2004, 27, 124-128.

CAPÍTULO 3

DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE PROTEÍNA C-REACTIVA (CRP) POR ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA LIBRE

**DESARROLLO DE UN MÉTODO DE ANÁLISIS DE PROTEÍNA C-REACTIVA
(CRP) POR ELECTROFORESIS CAPILAR EN ZONA LIBRE**

3.1 INTRODUCCIÓN.....	183
3.1.1 La proteína C-reactiva.....	183
3.1.2 Las enfermedades autoinmunes.....	185
3.1.3 Inducción de la glicosilación de la CRP en determinados estados patofisiológicos.....	186
3.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO.....	190
3.3 PARTE EXPERIMENTAL.....	191
3.3.1 Reactivos.....	191
3.3.2 Muestras.....	191
3.3.3 Preparación de las muestras.....	191
3.3.4 Dispositivos e instrumentación.....	192
3.3.5 Procedimientos para el análisis de CRP por CZE.....	193
3.3.6 Procedimientos para la extracción de CRP de muestras de suero.	194
3.3.7 Procedimientos para el análisis por CZE de CRP de muestras de suero de donantes sanos y pacientes con lupus eritromatoso sistémico (SLE) y artritis.....	195
3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	196
3.4.1 Optimización de un método de análisis de CRP por CZE robusto frente a las variaciones de calcio de la muestra.....	196
3.4.1.1 Desarrollo de un método de análisis de CRP por CZE.....	196
3.4.1.2 Estudio del efecto del catión calcio y del EDTA sobre el análisis de CRP por CZE.....	200
3.4.2 Optimización de la extracción de CRP de suero.....	207
3.4.3 Análisis y comparación de CRP extraída de sueros de individuos sanos y pacientes con SLE y artritis.....	212
3.4.3.1 Análisis de CRP extraída de donantes sanos.....	212
3.4.3.2 Análisis de CRP extraída de pacientes con SLE.....	214
3.4.3.3 Análisis de CRP extraída de una paciente con artritis.....	216
3.4.4 Consideraciones finales.....	217

3.5 CONCLUSIONES.....	218
3.6 BIBLIOGRAFÍA.....	219

3.1 INTRODUCCIÓN

3.1.1 La proteína C-reactiva

La proteína C-reactiva (CRP) se sintetiza en el hígado en humanos y otras especies animales y pertenece a las proteínas de fase aguda. La concentración de estas proteínas aumenta rápidamente y de forma pronunciada en respuesta a una infección o a un daño tisular. La función biológica principal de CRP es la de reconocer patógenos y células dañadas del organismo y mediar su eliminación [1]. La concentración de CRP en el suero de individuos sanos está en el intervalo de 0,1-0,5 µg/mL, pero puede aumentar hasta 1000 veces en estados de inflamación [2].

Con respecto a su estructura, la CRP es un pentámero compuesto por cinco unidades idénticas (protómeros), unidas no covalentemente en torno a un poro central. Cada protómero, que no está glicosilado, tiene dos puntos de unión al catión calcio y un puente disulfuro interno [3, 4]. Además, cada subunidad tiene 206 aminoácidos y un peso de 23027 kDa [4]. Una de las características más importantes de la CRP es su afinidad por la fosfocolina (PC); una molécula de PC puede unirse a cada uno de los protómeros [1]. Para que se produzca esta unión es necesario que tenga lugar el cambio conformacional en la proteína que origina la unión de dos cationes calcio por subunidad [3]. Por tanto, el catión calcio es clave en el reconocimiento PC-CRP.

La PC es un componente habitual de los polisacáridos de muchas bacterias y hongos. De hecho, la CRP debe su nombre a que es reactiva a los residuos de PC presentes en el polisacárido C, propio de *Streptococcus pneumoniae*. La CRP no sólo se une a la PC, también lo hace a ciertos componentes del núcleo celular, tales como pequeñas partículas ribonucleoprotéicas [1]. Estos complejos ligando-CRP activan la vía del complemento, que es el mayor actor de la respuesta humoral del sistema inmune, y consiste en alrededor de 30 proteínas de suero y de membrana. Tras su activación, estas proteínas interaccionan entre sí para dar lugar a productos de reacción que facilitan la eliminación de antígenos (moléculas o fragmentos de molécula que el organismo reconoce como extraños) y favorecen la respuesta inflamatoria [5]. Además, dichos complejos ligando-CRP se unen a receptores de los fagocitos provocando su activación para que cumplan su misión como células del sistema inmunitario con capacidad de

ingestión y digestión de antígenos (por ejemplo, microorganismos y células dañadas del propio organismo) [5]. Estas dos propiedades de la CRP, de reconocer patógenos y de iniciar su eliminación por medio de la activación de la vía del complemento y activando los fagocitos, hacen que la CRP sea clave en el sistema de defensa innato del organismo. Al contrario que el sistema inmunitario adaptativo, el sistema innato (o no específico), es un sistema de defensa que reconoce clases genéricas de moléculas. Cuando el sistema inmunitario innato reconoce estas moléculas, se dispara una respuesta inflamatoria, de la que son síntomas el enrojecimiento, la hinchazón de los puntos afectados, la fiebre y el malestar general [6]. La CRP, por tanto, juega un papel importantísimo en la regulación y activación del sistema inmunitario innato. Además, parece que la CRP forma parte en la eliminación de células apoptóticas (en proceso de suicidio celular) y necróticas del tejido dañado, contribuyendo al restablecimiento y funcionamiento normal de éste.

Desde un punto de vista clínico, los niveles de CRP en suero han sido utilizados para monitorizar procesos de inflamación, infección y daño tisular. Sin embargo, hasta la fecha, los niveles de CRP no tienen un valor diagnóstico por sí solos, siendo necesario conocer otros síntomas o resultados clínicos del paciente para poder establecer un diagnóstico. La medida de CRP en sangre se ha comparado con la medida de la temperatura de un paciente, en el sentido de que es un indicador útil del estado general del paciente, pero debe acompañarse de otras pruebas clínicas si se quiere diagnosticar las causas de su enfermedad. Las ventajas que presenta la CRP como marcador de inflamación e infección es que los valores de CRP en la respuesta aguda no presentan variación en función de la hora del día, no se ven afectados después de las comidas del paciente y hay muy pocos fármacos que alteren sus valores. Por tanto, es un marcador no específico muy robusto, que puede utilizarse para medir la respuesta de la inflamación o infección a determinados tratamientos [4]. Las medidas de CRP en plasma se utilizan para el estudio de la actividad de la enfermedad en artritis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, lupus y otras enfermedades inflamatorias [7, 8]. También se utiliza para ayuda en el diagnóstico y la monitorización del progreso de la infección en complicaciones post-operatorias, en septicemia neonatal y otros tipos de infecciones.

Existe bibliografía reciente que apunta hacia un posible valor diagnóstico de los niveles de CRP en enfermedades cardiovasculares. Niveles ligeramente altos de CRP tendrían una asociación directa con el riesgo de desarrollar una enfermedad cardiovascular y arteriosclerosis [4, 9-10]. Una de las opiniones más generalizadas es que ambas enfermedades implican un nivel de inflamación subyacente que se vería reflejado en este aumento ligero de los niveles de CRP en sangre [1, 4, 9]. También existen, sin embargo, publicaciones que atribuyen a la CRP una participación activa en el desarrollo de las placas arterioscleróticas [11-13].

3.1.2 Las enfermedades autoinmunes

El sistema inmunitario innato o no específico, en el que ya se ha mencionado el papel que juega la CRP, junto con el sistema inmunitario adaptativo, es el mecanismo de defensa del organismo frente a patógenos y antígenos en general. Brevemente, el sistema inmunitario adaptativo tiene como protagonistas a los linfocitos B y T. Los linfocitos B activados por las citoquinas, moléculas que forman parte de la respuesta innata, producen anticuerpos que se unen a los antígenos e inactivan la molécula o la marcan para que sea atacada por otros. Por otro lado, los linfocitos T reconocen los antígenos que presentan otras células. Los linfocitos B y T generan células “de memoria” que reconocerán el antígeno en futuras infecciones. La inmunidad adaptativa y la innata forman parte del mismo sistema inmunológico y están interrelacionadas [6].

Aunque, en teoría, el sistema inmune responde sólo a compuestos extraños, en ocasiones ocurre que el organismo se confunde y percibe como extraños compuestos propios. A estos antígenos se les ha denominado autoantígenos y a los anticuerpos que los reconocen, autoanticuerpos. Este fenómeno de trastorno inmunitario da lugar a un gran grupo de enfermedades que se denominan autoinmunes [6]. En esta introducción se va a describir con más detalle el lupus eritromatoso sistémico (SLE) y la artritis, dos enfermedades autoinmunes (una de las causas de la artritis es la autoinmunidad, entre otras), pues en este trabajo se ha contado con muestras de pacientes que tienen alguna de estas enfermedades.

El SLE es una enfermedad autoinmune. Una de las características de los pacientes de SLE es un eritema facial en forma de mariposa. Puede afectar a la piel, las articulaciones, los riñones, el corazón, los pulmones, los vasos sanguíneos y el cerebro [14, 15]. Como ocurre con muchas enfermedades autoinmunes, el diagnóstico de SLE es complicado. En la actualidad, el Colegio Estadounidense de Reumatólogos [16] ha elaborado un listado de once criterios para diagnosticar lupus. Una persona será diagnosticada con esta enfermedad cuando cuatro o más de los 11 criterios estén presentes simultánea o seriadamente, durante cualquier intervalo de la inflamación. Algunos de estos criterios son el eritema en las mejillas en forma de mariposa, fotosensibilidad y úlceras orales. El nivel de CRP no es un valor diagnóstico del lupus, sino que se utiliza para monitorizar el estado de la enfermedad y la respuesta a los tratamientos.

La artritis se caracteriza por dolor de naturaleza inflamatoria, limitación de la movilidad de la articulación afectada, tumefacción, aumento local de la temperatura y, en ocasiones, eritema periarticular [17]. Existen diversos orígenes de la artritis: bacteriano (artritis séptica bacteriana), fúngico (artritis por micobacterias y hongos) y vírico (artritis vírica) [18]. Además, una de las artritis más comunes es la artritis reumatoide [19], que está considerada como una enfermedad autoinmune [20] y que es crónica. Al igual que con el SLE, pueden pasar meses hasta que se establezca un diagnóstico seguro de la enfermedad [19]. Nuevamente, el Colegio Estadounidense de Reumatólogos ha establecido 9 criterios para diagnosticar artritis reumatoide [16]. El paciente debe cumplir al menos cuatro de los criterios para ser diagnosticado con la enfermedad. Los niveles de CRP en sangre también se utilizan en los pacientes con artritis para monitorizar el estado de la enfermedad, pero no son un criterio de diagnóstico.

3.1.3 Inducción de la glicosilación de la CRP en determinados estados patofisiológicos

Como se ha mencionado anteriormente, la CRP es una proteína no glicosilada. Sin embargo, recientemente, un grupo de investigación ha demostrado que la CRP sufre cierta glicosilación en pacientes con diversas enfermedades, como SLE, tuberculosis, y

otras [2, 21]. Los resultados de este grupo de investigación apuntan a que el tipo de glicosilación de CRP es específica para cada enfermedad y constante en los enfermos de una misma enfermedad. Al ser analizadas por electroforesis en geles con SDS (SDS/PAGE) y por isoelectroenfoque convencional, se demostró que existen variaciones significativas entre las CRP procedentes de pacientes con diferentes enfermedades. La glicosilación de CRP procedente de sueros de pacientes con las enfermedades estudiadas se demostró de diversos modos, entre otros, por tratamiento con neuraminidasa de la proteína. Las proteínas, una vez desprovistas de los ácidos siálicos, volvieron a analizarse por IEF y se comprobó que presentaban distintos puntos isoeléctricos que los encontrados en las CRP sin tratar. Además, las CRP de los diferentes pacientes se desglicosilaron y analizaron por SDS/PAGE, demostrando una variación de la masa de la proteína frente a la misma sin deglicosilar. Por otro lado, se realizó una cuantificación fluorimétrica del número de ácidos siálicos por molécula de CRP. Además, la composición glicosídica de cada CRP se estudió por cromatografía de gases (GC) y cromatografía de gases-espectrometría de masa (GC-MS). También se estudió la afinidad de las CRPs por diferentes lectinas. En el mismo trabajo, los fragmentos trípticos de la CRP de pacientes de tres de estas enfermedades se analizaron por MS. En las tres muestras fue característica la ausencia de dos fragmentos trípticos de CRP. Parece que esta ausencia provoca que dos residuos de la cadena aminoacídica, que potencialmente pueden anclar azúcares, queden expuestos hacia el exterior de la proteína, favoreciendo así su glicosilación.

