



Casa abierta al tiempo



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
UNIDAD XOCHIMILCO**

**DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS.**

**LICENCIATURA EN QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA**

**TÍTULO DEL INFORME:**

**“NUEVAS TÉCNICAS ANALÍTICAS UTILIZADAS EN LA  
CARACTERIZACIÓN Y SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE USO  
FARMACÉUTICO”.**

**PROYECTO GENÉRICO:**

**DESARROLLO DE MÉTODOS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA EL  
CONTROL FISIO, QUÍMICO, BIOLÓGICO Y O MICROBIOLÓGICO  
DE PRODUCTOS RELACIONADOS CON LA SALUD**

**ETAPA 1**

**KARLA DE LA CRUZ REYES.**

**2162044753**

**LABORATORIO DE SÍNTESIS DE POLÍMEROS, EDI: N-005, UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO**

---

**Asesor Interno:** Dra.  
Norma Angélica Noguez  
Méndez  
No. económico: 17902

---

**Asesor Externo:** Dr. Eric  
Alejandro García López  
No. económico: 43815

Fecha de inicio: 27 de agosto del 2021

Fecha de término: 21 de mayo de 2023

## ÍNDICE

Introducción	1
Justificación	1
Planteamiento del problema	1
Objetivo general	2
Objetivos específicos	2
Metodología	2
Marco teórico	3
1. Definición de proteína	5
2. Estructura y organización de las proteínas	6
2.1. Estructura primaria	6
2.2. Estructura secundaria	6
2.2.1 Hélice alfa	6
2.2.2 Lámina plegada beta	6
2.3 Estructura terciaria	7
2.2.6 Estructura cuaternaria	8
3. Relación estructura-función de las proteínas	8
4. Modificaciones postraduccionales de las proteínas (PTM)	11
4.1 Modificaciones postraduccionales más frecuentes	14
4.1.1. Fosforilación	14
4.1.2. Acetilación	14
4.1.3. e-N acetilación de lisina	15
4.1.4. Acilación	15
4.1.5. Mono y poliubiquitilación de proteína	16
4.1.6. N-Metilación	17
4.1.7. Glicosilación	17
4.1.9. Hidroxilación	18
5. Reversibilidad de las modificaciones postraduccionales	18
6. Modificaciones postraduccionales y su relación en las enfermedades	19
7. Antecedentes de proteínas de uso farmacéutico	19
8. Proteínas terapéuticas de uso e importancia	20
9. Clasificación de proteínas de uso farmacéutico	21
9.1. Grupo I. Proteínas con actividad enzimática o reguladora	22
9.2. Grupo II. Proteínas dirigidas	23
9.3. Grupo III. Vacunas proteínas	23
9.4. Grupo IV. Diagnóstico de proteínas	23
10. Mercado y regulación de proteínas de una farmacéutica	24
10.1. Restricciones de mercado	25
10.2. Regulación de medicamentos	25
11. Producción biotecnológica de moléculas bioterapéuticas	27

11.1 Síntesis química de proteínas terapéuticas	29
11.2 Síntesis de proteínas libres de células (CFPS)	29
11.3 Expresión basada en células	30
11.4 Sistema de expresión-	30
11.5 Banco celular	36
11.6 Procedimiento de fermentación en la producción de proteínas terapéuticas	37
11.7 Comparación de la fermentación con células de mamíferos y Microorganismos	39
12. Procesos de separación de proteínas de uso farmacéutico	37
12.1 Purificación	41
12.1.2 Preparación de la muestra	42
12.1.3 Captura	46
12.1.3 Purificación intermedia	46
12.1.4 Separación (pulido)	46
12.1.5 Caracterización de proteínas	47
13. Técnicas analíticas para la separación y caracterización de proteínas terapéuticas	48
13.1 Breve historia de la Cromatografía	49
13.1.2 Procesos cromatográficos	50
13.1.3 Componentes generales de la cromatografía	51
13.2 Breve historia de la Electroforesis	57
13.2.1 Componentes electroforéticos	58
13.2.3 Visualización	63
13.2.4 Análisis	65
13.3 Espectrometría de Masas	66
13.4 Western Blot (Ensayo de Inmunodetección)	69
13.5 ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima)	70
14. Limitaciones de las técnicas convencionales para la separación y caracterización	72
15. Implementación de nuevas técnicas	73
15.1 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) moderna	74
15.2 Cromatografía de exclusión por tamaño con detección de fluorescencia (FSEC)-	76
15.3 Espectrometría de movilidad iónica de campo	78
15.4 ToPIC Software y su acoplamiento en las técnicas para la identificación y caracterización de proteínas	80
15.5 Cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis de zona capilar, espectrometría de masas en tándem	81
15.6. Técnicas basadas en Nanoporos para la identificación y caracterización de proteínas de uso farmacéutico	81
15.6.1 Clasificación de nanoporos	83

15.6.2 Funcionamiento de la técnica	85
15.6.3 NanoPOTS	85
15.6.4 Componentes de los NanoPOTS	89
16. Analisis de resultados y discusión	91
17. Conclusiones	92

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Denominación y código de 3 letras de los aminoácidos más comunes.	3
<b>Tabla 2.</b> Carga de las cadenas laterales de los aminoácidos polares y no polares.	5
<b>Tabla 3.</b> Modificaciones postraduccionales en las cadenas laterales	12
<b>Tabla 4.</b> Mercado de las proteínas terapéuticas de acuerdo con el producto, aplicación y región.	24
<b>Tabla 5.</b> Ventajas y desventajas de sistemas de expresión	34
<b>Tabla 6.</b> Diferencias entre fermentaciones en suspensión para cultivo celular y fermentación microbiana.	39
<b>Tabla 7.</b> Métodos físicos y químicos implementados en la disrupción celular.	43
<b>Tabla 8.</b> Principales aditivos estabilizadores.	45
<b>Tabla 9.</b> Evolución de las técnicas de separación y caracterización.	49
<b>Tabla 10.</b> Propiedades más usadas en la elección del tipo de cromatografía.	52
<b>Tabla 11.</b> Ejemplos de materiales para la matriz y sus marcas.	54
<b>Tabla 12.</b> Geles utilizados en cromatografía.	55
<b>Tabla 13.</b> Principales disolventes implementados en cromatografía.	56
<b>Tabla 14.</b> Generalidades y consideraciones de las técnicas cromatograficas.	57
<b>Tabla 15.</b> Rango de separación de tamaño (kb) en función a la concentración de agarosa.	60
<b>Tabla 16.</b> Rango de separación de tamaño (kDa) en función a la concentración de acrilamida.	61
<b>Tabla 17. Buffers comúnmente utilizados en la electroforesis</b>	61
<b>Tabla 18. Métodos de tinción implementados en electroforesis</b>	63
<b>Tabla 19.</b> Bases de datos comúnmente utilizadas en el análisis de proteínas.	67
<b>Tabla 20. Medios de ionización usados</b> en Espectrometría de masas.	68
<b>Tabla 21.</b> Analizadores de masa de uso común en espectrometría de masas.	69
<b>Tabla 22.</b> Acoplamiento común de la espectrometría de masas.	71
<b>Tabla 23.</b> Ventajas y desventajas de los métodos directos o indirectos de Western blot.	73
<b>Tabla 24.</b> Tipos de métodos de ELISA comúnmente utilizados.	83

<b>Tabla 25.</b> Algunos de los metales identificados en las proteínas del estudio realizado por Shen 2018.	84
<b>Tabla 26.</b> Lista de algunas de las Modificaciones postraduccionales (PTM) detectadas en el estudio de Shen et al 2018.	87
<b>Tabla 27.</b> Tipos de nanoporos.	

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura molecular del aminoácido.	4
<b>Figura 2.</b> Enlace peptídico.	5
<b>Figura 3.</b> Hélice alfa.	7
<b>Figura 4.</b> Lámina plegada.	7
<b>Figura 5.</b> Niveles estructurales de las proteínas.	8
<b>Figura 6.</b> Clasificación de proteínas acorde a su estructura y función biológica.	10
<b>Figura 7.</b> Modificaciones covalentes y escisión de proteínas.	11
<b>Figura 8.</b> Clasificación de terapias proteicas en función de la actividad.	22
<b>Figura 9.</b> Crecimiento del mercado proteínas terapéuticas por región.	27
<b>Figura 10.</b> Producción biotecnológica de moléculas bioterapéuticas.	28
<b>Figura 11.</b> Componentes del sistema de expresión.	32
<b>Figura 12.</b> Producción de proteína terapéutica mediante plásmidos para la expresión del gen humano.	33
<b>Figura 13.</b> Gráfico de crecimiento celular en cultivo de fermentación	38
<b>Figura 14.</b> Esquema general en el proceso de purificación.	41
<b>Figura 15.</b> Centrifugación de proteínas.	45
<b>Figura 16.</b> Expresión utilizada para determinar el rendimiento del proceso.	47
<b>Figura 17: Purificación y volumen durante los procesos de purificación.</b>	48
<b>Figura 18.</b> Ecuación de resolución utilizada en cromatografía.	53
<b>Figura 19.</b> migración de las proteínas posterior al tratamiento con buffers y a la aplicación de corriente.	63
<b>Figura 20.</b> Forma de visualizar las proteínas en el gel electroforético.	69
<b>Figura 21.</b> Ejemplo de detección de glicofomas en espectrometría de masas.	69
<b>Figura 22.</b> Parámetros importantes en la elección de los métodos de separación y caracterización de proteínas terapéuticas.	75
<b>Figura 23.</b> Técnicas modernas de aislamiento y fraccionamiento de proteínas.	76
<b>Figura 24.</b> Factor de retención de columnas utilizadas en SEC moderna.	77
<b>Figura 25.</b> Ejemplo de intensidad de fluorescencia GFP en 4 especies diferentes.	78
<b>Figura 26.</b> Mapa de calor a nivel de proteínas de células T CD3+ identificadas sin y con FAIMS aplicando diferentes CV y cromatograma de las proteínas identificadas en el estudio realizado por Gerbasi et al 2022.	80
<b>Figura 27.</b> Resultados obtenidos en las identificaciones de proteínas y proteoformas en el estudio realizado por Gerbasi et al 2022.	80

<b>Figura 28.</b> Esquematizan del proceso de la técnica basada en nanoporos.	88
<b>Figura 29.</b> Expresión matemática de la translocación de membranas.	88
<b>Figura 30.</b> Formación del poror de acuerdo on los estudios realizados por Zhu et al 2018	90
<b>Figura 31:</b> Resultados de le evaluación de la sensibilidad absoluta de la plataforma global Nanopots-LC-MS	91

## **INTRODUCCIÓN**

Las proteínas, también conocidas como polipéptidos, son compuestos orgánicos formados por aminoácidos. Su estructura y función está determinada por el plegamiento de las secuencias de aminoácidos, las cuales son impulsadas por una serie de interacciones no covalentes en una o más conformaciones espaciales. Son moléculas vitales, ya que funcionan como catalizadores de reacciones o receptores y canales en las membranas, que proporcionan soporte de anclaje intracelular y extracelular de una célula u órgano, incluso también son importantes en el material genético ya que convierten condiciones ambientales en señales para la activación o desactivación de genes específicos.<sup>1,6</sup>

Desde la perspectiva patológica pueden aparecer enfermedades cuando alguna proteína contiene modificaciones y/o variaciones que son de carácter maligno, derivado a esto el tratamiento terapéutico basado en proteínas han tendido ventaja frente a los medicamentos de molécula pequeña, ya que su especificidad y complejidad de estas no pueden ser imitadas por compuestos químicos simples.<sup>7</sup>

En 2005, las proteínas terapéuticas representaron el 17% de los nuevos fármacos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. (FDA) y de acuerdo con el CDER (*Center for Drug Evaluation and Research's*, por sus siglas en inglés) de la FDA, en el 2020 se aprobaron 53 medicamentos nuevos, lo cual representa un aumento del 40%.<sup>7,8</sup> Esto representa el avance en tecnologías de ingeniería de proteínas que han permitido a los desarrolladores y fabricantes de medicamentos explotar las características funcionales de las proteínas de interés.<sup>1,13</sup>

Durante la última década, ha surgido la búsqueda de nuevas tecnologías y/o técnicas analíticas que permitan estudiar a las proteínas de manera más efectiva y eficiente, que sean metodológicamente replicables y/o a costos reducidos, para que puedan ser utilizadas por la mayoría de los investigadores y así se logre identificar de manera óptima las leyes que rigen la secuencia, estructura y función, así como los cambios conformacionales de cada proteína que sea de su interés.<sup>13,7</sup>

## **JUSTIFICACIÓN.**

El avance de tecnologías y la aplicación de diferentes softwares ha permitido que las técnicas analíticas tengan más herramientas para caracterizar y elucidar estructuras de proteínas de interés de una manera más eficiente.<sup>1,2,3</sup>

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Desde la perspectiva patológica, se plantea un inmenso desafío ya que una enfermedad puede aparecer cuando alguna o un conjunto de proteínas contienen anomalías, tomando como referencia a el genoma humano que contiene más de 20 000 genes que codifican proteínas, (lo que representa un 1 % de la longitud total del genoma) surge la importancia dentro del desarrollo de proteínas terapéuticas la búsqueda de nuevas tecnologías y/o técnicas analíticas que permitan optimizar los

procesos de separación y caracterización de aquellas proteínas que sean de interés farmacéutico.<sup>7</sup>

## **OBJETIVO GENERAL**

- Realizar una exhaustiva revisión bibliográfica en diferentes bases de datos sobre las nuevas técnicas analíticas utilizadas en la caracterización y separación de proteínas de uso farmacéutico.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Realizar una búsqueda sistemática mediante el uso de bases de datos de carácter científico, tecnológico, mediante la selección de artículos, resúmenes, tesis, que incluyan las palabras clave “técnicas analíticas” “separación”, “caracterización”, “proteínas terapéuticas”, “proteínas de uso farmacéutico”.
- Conocer las principales proteínas de interés farmacéutico.
- Identificar las metodologías y equipos empleados en las nuevas técnicas analíticas para la separación y caracterización de proteínas de uso farmacéutico.
- Describir el proceso de las nuevas técnicas analíticas para la separación y caracterización de proteínas de uso farmacéutico.
- Realizar una evaluación de acuerdo con las ventajas, costos de las nuevas técnicas analíticas para la caracterización y separación de proteínas de uso farmacéutico.