Estos dos trabajos sobre la inducción de la glicosilación [2, 21] de CRP abren una nueva línea de investigación muy interesante que consiste en la posibilidad de usar el tipo de glicosilación de CRP como marcador de una enfermedad, no sólo como un marcador inespecífico de inflamación a través de la medida de sus concentración en sangre. La hipótesis a la que apuntan los trabajos arriba descritos es que CRP sufre una glicosilación diferencial en función de la enfermedad. Si esa hipótesis se confirma, el estudio del tipo de glicosilación de CRP, junto a sus niveles en sangre, sería una información muy valiosa para el diagnóstico de enfermedades difíciles de llevar a cabo en la actualidad (lupus, artritis reumatoide y otras). Para ello, sería necesario realizar un estudio con un número más elevado de pacientes, para lo que sería muy útil disponer de nuevas técnicas analíticas que faciliten el estudio.

La electroforesis capilar en zona libre (CZE) ha demostrado ser útil para separar formas de glicoproteínas con relaciones carga/masa muy similares, como se ha discutido en la Introducción General y a lo largo de toda esta Memoria. Por tanto, sería interesante intentar analizar posibles glicofomas de CRP por dicha técnica, porque las variaciones descritas por Das et al. [2] en la proteína podrían dar lugar a perfiles electroforéticos diferenciales entre pacientes con diferentes enfermedades. Uno de los problemas que hay que abordar en el análisis de la CRP por CZE es la unión CRP-Ca²⁺, siendo necesario estudiar la influencia de distintas concentraciones del catión calcio en el análisis por CZE de una muestra de CRP, porque podría influir en la movilidad electroforética de la proteína y, por tanto, también en su t_m , confundiendo con potenciales cambios en la movilidad electroforética de CRP debidos a la glicosilación de sus cadenas polipeptídicas.

A priori, la electroforesis capilar (CE) parece una buena técnica para comparar la CRP de pacientes con diferentes patologías, en las que exista la posibilidad de que esté glicosilada diferencialmente. Sin embargo, apenas existen trabajos publicados de aplicación de técnicas de CE al estudio de la CRP. En un artículo de Heegard y Robey [22], se estudia la constante de disociación de la CRP con el Ca²⁺ y la constante de disociación de la CRP con la PC utilizando CE. Hasta el momento, no existen trabajos de electroforesis capilar en los que CRP se estudie desde un punto de vista clínico.

Como se ha dicho, la CRP es una de las proteínas de fase aguda del suero. Otro de los problemas que hay que abordar en el análisis por CZE de proteínas de suero es la purificación del analito. Como se ha mencionado en el Capítulo 2 de esta Memoria, en un análisis directo de un suero control por CZE con detección ultravioleta (UV) sólo son detectables las proteínas mayoritarias: albúmina, α_1 -lipoproteínas, α_1 -antitripsina, α_2 -macroglobulina, haptoglobina, β -lipoproteína, transferrina, y γ -globulina, que enmascaran el resto [23]. De hecho, alrededor del 85 % de la concentración total de proteínas en suero procede de las 10 proteínas mayoritarias [24]. Además, el intervalo de concentraciones en que las distintas proteínas están presentes en el suero es muy amplio. Por tanto, en el análisis de proteínas no mayoritarias del suero hay que abordar dos problemas: la purificación del analito y, en algunos casos, la concentración de la

proteína de interés para poder detectarla en CZE con detección ultravioleta. El límite de detección de proteínas en CZE con este tipo de detección es de alrededor de 10^{-6} M.

En este capítulo, en que se recoge el trabajo realizado durante una estancia breve en laboratorio del Prof. Landers, se ha comenzado a explorar la purificación y concentración de CRP de suero de pacientes y donantes sanos para obtener la proteína de modo y concentración adecuados para su análisis por CE. Además, se ha comenzado el desarrollo de un método de CE para el análisis de estas muestras, con el objeto de iniciar la investigación sobre el posible uso de esta técnica para analizar y comparar perfiles de CRP de diferentes orígenes. Las muestras de las que se ha dispuesto han sido sueros de donantes sanos, sueros de pacientes con SLE y un suero de una paciente con artritis. Mientras que la glicosilación de CRP de pacientes con SLE ya se ha descrito [2], no existe información sobre el estado de glicosilación de CRP en una enfermedad inflamatoria como la artritis. Sin embargo, resulta interesante el estudio del patrón electroforético de la CRP procedente de individuos con artritis porque, ambas enfermedades tienen mecanismos inmunológicos comunes [20]. Es interesante, por tanto, estudiar el perfil electroforético de CRP procedente de pacientes con ambas enfermedades y de individuos sanos y comprobar si difieren o no entre sí. Los resultados que se muestran en este capítulo corresponden a los ensayos previos realizados para estudiar la viabilidad de la CE como método de estudio de la glicosilación de CRP y su utilidad como método para utilizar esta glicosilación como marcador de enfermedad.

3.2 OBJETIVO Y PLAN DE TRABAJO

El objetivo es el desarrollo de un método de extracción de CRP de suero y de un método de análisis de esta proteína por CZE para su aplicación al estudio y comparación de los perfiles electroforéticos de la CRP procedente de individuos sanos y de pacientes con diferentes enfermedades.

Para abordar este objetivo se ha llevado a cabo el siguiente plan de trabajo:

1. Desarrollo de un método de análisis de CRP por CZE en el que la variación en la concentración de Ca^{2+} en el medio no afecte a la movilidad electroforética de la proteína.
2. Desarrollo de un método de extracción eficaz de CRP de suero humano.
3. Análisis y comparación de la CRP extraída del suero de donantes sanos y de pacientes con SLE y artritis.

3.3 PARTE EXPERIMENTAL

3.3.1 Reactivos

- Acetonitrilo (ACN) (Fluka, Buchs, Suiza).
- Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) (Fluka).
- Agua Milli-Q (Millipore, Molsheim, France).
- Bromuro de hexametonio (C₆MetBr) (Sigma, St. Louis, MO, USA).
- Cloruro de calcio (CaCl₂) (Fluka).
- Cloruro de magnesio (MgCl₂) (Fluka).
- Cloruro sódico (NaCl) (Merck, Darmstadt, Alemania).
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Fluka).
- N-N´bis (3-aminopropil) 1,4- butanodiamina (Espermina) (Sigma).
- Hidróxido sódico (NaOH) (Merck).
- Seroalbúmina humana (HSA) (Sigma).
- Tetraborato sódico dihidratado (borax) (Sigma).

3.3.2 Muestras

- Patrón de proteína C-reactiva (CRP) extraída de fluidos biológicos humanos (Fitzgerald Industries International, Concord, MA, USA).
- Patrón de proteína C-reactiva humana recombinante expresada en E. Coli (CRPr) (Fitzgerald Industries International).
- Cuatro muestras de sangre de donantes sanos.
- Ocho muestras de suero de pacientes diagnosticados con SLE, generosamente donadas por la Clínica Mayo (Rochester, Minnesota, USA).
- Una muestra de suero de una paciente diagnosticada con artritis, generosamente donada por la Clínica Mayo (Rochester, Minnesota, USA).

3.3.3 Preparación de muestras

Las muestras de CRP y CRPr se diluyeron en agua Milli-Q para obtener una concentración final de proteína de 0,44 mg/mL. Estas proteínas se comercializan en forma líquida en tampones ligeramente distintos. Así, la CRP se encuentra en una

concentración de 2,2 mg/L en un tampón Tris 100 mM, NaCl 200 mM, CaCl₂ 2 mM y azida sódica (NaN₃) al 0,1% (pH 7,5). Por otro lado, la CRPr se distribuye en una concentración de 1,0 mg/mL en un tampón Tris-HCl 20 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2 mM y NaN₃ 0,05% (pH 7,5).

Las muestras de sangre control fueron extraídas de individuos sanos. Se extrajeron 10 mL de cada uno de ellos y se siguió el protocolo habitual de obtención de suero. Las muestras, almacenadas cada una por separado en un tubo de centrifuga, se dejaron coagular en un baño a 37° C durante 60 min. Los sueros de cada una de las muestras se separaron del coágulo y se colocaron en nuevos tubos de centrifuga. Estos tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Este proceso se realizó para eliminar los posibles coágulos o glóbulos rojos todavía presentes en el suero. Los sueros limpios se pusieron en tubos eppendorf y se almacenaron a -80°C. El volumen de suero obtenido varió entre 4 y 5 mL dependiendo de los individuos.

Las muestras suero de enfermos se usaron según fueron suministradas por la Clínica Mayo.

3.3.4 Dispositivos e instrumentación

La extracción de CRP de suero se realizó mediante partículas con PC inmovilizada (Pierce, Rockford, IL, USA) que se suministran en forma de gel. La capacidad de unión de CRP de estas partículas es ≥ 3 mg CRP/mL de gel.

El equipo de electroforesis capilar con detección UV utilizado en el trabajo recogido en este capítulo fue un PACE 5500 (Beckman Instruments, Fullerton, CA, USA). La adquisición y análisis de datos se realizó en un ordenador AMC 486 con la versión 8.1 del software System Gold (Beckman Instruments). Los capilares fueron de sílice fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, USA) con una longitud total (L) de 27 y 57 cm y una longitud efectiva (l) de 20 y 50 cm, respectivamente. El diámetro externo del capilar fue de 375 μ m y el diámetro interno de 50 μ m. El acondicionamiento inicial de los capilares fue el mismo que el descrito en el Capítulo 1 de esta Memoria, salvo que en lugar de acetona se utilizó dimetilsulfóxido (DMSO) como marcador de flujo electroosmótico (EOF) con detección a 200 nm. Brevemente, antes de su uso los

capilares se lavaron dos veces con la siguiente secuencia: 30 min con NaOH 1M, 5 min con agua Milli-Q y 10 min con el tampón de separación. Después, se realizaron sucesivos análisis de DMSO al voltaje seleccionado para cada de capilar. Cuando el valor de RSD (%) del tiempo de migración del DMSO en tres inyecciones consecutivas fue menor de 0,5%, se consideró acondicionado el capilar. El lavado del capilar entre inyecciones consistió en la siguiente secuencia: 3 min con agua Milli-Q, 6 min con NaOH 0,1M, 3 min con agua Milli-Q y 6 min con el tampón de separación que fuera a utilizarse en el experimento siguiente. Al final del día, el lavado del capilar fue el mismo que entre inyecciones, excepto que el lavado con el tampón de separación se sustituyó por un secado con N₂.

Los sistemas de microconcentración usados fueron de un tamaño de corte de 10 kDa (Microcon 10, Amicot, Beverly, MA, USA)

3.3.5 Procedimientos para el análisis de CRP por CZE

La puesta a punto del método de CZE para el análisis de CRP se realizó con CRP humana patrón (Fitzgerald). Esta proteína procedía de individuos sanos y, en teoría, era una CRP no glicosilada, por lo que no era un patrón ideal porque el método ha de servir para el análisis de formas glicosiladas de CRP. Sin embargo, no existían CRP glicosiladas comerciales. Por tanto, se optó por desarrollar el método de análisis de CRP con el patrón de Fitzgerald, aun asumiendo que no presentaba glicosilación.

Se estudiaron distintas longitudes de capilar (27 y 57 cm de longitud total) y distintos voltajes de separación. El voltaje aplicado con cada tampón y longitud de capilar fue el máximo para el que se mantuvo la linealidad voltaje-corriente.