## **METODOLOGÍA:**

- Realizar una búsqueda bibliográfica mediante el uso de bases de datos de carácter científico, tecnológico, como ELSEVIER, PubMed, Springerlink ScienceDirect, SciFinder, Oxford Academic, ScieLo, Redalyc, Scopus mediante la selección de artículos, resúmenes, tesis, que incluyan las palabras clave “técnicas analíticas” “separación”, “caracterización”, “proteínas terapéuticas”, “proteínas de uso farmacéutico”, se excluirán artículos menores al año 2010. La búsqueda se realizará en idioma español e inglés.

## MARCO TEÓRICO.

### 1. DEFINICIÓN DE PROTEÍNA.

Las proteínas son macromoléculas que participan en todos los procesos de diferentes células, como en la catálisis enzimática (involucrada en prácticamente todos los procesos fisiológicos), soporte mecánico, transporte y almacenamiento, movimiento coordinado, protección inmune, generación y transmisión de los impulsos nerviosos, señalización intra e intercelular, control del crecimiento y la diferenciación celular, etc.<sup>9,11</sup>

Su estructura y función está determinada por el plegamiento de las secuencias de aminoácidos, las cuales son impulsadas por una serie de interacciones en una o más conformaciones espaciales entre sus laterales (grupos R) y por su heterogeneidad superficial, su flexibilidad conformacional, todo lo cual permite definir a las proteínas como conectores moleculares capaces de recibir, integrar y transmitir la información con alta eficiencia y especificidad.<sup>9</sup>

Los aminoácidos que las conforman presentan una serie de reacciones debido a la función amino y ácido. Además, si poseen una cadena lateral reactiva tienen reacciones específicas, entre ellas, la de producir color, la cual permite detectar y valorar en forma cuantitativa las proteínas y los aminoácidos. Todos los aminoácidos no necesariamente se encuentran en una proteína determinada y también algunos de ellos pueden estar presentes muchas veces en la misma molécula proteica, de aquí que se consideren esenciales y no esenciales.<sup>10</sup> (**Tabla 1**). Sin embargo, las proteínas son polímeros de más de 20 aminoácidos, donde aproximadamente la mitad de ellos participan en reacciones nucleofílicas.

**Tabla 1:** Denominación y código de tres letras de los aminoácidos más comunes.

<b>Aminoácidos esenciales</b>		<b>Aminoácidos no esenciales</b>	
<b>Valina</b>	Val	<b>Alanina</b>	Ala
<b>Leucina</b>	Leu	<b>Prolina</b>	Pro
<b>Isoleucina</b>	Ile	<b>Glicina</b>	Gly
<b>Treonina</b>	Thr	<b>Serina</b>	Ser
<b>Metionina</b>	Met	<b>Tirosina</b>	Tyr
<b>Lisina</b>	Lys	<b>Cisteína</b>	Cys
<b>Fenilalanina</b>	Phe	<b>Asparagina</b>	Asn
<b>Triptófano</b>	Trp	<b>Glutamina</b>	Gln
<b>Histidina</b>	His	<b>Aspartato</b>	Asp
<b>Arginina*</b>	Arg	<b>Glutamato</b>	Glus

\*Extraída de: Pradera, 2016

\*La arginina solo se considera esencial durante la época de crecimiento y en ciertas situaciones de estrés metabólico asociadas a procesos de reconstrucción de tejidos.

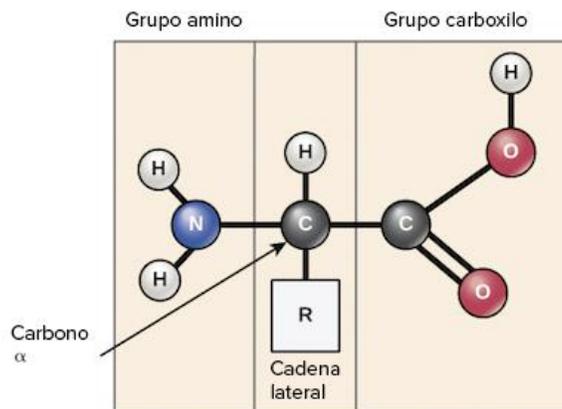
Un enlace peptídico es un enlace covalente que se forma entre dos aminoácidos, para formar el enlace peptídico, un grupo carboxilo de un aminoácido reacciona con

el grupo amino de otro aminoácido. Como resultado, también se libera una molécula de agua (reacción de condensación) y el enlace resultante es CO-NH, donde la molécula se denomina amida (**Figura 1**). La polaridad del enlace peptídico será determinada por la estructura de resonancia. Las cargas dan como resultado que el enlace peptídico tenga un dipolo permanente. El oxígeno tiene una carga de  $-0.28$  y el nitrógeno tiene una carga de  $+0.28$  como resultado de la resonancia.<sup>9</sup>

Las proteínas pueden tener cadenas largas de polipéptidos, las cuales son muy flexibles, muchos de los enlaces covalentes que unen átomos de carbono en una cadena extensa de aminoácidos permiten la rotación libre de los átomos que las unen. Por lo tanto, las proteínas en principio pueden plegarse de muchas formas, sin embargo, cada cadena plegada está restringida por diferentes enlaces no covalentes débiles que se forman dentro de las proteínas. De estos enlaces participan los átomos del esqueleto polipeptídico, así como los átomos de las cadenas laterales de los aminoácidos. Los enlaces no covalentes que ayudan a mantener la forma de las proteínas son enlaces de hidrogeno, los enlaces iónicos y las fuerzas de van der Waals.<sup>9,10,4</sup>

Puesto que los enlaces no covalentes son mucho más débiles que los enlaces covalentes, se necesitan muchos no covalentes para mantener unidas a dos regiones de regiones de una cadena polipeptídica. De ahí que la estabilidad de cada forma plegada este afectada por las fuerzas combinadas de un gran número de enlaces.<sup>11</sup>

**Figura 1:** Estructura molecular del aminoácido



Extraído de: OpenStax Biología

Una cuarta fuerza débil también desempeña un papel central en la determinación de la forma de una proteína, el ambiente acuoso puede reducir los efectos de separación en los enlaces de hidrogeno de las moléculas de agua, forzando la unión entre moléculas hidrófobas, incluidas las laterales no polares de aminoácidos.

En la **Tabla 2**, se puede observar las cargas de las cadenas laterales de los aminoácidos

**Tabla 2:** Cargas de las cadenas laterales de los aminoácidos polares y no polares.

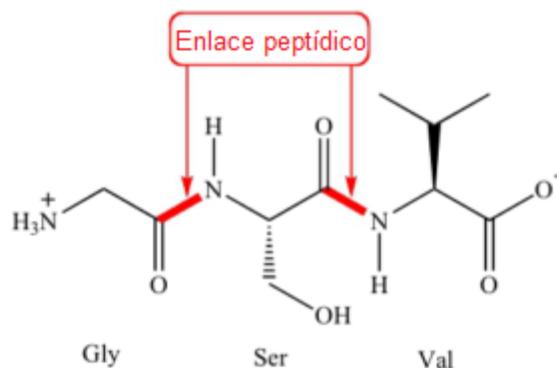
Aminoácidos polares		Aminoácidos no polares	
Aminoácido	Cadena Lateral	Aminoácido	Cadena Lateral
<b>Asp</b>	Negativo	<b>Ala</b>	No polar
<b>Glu</b>	Negativo	<b>Gly</b>	No polar
<b>Arg</b>	Positivo	<b>Val</b>	No polar
<b>Lys</b>	Positivo	<b>Leu</b>	No polar
<b>His</b>	Positivo	<b>Ile</b>	No polar
<b>Asn</b>	Polar no cargado	<b>Pro</b>	No polar
<b>Gln</b>	Polar no cargado	<b>Phe</b>	No polar
<b>Ser</b>	Polar no cargado	<b>Met</b>	No polar
<b>Thr</b>	Polar no cargado	<b>Trp</b>	No polar
<b>Tyr</b>	Polar no cargado	<b>Cys</b>	No polar

\*Extraído de: Alberts, 2021.

## 2. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS.

Mediante los enlaces peptídicos, los aminoácidos se enlazan para formar proteínas con diferentes estructuras y diferentes funciones fisiológicas. Dada su extraordinaria diversidad funcional, se permite un amplio espectro de utilidades para el hombre en el campo de la biomedicina.<sup>4</sup> (Figura 2)

**Figura 2:** Enlace peptídico



Extraído de: peptideszince.com

Las proteínas tienen diferentes niveles de organización estructural; primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria, las cuales dependerán de la secuencia de aminoácidos que las conforman, tanto de las interacciones no covalentes, (entre la misma proteína como con su entorno) y la libertad de adoptar diferentes conformaciones estables a una temperatura fisiológica.<sup>9</sup>

## 2.1 Estructura primaria

La estructura primaria denota el número y la secuencia de aminoácidos en la proteína. Los niveles superiores de organización los decide la estructura primaria, en la que la cada cadena polipeptídica tiene una secuencia de aminoácidos única. Dicha estructura se mantiene mediante los enlaces covalentes de los enlaces peptídicos, donde el primer residuo tiene su grupo  $\alpha$ -NH<sub>2</sub> libre y el último residuo tiene su grupo  $\alpha$ -COOH libre. Así se establecen el extremo N-terminal y C-terminal, con el que inicia y termina la secuencia, debido a que no hay protones dissociables en los enlaces peptídicos, las cargas en una cadena polipeptídica se deben solo al grupo N-terminal, el grupo carboxilo C-terminal y las cadenas laterales en los residuos de aminoácidos. Es por ello por lo que su disposición es lineal, con cadenas cortas y bien definidas entre la unión de varios aminoácidos.<sup>19,43</sup>

## 2.2 Estructura secundaria.

Este tipo de estructura se adopta gracias a la formación de enlaces de hidrógeno entre los grupos carbonilo (-CO-) y amino (-NH-), denota la relación de configuración entre los residuos que están separados por unos 3-4 aminoácidos en la secuencia lineal.<sup>9</sup>

Los niveles secundarios y terciarios de la estructura de la proteína se conservan mediante fuerzas o enlaces no covalentes como enlaces de hidrógeno, enlaces electrostáticos, interacciones hidrofóbicas y fuerzas de van der Waals. Estos también se los encuentra en forma de espiral aplanada.<sup>4</sup> Existen diferentes modelos de estructuras secundarias, sin embargo, los más frecuentes son la hélice alfa y la conformación beta o lámina plegada, es abundante en hemoglobina, mioglobina.<sup>9</sup>

### 2.2.1 Hélice alfa.

Pauling (premio Nobel, 1954) y Corey describieron la hélice alfa y las estructuras laminares con pliegues beta de las cadenas polipeptídicas en 1951. En esta estructura la cadena polipeptídica se desarrolla en espiral sobre sí misma debido a los giros producidos en torno al carbono alfa de cada aminoácido. Los enlaces forman la columna vertebral y las cadenas laterales de aminoácidos se extienden hacia afuera. La estructura se estabiliza mediante 3 enlaces de hidrógeno entre los grupos NH y C = O de la cadena principal, con una distancia aproximada de 250 pm.<sup>4,17</sup>(Figura 3)

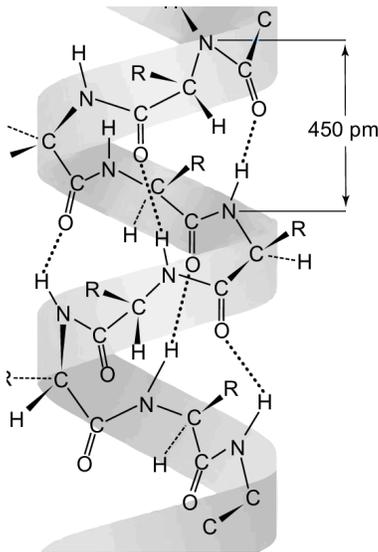
### 2.2.2 Lamina plegada beta.

Las cadenas polipeptídicas en la hoja plegada beta están casi completamente extendidas, la cual es estabilizada por enlaces de hidrógeno entre los grupos NH y C = O de los segmentos vecinos polipeptídicos. Las hebras adyacentes en una hoja pueden correr en la misma dirección con respecto a los extremos amino y carboxi terminales de la cadena polipeptídica (paralela) o en dirección opuesta (hoja beta antiparalela). Se pueden formar curvas beta en muchas proteínas por el abrupto

plegamiento en U de la cadena, donde los puentes de disulfuro intracadena estabilizan estas curvas.<sup>4,17</sup>

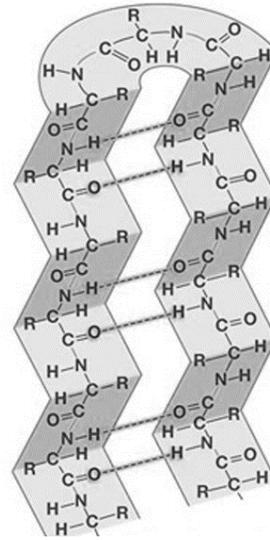
Algunas regiones de proteínas adoptan una estructura en zigzag y se asocian entre sí estableciendo uniones mediante enlaces de hidrógeno intracatenarios. Todos los enlaces peptídicos participan en estos enlaces cruzados, confiriendo así gran estabilidad a la estructura.<sup>10</sup> En la **Figura 3** y **Figura 4** se pueden observar la hélice alfa y la lámina plegada.