El tampón de separación fue optimizado en este trabajo. Se estudió la influencia de distintos recubrimientos dinámicos (espermina y bromuro de hexametonio) y de la presencia de NaCl. También se estudió el efecto de la presencia de distintas concentraciones de catión calcio en la muestra y en el tampón mediante el análisis de CRP en tampones en presencia y ausencia de este catión, en presencia y ausencia de EDTA y para disoluciones de CRP con distintas concentraciones de calcio.

En las ocasiones en que fue necesario conocer el EOF, se coinyectó con la muestra una disolución de DMSO en agua (1/500 (v/v)) mediante presión (0,5 p.s.i.) durante 1,5 segundos como marcador de flujo electroosmótico. Las condiciones de análisis que se mantuvieron constantes en todos los experimentos fueron la detección (200 nm) y la temperatura de separación (25°C). La inyección de la muestra siempre se realizó por presión (0,5 p.s.i.) durante tiempos que se indicarán en cada experimento.

3.3.6 Procedimientos para la extracción de CRP de muestras de suero

En este trabajo se puso a punto un método de extracción de CRP de suero con las partículas con fosfocolina (PC) inmovilizada. Con objeto de simplificar el protocolo, se eliminó la fase de empaquetamiento de las partículas en una columna desechable que recomienda el fabricante.

El protocolo inicial de extracción de CRP de muestras se diseñó en el laboratorio imitando en lo posible los tampones, volúmenes y tiempos de incubación recomendados por la casa comercial para una columna de partículas de PC. Los tampones utilizados fueron:

- Tampón de unión: Borato 0,1M, NaCl 0,1 M y CaCl₂ 2 mM (pH: 8,3).
- Tampón de lavado: NaCl 0,1 M y CaCl₂ 2 mM.
- Tampón de elución: Borato 0,1M, NaCl 0,1 M y EDTA 2 mM (pH: 8,3).

El suero se mezcló con un volumen igual de tampón de unión. El volumen de suero utilizado varió entre 0,75 mL y 1,5 mL, dependiendo del suero disponible de cada muestra. La mezcla se agitó en un vortex durante 1 min. Esta mezcla se añadió a un tubo eppendorf que contenía 50 µL de partículas de PC. Un volumen de 50 µL de estas partículas tienen una capacidad de unión de CRP teórica de 0,15 mg. La mezcla se agitó nuevamente en un vortex y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente y con agitación. Para separar las partículas de PC, esta mezcla se centrifugó durante 3 min a 10000 g. Se descartó el sobrenadante y se recuperó el precipitado, que contenía las partículas de PC con la CRP unida. Se añadió al precipitado 0,25 mL de tampón de lavado y se incubó la mezcla durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación. Nuevamente, la muestra se centrifugó durante 3 min a 10000 g, se descartó el sobrenadante y se recuperó el precipitado. Esta operación de lavado se realizó dos

veces. La etapa de elución consistió en añadir a las partículas de PC 0,1 mL de tampón de elución e incubarlo durante 10 min a temperatura ambiente y con agitación. La mezcla se centrifugó 3 min a 10000 g y se recuperó el sobrenadante.

El sobrenadante obtenido tras este protocolo de extracción contenía la CRP recuperada de la muestra en el tampón de elución y probablemente la concentración de CRP en los 0,1 mL no fuese suficiente para su análisis en CZE con detección ultravioleta. Por tanto, se introdujo en el método una etapa de lavado de la muestra con agua Milli-Q, para dejarla libre de sales, y posterior concentración del sobrenadante obtenido. La muestra se centrifugó en un Microcón de tamaño de corte de 10 kDa. La centrifugación se realizó a 14000 g y 4°C durante 1 hora. Después, se añadieron 0,2 mL de agua Milli-Q para lavar la muestra y volvió a centrifugarse el mismo tiempo y con la misma fuerza centrífuga. Estos tiempos de centrifugación variaron ligeramente en función del comportamiento de cada muestra en la filtración. La centrifugación se dio por finalizada cuando, a la vista, la membrana del sistema parecía estar seca. Cuando esto sucedió, se invirtió el sistema para recuperar la CRP lavada y concentrada. El sistema de microconcentración se centrifugó invertido durante 3 min a 1000 g y 4°C. Para aumentar la recuperación de proteína de la membrana, este proceso se repitió una vez más añadiendo 5 µL de agua Milli-Q a la membrana. Todas las muestras se llevaron a un volumen final de 10 ó 20 µL (se indicará para cada muestra).

La optimización del método, no obstante, dio lugar a modificaciones en el protocolo de extracción de CRP de suero, que se discutirán en el apartado de Resultados y Discusión de este capítulo.

3.3.7 Procedimientos para el análisis de CRP de muestras de suero de donantes sanos y pacientes con SLE y artritis

Para evaluar la capacidad de los métodos desarrollados para la extracción de CRP a partir de suero, su análisis por CZE y su utilidad para comparar perfiles electroforéticos entre distintos individuos, éstos se utilizaron en el análisis de la CRP extraída del suero de cuatro individuos sanos, ocho pacientes con SLE y una paciente con artritis. La identificación de la CRP de dichas muestras se realizó mediante coinyección de las mismas con una muestra de CRP o CRPr (indistintamente).

3.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.4.1 Optimización de un método de análisis de CRP por CZE robusto frente a las variaciones de calcio de la muestra

3.4.1.1 Desarrollo de un método de análisis de CRP por CZE

La hipótesis de trabajo fue que, si la CRP de los sueros de los pacientes analizados estaba glicosilada, el comportamiento electroforético de la muestra podría ser diferente al de la CRP de sueros de donantes sanos, tanto en tiempo de migración como en movilidad electroforética efectiva de la CRP. La optimización del análisis de CRP por CZE se realizó con el objetivo de tener un procedimiento de separación que no se viese afectado por las diferentes concentraciones de Ca^{2+} presentes en cada muestra ya que, como se ha descrito en la Introducción, este ion se une a CRP por dos regiones en cada protómero. Evitar cambios electroforéticos de la proteína debidos a variaciones en la concentración de Ca^{2+} en la muestra impediría errores de interpretación de los resultados.

El primer ensayo para analizar CRP patrón por CZE se realizó en un capilar de 27 cm. La composición del tampón de separación fue: borato 40 mM, C_6MetBr 1 mM y espermina 20 μM (pH 8,8). El voltaje aplicado fue de 9 kV.

Este pH se eligió para conseguir que la carga total de la CRP (pI 6,3) [25] fuera negativa, evitando así en lo posible su adsorción a los silanoles libres de la pared del capilar. El borato se escogió como tampón porque se conoce su influencia en la separación de glicoproteínas tales como la ovoalbúmina [26] o la ribonucleasa B [27]. La carga negativa de los glicanos se debe a la presencia de residuos de ácido siálico. El resto de azúcares de los glicanos son neutros. En presencia de borato, sin embargo, pueden dar lugar a complejos con éste a través de los dioles de los azúcares, lo que les confiere una carga negativa que no tienen en ausencia de este compuesto en el medio. La reacción de complejación [28] tiene lugar como se describe en la **Figura 3.1**, siendo la formación de complejos preferencial en los grupos hidroxilos cis que trans.

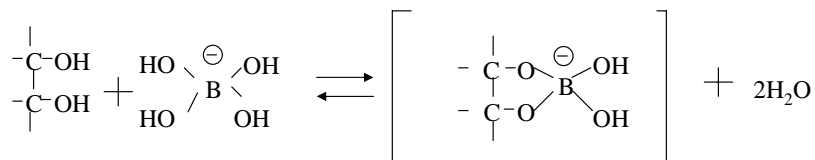


Figura 3.1. Complejación del borato con un polioliol.

En definitiva, esta complejación favorece las diferencias en la relación carga/masa de las glicofomas que difieran en el número o tipo de azúcares neutros con hidroxilos en posiciones contiguas del anillo, lo que facilita su separación por CZE.

Por otro lado, y como se ha descrito en la Introducción General de esta Memoria, una de las formas más habituales de evitar la adsorción de los analitos a la pared del capilar a través de los silanoles libres es añadiendo alguna amina al tampón de separación (monoaminas, diaminas, oligoaminas) o alguna sal de amonio cuaternaria (bromuro de hexametonio o C_6MetBr , bromuro de decametonio o $\text{C}_{10}\text{MetBr}$). La espermina y el C_6MetBr se utilizan conjuntamente como recubrimientos dinámicos de la pared del capilar en este trabajo, ya que nuestra experiencia mostraba que la combinación de ambos mejoraba la separación en CZE de ciertas glicoproteínas, tales como el antígeno específico de próstata (PSA). La fórmula de estas moléculas está representada en la **Figura 3.2**.

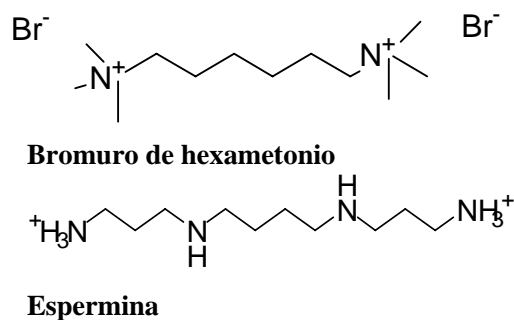


Figura 3.2. Fórmula del bromuro de hexametonio y de la espermina.

La separación obtenida con este tampón inicial no fue satisfactoria. La adición al tampón de NaCl 10 mM dio lugar a una mejora notable de la separación, aunque sin una resolución completa de picos, como puede observarse en la **Figura 3.3**. El efecto del NaCl sobre la separación se puede interpretar como una mejora debido a que el catión

Na^+ ayuda a apantallar los silanoles libres de la pared del capilar, evitando así que la CRP se adsorba. Además, el efecto del Na^+ sobre la pared del capilar puede reducir el EOF, como de hecho ocurrió si se compara la migración del marcador de EOF en los electroforegramas **3.3.a** y **3.3.b**. Recuérdese que los tampones de separación de eritropoyetina y de AGP para CZE (Capítulo 1 y 2 de esta Memoria), por ejemplo, también contenían NaCl 10 mM.

Se trató de mejorar la separación de la CRP mediante el aumento de la concentración de las aminas que actuaban como recubrimientos dinámicos (Espermina y C_6MetBr). Se probó un tampón de separación con espermina 40 μM y C_6MetBr 1 mM y otro tampón con espermina 20 μM y C_6MetBr 1,5 mM. Ninguno de estos tampones mejoró la separación.

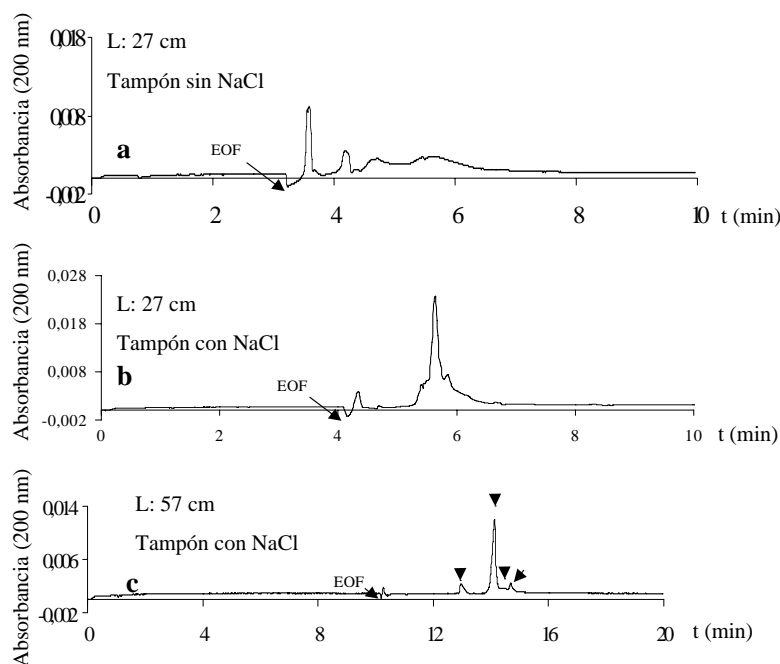


Figura 3.3. Optimización del método de separación de CRP por CZE. Electroforegramas de CRP obtenidos en diferentes condiciones analíticas. Electroforegrama **a**: Tampón de separación: Borato 40 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM (pH: 8,8). Longitud del capilar: 27 cm. Voltaje: 9 kV. Electroforegrama **b**: Tampón de separación: Borato 40 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 10 mM (pH: 8,8). Longitud del capilar: 27 cm. Voltaje: 9 kV. Electroforegrama **c**: Tampón de separación como en electroforegrama b. Longitud del capilar: 57 cm. Voltaje: 18 kV. Condiciones analíticas comunes: 6 segundos inyección muestra (CRP patrón: 0,44 mg/mL); temperatura: 25°C.