**Figura 3 Hélice alfa.**



\*Extraído de: Georgieva, & Glazebrook 2018

**Figura 4: Lamina plegada**



\*Extraído de: Center for biomolecular Modeling

### 2.3 Estructura terciaria.

La estructura terciaria denota la estructura tridimensional de la proteína completa, define la relación estérica de los aminoácidos que están muy separados entre sí en la secuencia lineal, pero cercanos en el aspecto tridimensional. Las formas plegadas tridimensionales de las proteínas dependen de sus estructuras primaria y secundaria, que juntas hacen posible la interacción. Los enlaces de hidrógeno se forman entre varias cadenas laterales de aminoácidos, como los grupos -OH de serina, treonina y tirosina.<sup>43</sup>

Este tipo de estructura es termodinámicamente más estable, existe dos posibles estructuras terciarias: la estructura globular y la estructura fibrilar. La estructura globular tiene forma de "ovillo", es soluble, y es típica de las hormonas o enzimas; la estructura fibrosa se caracteriza por dar a la proteína forma de filamento y ser

insoluble, algunos ejemplos con esta estructura son la alfa o la beta-queratina y el colágeno.<sup>19</sup>

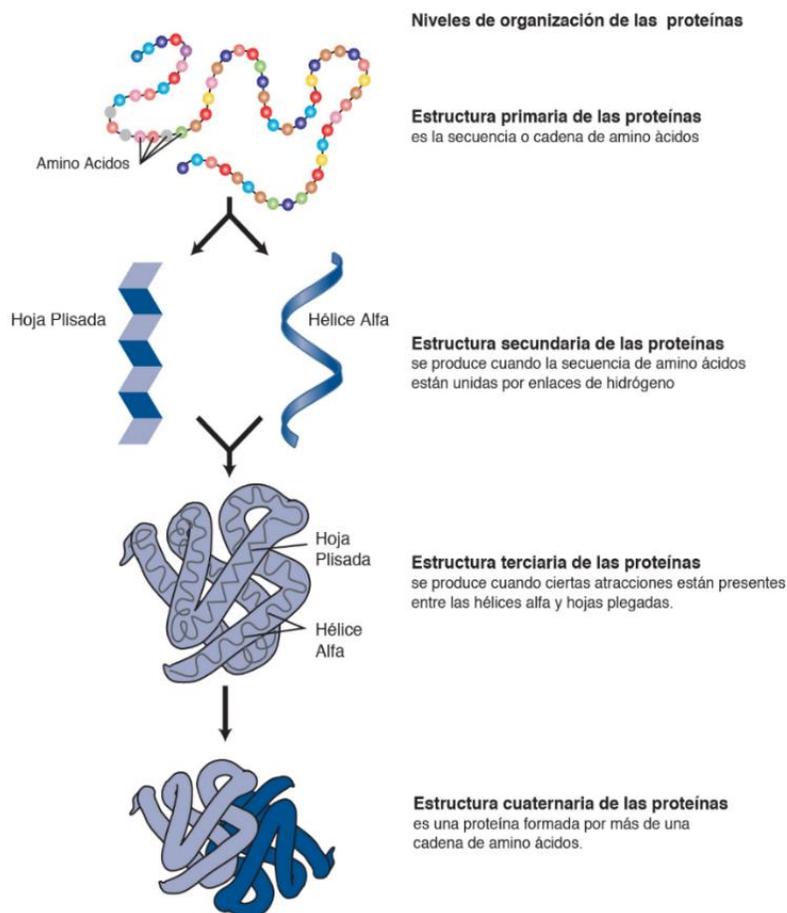
### 2.3 Estructura cuaternaria.

La estructura cuaternaria de una proteína es la asociación de varias cadenas o subunidades de proteínas en un arreglo compacto. Cada una de las subunidades tiene su propia estructura primaria, secundaria y terciaria, donde las subunidades se mantienen unidas por enlaces de hidrógeno y fuerzas de van der Waals entre cadenas laterales no polares.<sup>19</sup>

Para que la proteína este completa y funcione correctamente, las subunidades deben organizarse específicamente, de no ser así, estas se disociaran y provocara cambios en la actividad biológica.<sup>19</sup>

En la **Figura 5** se pueden observar los niveles de estructurales de las proteínas

**Figura 5. Niveles estructurales de las proteínas**



\*Extraído de: National Human Reserch Institute.

### 3. RELACIÓN ESTRUCTURA-FUNCIÓN DE LAS PROTEINAS

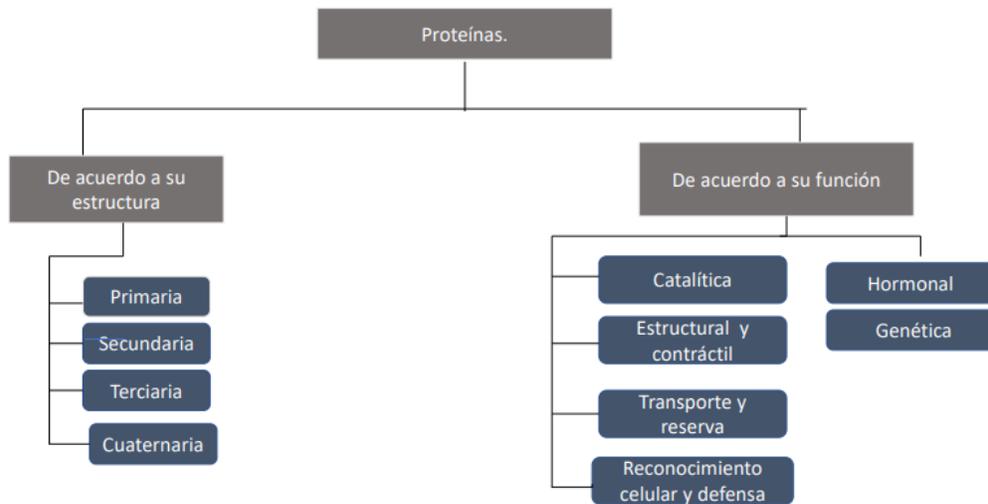
Las funciones de las proteínas se mantienen debido a su capacidad de reconocimiento e interacción con una variedad de moléculas. La conformación estructural tridimensional depende de la estructura primaria para proporcionar y mantener las características funcionales. Por lo tanto, cualquier diferencia en la estructura primaria puede generar una pérdida de función en la proteína.<sup>21</sup>

De acuerdo con Gerald, 2009,<sup>21</sup> las principales funciones biológicas que realizan las proteínas son las siguientes:

- **Función catalítica:** Las enzimas son las proteínas que tienen funciones de catálisis biológica, son capaces de aumentar la velocidad de las reacciones químicas, siendo altamente específicas.  
Sin embargo, pierden su actividad catalítica cuando sufren desnaturalización por efecto de los mismos agentes que afectan a las demás proteínas; la conformación tridimensional nativa intacta de la proteína enzimática resulta indispensable para que ésta desempeñe su función.
- **Función estructural:** Contribuyen a la morfología y propiedades físicas de las células, medio extracelular, tejidos y órganos, por ejemplo, la elastina y colágeno.
- **Función de transporte y reserva:** Transportan biomoléculas en el interior/ exterior de las células, actúan también como reserva de algunas sustancias químicas, por ejemplo, las proteínas receptoras de hormonas esteroideas y caseína (suministra ácido fosfórico).
- **Funciones de reconocimiento celular y defensa:** Se encargan de reconocer moléculas u organismos extraños, para unirse a ellos y facilitar su destrucción (glicoproteínas) mediante las células del sistema inmunitario (inmunoglobulinas).
- **Función contráctil:** Permiten la contracción de algunos músculos, por ejemplo, el complejo actina-miosina del músculo.
- **Función Hormonal:** Actúan como mensajeros químicos de un tejido a otro, a través de la sangre.
- **Función genética:** Facilitan el empaquetamiento del DNA en los cromosomas, las histonas son las que se encargan de esta función.

En la **Figura 6**, se muestra un mapa conceptual que resume la clasificación de proteínas.

**Figura 6:** Clasificación de proteínas acorde a su estructura y función biológica



#### 4. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE LAS PROTEINAS (PTM).

La transcripción y traducción son procesos que la célula utiliza para la elaboración de todas las proteínas, a partir de la información almacenada en las secuencias de bases del DNA. Durante la transcripción, una porción de DNA que codifica un gen específico se copia en un RNA mensajero (RNAm) dentro del núcleo de la célula. Luego, este lleva la información genética del DNA al citoplasma, en donde ocurre la traducción. A medida que el RNAm va a través del ribosoma, otro tipo de RNA llamado RNA de transferencia (ARNt) enlaza aminoácidos, así hasta elaborar la proteína codificada.<sup>44</sup>

La modificación postraduccional de proteínas (PTM, del inglés *Post-translational modification*), es una de las últimas etapas de esta síntesis. Son cambios químicos reversibles o irreversibles que las proteínas pueden sufrir después de la traducción. Estos cambios van desde la escisión enzimática de enlaces peptídicos, adiciones covalentes de grupos químicos como lípidos, carbohidratos o incluso proteínas completas que se insertan en las cadenas laterales de aminoácidos.<sup>22</sup>

Las modificaciones amplían la gama de estructuras y propiedades de aminoácidos y, en consecuencia, diversifican las estructuras y funciones de las proteínas. En conjunto, se sabe que ocurren fisiológicamente hasta 300 modificaciones postraduccionales de proteínas. Aunque, las PTM más comunes son de acuerdo con Maloy & Hughes 2013<sup>22</sup>:

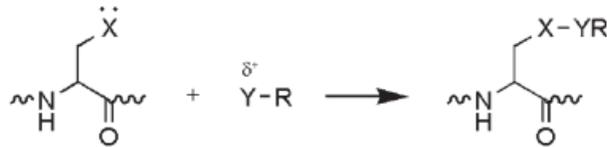
- Escisión específica de proteínas precursoras.
- Formación de enlaces disulfuro.
- Adición o escisión covalente de grupos de bajo peso molecular, lo que conduce a modificaciones como:
- Acetilación, amidación, biotinilación, cisteinilación, desamidación, farnesilación, formilación, geranilgeranilación, glutatiónilación, glicación

(conjugación no enzimática con carbohidratos), glicosilación (conjugación enzimática con carbohidratos), hidroxilación, metilación, mono ADP-ribosilación, miristoilación, oxidación, palmitoilación, fosforilación, poli (ADP-ribosilación) o estereoilación.

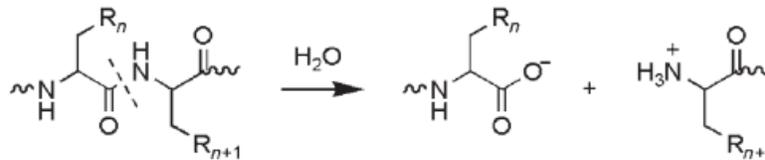
Es importante mencionar que todas las adiciones covalentes (**Figura 7**) son catalizadas por enzimas de algún grupo químico, generalmente un fragmento electrofílico de un cosustrato, que va a un residuo de cadena lateral en una proteína. La cadena lateral modificada suele ser rica en electrones y actúa como un nucleófilo en la transferencia, mientras que la escisión covalente de los esqueletos peptídicos de las proteínas es producida por acción de proteasas, y en menor frecuencia, por escisión autocatalítica<sup>70</sup>

**Figura 7: Modificaciones covalentes y escisión de proteínas**

1. Modificación Covalente



2. Escisión de la estructura principal de la proteína



\*Modificado de: Walsh et al, 2005.

La modificación covalente, se encuentra mucho más ampliada en células nucleadas, siendo el tipo de modificaciones con mayor frecuencia de ocurrencia. Aproximadamente el 5% de los genomas de eucariotas (entre ellos, el del ser humano) pueden dedicarse a enzimas que lleven a cabo este tipo de modificaciones postraduccionales.<sup>70</sup>

Las cadenas laterales de los aminoácidos actúan como nucleófilos fuertes o débiles, mientras que los residuos restantes rara vez participan en modificaciones covalentes de cadenas laterales. La **Tabla 3** muestra algunos aminoácidos con modificaciones en estas cadenas.<sup>22</sup>

**Tabla 3. Modificaciones postraduccionales en las cadenas laterales.**

<b>Residuo</b>	<b>Reacción</b>	<b>Ejemplo</b>
<b>Asp</b>	3 Fosforilación 4 Isomerización a isoAsp	<b>5</b> Proteína tirosina fosfatasas reguladoras de respuesta en sistemas de dos compuestos
<b>Ala</b>	6 N-Acetilación 7 Amidación 8 N-Metilación	9 N-Alfa-acetiltransferasa 10 Pantotenato sintetasa <b>11</b> Proteínas ribosomales
<b>Glu</b>	12 Metilación 13 Carboxilación 14 Poliglicinación <b>15</b> Poliglutamilación	16 Proteínas receptoras de quimiotaxis 17 Residuos de Gla en la coagulación 18 Tubulina
<b>Gln</b>	19 Amidación <b>20</b> N-Metilación	21 FMRFamida-péptidos relacionados <b>22</b> Proteínas ribosomales
<b>Ser</b>	23 Fosforilación 24 O-glicosilación 25 Fosfopanteteinilación 26 Fosforilación 27 Autoescisión 28 N-Acetilación 29 O-Acetilación 30 Amidación 31 O-Palmitoilación	32 Proteína serina quinasa y fosfatasas. 33 O- glicosilación 34 Ácido graso sintasa 35 Proteína serina quinasa y fosfatasa 36 Formación de enzimas piramidales 37 N-Alfa-acetiltransferasa 38 O-Acetilsernal(tiol) liasa 39 Kallikrein-8 40 Mielin propteolipido de 51kDa
<b>Trp</b>	41 Amidación 42 Hidroxilación <b>43</b> C-Mannosilación	44 Neuropeptidos como proteínas 45 Alfa-quetoglutarato- dependiente de taurina dioxigenasa <b>46</b> Plasma-proteínas de membrana
<b>Thr</b>	47 Fosforilación <b>48</b> O-glicosilación	<b>49</b> Proteína tirosina quinasa fosfatasa.
<b>Tyr</b>	50 Fosforilación 51 Sulfatación 52 Orto nitración. <b>53</b> TOPA quinona	54 Tirosina cinasa/fosfatasa 55 Respuestas inflamatorias <b>56</b> Maduración de la amina oxidasa
<b>His</b>	57 Fosforilación 58 Aminocarboxilopropilación 59 N-metilación <b>60</b> Metilación	61 Sensor de proteína quinasas en sistemas reguladores de dos componentes 62 Formación de diftamida <b>63</b> Metil CoM reductasa
<b>Ile</b>	64 Amidación <b>65</b> N-Metilación	66 Neuropeptidos de miomodulina <b>67</b> Subunidad estructural principal del pilus formador de haces
<b>Lys</b>	68 N-Metilación 69 N-acilación por grupos acetilo. 70 C-hidroxilación 71 O-Glicosilación 72 N-Acetilación 73 Amidación 74 N-Palmitoilación <b>75</b> Trimetilación	76 Metilación de histonas 77 Acetilación de histonas 78 SUMO, etiquetado de proteínas maduración del colágeno 79 O-Glicoproteínas 80 N-Alpha-acetiltransferasa 81 EHMT1 82 Carbonil reductasas 83 Miosinas
<b>Cys</b>	84 S-hidroxilación (S-OH), formación de puentes disulfuro	89 Intermedios de sulfenato 90 Proteína en ambientes oxidantes

	85 Fosforilación 86 S-acetilación 87 S-prenilación <b>88</b> Splicing de proteínas		91 PTPasas 92 Ras <b>93</b> Escisiones intencionales
<b>Met</b>	94 Oxidación a sulfóxido 95 N-Acetilación 96 Amidación <b>97</b> N-Metilación		98 Met sulfóxido reductasa 99 N-Alfatransferasa 100 Péptidos relacionados con MIP <b>101</b> Proteínas ribosomales
<b>Phe</b>	102 Amidación 103 Hidroxilación <b>104</b> N-Metilación		105 FMRFamida neuropéptidos 106 Proteínas de matriz de placa adhesiva <b>107</b> Proteínas del operón ComG
<b>Arg</b>	108 N-metilación 109 N- Acetilación 110 Amidación 111 Hidroxilación 112 Fosforilación <b>113</b> N-Glicosilación		114 Histonas 115 GSA 116 Argininosuccinato sintasa 117 N-alfa-acetiltransferasa 118 Monóxido de carbono deshidrogenasa de cadena larga <b>119</b> N-glicoproteínas
<b>Asn</b>	120 N-glicosilación 121 N-ADP-ribosilación <b>122</b> Splicing de proteínas		123 N-glucoproteínas <b>124</b> Paso de escisión intein
<b>Gln</b>	<b>125</b> Transglutaminación		<b>126</b> Entrecruzamiento de proteínas
<b>Trp</b>	<b>127</b> C-manosilación		<b>128</b> Proteínas de la membrana plasmática
<b>Pro</b>	129 C-hidroxilación 130 Dihidroxilación 131 N-Acetilación 132 Amidación <b>133</b> N-Metilación		134 Colágeno 135 HIF-1 <sup>a</sup> 136 Virotoxoin 137 N-Alfa-acetiltransferasa 138 Protioroliberin <b>139</b> N-Metilprolina demetilsa
<b>Gly</b>	140 C-Hidroxilación 141 N-Acetilación <b>142</b> Amidación		143 Formación de amida C-terminal 144 N-Alfa-acetiltransferasa 145 Glicina oxidasa
<b>Leu</b>	146 Amidación <b>147</b> N-Metilación		148 Miomodulin neuropéptidos <b>149</b> Subunidad estructural principal del pilus formador de haces
<b>Tyr</b>	150 Fosforilación 151 Sulfación 152 Ortho-Nitración 153 N-Acetilación 154 N-Metilación <b>155</b> O-Glicosilación		156 Tirosina kinasas/fosfofatasas 157 CCR5 receptor de maduración 158 Respuestas inflamatorias 159 N-alfa-acetiltransferasa 160 Proteína I de la vía de secreción general <b>161</b> Proteína de capa S SpaA
<b>Val</b>	162 N-Acetilación 163 Amidación <b>164</b> Hidroxilación		165 N-Alfa-acetiltransferasa 166 MIP- Péptidos relacionados con la propiedad intelectual

\*Modificada de: Walsh *et al.*2005; Maloy *et al.*2013.

#### 4.1 Modificaciones postraduccionales más frecuentes:

Una de las modificaciones más frecuente es la adición de grupos covalentes, dentro de estas se encuentran la fosforilación, acilación, acetilación, metilación glicosilación, ubiquitinación, hidroxilación.

##### 4.1.1 Fosforilación.

La fosforilación de proteínas es una de las PTM más importante, este mecanismo reversible se produce a través de las proteínas quinasas, y consiste en la adición de un grupo fosfato ( $\text{PO}_4$ ) al grupo polar R de los aminoácidos, principalmente serina, treonina y tirosina. En consecuencia, esta adición modifica la proteína de apolar hidrófobo a polar hidrófilo, lo que permite que la proteína cambie de conformación al interactuar con otras moléculas o que estas lleven otro tipo de PTM. Un aminoácido fosforilado puede unirse a moléculas capaces de interactuar con otras proteínas y, en consecuencia, ensamblar y separar complejos proteicos.<sup>18,70</sup>

Los sitios diana de fosforilación son los residuos Ser, Thr, Tyr, His, Pro, Arg, Asp y Cys, pero esta modificación ocurre principalmente en los residuos Ser, Thr, Tyr e His. Este PTM incluye la transferencia de un grupo fosfato del trifosfato de adenosina a los residuos del receptor mediante enzimas quinasas, Por el contrario, la desfosforilación o eliminación de un grupo fosfato es una reacción enzimática catalizada por diferentes fosfatasas.<sup>22,25</sup>

Se ha demostrado que más de dos tercios de las 21.000 proteínas codificadas por el genoma humano están fosforiladas, y es probable que más del 90% estén realmente sometidas a este tipo de PTM.<sup>70</sup> El genoma humano, de hecho, incluye aproximadamente 568 proteína quinasas y 156 proteína fosfatasas que regulan los eventos de fosforilación y, por lo tanto, juegan un papel importante en el control de procesos biológicos como la proliferación, diferenciación celular, procesos de invasión, metástasis y apoptosis.<sup>12</sup>

Por lo tanto, una identificación de los residuos fosforilados en proteínas implicadas en el desarrollo de patologías como cáncer, enfermedad de Alzheimer, enfermedad del Parkinson, puede contribuir a entender las bases moleculares de estas patologías.<sup>24</sup>

##### 4.1.2 Acetilación.

La acetilación se cataliza a través de las enzimas lisina acetiltransferasa (KAT) e histona acetiltransferasa (HAT). Las acetiltransferasas usan acetil CoA como cofactor para agregar un grupo acetilo ( $\text{COCH}_3$ ) al grupo  $\epsilon$ -amino de las cadenas

laterales de lisina, mientras que las desacetilasas (HDAC) eliminan un grupo acetilo en las cadenas laterales de lisina.<sup>22,23</sup>

Esta modificación tiene un papel esencial en los procesos biológicos, por ejemplo, la estabilidad de la cromatina, la interacción proteína-proteína, el control del ciclo celular, el metabolismo celular, el transporte nuclear y la nucleación de actina. Según la evidencia disponible, la lisina acetilada es vital para el desarrollo celular, y su desregulación conduce enfermedades graves como cáncer, envejecimiento, desórdenes inmunológicos, enfermedades neurológicas (enfermedad de Huntington y enfermedad de Parkinson) y enfermedades cardiovasculares.<sup>23</sup>

Hasta ahora se reporta la existencia de tres formas de acetilación: N $\alpha$ -acetilación, N  $\epsilon$ -acetilación y O-acetilación. La N $\alpha$ -acetilación es una modificación irreversible y los otros dos tipos de acetilación son reversibles. Estas tres formas de acetilación ocurren en residuos de Lys, Ala, Arg, Asp, Cys, Gly, Glu, Met, Pro, Ser, Thr y Val con diferentes frecuencias, sin embargo, en el residuo de lisina se presenta mayormente la acetilación. Es importante mencionar que la N  $\epsilon$ -acetilación es biológicamente más significativa en comparación con los otros tipos de acetilación.<sup>22,25</sup>

#### **4.1.3 e-N-acetilación de lisina.**

Se refiere a la unión covalente de un grupo acetilo (CH<sub>3</sub>CO) al grupo  $\alpha$ -amino libre (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) en el extremo N-terminal de un polipéptido, neutralizado la carga positiva del extremo N-terminal. Esta modificación afecta en gran medida las propiedades electrostáticas de las proteínas y por ende su función, al ser una PTM irreversible, esta afecta a una amplia gama de propiedades proteicas, incluida la estabilidad del plegamiento, las interacciones proteína-proteína y la focalización subcelular. Por lo tanto, se puede dirigir a varios procesos biológicos, incluido el del control transcripcional a través de modificaciones de la cola de histonas.<sup>23,25</sup>

Las e-N-acetilaciones múltiples de residuos de lisina en las colas terminales de la histona del factor de transcripción p53 en cáncer, se consideran una parte integral del código epigenético. Uno de los impactos que genera esta PTM en esta transcripción es la preservación de la integridad genética de la célula para así inducir una detención de la división celular y la reparación del daño del ADN generado por mutaciones.<sup>25,70</sup>

#### **4.1.4 Acilación.**

La acilación es el resultado de la adición enzimática de lípidos de cadena larga, en promedio 74% palmitato, 22% estearato y 4% oleato sobre residuos de cisteína en proteínas solubles y transmembrana, mediante un enlace tioéster lábil<sup>13</sup>. Es una PTM reversible debido a este enlace, los principales tipos de acilación caracterizados hasta la fecha son la N- miristoilación y la S- acilación, las cuales dan como resultado aumentos en la hidrofobicidad de las proteínas que pueden

afectar la estructura, el ensamblaje, la maduración, el tráfico y la función de las proteínas.<sup>13,16</sup>

La acilación regula múltiples pasos en el ciclo de vida de las proteínas de membrana y de membrana periférica, incluido el ensamblaje, la salida del RE, la maduración y la salida de Golgi, la clasificación y el tráfico a las membranas, el reciclaje y la internalización; el control de propiedades y regulación por otras vías de señalización, el reparto de proteínas de membrana periférica entre el citosol y membranas, así como el reciclaje y degradación final.<sup>13</sup>

La N- miristoilación implica la reacción cotraduccional del ácido mirístico con un residuo de glicina en la secuencia consenso MGXXXS / T (donde M es la metionina de inicio y X es cualquier aminoácido que se unirá de forma covalente) y la S-acilación se denomina frecuentemente palmitoilación, lo que refleja el hecho de que el palmitato es el ácido graso unido predominantemente a las proteínas S- aciladas, estas pueden clasificarse ampliamente como proteínas transmembrana o de membrana periférica.<sup>13,25</sup>

Los procesos fisiológicos controlados por S-acilación van desde el control de la transcripción de genes y la arquitectura celular hasta el flujo de iones a través de las membranas.

#### **4.1.5 Mono y poliubiquitinación de proteínas.**

La ubiquitinación es una PTM que implica la unión covalente de un péptido de ubiquitina (Ub) de 8 kDa a una o más lisinas de una proteína diana. La modificación de una proteína diana puede ocurrir como una única Ub en una sola lisina (monoubiquitinación), una sola Ub en múltiples lisinas (multiubiquitinación) o como cadenas ubiquitinadas en las que las lisinas en la ubiquitina conjugada con proteína inicial se extienden a través de rondas secuenciales de ubiquitinación (poliubiquitinación).<sup>13,24</sup>

La ubiquitinación de proteínas tiene una gran importancia fisiológica y desempeña un papel en todos los procesos celulares. Los ejemplos incluyen la determinación de la localización subcelular de la proteína, regulación de señalización (Factores de transcripción, proteína quinasas), la duración y magnitud de la actividad de una proteína al promover su eliminación<sup>70,14</sup>

La reacción se genera mediante los donantes de acil CoA de los grupos electrófilos acetilo, miristoílo y acilo palmitoílo, el grupo carboxi C-terminal de la ubiquitina de 76 residuos, para ello esta debe preactivarse para la transferencia de acilo maquinaria de activación enzimática, que involucra una enzima para producir ubiquitil-AMP y un conjunto de aproximadamente una docena de enzimas que contienen tiol que proporcionan el nucleófilo del sitio activo para capturar el grupo ubiquitil como un conjunto de miembros de la familia de la enzima ubiquitil-S. En general, se requiere un tercer conjunto de proteínas, conocidas colectivamente

como variantes de la enzima, para catalizar la transferencia eficiente de la proteína ubiquitil activada a las cadenas laterales Lys de las proteínas diana.<sup>25,70</sup>

#### **4.1.6 N-Metilación.**

La metilación de átomos de nitrógeno es una de las PTM más importantes en la regulación de las funciones biológicas, tiene un papel crucial en la epigenética, la cual comprende todos los cambios heredables meiótica y mitóticamente en la expresión génica. La hipometilación e hipermetilación globales y específicas de genes son los principales tipos de metilación del ADN, los cambios de uno u otro pueden causar varias enfermedades como el cáncer.<sup>16</sup>

Esta PTM es provocada por varias metiltransferasas altamente específicas, ocurre principalmente en adenina, lisina, arginina y citosina en los sitios CpG. Sin embargo, dependiendo de la posición de la metilación pueden inducir tanto en la activación como la represión de la transcripción del ADN, hay ciertos residuos de lisina que pueden metilarse hasta tres veces y, por lo tanto, conducir a diferentes estados metilados para cada lisina. Además, la N-metilación covalente postraducciona de las colas de histonas, complementa la acetilación como segunda parte principal de la escritura y lectura del código de histonas<sup>16</sup>

#### **4.1.7 Glicosilación.**

La glicosilación es un proceso dirigido por enzimas (glicosiltransferasas), específico de sustrato, reversible y estrictamente regulado. Implica la adición de un grupo carbohidrato (donante de glicosilo) a un grupo hidroxilo u otro grupo funcional de proteínas, lípidos y otras moléculas orgánicas. La mayoría de las proteínas se glicosilan después de su síntesis en el retículo endoplásmico rugoso. Sin embargo, esta PTM se produce en múltiples ubicaciones celulares, como el Aparto de Golgi, el citosol, la membrana del sarcolema y en las proteínas secretadas, además, el 50% de las proteínas plasmáticas están glicosiladas.<sup>24</sup>

Esta modificación, generalmente ocurre en la cadena lateral de residuos como Trp, Ala, Arg, Asn, Asp, Ile, Lys, Ser, Thr, Val, Glu, Pro, Tyr, Cys y Gly. La glicosilación tiene un papel esencial en las interacciones proteína-proteína, las respuestas inmunes, la estabilidad estructural de la célula, la localización de las proteínas y la regulación de la señalización celular. Por lo tanto, cualquier glicosilación defectuosa puede conducir a enfermedades como cirrosis, diabetes.<sup>24,25</sup>

Las moléculas glicosiladas se clasifican en cinco grupos<sup>24,25</sup>:

- Glicanos N-ligados con cadenas de carbohidratos ligadas al nitrógeno del asparagina o cadena lateral de arginina. Su síntesis implica la participación de una molécula lipídica particular, conocida como dolicol fosfato.