La siguiente modificación al método inicial consistió en trabajar con un capilar más largo (longitud total: 57 cm), pero manteniendo aproximadamente constante el

campo eléctrico aplicado. Con esta variación se consiguió una buena resolución de los componentes de la CRP patrón, como puede observarse en la **Figura 3.3**. En el electroforegrama **3.3.c** se observa un pico mayoritario y 3 minoritarios.

La CRP patrón adquirida para este trabajo procedía de fluidos biológicos humanos (la casa comercial no especifica de cuál o cuáles). Es de suponer que dichos individuos estén sanos, por lo que, en principio, la CRP no estará glicosilada [2, 4]. Por tanto, suponer que los 4 picos obtenidos en la separación electroforética de CRP son debidos a la presencia de diversas glicofomas no parece correcto. Por otro lado, la glicosilación de proteínas es una modificación post-traducciona propia de las células eucariotas. En general, las bacterias no producen glicoproteínas [29]. Por tanto, para comprobar si los picos observados en CRP patrón se debían o no a la presencia de glicofomas de la proteína, se analizó CRP humana expresada en *Escherichia coli*. Esta CRP recombinante se analizó en el mismo tampón que la purificada de humanos y también se coinyectó con ella. En la **Figura 3.4** se muestran los electroforegramas correspondientes al análisis de CRP, CRPr y la coinyección de ambas.

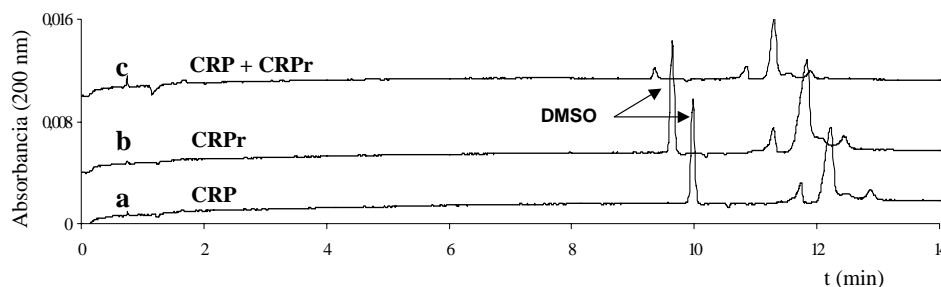


Figura 3.4. Comparación de perfil electroforético de CRP y CRPr obtenido por CZE. Condiciones de separación: longitud total del capilar: 57 cm. Tampón de separación: borato 40 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 10 mM (pH: 8,8). Voltaje: 18 kV. Temperatura: 25°C. Electroforegrama **a**: coinyección de 6 segundos de inyección de CRP (0,44 mg/mL) y 1,5 segundos de DMSO (1/500(v/v)). Electroforegrama **b**: 6 segundos inyección CRPr (0,44 mg/mL) y 1,5 segundos de DMSO (1/500(v/v)). Electroforegrama **c**: 3 segundos de inyección de CRP (0,44 mg/mL) y 3 segundos de inyección de CRPr (0,44 mg/mL).

En la figura puede verse cómo no existe diferencia alguna en el perfil electroforético de ambas proteínas. Con estos experimentos quedó descartada la glicosilación de CRP de individuos sanos, lo que corresponde con lo descrito en la bibliografía [2, 4]. Pueden esgrimirse diversas hipótesis para justificar la presencia de

los picos minoritarios en CRP y en CRPr. Podrían deberse a otras modificaciones post-traduccionales de CRP, a impurezas procedentes de la purificación de la proteína o a protómeros de CRP asociados en número distinto de cinco. En esta memoria, se consideró CRP el pico mayoritario obtenido en la **Figura 3.3.c**. Una vez comprobado que el perfil electroforético de ambas proteínas era el mismo, se utilizaron indistintamente en la futura coinyección con muestras purificadas de donantes sanos y pacientes de SLE y artritis.

3.4.1.2 Estudio del efecto del catión calcio y del EDTA sobre el análisis de CRP por CZE

Como se ha descrito en la Introducción, la CRP es una proteína que tiene dos sitios de unión a calcio por monómero [3]. Por tanto, la concentración de calcio en el medio puede influir en la movilidad electroforética de la proteína, por lo que fue necesario estudiar la influencia de este catión sobre el análisis de CRP. La hipótesis de partida del trabajo descrito en este capítulo es que la inducción de la glicosilación de CRP puede hacer cambiar el perfil electroforético de CRP, por lo que cambios en ese perfil debidos a otros motivos deben ser previamente descartados o controlados.

Los primeros experimentos para estudiar la influencia del catión calcio en la separación electroforética se realizaron modificando el tampón de separación de partida. De ese modo, se añadió CaCl_2 al tampón de separación para introducir Ca^{2+} . La misma concentración de MgCl_2 se añadió a otra alícuota del tampón de separación para descartar que los posibles cambios que se observaran fueran debidos a la adición de un catión divalente (en este caso Mg^{2+} , para el que no se ha encontrado bibliografía que describa ninguna afinidad por CRP). El tampón al que se añadieron las sales de magnesio y de calcio fue distinto al optimizado anteriormente porque fue necesario tener un tampón de separación con mayor fuerza iónica (para lo que se le añadió una concentración más elevada de NaCl) para tratar de evitar cambios sustanciales en la movilidad del EOF debidos a la adición de CaCl_2 o MgCl_2 . De hecho, en la única publicación en la que la CRP se analiza por electroforesis capilar [30], se determina la constante de disociación de la CRP con el catión calcio por cambios de la movilidad electroforética de la proteína en CZE. En ella, y a pesar de que el tampón es diferente, esos autores también utilizan una elevada concentración de NaCl para evitar grandes

cambios en el EOF al añadir CaCl_2 . Por tanto, los tampones preparados para el estudio del efecto del calcio fueron:

-Tampón de partida (1): Borato 20 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 150 mM (pH: 8,8).

-Tampón con CaCl_2 (2): Borato 20 mM, CaCl_2 2 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 150 mM (pH: 8,8).

-Tampón con MgCl_2 (3): Borato 20 mM, MgCl_2 2 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 150 mM (pH: 8,8).

El voltaje de separación tuvo que disminuirse a 7 kV debido al aumento de corriente producido por la alta concentración de NaCl .

Los electroforegramas obtenidos tras el análisis de CRP en estos tres tampones se representan en la **Figura 3.5**. En esta figura puede observarse cómo, incluso en un tampón de fuerza iónica tan alta, la adición de CaCl_2 o de MgCl_2 disminuyó la movilidad del EOF, correspondiente al pico de DMSO. Por este motivo, para estudiar el efecto del calcio sobre la CRP se calculó la movilidad electroforética efectiva (μ_{eff}) de ésta, pues como se ha discutido extensamente en el Capítulo 1 de esta Memoria, este parámetro de migración es el más robusto frente los cambios en la movilidad del EOF. Por tanto, las potenciales variaciones de μ_{eff} de la CRP en los distintos tampones no podrían ser atribuidas a variaciones en μ_{EOF} . La μ_{eff} de la CRP se calculó según la ecuación 3.1 ya descrita, donde μ_{app} es la movilidad electroforética aparente, μ_{EOF} es la movilidad electroosmótica, L es la longitud total del capilar, l es la longitud efectiva, t_m es el tiempo de migración del analito y t_{EOF} es el tiempo de migración del marcador del flujo electroosmótico.

$$\mu_{\text{eff}} = \mu_{\text{app}} - \mu_{\text{EOF}} = \frac{Ll}{t_m V} - \frac{Ll}{t_{\text{EOF}} V} = \frac{Ll}{V} \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right) \quad (3.1)$$

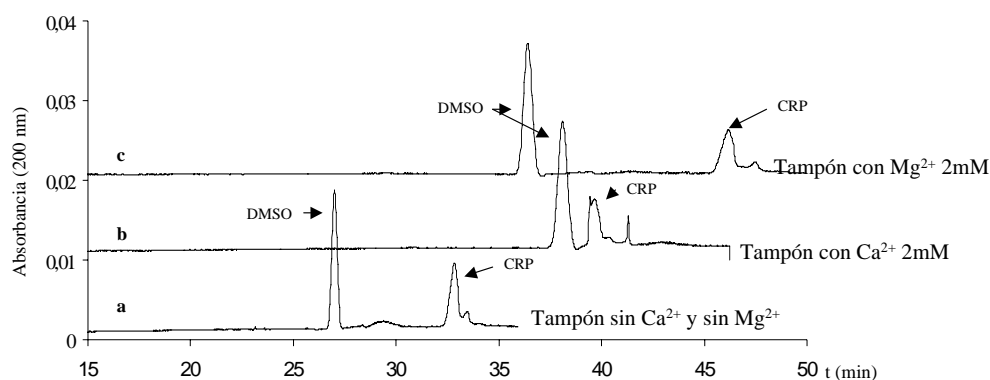


Figura 3.5. Efecto de la presencia de calcio en el tampón de separación sobre la separación de la CRP en CZE. Electroforegrama **a**: tampón de separación: Borato 20 mM, C₆MetBr 1 mM, espermina 20 μM, NaCl 150 mM (pH: 8,8). Electroforegrama **b**: Borato 20 mM, CaCl₂ 2 mM, C₆MetBr 1 mM, espermina 20 μM, NaCl 150 mM (pH: 8,8). Electroforegrama **c**: Borato 20 mM, MgCl₂ 2 mM, C₆MetBr 1 mM, espermina 20 μM, NaCl 150 mM (pH: 8,8). Condiciones analíticas comunes: Voltaje: 7 kV; longitud del capilar: 57 cm (longitud efectiva: 50 cm), temperatura: 25°C, detección: 200 nm, inyección: 6 segundos CRP (0,44mg/mL) y 1,5 segundos DMSO (1/500(v/v)).

En la **Tabla 3.1** están reflejadas las movilidades electroforéticas del pico mayoritario de CRP en los tres tampones de separación estudiados.

Tabla 3.1. Movilidad electroforética efectiva del pico mayoritario de CRP en los distintos tampones de separación.

Tampón de separación	Movilidad electroforética efectiva de CRP (μ_{eff}) (cm^2/Vmin)
a) Sin CaCl ₂ ni MgCl ₂	$2,7 \times 10^{-3}$
b) Con CaCl ₂ 2mM	$0,4 \times 10^{-3}$
c) Con MgCl ₂ 2mM	$2,4 \times 10^{-3}$

a) Borato 20 mM, C₆MetBr 1 mM, espermina 20 μM, NaCl 150 mM (pH: 8,8).

b) Borato 20 mM, CaCl₂ 2 mM, C₆MetBr 1 mM, espermina 20 μM, NaCl 150 mM (pH: 8,8).

c) Borato 20 mM, MgCl₂ 2 mM, C₆MetBr 1 mM, espermina 20 μM, NaCl 150 mM (pH: 8,8).