- Glicanos ligados a O con cadenas de carbohidratos ligadas al –OH de las cadenas laterales de serina, tirosina, treonina, hidroxilisina o hidroxiprolina. Los glicanos ligados a O participan en una variedad de procesos celulares.
- Los glicanos ligados a C son las formas de productos de silación de glicol donde un residuo de azúcar está ligado al átomo de carbono de la cadena lateral de triptófano.
- Fosfoglicanos, donde los grupos de azúcar están bloqueados a través del grupo fosfato de la fosfoserina.
- Glipiado, que implica la adición de glicosilfosfitos

#### 4.1.8 Hidroxilación.

La hidroxilación es una PTM reversible realizada por las enzimas conocidas como hidroxilasas, y tiene la máxima importancia en la fisiología celular. En las proteínas humanas, la prolina es el residuo hidroxilado con mayor frecuencia.<sup>24</sup>

Sin embargo, hasta ahora solo se ha detectado experimentalmente una pequeña fracción de todos los sitios hidroxilados. Un ejemplo de esta PTM es en la hidroxilación de prolina (PH), la cual es realizada por prolil hidroxilasas, que catalizan la adición de un grupo hidroxilo al anillo de pirrolidina de la cadena lateral en la posición gamma.

Esta modificación es crucial para el plegado correcto de la triple hélice de colágeno, en la señalización de las vías de detección de oxígeno, la angiogénesis y la proliferación de células tumorales.<sup>24</sup>

## 5. REVERSIBILIDAD DE LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES.

Uno de los procesos por los cuales se controla la actividad y la vida útil de cada proteína antes de someterse a dicha diversificación (**Tabla 3**) es mediante la proteólisis limitada.

De las cinco categorías principales (fosforilación, acilación, glicosilación, química de tiol-disulfuro y alquilación), todas menos la alquilación tiene enzimas dedicadas, a menudo grandes familias de enzimas, que catalizan la eliminación de las modificaciones covalentes. Las enzimas que revierten la fosforilación, acilación y glicosilación son, en general, hidrolasas específicas, mientras que los enlaces disulfuro son escindidos por reductasas.<sup>70</sup>

Mediante la ruta enzimática oxidativa en la alquilación se eliminan los sustituyentes N-metilo de las colas de histonas. Las proteínas quinasas generalmente se encuentran como formas de baja actividad "apagadas" en estados basales en ausencia de un estímulo específico.

La acetilación de proteínas, la ubiquitinación de proteínas y la S-palmitoilación de proteínas son otras tres clases de modificaciones covalentes que se revierten fácilmente y, por lo tanto, califican para funciones de regulación y señalización.<sup>22,70</sup>

## **6. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES Y SU RELACIÓN EN LAS ENFERMEDADES**

Dado que las PTM están relacionadas con la regulación de la estructura, el plegamiento y la función de las proteínas, se sabe que algunas de ellas están directamente asociadas con la patogénesis de las enfermedades humanas. A continuación, se dan varios ejemplos ilustrativos de las funciones patológicas.<sup>24</sup>

La hiperfosforilación de una de las proteínas asociadas a los microtúbulos, (proteínas tau), juega un papel importante en la etiología de ciertos trastornos neurodegenerativos como las diferentes tauopatías y la enfermedad de Alzheimer (EA) al facilitar la formación de filamentos helicoidales apareados y ovillos neurofibrilares.<sup>24</sup>

- 5 La pérdida de los sitios de acetilación en los receptores de andrógenos se incrementa en la enfermedad de Kennedy (un trastorno neurodegenerativo hereditario).<sup>24</sup>
- 6 En la enfermedad de Alzheimer, el papel de la O-glicosilación y fosforilación es beneficioso y disminuye la formación de masas neurofibrilares en las neuronas.<sup>24</sup>

## **7. ANTECEDENTES DE PROTEÍNAS DE USO FARMACÉUTICO.**

El campo de la terapéutica con proteínas se inició en 1921 con el primer uso médico de insulina, extraída de páncreas de animales. Los fisiólogos canadienses Frederick G. Banting y Charles H. Best extrajeron por primera vez la insulina, la cual revolucionó el tratamiento de la Diabetes tipo 1, y que posteriormente en 1923 estaba comercialmente disponible en los Estados Unidos. Sin embargo, la insulina se empezó a obtener a partir de páncreas de cerdos o vacas, aunque esta es biológicamente activa en humanos, no es idéntica a la humana, por lo que se generaban reacciones inmunes adversas, lo cual ponía en riesgo a los pacientes<sup>27,28</sup>.

En 1955, el bioquímico británico Frederick Sanger logró secuenciar completamente la insulina bovina y descubrió su composición exacta en términos de aminoácidos, luego en 1965 la bioquímica inglesa Dorothy Mary Crowfoot-Hodgkin pionera en la cristalografía de rayos X de proteínas, logra descifrar su estructura química.<sup>27</sup>

A mediados de 1970 se inició el desarrollo de la ingeniería genética basada en la tecnología de ADN recombinante que marcó a su vez, el comienzo de la industria

biofarmacéutica actual. Mediante la tecnología de ADN recombinante fue posible modificar genéticamente diversos tipos de células que actúan como “reactores” biológicos, capaces de sintetizar proteínas recombinantes (biofármacos) con aplicaciones terapéuticas.<sup>27</sup>

En 1978, la insulina humana se produjo como la primera proteína de uso terapéutico con la ayuda de los descubrimientos de Sanger, Dorothy y la ingeniería genética. El pequeño tamaño de la molécula de insulina era una ventaja para intentar sintetizar y clonar el gen que ordena su producción. Mediante el gen modificado desarrollado en el laboratorio Genentech se insertó en un bucle del plásmido y transfectado en bacterias *Escherichia coli*, generando bacterias recombinantes que mediante fermentaciones en tanques se logró producir Insulina recombinante.<sup>28</sup>

Los avances de la ingeniería genética en la década de 1980, permitió la biosíntesis de la hormona de crecimiento humano recombinante(rhGH). Mediante la identificación de la estructura bioquímica en 1972 de la hormona de crecimiento (GH) humana y la clonación del gen en 1979 por Genentech, se desarrolló el primer gen recombinante de GH humana (rhGH) en 1981. Posteriormente se fue mejorado el desarrollo y mediante la tecnología de secreción de proteínas en 1985, se consiguió la biosíntesis total, beneficiando a miles de niños carecientes de esta hormona.<sup>29</sup>

Posteriormente, en 1996 la FDA (Administración de Medicamentos y Alimentos) permitió el uso de la hormona de crecimiento recombinante para el tratamiento de niños con deficiencia de GH, más adelante en 1997 la FDA aprobó la insulina recombinante que está específicamente formulada para funcionar inmediatamente después de la inyección.<sup>29</sup>

El uso y beneficio de estas proteínas represento un fuerte impacto, y un gran aumento en las capacidades terapéuticas de la medicina. Actualmente se realiza la producción de proteínas más grandes las cuales van mejor orientadas al objetivo. En 2005, las proteínas terapéuticas representaron el 17% de los nuevos fármacos aprobados por la FDA) y de acuerdo con el CDER (por sus siglas en ingles *Center for Drug Evaluation and Research's*.) en el 2020 se aprobaron 53 medicamentos nuevos, lo cual representa un aumento del 40% en tan solo una década.<sup>7,8</sup>

## **8. PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS USO E IMPORTANCIA**

Una proteína de uso farmacéutico es cualquier fármaco a base de proteínas, es también conocida como proteína recombinante. El término se utilizó por primera vez para describir medicamentos que son versiones de proteínas humanas genéticamente modificadas.

Son una clase de moléculas con actividad terapéutica dentro del grupo de los productos biológicos. De acuerdo con la FDA, estos son un grupo heterogéneo de

principios con actividad terapéutica que incluyen diferentes tipos como vacunas, sangre, hemoderivados, terapias genéticas, terapias con células madre, tisulares y somáticas, así como las proteínas recombinantes, las cuales deben contener una secuencia específica y definida, con un tamaño superior a 40 aminoácidos. Dichos productos biológicos pueden estar compuestos de azúcares, proteínas, ácidos nucleicos o combinaciones complejas de estas sustancias, entidades vivas como células y tejidos

Es considerable mencionar que existe una diferencia semántica entre *Biologics Products* (Todos los productos bioterapéuticos) y *Biologicals Products* (Aquellos productos obtenidos mediante tecnologías DNA recombinante), los primeros están compuestos por entidades moleculares (proteínas, ácidos nucleicos y azúcares), mientras que los segundos son obtenidos de procesos biotecnológicos, en estos las proteínas terapéuticas representan el grupo más importante.<sup>8</sup>

El uso de proteínas recombinantes (*Biologicals products*) ha representado un fuerte impacto y un gran aumento en las capacidades terapéuticas de la medicina debido a las ventajas que estas poseen, por ejemplo en la producción se pueden llegar a tener cantidades suficientes de proteínas, libres de patógenos que en comparación con la extracción de una proteína de tejido (animal o humano), la disponibilidad es insuficiente para cumplir la cantidad requerida, además de que corre el riesgo de contaminación por patógenos (virus y / o priones).<sup>8</sup>

De igual manera las proteínas terapéuticas presentan ventaja frente a los medicamentos tradicionales, puesto que las proteínas tienen múltiples funciones complejas, y las características inherentes que les provee funciones altamente específicas, no pueden ser imitadas por compuestos químicos simples. Sin embargo, al igual que los fármacos de molécula pequeña, existen tres parámetros principales que influyen en su eficacia terapéutica: tiempo (t  $\frac{1}{2}$  o semivida), toxicidad y unión dirigida

Otra ventaja importante de las proteínas terapéuticas, es que al ser producidas de manera natural por el cuerpo humano, que mediante la tecnología recombinante permite la modificación de una proteína o la selección de una variante genética particular para mejorar la función o la especificación y por ende son bien toleradas, así cualquier enfermedad en la que un determinado gen este alterado o no pueda producir la proteína codificada, podría ser tratada mediante el uso de estas proteínas terapéuticas.<sup>28</sup>

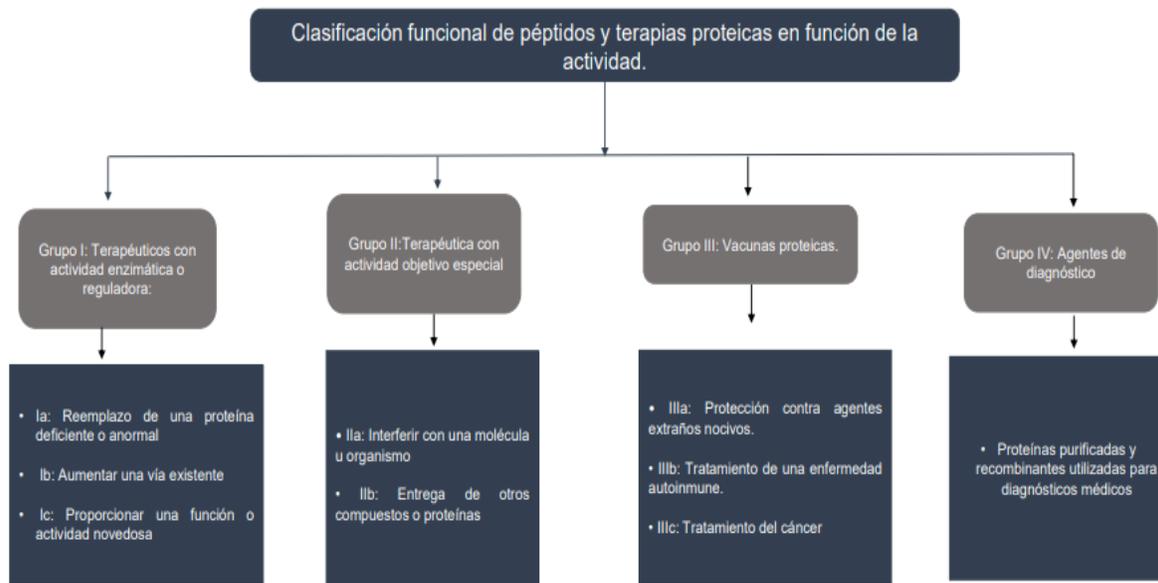
## **9. CLASIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE USO FARMACÉUTICO.**

Las proteínas terapéuticas se pueden clasificar en grupos de acuerdo con su actividad farmacológica, estos grupos son: **I)** proteínas que reemplazan una proteína que es deficiente o anormal; **II)** proteínas que aumentan una ruta existente;

III) Proteínas que proporcionan una función o actividad nueva; IV) Proteínas como agentes de diagnóstico. Sin embargo, Leader 2008, categorizo a las proteínas en términos de función y aplicación terapéutica, esta clasificación fue aprobada por la FDA, la cual coloca en Grupos I y II a los investigados de forma *In vivo*, mientras que los grupos III y IV, a los investigados de forma *In vitro*. El número de terapias mediante proteínas que contiene cada grupo refleja la dificultad relativa asociada con el desarrollo de fármacos<sup>6</sup> (Figura 8).

Es importante mencionar que alternativamente se pueden agrupar las proteínas terapéuticas en tipos moleculares que incluyen: fármacos basados en anticuerpos, anticoagulantes, factores sanguíneos, proteínas morfogénicas óseas, armazones proteicos modificados genéticamente, enzimas, proteínas de fusión, factores de crecimiento (Fc), hormonas, interferones, interleucinas y trombolíticos, siendo los fármacos basados en anticuerpos la clase más grande y de más rápido crecimiento de las terapias proteicas<sup>6,31</sup>

Figura 8. Clasificación de terapias proteicas en función de la actividad.



\*Extraído de: Catrter, 2011.

### 9.1 Grupo I: Proteínas con actividad enzimática o reguladora.

Este grupo se implementa en el tratamiento para el déficit de alguna proteína endógena, mediante el uso de proteínas exógenas (proteínas terapéuticas). Dentro de este, las proteínas terapéuticas se clasifican a su vez en Grupo Ia, Grupo Ib y Grupo Ic; donde el primero se utilizan para sustituir una actividad particular en casos de deficiencia proteica o producción anormal. El segundo se utiliza para mejorar la

magnitud o el momento de una actividad proteica normal, y el ultimo se utiliza para activar proteínas.<sup>31</sup>

### **9.2 Grupo II: Proteínas dirigidas**

Las proteínas de este grupo utilizan los sitios de reconocimiento de antígenos, donde las moléculas de inmunoglobulina (Ig) o los dominios de unión al receptor de los ligandos de proteínas nativas, con la finalidad de guiar al sistema inmunológico para destruir moléculas o células específicamente dirigidas.