En esta Memoria, la discusión sobre μ_{eff} se hará en términos de valor absoluto, aunque, en estas condiciones analíticas, la movilidad electroforética de la CRP es contraria al movimiento del EOF. Como puede observarse, la movilidad electroforética de la CRP apenas varía entre el tampón de separación sin CaCl_2 y sin MgCl_2 y el tampón con MgCl_2 , por lo que una modificación de la μ_{eff} de CRP debido a la unión del catión Mg^{2+} quedó descartada. Sin embargo, la μ_{eff} de la CRP en el tampón de separación con CaCl_2 fue alrededor de seis veces menor. En ese sentido, para una misma masa, una μ_{eff} menor corresponde a una molécula menos cargada negativamente, que es lo que le ocurre a la CRP en presencia de calcio, apoyando la hipótesis de que se produce una unión CRP- Ca^{2+} que contrarresta hasta cierto punto las cargas negativas de la proteína a pH 8,8. Además, no puede descartarse que el cambio de conformación que se produce en la proteína al unir Ca^{2+} también afecte a su μ_{eff} . En este razonamiento se ha despreciado el aporte de masa que le supone a CRP la unión del calcio. El efecto de la presencia de calcio sobre el pico de la CRP se aprecia incluso visualmente en la **Figura 3.5**, donde el pico de CRP migra mucho más cerca del DMSO en el tampón con Ca^{2+} que en los otros dos tampones.

Este experimento confirmó la unión del calcio a CRP y su influencia sobre su μ_{eff} , pero el tampón de separación necesario para saturar la proteína con calcio no resultó ser adecuado para la separación por electroforesis capilar porque los tiempos de análisis resultaron demasiado largos (cerca de 50 min), probablemente debido a la gran fuerza iónica del tampón de separación. Por tanto, el objetivo de neutralizar el efecto de diferentes concentraciones de calcio en la CRP extraída de distintos individuos se abordó de otro modo. Se trabajó con un tampón de separación con el quelante de calcio ácido etilendiaminotetracético (EDTA). Para realizar los análisis de CRP por CZE con esta nueva aproximación al objetivo marcado, se prepararon los siguientes tampones de separación:

-Tampón sin EDTA: Borato 40 mM, NaCl 10 mM, C_6MetBr 1 mM y espermina 20 μM (pH 8,8).

-Tampón con EDTA: Borato 40 mM, EDTA 2,5 mM, NaCl 10 mM, C_6MetBr 1 mM y espermina 20 μM (pH 8,8).

El voltaje de separación aplicado fue de 16 kV.

Los electroforegramas obtenidos tras el análisis de CRP en los dos tampones arriba descritos están representados en la **Figura 3.6**. Puede observarse cómo la adición de EDTA al tampón de separación afectó a la movilidad de EOF, por lo que el estudio del perfil electroforético de la CRP en estos tampones se realizó de nuevo mediante el cálculo de su μ_{eff} .

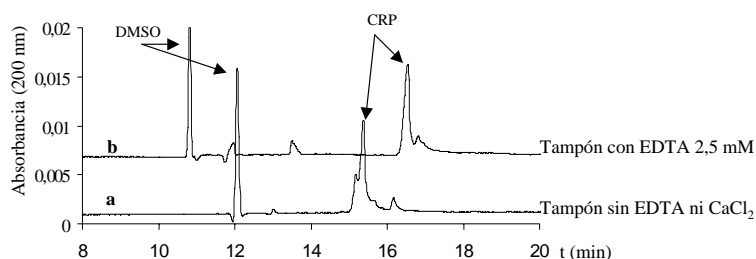


Figura 3.6. Efecto de la presencia de EDTA en el tampón de separación sobre la movilidad electroforética de CRP analizada por CZE. Electroforegrama **a**: tampón de separación: Borato 40 mM, $C_6\text{MetBr}$ 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 10 mM (pH: 8,8). Electroforegrama **b**: Borato 40 mM, EDTA 2.5 mM, $C_6\text{MetBr}$ 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 10 mM (pH: 8,8). Condiciones analíticas comunes: Voltaje: 16 kV; longitud del capilar: 57 cm (longitud efectiva: 50 cm), temperatura: 25°C, detección: 200 nm, inyección: 6 segundos CRP (0,44mg/mL) y 1,5 segundos DMSO (1/500(v/v)).

La movilidad electroforética efectiva del pico mayoritario de CRP cuando se analizó con los dos tampones objeto de estudio está reflejada en la **Tabla 3.2**. La comparación entre μ_{eff} de CRP en los distintos tampones se realizó con su valor absoluto. Una μ_{eff} mayor que otra significa una relación carga negativa/masa mayor y al contrario. Como se desprende de la Tabla, la μ_{eff} menor de CRP (con menor relación carga negativa/masa) correspondió a la CRP analizada en el tampón sin EDTA en el medio. Resulta interesante comprobar cómo esa μ_{eff} aumentó (mayor relación carga negativa/masa) cuando el tampón contenía EDTA. Este resultado parece indicar que el EDTA presente en el tampón quela el catión calcio de la muestra analizada. En efecto, la CRP se comercializa en disolución con una concentración de CaCl_2 de 0,4 mM y 0,44 mg/mL de proteína. En este experimento ha de tenerse en cuenta la gran capacidad quelante del EDTA con el Ca^{2+} ($K_d = 10^{-11}$ M) [31], frente a la de CRP con el Ca^{2+} ($K_d = 6 \times 10^{-5}$ M) [22], además de la diferencia en número de moléculas de CRP inyectadas (correspondientes a 6 segundos de inyección) frente al número de moléculas de EDTA

presentes en el tampón de separación, que ocupa el resto del capilar. Estos dos hechos favorecen la formación del complejo EDTA-Ca²⁺ frente al complejo CRP- Ca²⁺. No resulta extraño, por tanto, que el EDTA presente en el tampón permita obtener una CRP aparentemente libre de Ca²⁺.

Tabla 3.2. Movilidad electroforética efectiva del pico mayoritario de CRP en los distintos tampones de separación.

Tampón de separación	Movilidad electroforética efectiva de CRP (μ_{eff}) (cm ² /Vmin)
a) Sin EDTA ni CaCl ₂	3,2 × 10 ⁻³
b) Con EDTA 2,5 mM	5,6 × 10 ⁻³

a) Borato 40 mM, C₆MetBr 1 mM, espermina 20 μM, NaCl 10 mM (pH: 8,8).

b) Borato 40 mM, EDTA 2,5 mM, C₆MetBr 1 mM, espermina 20 μM, NaCl 10 mM (pH: 8,8).

Para estudiar si el EDTA presente en el tampón era suficiente para quelar concentraciones mayores del catión calcio en la muestra, ésta se dopó con CaCl₂ y se analizó por CZE. De este modo, se prepararon dos muestras de CRP con distinta relación proteína/CaCl₂:

-Muestra patrón: 0,44 mg/mL CRP y 0,4 mM CaCl₂.

-Muestra con CaCl₂ añadido: 0,44 mg/mL CRP y 28,8 mM CaCl₂.

Las dos muestras se analizaron en el tampón de separación sin EDTA y en el tampón de separación con EDTA para estudiar su comportamiento electroforético. Los resultados de los análisis están representados en la **Figura 3.7**.

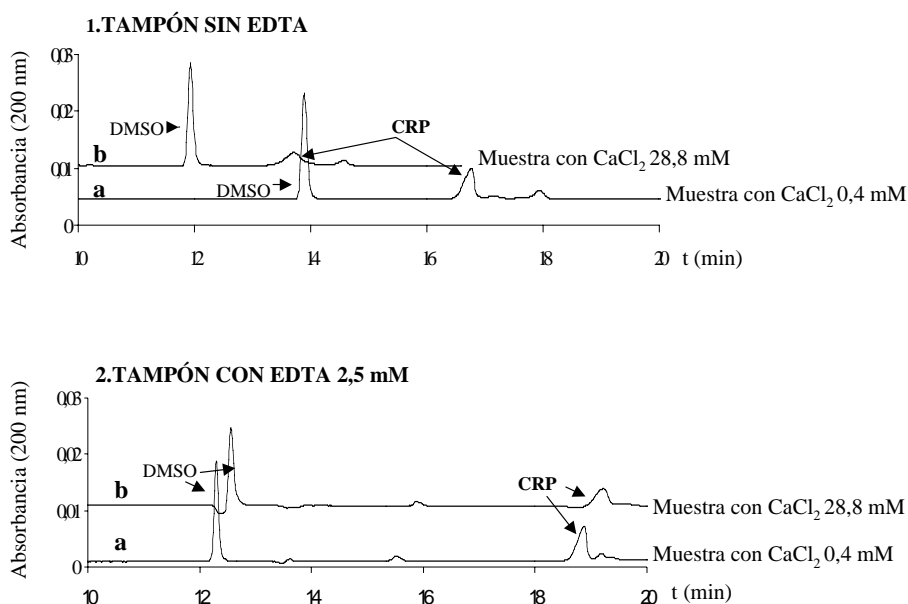


Figura 3.7. Efecto de la concentración de CaCl_2 en la muestra sobre la movilidad electroforética de CRP. **Figura 1.** Tampón de separación: Borato 40 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 10 mM (pH: 8,8). Electroforegrama **a**: Muestra: CRP 0,44 mg/mL y CaCl_2 0,4 mM. Electroforegrama **b**: Muestra: CRP 0,44 mg/mL y CaCl_2 28,8 mM. **Figura 2.** Tampón de separación: Borato 40 mM, EDTA 2,5 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 10 mM (pH: 8,8). Electroforegrama **a**: Muestra: CRP 0,44 mg/mL y CaCl_2 0,4 mM. Electroforegrama **b**: Muestra: CRP 0,44 mg/mL y CaCl_2 28,8 mM. Resto de condiciones analíticas: Voltaje: 16 kV; longitud del capilar: 57 cm (longitud efectiva: 50 cm), temperatura: 25°C, detección: 200 nm, inyección: 6 segundos CRP (0,44mg/mL) y 1,5 segundos DMSO (1/500(v/v)).

Nuevamente, para la estudiar la influencia de la concentración del catión calcio en la muestra, se utilizó la μ_{eff} de CRP. Las movilidades del pico mayoritario de CRP para cada muestra y tampón de separación están reflejadas en la **Tabla 3.3**.

Tabla 3.3. Movilidad electroforética efectiva del pico mayoritario de CRP en los distintos tampones de separación.

Tampón de separación	Movilidad electroforética efectiva de CRP (μ_{eff}) (cm^2/Vmin)	
	Muestra: CRP 0,44 mg/mL y CaCl_2 0,4 mM	Muestra: CRP 0,44 mg/mL y CaCl_2 28,8mM
a) Sin EDTA	$2,2 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-3}$
b) Con EDTA 2,5 mM	$4,9 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^{-3}$

a) Borato 40 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 10 mM (pH: 8,8).

b) Borato 40 mM, EDTA 2,5 mM, C_6MetBr 1 mM, espermina 20 μM , NaCl 10 mM (pH: 8,8).

El estudio de la μ_{eff} de las muestras de CRP con diferentes concentraciones de CaCl_2 analizadas en el tampón con EDTA reveló que este compuesto es capaz de quelar el catión calcio presente en la muestra (al menos hasta una concentración de 28,8 mM) porque ambas CRP presentan la misma μ_{eff} . Por otro lado, las μ_{eff} de las CRP en las dos muestras (con 0,4 mM y 28,8 mM de CaCl_2) cuando se analizaron en el tampón de separación sin EDTA fue menor que en presencia de EDTA, indicando la complejación de CRP con Ca^{2+} . Además, la μ_{eff} fue muy similar en ambas muestras, indicando que, probablemente, la CRP está prácticamente saturada de Ca^{2+} en la muestra con 0,4 mM de Ca^{2+} . Es importante destacar aquí que la concentración de catión calcio añadido a la CRP patrón (28,8 mM) en este ensayo supera la esperada en cualquier muestra de CRP extraída de suero con el método desarrollado en la sección 3.4.2, porque como se detalla más adelante, la elución de CRP de las partículas de fosfocolina se basa en el lavado de las partículas con un tampón que contiene EDTA, por lo que es esperable que la mayor parte del calcio de la muestra esté quelado por el mismo.

Por tanto, el tampón de separación seleccionado para el análisis de CRP consistió en borato 40 mM, EDTA 2,5 mM, NaCl 10 mM, C_6MetBr 1 mM y espermina 20 μM (pH 8,8), porque es capaz de quelar el Ca^{2+} en la muestra hasta una concentración del catión de 28,8 mM y evitar así que influya en la movilidad electroforética efectiva de CRP.