Al unirse a tales receptores, las terapias de proteínas dirigidas pueden activar las vías de señalización celular y afectar profundamente la función celular. Sin embargo, los resultados pueden variar desde la muerte celular (a través de la inducción de la apoptosis), hasta bajar la regulación de la división celular o aumentar la proliferación celular. Dentro de este grupo se encuentran los fármacos basados en anticuerpos monoclonales e inmunoadhesinas neutralizantes, entre otras.<sup>31</sup>

### **9.3 Grupo III: Vacunas proteicas.**

Para que los seres humanos desarrollen una inmunidad eficaz contra organismos extraños, deben activarse células inmunitarias como las células T colaboradoras. La activación de las células inmunitarias está mediada por células presentadoras de antígenos, que muestran en su superficie oligopéptidos específicos que se derivan de proteínas que se encuentran en organismos extraños.

Se ha logrado inmunidad frente a estos patógenos, mediante la vacunación atenuada o muerta de estos tipos de organismos. Desafortunadamente, estos métodos han implicado una cierta cantidad de riesgo inevitable de infección o reacción adversa.<sup>31,71</sup>

Las proteínas que se clasifican en este grupo se utilizan para generar protección frente a enfermedades infecciosas o toxinas, las cuales presentan ventaja contra las vacunas tradicionales, debido a que cuando los seres humanos (incluso los inmunocompetentes) se exponen y se vuelven a exponer a esta proteína, se produce una inmunidad significativa, sin la presencia de reacciones secundarias. Esto es debido a que al inyectar específicamente los componentes proteicos inmunogénicos (pero no patógenos) apropiados de un microorganismo esta hace que el sistema inmunológico del cuerpo desarrolle tolerancia al eliminar o desactivar las células que reaccionan contra la proteína terapéutica.<sup>31</sup>

### **9.4 Grupo IV: Diagnóstico de proteínas.**

Las proteínas purificadas y recombinantes de este grupo son utilizadas para el diagnóstico médico (tanto in vivo como in vitro), estas son invaluable en el proceso de toma de decisiones que precede al tratamiento y manejo de muchas enfermedades.<sup>31</sup>

## 10.MERCADO Y REGULARIZACIÓN DE PROTEINAS DE USO FARMACEUTICO.

En 2005, las proteínas terapéuticas representaron el 17% de los nuevos fármacos aprobados por la Administración de Medicamentos y Alimentos de los EE. UU. (FDA) y de acuerdo con el CDER (*Center for Drug Evaluation and Research's*, por sus siglas en inglés) de la FDA, en el 2020 se aprobaron 53 medicamentos nuevos.<sup>30</sup>

De acuerdo con el informe realizado por *Research and Markets*,2021, se espera que el mercado global de proteínas terapéuticas crezca de \$ 170. 33 mil millones de dólares obtenidos en el 2021 a \$ 233.36 mil millones de dólares en 2026. Uno de los factores clave que impulsa el crecimiento del mercado, es el uso de proteínas farmacéuticas en la creciente prevalencia de enfermedades crónicas<sup>32</sup>.

Otro factor clave es el uso de las tecnologías avanzadas que permiten el desarrollo de fármacos basados en proteínas para la proporción de terapias, un impacto de ellas fue el desarrollo de anticuerpos monoclonales (mAbs) en el tratamiento para la COVID-19, aumentando en el segmento terapéutico de proteínas. Se pronostica que el mercado de anticuerpos monoclonales registre una tasa compuesta anual de 8.51% durante el período de pronóstico de 2021-2026.<sup>32,3336</sup>

Se espera que otros factores, incluidas las amplias actividades de investigación y desarrollo (I + D) en el campo de la ingeniería de proteínas, junto con mejoras significativas en la infraestructura de atención médica, impulsen aún más el mercado<sup>32</sup>. En la **tabla 4**, se muestran las principales proteínas terapéuticas que se encuentran dentro del mercado.

**Tabla 4: Mercado de las proteínas terapéuticas de acuerdo con el producto, aplicación y región.<sup>71</sup>**

<b>Mercado de terapias proteicas por producto.</b>	<b>Mercado de terapias proteicas por aplicación</b>	<b>Mercado de terapias proteicas por región.</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Anticuerpos Monoclonales</b></li> <li>• <b>Insulina</b></li> <li>• <b>Proteína de fusión</b></li> <li>• <b>Eritropoyetina</b></li> <li>• <b>Interferón</b></li> <li>• <b>Hormona de Crecimiento humano</b></li> <li>• <b>Hormona estimuladora folicular.</b></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Desordenes metabólicos</li> <li>• Trastornos inmunológicos</li> <li>• Trastornos hematológicos</li> <li>• Cáncer</li> <li>• Trastornos hormonales</li> <li>• Desordenes genéticos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Norteamérica</li> <li>• Europa</li> <li>• Asia Pacifico</li> <li>• América Latina</li> <li>• Medio Oriente y África</li> </ul>

De acuerdo con el mercado de terapias proteicas por región, América del norte fue el líder en 2019-2021, siendo Estados Unidos de América el que domino alrededor de la mitad del mercado, debido a las altas instalaciones médicas y los avances tecnológicos que el país posee.<sup>71</sup>

Europa se registró como la segunda región de ingresos dentro del mercado a nivel mundial en 2020, consecuencia de los países desarrollados como Alemania, Francia, Italia y el Reino unido, que cuentan con la infraestructura y el capital destinado para el desarrollo de proteínas terapéuticas. Por otro lado, el mercado para Asia pacifico se pronostica con un alto crecimiento puesto que existe un aumento en enfermedades crónicas.<sup>32,33</sup>

En cuanto a América latina, el mercado está siendo impulsado por las crecientes investigaciones, el desarrollo en el sector de la ingeniería de proteínas, los avances destacados en el dominio de la salud y el crecimiento de la incidencia de enfermedades crónicas.<sup>33</sup>

### **10.1 Restricciones del mercado.**

Las restricciones significativas para el mercado global de terapias proteicas son el alto costo de instalación, mantenimiento en los laboratorios, las estrictas regulaciones marco regulatorio relacionado con la aprobación del producto.

### **10.2 Regulación de Medicamentos.**

Los medicamentos (incluidos los biológicos) desempeñan un papel crucial para la salud pública y, si son asequibles, de buena calidad y su uso se administra en forma racional, pueden ofrecer una respuesta eficiente para la solución de los problemas sanitarios. Es por ello por lo que la reglamentación y garantía de calidad está considerada como uno de los componentes esenciales de las políticas farmacéuticas, las Autoridades Nacionales Reguladoras son quienes desarrollan y aplican la mayor parte de las leyes y reglamentos relacionados con los productos farmacéuticos.<sup>34</sup>

El proceso de desarrollo, ensayo y comercialización de cualquier molécula biológica está pautado por diferentes agencias en función del país o entidad supranacional correspondiente. En México la COFEPRIS (Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios) es el órgano responsable de la regulación, vigilancia, control y fomento de sanitario de diferentes áreas estratégicas relacionadas con la salud<sup>35</sup>. Sin embargo, la FDA y la EMA (*European Medicine Agency*) son las agencias reguladoras más importantes y las referenciadas a nivel mundial.<sup>71</sup>

La FDA regula una amplia gama de productos, incluidos los alimentos, medicamentos humanos y veterinarios; vacunas y otros productos biológicos; dispositivos médicos destinados al uso humano; productos electrónicos emisores de radiación; productos cosméticos; suplementos dietéticos y productos de tabaco.

El Centro de Evaluación e Investigación Biológica (CBER) y los requisitos que la FDA verifica los productos biológicos que serán importados. Si las muestras biológicas que se ofrecen para la importación están destinadas a ser utilizadas únicamente para pruebas en un laboratorio clínico o para investigación científica básica y no son artículos destinados a la prevención, el tratamiento, el diagnóstico o la cura de enfermedades, lesiones o afecciones en seres humanos, no estarán reguladas por la FDA.<sup>30,36, 71</sup>

Para el desarrollo de cualquier fármaco, incluidos los biológicos, la FDA lo divide en 5 fases.<sup>36</sup>

1. **Descubrimiento y desarrollo:** Esta es la primera fase y, dadas sus características científicas y académicas, no es una fase regulada. En esta fase se informa sobre los nuevos conocimientos sobre el proceso de una enfermedad, las numerosas pruebas de compuestos moleculares, tratamientos y nuevas tecnologías.
2. **Investigación preclínica:** Es la primera fase en donde la FDA obliga a marcar los posibles efectos tóxicos del fármaco, mediante técnicas in vitro e in vivo. La FDA requiere que las pruebas se realicen según la normativa BPL (Buenas Prácticas de laboratorio) y que además se proporcione la información detallada sobre la dosis y los niveles de toxicidad.
3. **Investigación clínica:** En esta fase se llevan estudios en seres humanos, los cuales se encuentran divididos en 4 fases, que a su vez se evalúan en diferentes parámetros:
  - Seguridad y dosis (Entre 20 y 100 personas).
  - Eficacia y efectos no deseados (Varios cientos de personas)
  - Eficacia y seguimiento secundarios (300 a 3000 voluntarios)
  - Eficacia y seguridad (Varios miles de voluntarios)
4. **Revisión:** Una vez completadas las anteriores fases, un equipo de la FDA revisa todos los datos acerca del producto y emite un informe aprobado o rechazando la licencia de comercialización del producto, donde los desarrolladores deben incluir informes sobre todos los estudios, datos y análisis de los resultados clínicos.
5. **Monitorizando:** Una vez aprobados los medicamentos, la FDA continúa monitorizándolos durante un cierto periodo de tiempo, con el fin de vigilar posibles efectos no deseados que no hayan sido descubiertos durante las fases clínicas anteriores.

Es importante mencionar que la FDA fomenta el uso de tecnología de vanguardia disponible, es decir los patrocinadores deben utilizar metodologías analíticas apropiadas que tengan la sensibilidad y especificidad adecuadas para detectar y caracterizar las diferencias entre el producto propuesto y el producto de referencia.

En la **Figura 9** se puede observar los países con tasa de crecimiento, cabe señalar que dentro del continente asiático, el mercado de proteínas ha presentado un alto crecimiento.<sup>69</sup>

**Figura 9: Crecimiento del mercado de proteínas terapéuticas por región.**



\*Extraído de: Mordor Intelligent.

## 11. PRODUCCIÓN BIOTECNOLÓGICA DE MOLÉCULAS BIOTERAPEUTICAS.

Las proteínas terapéuticas son obtenidas mediante procesos biotecnológicos, los cuales implica: cultivación, fermentación, purificación y formulación. La cultivación se origina mediante una célula huésped, la cual puede ser de plantas, mamíferos o microorganismos.<sup>72</sup>

De acuerdo con la tecnología de fabricación de productos biofarmacéuticos, el proceso de producción de proteínas terapéuticas se puede dividir en dos: *Upstream* y *Dowstream*<sup>72</sup>, (**Figura 10**).

- a) **Upstream:** Se define como el crecimiento microbiano necesario para producir productos biofarmacéuticos u otras biomoléculas e implica una serie de eventos que incluyen la selección de la línea celular (sistema de expresión), los medios de cultivo, los parámetros de crecimiento y la optimización del

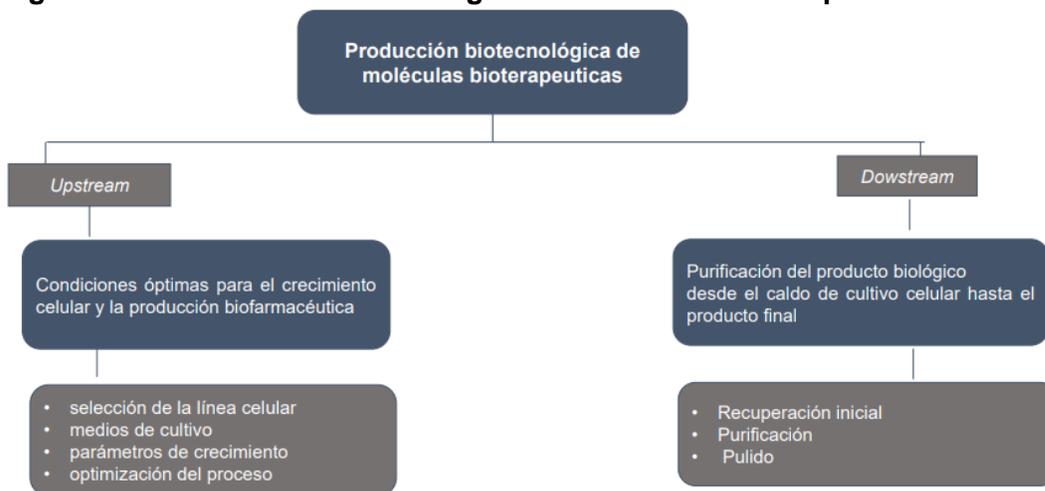
proceso para lograr las condiciones óptimas para el crecimiento celular y la producción biofarmacéutica.<sup>72</sup>

- Requiere condiciones bien controladas e implica el uso de biorreactores a gran escala.
- Deben considerarse factores como el tipo de proceso (por lotes, lote alimentado, continuo, etc.), la temperatura, el pH y el suministro de oxígeno, esterilización de materiales y equipos empleados, y mantenimiento del ambiente para asegurar que esté libre de microorganismos contaminantes.

**b) *Dowstream*:** Se incluyen todos los pasos necesarios para purificar un producto biológico desde el caldo de cultivo celular hasta el producto final. Implica varios pasos para capturar la proteína de interés y eliminar las impurezas relacionadas con la célula huésped, e impurezas relacionadas con el producto, donde cada paso de purificación es capaz de eliminar una o más clases de impurezas.<sup>72</sup>

- Consiste en una etapa de separación sólido-líquido mediante filtración o centrifugación con el fin de separar las células de caldo de cultivo que contiene la proteína de interés; una etapa de concentración y diálisis; una o varias etapas de cromatografía; acondicionamiento final<sup>71</sup>
- La pureza lograda, la velocidad de desarrollo del proceso, el rendimiento de recuperación general y el rendimiento, son algunos parámetros clave que deben tenerse en cuenta durante el desarrollo del proceso posterior.
- 

**Figura 10: Producción biotecnológica de moléculas bioterapéuticas.**



\*Modificada de: Jozala et al 2016.