3.4.2 Optimización de la extracción de CRP de suero

Para poder comparar el perfil electroforético de CRP de sueros de individuos con distintas condiciones patofisiológicas no es necesario que la recuperación de proteína mediante el procedimiento de extracción del suero sea total, pero sí que proporcione cantidades suficientes de la misma para su detección UV en el análisis por CZE. Para estimar el porcentaje de recuperación de CRP de suero obtenido con distintas versiones del protocolo de extracción con PC, se realizó una curva de calibrado para el área de CRP patrón obtenida en CZE en función de la concentración inyectada y se integró el área bajo el pico mayoritario de CRP. El tampón de separación consistió en Borato 40 mM, EDTA 2,5 mM, NaCl 10 mM, C_6MetBr 1 mM y espermina 20 μM (pH

8,8). Se analizaron muestras patrón con concentraciones de 0,22; 0,35; 0,7; 1,1 y 2,2 mg/mL de CRP disuelta en agua. Las concentraciones de CRP del suero de enfermos de lupus y artritis se encuentran, aproximadamente, en este intervalo si se tiene en cuenta el proceso de lavado y concentración de la muestra previo a su análisis por CZE. Por otro lado, la cantidad de CRP descrita en individuos sanos está entre 0,1-0,5 $\mu\text{g/mL}$ (4×10^{-7} - 2×10^{-6} M tras la concentración de la muestra y suponiendo un 100% de recuperación con el método de extracción), que está por debajo o muy cerca del límite de detección teórico para proteínas en UV.

La recta de calibrado obtenida, con un r^2 de 0,9984, fue: $A = 0,5032 \times C + 0,0258$, siendo A el área bajo el pico mayoritario de muestras de CRP y C la concentración (mg/mL) de CRP patrón en agua. Esta recta de calibrado permitió calcular concentraciones de CRP extraídas de muestras desconocidas mediante su análisis por CZE.

Inicialmente, se aplicó el protocolo de extracción de CRP de suero siguiendo los pasos recomendados por la casa comercial y descritos en la Parte Experimental de este capítulo. Para estimar la recuperación de CRP con el protocolo arriba descrito, se utilizó 1 mL de suero de un individuo sano con una concentración teórica de CRP inferior al límite de detección de la técnica. Para realizar un cálculo exacto de la eficacia de extracción hubiese sido necesario contar con un suero certificado del que se conociese la concentración de CRP, haber realizado una medida de la concentración de la proteína con un método validado de análisis, o haber empleado un suero en el que previamente se hubiese eliminado CRP. Sin embargo, al no disponer de esas muestras, se consideró que, para estos experimentos iniciales de estimación de la eficacia de extracción, era adecuado el dopar el suero del individuo sano con distintas cantidades de CRP patrón. Así, se prepararon cuatro muestras añadiendo a alícuotas de 1 mL del suero 0, 10, 20 y 30 μg de CRP patrón, con el fin de obtener concentraciones en la muestra del orden de las esperadas en individuos con lupus o artritis. Estas cuatro muestras se sometieron al protocolo de extracción, lavado y concentración descrito en la Parte Experimental. Todas las muestras se llevaron a un volumen final de 10 μL y posteriormente, se analizaron por CZE, calculándose a partir del área del pico de CRP en cada análisis y de la recta de calibrado la cantidad de proteína extraída.

En estos experimentos, la recuperación de proteína fue menor o igual del 10%, aproximadamente. Además, se observó que la recuperación aumentó con la cantidad de CRP añadida en la muestra, lo que indica que la extracción se ve favorecida con concentraciones mayores de CRP.

Como puede observarse en la **Figura 3.9**, la extracción de CRP de suero ocurrió con la coextracción de otro compuesto que migró cerca de los 18 min. Debido a la abundancia de seroalbúmina humana (HSA) en plasma, se sospechó que ese pico desconocido podía ser esa proteína. Esta sospecha se confirmó por coinyección de la muestra con HSA patrón. Una observación interesante que se realizó en este experimento es que el área de HSA obtenida en la separación por CZE disminuyó conforme aumentó la cantidad de CRP con la que se dopó el suero (no se muestran los datos). Este hecho parece apuntar a que la relación de concentraciones albúmina-CRP en suero también determina la cantidad de CRP extraída, probablemente debido a una adsorción inespecífica de la HSA sobre las partículas de PC que dificulta la unión CRP-PC.

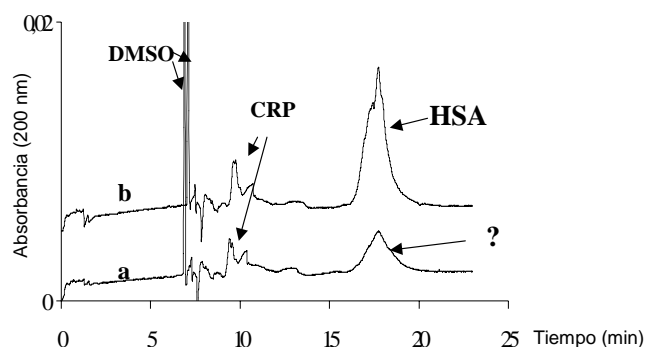


Figura 3.9. Electroforegramas en CZE del extracto de CRP de suero obtenido y su coinyección con HSA. Electroforegrama **a**: 3 segundos inyección de muestra de CRP extraída de suero y 1 segundo de inyección de DMSO (1:500 (v/v)). Electroforegrama **b**: 3 segundos inyección de muestra de CRP extraída de suero, 3 segundos de inyección de HSA (5 mg/mL) y 1 segundo de inyección de DMSO (1:500 (v/v)). Condiciones analíticas como en **Figura 3.6.b**, excepto el voltaje (20 kV).

Con el objetivo de mejorar la eficacia de extracción de CRP, se realizaron dos modificaciones al protocolo. La primera consistió en añadir acetonitrilo al suero hasta una concentración de 10 % (v/v). En la segunda modificación, el tampón de elución se sustituyó por otro que contuvo: borato 0,1M, NaCl 0,1 M y EDTA 10 mM (pH: 8,3). El resto del protocolo de extracción se mantuvo como el descrito inicialmente.

El objetivo de añadir acetonitrilo en el suero fue la de hacerlo un medio ligeramente más hidrófobo. La HSA es, entre otras cosas, uno de los transportadores de ácidos grasos de la sangre [32] y esta unión la realiza a través de diversos parches hidrófobos distribuidos a lo largo de la proteína [33], que pudieran ser también las zonas de unión a PC. Por tanto, hacer del suero un medio más hidrófobo puede disminuir las interacciones hidrófobas de la HSA a las partículas de PC, permitiendo así un mayor número de uniones PC-CRP y por tanto una mayor recuperación. Roper et al. [34] han descrito que un lavado hidrófobo de las partículas de PC (previo a un lavado salino de las mismas) reduce las adsorciones no específicas de proteínas del suero indicando que, entre las múltiples interacciones no específicas, algunas son hidrófobas y electrostáticas.

Por otro lado, el aumento a 10 mM de EDTA en el tampón de elución tuvo como objeto el tener dicho quelante en una concentración en exceso frente a la concentración de calcio en el medio en que se encuentran las partículas de PC. La base teórica de las partículas de PC como medio para la extracción y posterior elución de CRP es sencilla. Por un lado, la CRP se une a PC en presencia del catión calcio (como se ha descrito en la Introducción, el calcio unido a los protómeros de CRP provoca un cambio conformacional en la proteína que permite la asociación CRP-PC). Por tanto, la unión PC-CRP se favorece con un tampón de unión rico en calcio (2 mM). Tras el tampón de lavado, la elución de la CRP de las partículas de PC se lleva a cabo a través de la adición de EDTA al medio. Este quelante elimina el calcio del medio y por tanto rompe la unión PC-CRP. Mediante el aumento de la concentración de EDTA en el tampón de elución se favorece su unión al catión calcio y se mejora la recuperación de CRP.

Nuevamente, el cálculo de la eficacia de extracción se realizó con el mismo procedimiento de dopaje de un suero con CRP patrón. En esta ocasión, las alícuotas del suero se doparon con 10 μ g de CRP. Se utilizó esta cantidad de CRP porque en el experimento anterior ya había quedado patente que la eficacia de extracción era función de la cantidad de CRP patrón añadida al suero. Se trabajó, por tanto, con suero dopado con 10 μ g de CRP por ser las condiciones más desfavorables para la eficacia de extracción. Era de esperar que se obtuvieran iguales o mejores recuperaciones cuando CRP patrón fuera más abundante en suero. Las muestras de suero que se utilizaron en este experimento fueron:

- Muestra 1: 1 mL suero de un donante sano.
- Muestra 2: 1 mL suero + 10 µg de CRP patrón.
- Muestra 3: 1 mL suero + acetonitrilo 10%.
- Muestra 4: 1 mL suero + acetonitrilo 10 % + 10 µg de CRP patrón.

Las muestras 1 y 2 se sometieron al protocolo con el tampón de elución modificado (EDTA 10 mM), mientras que las Muestras 3 y 4 se sometieron al protocolo inicial sin ninguna modificación (salvo la adición de acetonitrilo al suero). De esta forma pudo calcularse el efecto de cada una de las modificaciones individualmente sobre la cantidad de CRP extraída. La recuperación de proteína en el experimento en el que se añadió acetonitrilo al suero estuvo en torno al 30%, mientras que en el que se modificó el tampón de elución estuvo en torno al 75%.

Las dos modificaciones incluidas en el protocolo de extracción ayudaron a mejorar la recuperación de CRP. Parece que, en efecto, la adsorción de HSA a las partículas de PC se debe (al menos, en parte) a interacciones hidrófobas que se ven minimizadas cuando el suero se modifica para aumentar su hidrofobicidad. Por otro lado, la concentración de EDTA recomendada por el fabricante (2,5 mM) no resultó suficiente para quelar todo el calcio añadido en el tampón de unión, además del ya presente en el suero. Incrementando el EDTA a 10 mM la recuperación de CRP aumentó sustancialmente.

En la **Figura 3.10** puede verse un esquema de los pasos del protocolo de purificación de la muestra y las modificaciones introducidas con el objeto de mejorar la eficacia. Este protocolo modificado se usó en la extracción de CRP de los sueros de donantes sanos y enfermos de SLE y artritis estudiados en el siguiente apartado.

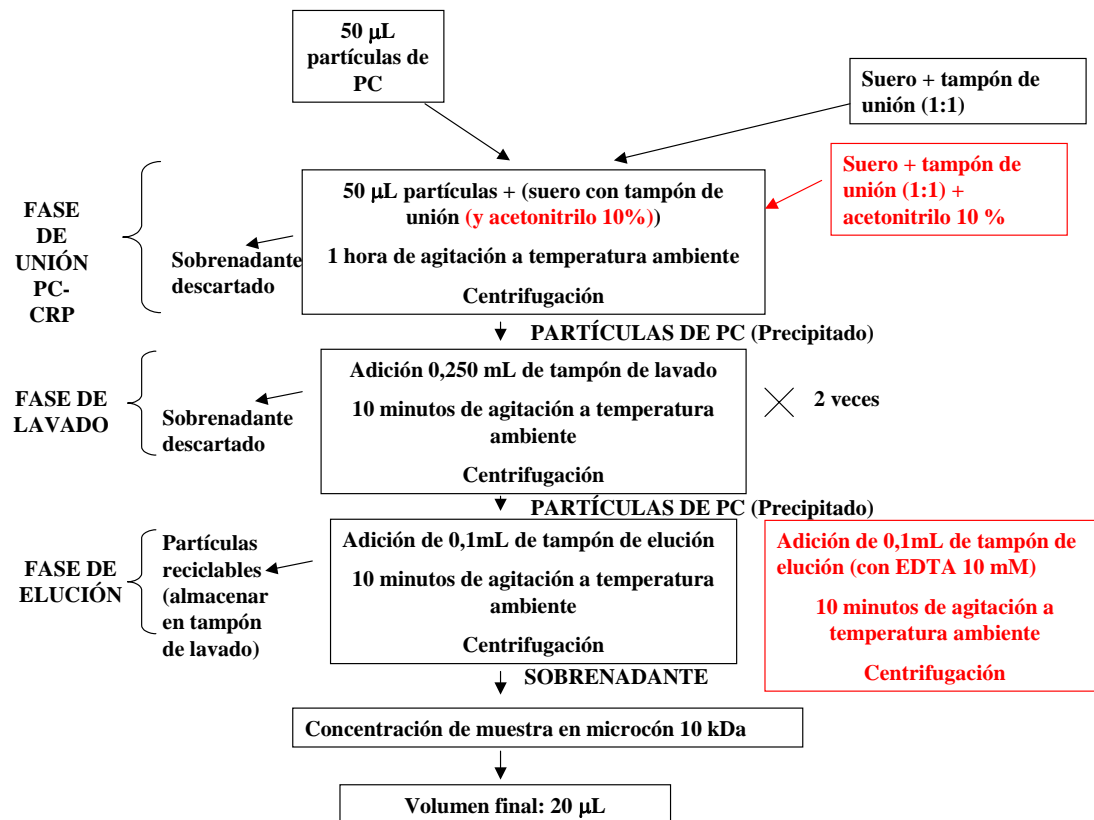


Figura 3.10. Protocolo de purificación de CRP con partículas de PC a partir de suero. En negro, protocolo inicial. En rojo, modificaciones introducidas para aumentar eficacia de extracción.