El proceso inicia con la síntesis de una proteína diana, para posteriormente ser inoculada en la célula huésped. Actualmente, existen tres estrategias para sintetizar

proteínas terapéuticas: síntesis química, expresión basada en células y síntesis de proteínas libres de células (CFPS).<sup>71</sup>

### **11.1 Síntesis química de proteínas terapéuticas**

La síntesis química de proteínas se realiza mediante reacciones químicas, las cuales se pueden llevar a cabo en dos fases independientes: Sólida y Líquida. La síntesis en fase líquida alberga elongaciones graduales, donde se añade cada aminoácido de uno en uno, teniendo una síntesis convergente que produce péptidos de pequeño tamaño.<sup>38</sup>

La fase sólida que hoy en día es común encontrarla de forma automatizada, esta consiste en tener un aminoácido con protección tanto del grupo  $\alpha$ -amino como de la cadena lateral, el cual se inmoviliza en una resina. El grupo protector del  $\alpha$ -amino es típicamente un grupo *tert*-butoxicarbonilo (Boc) sensible a los ácidos o un grupo 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) sensible a las bases.<sup>39</sup>

Estos grupos protectores se pueden eliminar rápida y completamente, posteriormente se puede acoplar un aminoácido protegido con un grupo carboxilo activado a la amina unida a la resina desprotegida, así mediante reacciones de acoplamiento y utilizando un exceso de aminoácido soluble activado, los ciclos de desprotección y acoplamiento se repiten hasta completar la secuencia.<sup>38,39</sup>

Sin embargo, la síntesis química tiene una aplicación limitada, debido a que no es capaz de producir péptidos o proteínas grandes, es por ello por lo que se realiza la síntesis basada en células, ya que esta supera la limitación de tamaño de la molécula a sintetizar.<sup>39</sup>

### **11.2 Síntesis de proteínas libres de células (CFPS).**

La síntesis de proteínas sin células (CFPS) es una forma de síntesis rápida de proteínas *in vitro*, se pueden definir como sistemas donde las reacciones bioquímicas ocurren independientemente de las células vivas, es decir la célula se lisa y el contenido citoplasmático, lleno de biomoléculas activas, es capaz de realizar muchas funciones celulares, como la transcripción y la traducción.<sup>40,41</sup>

La ausencia de membrana celular en estos sistemas contribuye al plegamiento de proteínas, a la síntesis de proteínas difíciles de expresar y a la producción de alto rendimiento. Debido a que no hay necesidad de mantener vivas las células, todos los recursos disponibles se canalizan hacia la expresión del gen de interés. Esto permite que el proceso de purificación sea más simple.<sup>39</sup>

Por lo tanto, se reduce la pérdida de proteínas diana durante el proceso de purificación y se pueden obtener mayores rendimientos de proteínas. Los sistemas CFPS se dividen en sistemas eucariotas y procariotas, siendo los segundos los más

utilizados, debido al bajo costo y la fácil manipulación. En la actualidad, *Escherichia coli* es el sistema procariótico más popular y ampliamente utilizado.<sup>47</sup>

Sin embargo, aún quedan algunos obstáculos con respecto a este sistema, uno de ellos es la optimización del volumen del compartimento para reacciones de alto orden, el desarrollo de biorreactores que permitan la evaluación de los efectos de transferencia de masa de moléculas pequeñas. Otro inconveniente es el alto costo, debido a que los componentes principales son moléculas energéticas (p. ej., ATP, GTP, etc.). Sin embargo, se están estudiando algunos sistemas de regeneración de energía que buscan fuentes de energía más baratas para la reacción sin células.<sup>39</sup>

### 11.3 Expresión basada en células

La síntesis de una proteína diana por parte de una célula se denomina "expresión de proteínas". La totalidad de la célula huésped biológica y la información genética que es modificada e implantada se denomina "sistema de expresión". Cabe mencionar que la síntesis es solo un paso del sistema metabólico del organismo.

La célula biológica es el núcleo de todo proceso biotecnológico. Es el "microrreactor" en el que se produce el principio activo. Su desempeño determina el tamaño del proceso de fermentación, y el espectro de subproductos determinara el tipo de proceso de purificación.<sup>40,46</sup>

### 11.4 Sistemas de expresión.

Es necesaria la expresión de proteínas por parte de la célula huésped para la producción de proteínas terapéuticas. Esto se puede lograr mediante diferentes sistemas de expresión, los cuales se dividen principalmente en sistemas eucariotas y procariotas.<sup>41,42</sup>

Para el proceso de expresión de una proteína terapéutica en un sistema de expresión, se requiere de la siguiente información/componentes: **(Figura 11)**

- Identificación del gen que codifica la proteína de interés.
- Generación de cDNA a partir del mRNA respectivo.
- Selección del vector de expresión adecuado para insertar la secuencia del gen.
- Selección de un sistema adecuado que pueda expresar el vector.
- Métodos apropiados de selección y ampliación.

Los plásmidos son los vectores principales, estos contienen todos los elementos genéticos necesarios para la expresión de la proteína recombinante (terapéutica) y para la selección de las células que generan el producto deseado.<sup>42</sup>

Para tener un mejor resultado en la mejora de expresión de proteínas terapéuticas, se recurre frecuentemente a la optimización de las secuencias de genes de interés

para su uso en forma de codones, RNAt, contenido GC, secuencias de unión a ribosomas, así como a la eliminación de estructuras secundarias innecesarias.<sup>42</sup>

Si se requiere producir líneas celulares estables con un alto nivel de expresión del gen de interés, los plásmidos deben integrarse en regiones cromosómicas transcripcionalmente activas, para ello se recurren a elementos promotores del vector, los cuales impulsan la expresión de la proteína y estos se derivan principalmente de virus, ratones y seres humanos. Cabe mencionar que se pueden encontrar promotores fuertes y débiles, la utilización de cada uno de ellos dependerá la aplicación, por ejemplo, el promotor fuerte se utiliza para la expresión de genes de interés (ej. Citomegalovirus murino o humano (CMV)); mientras que los promotores débiles se aplican para la expresión de genes marcadores de selección (ej. virus simio 40 (SV40) y virus del sarcoma rosa (RSV)).<sup>42,41,72</sup>

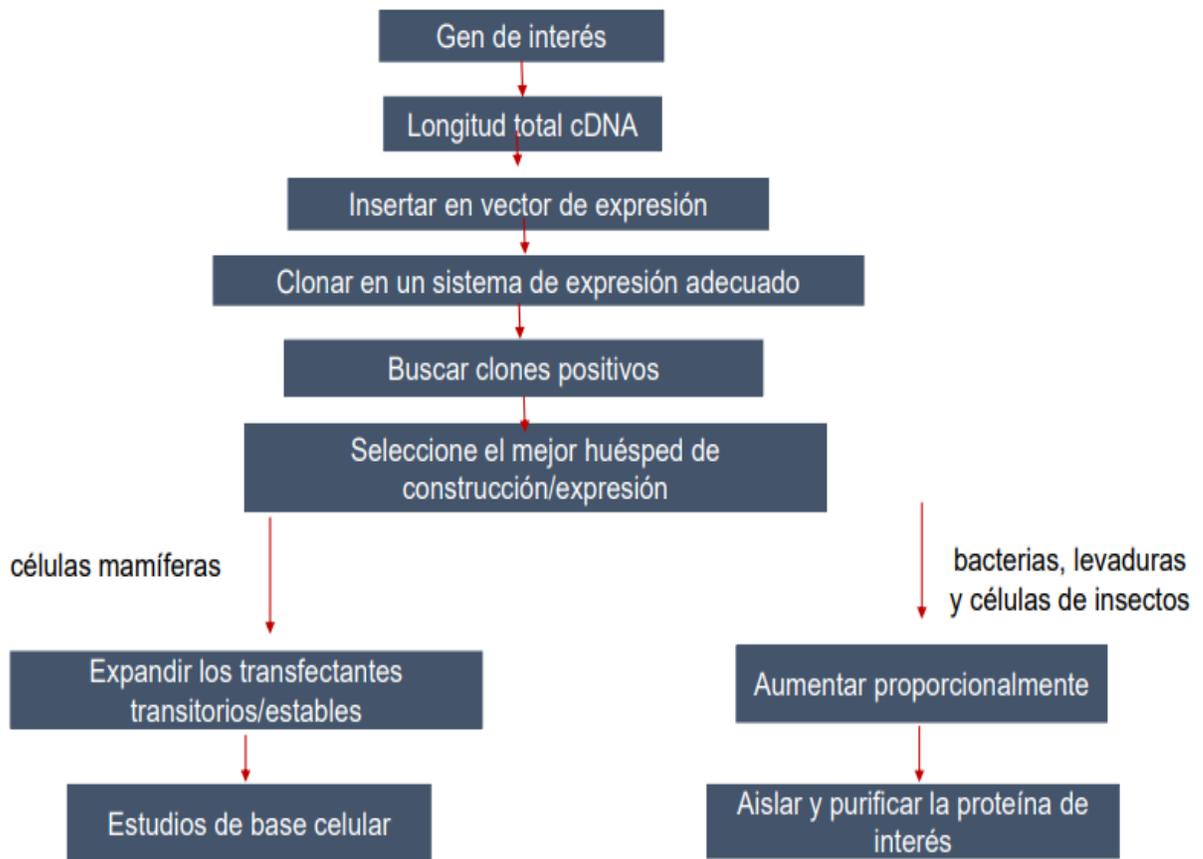
El plásmido también puede contener marcadores seleccionables, esto para permitir la selección de células que expresan la proteína deseada. Algunos ejemplos de estos marcadores son el gen *neo* que genera aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH 3' II) para la resistencia a la geneticina G418, el gen de la fosfotransferasa *hph* para la resistencia a la higromicina, el gen *Sh ble* para la resistencia a la zeocina.<sup>72</sup>

Además, es importante considerar el tamaño de la aplicación del sistema, por ejemplo, a gran escala se tiene la producción de enzimas, anticuerpos o vacunas, aquí la cantidad de proteína requerida es considerablemente alta. En tales casos, el sistema en el que se expresa la proteína debe ser fácil de cultivar y mantener, crecer rápidamente para así producir grandes cantidades.<sup>41,42</sup>

Existen otros factores que determinan el tipo de sistema de expresión, estos son: el tiempo empleado en expresar la proteína, la facilidad de manejo del sistema de expresión, la cantidad de proteína necesaria, el tipo de modificaciones postraduccionales, el número de enlaces disulfuro destino de la expresión proteica.

Dentro de los sistemas de expresión, las células eucariotas (ej. células de mamíferos) son células huésped seguras, tienen funciones de modificación postraduccionales complejas y pueden producir proteínas más complejas. Sin embargo, el alto costo de cultivar células eucariotas, el proceso más complejo y el bajo rendimiento de proteínas en la reacción por lotes, hace que las industrias y científicos se inclinen más en las células huésped procariotas (Levaduras, bacterias)<sup>72</sup>

**Figura 11:** Componentes del sistema de expresión.

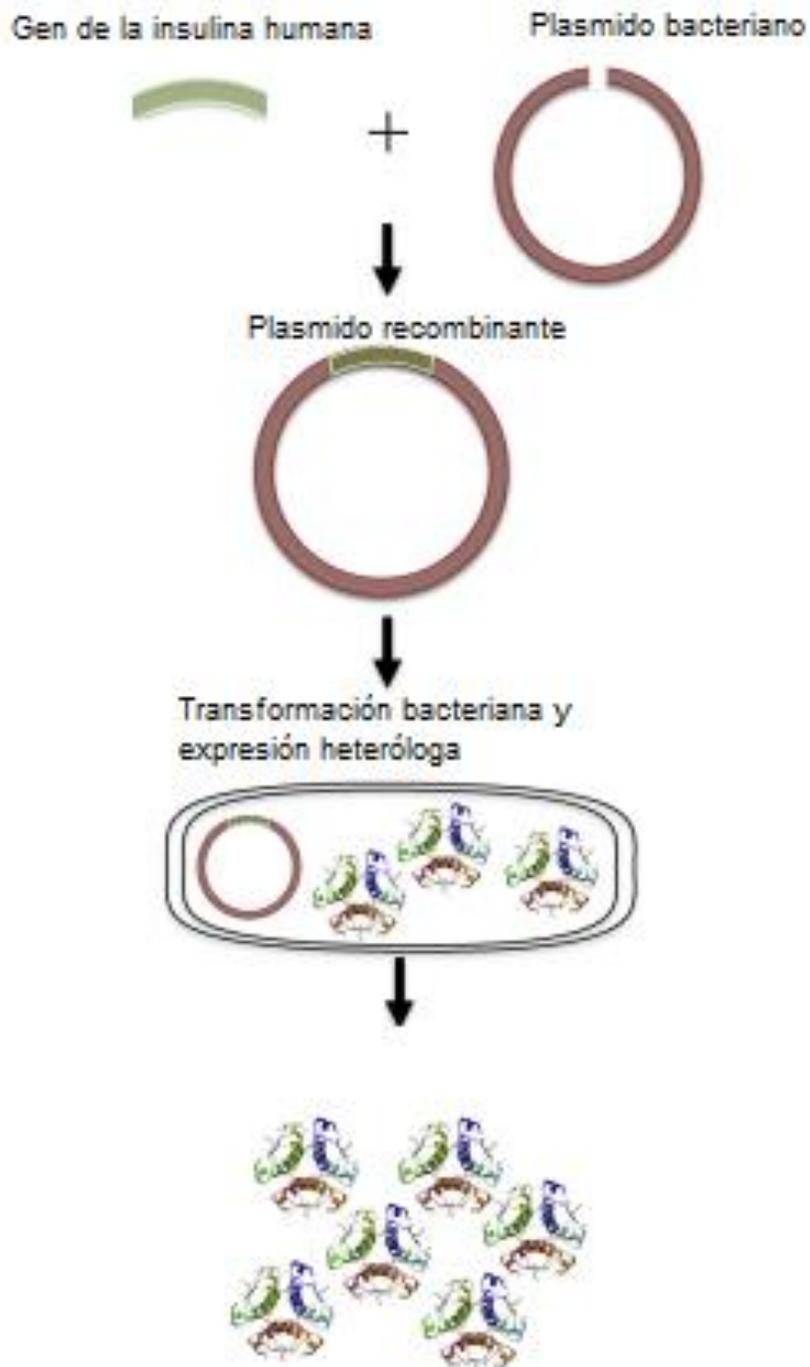


\*Extraído de: Jozala, 2016.

En comparación con el sistema eucariota, el sistema procariota tiene una preparación de solución de extracción más conveniente, mayor rendimiento de proteínas y menor procesamiento posterior.

En la **Figura 12**, se muestra la producción de una proteína terapéutica mediante el uso de plásmidos.

Figura 12: Producción de proteína terapéutica mediante plásmidos para la expresión del gen humano diana.