3.4.3 Análisis y comparación de CRP extraída de sueros de individuos sanos y pacientes con SLE y artritis

Una vez optimizado el método de análisis por CZE de CRP y la extracción de CRP de suero, se analizaron 4 sueros de donantes sanos, 8 sueros de pacientes con SLE y 1 suero de una paciente con artritis. Se llevaron a cabo coinyecciones de las muestras con CRP patrón para identificar el pico correspondiente a CRP en las muestras analizadas. Esta coinyección se hizo indistintamente con CRPr y CRP, en función de la disponibilidad en el laboratorio, porque quedó demostrado que su comportamiento electroforético era el mismo (epígrafe 3.4.1).

3.4.3.1 Análisis de CRP extraída de donantes sanos

En el caso de los donantes sanos, se trabajó con un volumen de suero de 4 mL, el máximo del que se dispuso, para tratar de extraer la mayor cantidad de proteína posible.

Este aumento de volumen de suero está justificado porque la literatura describe niveles de CRP en suero de individuos sanos entre 0,1-0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [2]. Por tanto, partiendo de 1 mL de suero, estimando eficacias de extracción en torno al 75% y llevando la muestra a un volumen final de 10 μL , las concentraciones de CRP estarían en el intervalo de 7,5-37,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (3×10^{-7} - $1,5 \times 10^{-6}\text{M}$), por debajo o muy cerca del límite de detección teórico de la técnica. El aumento del volumen de suero utilizado en la extracción aumentó el tiempo de extracción y concentración de la muestra. Dicho suero se separó en 4 alícuotas y todas ellas se sometieron al protocolo de extracción. Las alícuotas obtenidas tras la etapa de elución se lavaron y concentraron en el mismo Microcon 10 de forma consecutiva. El volumen final a partir de los 4 mL de suero fue de 10 μL .

El resultado del análisis por CZE de la extracción de CRP del suero de un donante sano, junto con la coinyección de esa muestra con CRPr patrón se muestra en la **Figura 3.11**. Como puede observarse al comparar los dos electroforegramas de la figura, la muestra del donante sano dio lugar a un pico que no correspondió a CRP, además del pico mayoritario correspondiente a HSA. Con los datos publicados en la literatura no se esperaba que la CRP obtenida de individuos sanos estuviese glicosilada y por tanto tuviera una movilidad electroforética diferente de la patrón. Se sospechó que el pico obtenido en la muestra podría ser el componente amiloide-P de suero (SAP). SAP es una pentraxina (al igual que CRP) con una alta coincidencia de secuencia aminoacídica con CRP. Aunque con menos afinidad, también se une a PC en presencia de catión calcio [34]. No existe mucha literatura sobre la concentración de SAP en suero de individuos sanos. Nybo et al [35] realizaron un estudio de niveles de SAP en individuos sanos y se les atribuyó una media de concentración en sangre de 32,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esta concentración corresponde a 60-300 veces la concentración de CRP en individuos sanos, por lo que, a pesar de tener menor afinidad por PC, SAP puede estar uniéndose más a PC en muestras de individuos sanos que la propia CRP. Roper et al [34] también han especulado sobre la coextracción de SAP en la muestra preparada a través de partículas de PC. En el análisis mencionado anteriormente de una muestra de CRP de un individuo sano, empleado en el estudio de eficacia de extracción de CRP, no se había observado la presencia de ningún pico atribuible a SAP, probablemente debido a las diferencias entre sueros, en los que puede haber niveles de SAP variables.

El resultado para los otros tres de sueros de donantes sanos fue muy similar, por lo que no se muestran los datos.

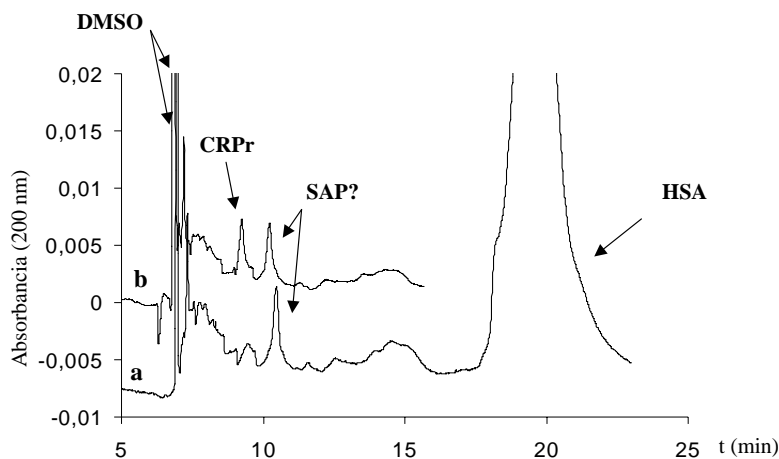


Figura 3.11. Electroforegramas en CZE del extracto de CRP de suero de un donante sano y su coinyección con CRPr. Electroforegrama **a**: 6 segundos de inyección de muestra extraída de suero de donante sano y 1,5 segundos de DMSO (1/500(v/v)). Electroforegrama **b**: 6 segundos de inyección de muestra extraída, 1 segundo inyección CRPr (1mg/mL) y 1,5 segundos de DMSO (1/500(v/v)). Condiciones analíticas como en **Figura 3.6.b.**, excepto voltaje (20kV).

3.4.3.2 Análisis de CRP extraída de pacientes con SLE

Una vez analizadas las muestras procedentes de los donantes sanos, se procedió al análisis de las muestras de los sueros de los pacientes con SLE. Los resultados obtenidos para las ocho muestras fueron nuevamente muy similares entre sí. En la **Figura 3.12**, se muestran los electroforegramas para el análisis por CZE de una muestra extraída del suero de un paciente con SLE y para la coinyección de dicha muestra con CRPr. En este caso, se trabajó con el máximo volumen disponible por muestra (1 mL). Como puede observarse en la **Figura 3.12**, el pico mayoritario extraído de la muestra (obviando la HSA) comigra con CRPr. En este caso, al contrario que en el electroforegrama del suero de un paciente sano, no aparece el pico que se ha atribuido en esta discusión a la SAP. Una posibilidad que explique esta observación es que los pacientes con SLE pueden sufrir un aumento de la concentración de CRP en sangre (más de 600 veces según Das et al. [2]). Este aumento de la concentración de CRP haría que ésta compitiese favorablemente con la SAP por la PC. Que la CRP de los pacientes

con SLE no parezca presentar diferencias electroforéticas con el patrón de CRP (comigra con éste) no apoya los resultados publicados por Das et al. [2] que, entre otros cambios frente a CRP de individuos sanos y para un conjunto de sueros de unos pocos individuos con SLE, describen una presencia de 6,8 ng de ácido siálico por μg de CRP. Teóricamente, este aumento en la relación carga negativa total/masa de CRP se debería ver reflejado en un tiempo de migración mayor de la CRP de individuos con SLE que la CRP de individuos sanos. Este hecho no se observó en ninguno de los 8 pacientes con SLE analizados. Estos resultados pueden tener diversos orígenes, uno de ellos relacionado la situación del paciente en el momento de la toma de muestras. Como enfermedad autoinmune, los niveles de CRP varían en función de la actividad de la inflamación en el momento de la extracción de sangre. Quizá, esta variación en los niveles de CRP también vaya asociado a cambios en su glicosilación. Desafortunadamente, se desconoce el momento de la enfermedad en que se recogieron las muestras de pacientes de SLE disponible, por lo que serán necesarios más estudios con muestras de suero de enfermos de SLE para alcanzar conclusiones fiables. Otro posible origen de la discrepancia de los resultados de este trabajo con el de Das y su grupo de investigación podrían ser las ligeras variaciones en el modo de purificar CRP de suero en ambos trabajos.

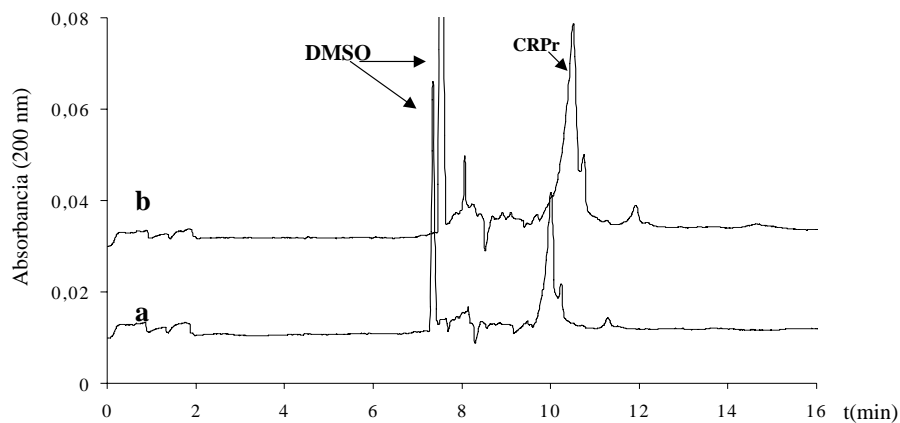


Figura 3.12. Electroforegramas en CZE del extracto de CRP de suero de un paciente con SLE y su coinyección con CRP. Electroforegrama **a**: 6 segundos de inyección de muestra extraída del suero del paciente con SLE y 1,5 segundos de DMSO (1/500 (v/v)). Electroforegrama **b**: 6 segundos de inyección de muestra extraída de 1 mL de paciente con SLE, 1 segundo inyección CRPr (1mg/mL) y 1,5 segundo de DMSO (1/500(v/v)). Condiciones analíticas como en la **Figura 3.6.2.**, excepto voltaje (20 kV).

3.4.3.3 Análisis de CRP extraída de una paciente con artritis

En el caso de la muestra de suero de una paciente de 60 años con artritis, de nuevo se partió de 1 mL y la muestra se llevó a un volumen final de 20 μ L. Como puede observarse en la **Figura 3.13**, el perfil electroforético de la muestra obtenida fue diferente al conocido para CRP. Pueden observarse diferentes picos electroforéticos de identidad desconocida. Sólo uno de ellos comigra con CRP, como se comprueba al coinyectar la muestra con una alícuota de CRP patrón y no es el pico mayoritario del electroforegrama. Esta observación resulta prometedora. A pesar de que la hipótesis debe confirmarse con otras técnicas de identificación (por ejemplo, MS), los resultados obtenidos por CZE parecen indicar que en la muestra de artritis, las partículas de PC extraen hasta 5 formas distintas de CRP, aunque no puede descartarse la posibilidad de que el pico señalado como 2 en la **Figura 3.13** corresponda a la SAP. Cuatro de las formas migran más lejos del flujo electrosmótico que el pico que comigra con la CRP patrón. Este comportamiento electroforético se corresponde con una relación carga negativa/masa mayor que el pico que comigra con la CRP. Este aumento de la relación carga/masa podría estar relacionado con una glicosilación de la proteína en que hubiese residuos de ácido siálico.

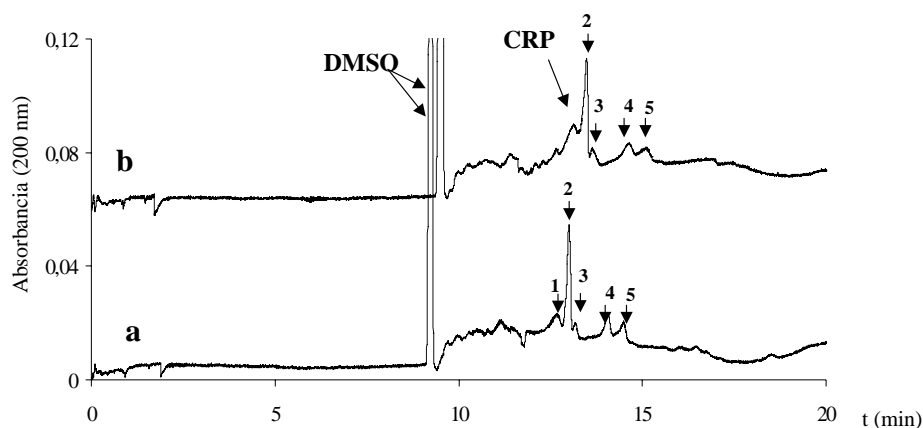


Figura 3.13. Electroforegramas en CZE del extracto de CRP del suero de un paciente con artritis y su coinyección con CRP. Electroforegrama **a**: 4 segundos de inyección de muestra extraída de 1 mL de suero de paciente con artritis y 1,5 segundos de DMSO (1/500 (v/v)). Electroforegrama **b**: 4 segundos de inyección de muestra extraída del suero del paciente con artritis, 4 segundos inyección CRP patrón (0,25mg/mL) y 1,5 segundos de DMSO (1/500 (v/v)). Condiciones analíticas como en **Figura 3.6.2**.

3.4.4. Consideraciones finales

Los resultados expuestos en este capítulo apuntan a que la purificación de CRP a través de su afinidad por la PC, junto con su análisis por CE pueden ser técnicas útiles para, estudiar el uso del perfil electroforético de la CRP como marcador de enfermedad. Este estudio es la base para el trabajo que se está continuando en el laboratorio del Dr. Landers.

3.5 CONCLUSIONES

De los resultados expuestos en este capítulo pueden extraerse las siguientes conclusiones:

1. El método de CZE desarrollado en este capítulo para el análisis de CRP permite eliminar las variaciones en la movilidad electroforética de la CRP debidas a diferencias en la concentración de Ca^{2+} del medio
2. La optimización del método de extracción de CRP de suero mediante partículas de PC da lugar a eficacias de extracción en torno al 75%.
3. Los sueros de pacientes con SLE analizados en este trabajo tienen concentraciones elevadas de CRP, pero su movilidad electroforética es la misma que la de CRP sin glicosilar (CRP), lo que podría indicar que, en estos pacientes, la proteína no estaba glicosilada.
4. La paciente con artritis presenta un perfil electroforético con 5 picos correspondientes a compuestos extraídos del suero mediante partículas de PC. Uno de ellos (minoritario) presenta la misma movilidad electroforética que la CRP no glicosilada. Los otros cuatro presentan movilidades electroforéticas que podrían corresponder a formas de CRP cargadas más negativamente (con mayor relación carga negativa/masa). No puede excluirse que estos cambios sean debidos a la glicosilación de CRP con ácidos siálicos, entre otros azúcares. Esta hipótesis debe ser confirmada con análisis de más muestras de suero de pacientes mediante el método desarrollado en esta Memoria y mediante otras técnicas como MS.

3.6 BIBLIOGRAFÍA

- [1] Volanakis, J.E., *Mol. Immunol.* 2001, 38, 189-197.
- [2] Das, T., Sen, A., Kempf, T., Pramanik, S. R., Mandal, C., Mandal, C. *Biochem. J.* 2003, 373, 345-355.
- [3] Mullenix, M.C., Mortensen, R.F. *Mol. Immunol.* 1994, 31, 615-622.
- [4] Pepys, M.B., Hirschfield, G.M. *J. Clin. Invest.* 2003, 111, 1805-1812.
- [5] Kubby, J. *Immunology*, 2ª edición, Freeman, USA, 1991.pp 1-23.
- [6] O'Neill, L. A. J. *Investigación y Ciencia*, 2005, 342, 6-14.
- [7] www.nlm.nih.gov Julio 2006
- [8] www.labtestsonline.org Julio 2006
- [9] Black, S., Kushner, I., Samols, D. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 48487-48490.
- [10] Ridker, P.M. *Circulation* 2003, 107, 363-369.
- [11] Zwaka, T.P., Hombach, V., Torzewski, J. *Circulation* 2001, 103, 1194-1197.
- [12] Montero, I., Orbe, I., Varo, N., Beloqui, O., Monreal J.I., Rodríguez, J. A., Diez, J., Libby, P., Paromo, J. A. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2006, 47, 1369-1378.
- [13] Verma, S., Szmitko, P.E., Yeh, E.T.H., *Circulation* 2004, 109, 1914-1917.
- [14] Zouali, M. *Investigación y Ciencia* 2005, 242, 47-53.
- [15] Koffler, D. *Investigación y Ciencia* 1980, 48, 14-25.
- [16] www.rheumatology.org Junio 2006
- [17] Farreras, P., Rozman, C. *Medicina Interna*, 13ª Edición. Editorial: Harcourt-Brace, Madrid, 1995.
- [18] Diaz-Rubio, M., Espinos, D. *Tratado de Medicina Interna*, Editorial Médica Panamericana, Madrid, 1994.
- [19] Lee, D.M., Weinblatt, M.E. *Lancet* 2005, 358, 903-911.
- [20] Mottram, P.M. *Immun. Cell Biol.* 2003, 81, 350-353.
- [21] Das, T., Mandal, C., Mandal, C. *Glycoconj. J.* 2004, 20, 537-543.
- [22] Heegaard, N., Robey, F. A. *J. Immunol.Meth.* 1993, 166, 103-110.
- [23] Reif, O.W., Lasuch, R., Freitag, R. *Adv. Chromatogr.* 1994, 34, 1-56.
- [24] Pieper, R., Su, Q., Gatlin, C.L., Huang, S.T., Anderson, N.L., Steiner, S. *Proteomics* 2003, 3, 422.
- [25] Laurent, P., Potempa, L.A., Gewurz, H., Fiedel, B.A., Allen, R.C. *Electrophoresis* 1983, 4, 316-317.

- [26] Landers, J.P, Oda, R.P, Madden, B.J., Spelsberg, T. C. *Anal Biochem.* 1992, 205, 115-124.
- [27] Rudd, P.M., Scargg, I.A., Coghill, E., Dwek, R.A. *Glycoconjugate J.* 1992, 9, 86-91.
- [28] Paulus, A., Klockow-beck, A. *Chromatographia CE series, analysis of carbohydrates by capillary electrophoresis*, Vieweg, Alemania, 1998. pp 49-93.
- [29] Gianazza, E., *J. Chromatogr. A* 1995, 705, 67-87.
- [30] Heegard, N.H.H., Robey, F.A. *J. Immunol. Meth.* 1993, 166, 103-110.
- [31] Burriel, F., Conde, F.L., Arribas, S., Hernández, J. *Química Analítica cuantitativa*. Editorial Paraninfo, 2000. pp 1014-1032.
- [32] Sarer, R.W., Gao, H., Tian, F. *Anal. Biochem.* 2005, 347, 297-302.
- [33] Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., Franks, N. *Nat. Struct. Biol.* 1998, 5, 827-835.
- [34] Christner, R.B., Mortensen, R.F. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, 314, 337-343.
- [34] Roper, M.G., Fris, M.L., Oberlander, J.P., Ferrance, J.P., McGrory, B.J., Landers, J.P. *Anal. Chim. Acta* 2006, 569, 195-202.
- [35] Nybo, M., Oslen, H., Jeune, B., Andersen-Ranberg, K., Holm Nieslen, E., Svehag, H. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 1998, 9, 126-129.

CONCLUSIONES GENERALES

CONCLUSIONES GENERALES

1. El programa estadístico desarrollado permite seleccionar, entre varios, el parámetro de migración más exacto para la asignación de bandas electroforéticas en casos en que la dispersión del tiempo de migración de un pico es del mismo orden de magnitud que la diferencia en tiempos de migración de picos adyacentes. Este programa se ha utilizado con éxito para seleccionar parámetros de migración adecuados y asignar isoformas con exactitudes cercanas al 100% en el análisis de eritropoyetina (EPO) por electroforesis capilar en zona libre (CZE) y en el análisis de alfa1-glicoproteína ácida (AGP) por CZE y por isoelectroenfoque capilar (CIEF).

2. La asignación de isoformas de EPO separadas mediante CZE permite poner de manifiesto las similitudes y diferencias entre muestras de EPOr correspondientes a estándares, fármacos en desarrollo y distintos fármacos comerciales.

3. Los métodos de análisis de isoformas de AGP por CZE y CIEF desarrollados permiten obtener una separación de 11 bandas de AGP a línea de base en CZE y de hasta 12 bandas de AGP en CIEF.

4. La asignación de isoformas de AGP separadas mediante CZE y CIEF pone de manifiesto diferencias cualitativas y cuantitativas entre los perfiles electroforéticos de AGP de individuos sanos y los de pacientes con cáncer de ovario y leucemia. Para su empleo con fines diagnósticos es necesario realizar un estudio con un número elevado de muestras, así como simplificar el procedimiento de purificación de éstas.

5. El desarrollo de un método de purificación de proteína C-reactiva (CRP) de suero y de un método de análisis por CZE de esta proteína han permitido la purificación y análisis de CRP de individuos sanos, con lupus eritromatoso sistémico (SLE) y con artritis. El perfil electroforético de los donantes sanos, los pacientes con SLE y los pacientes con artritis fue cualitativamente diferente entre sí.

6. Los métodos electroforéticos desarrollados, junto con el programa estadístico, son fiables y rápidos para el análisis de isoformas de glicoproteínas de diferentes orígenes. El método de análisis de EPO es útil para el control de calidad de fármacos de

esta proteína recombinante. Los métodos de análisis de AGP y CRP son herramientas útiles para el estudio del papel de estas glicoproteínas como marcadores de las enfermedades con las que han sido relacionadas.

ANEXO: PUBLICACIONES RELACIONADAS

PUBLICACIONES RELACIONADAS

* Lacunza, I., Lara, P., Moya, G., Sanz, J., Díez-Masa, J. C., Frutos, M.
Selection of migration parameters for a highly reliable assignment of bands of isoforms of erythropoietin separated by capillary electrophoresis.
Electrophoresis 2004, 25, 1569-1579.

* Lara-Quintanar, P., Lacunza, I., Sanz, J., Díez-Masa, J.C., Frutos, M.
Immunochemical removal of albumin in erythropoietin biopharmaceutical formulations for its analysis by capillary electrophoresis.
Journal of Chromatography B, on line desde 16 agosto 2006.

* Lacunza, I., Sanz, J., Díez-Masa, J.C., Frutos, M.
Capillary zone electrophoresis of human alpha-1-acid glycoprotein for qualitative and quantitative comparison of samples from different pathological conditions.
Electrophoresis 2006, 27, 4205-4214.

* Lacunza, I., Sanz, J., Díez-Masa, J.C., Frutos, M.
Capillary isoelectric focusing for the separation of forms of alpha-1-acid glycoprotein.
Aceptado por *Electrophoresis* con revisiones.

Lacunza, I., Kremmer, T., Díez-Masa, J.C., Sanz, J., Frutos, M.
Comparison of alpha-1-acid glycoprotein isoforms from healthy and cancer patients by capillary isoelectric focusing.
Enviado a *Electrophoresis*.