Extraído de: Jozala, 2016

Con base a la comparación de la **Tabla 5 “Desventajas y ventajas de sistemas de expresión”**, se observa que los principales protagonistas de los sistemas microbianos y levaduras son *E. coli* y *S. cerevisiae*. Las principales ventajas que tienen los sistemas microbianos, es su alta robustez y medios económicos con los que pueden fermentarse hasta escalas de expresión intra y extracelular de 100 000 L hasta 1000 mg L<sup>-1</sup> de caldo de fermentación.<sup>46</sup>

*E. coli* generalmente se expresa intracelularmente en el citoplasma o en el espacio periplásmico, mientras que los otros sistemas pueden expresarse intracelular o extracelularmente. Con la expresión extracelular, la proteína es guiada fuera de la célula hacia la fase acuosa circundante, lo que simplifica significativamente la purificación.<sup>46</sup>

Sin embargo, al expresarse intracelularmente pueden presentar la siguiente desventaja: si la proteína no se secreta al agua circundante, sino que se agrega en la célula en los denominados cuerpos de inclusión, estos pueden estar ubicados en el citoplasma y al romperse para liberar las proteínas, se pueden agregar impurezas como endotoxinas las cuales pueden provocar fiebre cuando se administran por vía parenteral a humanos, para evitar estas agregaciones se tendrá que realizar una purificación con alta robustez en estos sistemas, la cual aumentaría el tiempo y costo de producción.<sup>46</sup>

El uso de sistemas de expresión de levaduras suele producir glicosilaciones diferentes a las humanas, lo que puede conllevar a la producción de proteasas y proteínas inmunogénicas que pueden causar reacciones inmunitarias en humanos. En cuanto a las células de insecto, su uso mayoritario es en la producción de vacunas virales, debido a su limitada capacidad de glicosilación.<sup>10,46</sup>

De acuerdo con lo reportado por la FDA, las células más utilizadas para la producción de proteínas terapéuticas son la bacteria *Escherichia coli* (*E. coli*) y las células de ovario del hámster chino (CHO)<sup>45</sup>

Se informa que alrededor del 70 % de las proteínas terapéuticas recombinantes se producen en sistemas de células CHO, debido a la glicosilación, ensamblaje y plegamiento que generan de forma más precisa las proteínas de este sistema. Sin embargo, requieren medios de cultivo costosos y crecen lentamente en comparación con *E. coli*. Por tanto, para algunas proteínas cuyas actividades están íntimamente ligadas a la modificación postraduccional, como la eritropoyetina, las células CHO se convierten en los mejores huéspedes de producción.<sup>39,72</sup>

**Tabla 5. Ventajas y desventajas de sistemas de expresión.**<sup>37,70</sup>

Sistemas de expresión	Aplicaciones	Ventajas	Desventajas
Bacterias	2 Actúan como sistemas rápidos y sencillos de	15 Variedad de sistemas de expresión y modificación.	20 <i>E. coli</i> contiene pirógenos tóxicos y es posible que las proteínas

	<p>expresión de proteínas.</p> <p>13 En análisis funcionales y estructurales de proteínas.</p> <p>14 Producción de fragmentos de mAbs</p>	<p>16 Fácilmente escalable</p> <p>17 Medios de cultivo baratos, adaptados para aumentar producción.</p> <p>18 Manipulación genética fácil.</p> <p>19 Apta para fermentaciones a alta escala.</p>	<p>expresadas deban someterse a pruebas exhaustivas antes de su uso.</p> <p>21 Sin modificaciones postraduccionales.</p> <p>22 Difícil expresar proteínas complejas.</p> <p>23 Problemas de solubilidad.</p> <p>24 Purificación más compleja</p>
<b>Levaduras</b>	<p>25 Análisis funcionales y estructurales de proteínas.</p> <p>26 Producción de fragmentos de mAbs</p> <p>27 Expresión de proteínas de complejidad mediana.</p> <p>28 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> un organismo atractivo para la expresión y producción de proteínas recombinantes</p>	<p>29 La mayoría de las modificaciones postraduccionales y de plegamiento de proteínas son posibles.</p> <p>30 Tiempo reducido.</p> <p>31 Se puede transportar plásmidos diseñados específicamente.</p> <p>32 Fácilmente escalable.</p> <p>33 Medio cultivo barato.</p> <p>34 Muy alta productividad.</p>	<p>35 Hiperglicosilacion.</p> <p>36 Difícil expresar proteínas complejas</p> <p>37 Algunas proteínas de mamífero son difíciles de secretar.</p> <p>38 Necesidad de sistemas avanzados</p> <p>39 Requiere el uso de péptidos señal de secreción de levadura</p> <p>40 Se requieren precauciones de seguridad mejoradas</p>
<b>Mamíferos</b>	<p>41 Análisis funcionales y estructurales de proteínas.</p> <p>42 Producción de mAbs</p> <p>43 Producción de proteínas complejas</p> <p>44 Producción de virus.</p>	<p>46 Modificaciones postraduccionales complejas</p> <p>47 Proteínas secretadas al medio extracelular</p> <p>48 Variedad de sistemas de expresión y modificación.</p>	<p>51 Reducción de la eficiencia y los niveles de la proteína expresada.</p> <p>52 Técnicas de cultivo complejas.</p> <p>53 Medio de cultivo caro.</p> <p>54 Baja productividad</p>

	45 Líneas celulares como HEK293 y CHO se han desarrollado como sistemas de expresión estables y transitorios eficientes, respectivamente	49 Todo el plegamiento de proteínas y las modificaciones postraduccionales más auténticas son posibles 50 Funciona bien para proteínas secretadas y de membrana.	55 Los rendimientos de proteínas intracelulares son bajos. 56 Difícil de escalar 57 Largo tiempo de expresión
<b>Insecto</b>	58 Análisis funcionales y estructurales de proteínas 59 Producción de proteínas complejas	60 Modificaciones postraduccionales complejas, limitadas. 61 Proteínas secretadas al medio extracelular. 62 Expresión moderadamente rápida 63 Funciona bien para proteínas secretadas, de membrana e intracelulares. 64 La mayoría de las modificaciones postraduccionales y de plegamiento de proteínas son posibles	65 66 Técnicas de cultivo complejas 67 Medico de cultivo caro 68 Baja productividad 69 Difícil de escalar 70 Las estructuras de proteínas de glicanos unidos a N características son diferentes en comparación con las proteínas típicas de mamíferos.

Extraída de: Merck, 2021, Roman 2018.

### 11.5 Banco celular.

Después de que las células sean modificadas genéticamente, estas son reproducidas y almacenadas en forma de crioviales (crioconservación) los cuales son congelados en la fase líquida mediante vapor de nitrógeno líquido a unas temperaturas de -196 y -70°C. Este proceso detiene todas las actividades celulares, protegiendo a la célula y a la información genética, poniendo en pausa la división celular, lo cual es importante para las líneas celulares no continuas que tienen un número de divisiones limitado.

Cuando se requiere la producción en cantidades superiores, las células se transfieren del banco de células maestras (MCB) ultracongeladas a recipientes de acero (fermentador) que contienen medio nutritivo líquido, formulado con diferentes componentes que están optimizados para la fabricación de la proteína deseada. El banco de células es el material de partida más importante del proceso biotecnológico. Por lo tanto, es importante realizar pruebas frecuentes y repetidas del contenido, la identidad y la estabilidad de las células.<sup>46</sup>

### **11.6 Procedimiento de fermentación en la producción de proteínas terapéuticas.**

El proceso se inicia con una alícuota (un vial que contiene material celular) que se sustrae del MCB. Primero se incuba a pequeña escala en un matraz de agitación, siguiendo un aumento de escala de forma secuencial que normalmente difieren en volumen por un factor de 10, para generar el cultivo de inoculación para el fermentador de producción. Los nutrientes para el metabolismo celular se suministran a través del medio y la aireación.

De acuerdo con Willey 2015 los medios de cultivo celular deben cumplir con los siguientes requisitos tecnológicos:<sup>47</sup>

- Criterio de integridad celular: El medio debe soportar las funciones vitales y la reactividad celular de la célula diana.
- Criterio analítico: Los componentes del medio no deben interferir con los métodos analíticos utilizados en el proceso.
- Criterio de interacción: los componentes del medio no deben interactuar con la proteína diana segregada ni con otras proteínas segregadas.
- Criterio preparativo: El medio debe estar compuesto de tal manera que la purificación no sea innecesariamente complicada.

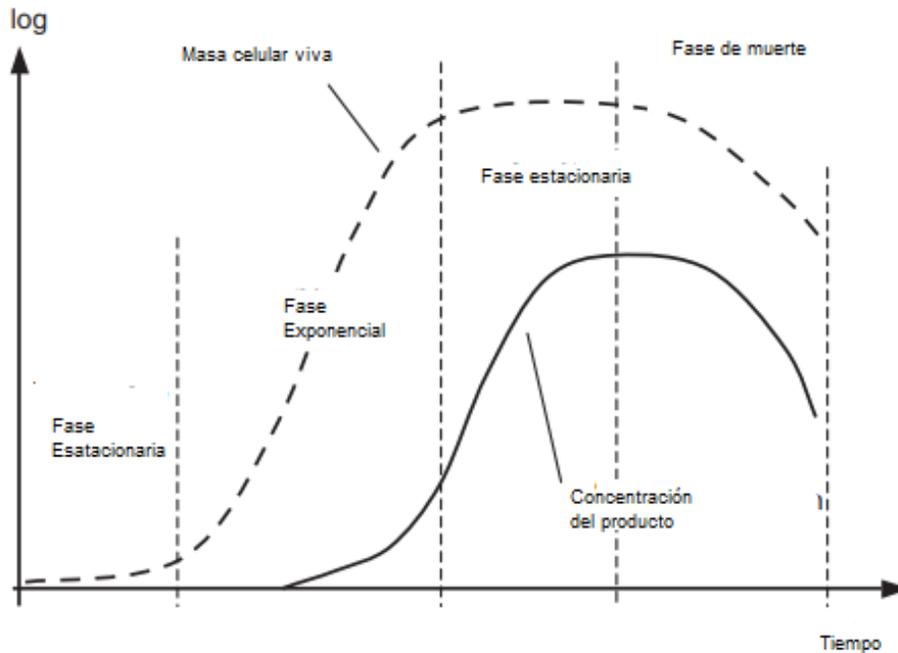
Es importante mencionar que los requisitos de los medios son muy diferentes para cultivos celulares y fermentaciones microbianas. Los microorganismos solo necesitan una fuente de carbono, sales esenciales, aminoácidos, vitaminas y tampones adecuados para estabilizar el valor del pH. Estos medios se pueden obtener de fuentes simples como el extracto de levadura. Los medios de cultivo celular necesitan más factores de crecimiento y hormonas, puesto que se deben parecer a las condiciones in vivo de la célula.<sup>47</sup>

El suministro de oxígeno en las fermentaciones microbianas, se realiza través del aire ambiental filtrado, el valor del pH se ajusta mediante ácidos diluidos o bases. En los cultivos celulares a menudo se suministran con mezclas sintéticas de oxígeno y nitrógeno, además de que se agrega dióxido de carbono para ajustar el pH.<sup>47</sup>

Después de inocular el fermentador con todos sus componentes, las células entran a una etapa de adaptación a las condiciones ambientales en el punto de tiempo cero,

posteriormente entran a una fase de crecimiento exponencial donde aumenta el número de masa celular. (Figura 13)<sup>47,48</sup>

Figura 13: Grafico de crecimiento celular en cultivo de fermentación.



\*Extraído de: Willey, 2015.

La fase exponencial se fusiona con la fase estacionaria, generándose un equilibrio dinámico entre células nuevas y moribundas; es por eso por lo que la masa de células vivas ya no cambia después de este punto. La curva de la fase exponencial aumenta en paralelo con la masa celular y alcanza un pico una vez que está presente un alto número de células con la tasa de expresión deseada. La disminución subsiguiente de la concentración del producto suele ser consecuencia de la mala estabilidad de la proteína. La proteína puede perder su estructura tridimensional o ser atacada por enzimas que rompen las cadenas proteicas (degradación proteolítica). El curso indicado es sólo una de varias opciones. La expresión del producto también puede comenzar después de la fase de latencia por sí misma o ser inducida desde el exterior mediante la adición de agentes activadores de la expresión.<sup>47</sup>

Sin embargo, puede existir una limitación del crecimiento causada por el consumo excesivo de un nutriente específico (sustrato) o la formación de un subproducto tóxico. En un sistema cerrado (cultivo por lotes), el curso termina con la fase de muerte en la que el número de células disminuye y, debido a la limitación de sustratos, no se genera volumen de nuevas células.<sup>47</sup>

## 11.7 Comparación de la fermentación con células de mamíferos y microorganismos.

Las diferencias que presentan las células de mamíferos en comparación con la de la de microorganismos es la sensibilidad que poseen ante las fuerzas de cizallamiento, los nutrientes que estas necesitan para el crecimiento, ya que estos son más pretenciosos, además las células de mamíferos son más susceptibles a las variaciones del entorno, impactando su metabolismo y tasa de crecimiento.

Es importante mencionar que el reactor agitado es el más utilizado por la industria de proteínas terapéuticas para cultivos en suspensión de células mamíferas y de microorganismos. Sin embargo, dentro de estos las células presentan diferencias en las condiciones de cultivo (**Tabla 6**)

**Tabla 6.** Diferencias entre fermentadores en suspensión para cultivo celular y fermentación microbiana.<sup>47,42,43,73</sup>

	<b>Fermentación Microbiana</b>	<b>Cultivo celular</b>
<b>Características del sistema.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento rápido, tiempo de duplicación de 0.5 a 4 h</li> <li>• Alta demanda de oxígeno</li> <li>• Duración 18–80 horas</li> <li>• Las células son relativamente robustas en cuanto al estrés mecánico y térmico.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Crecimiento lento, tiempo de duplicación de 20 a 30 h</li> <li>• baja demanda de oxígeno</li> <li>• Duración 30–40 días</li> <li>• Las células son sensibles al estrés mecánico y térmico.</li> </ul>
<b>Dimensión del recipiente calefacción/refrigeración</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto espacio de cabeza para acomodar la formación de espuma causada por la aireación intensiva.</li> <li>• Camisa calefactora en el perímetro de la vasija con alta capacidad frigorífica.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Espacio de cabeza pequeño suficiente.</li> </ul>
<b>Agitador</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta energía deseada para I) dispersar burbujas (alta demanda de oxígeno) y II) permitir la transferencia de calor, lo que significa una geometría de agitador especial, eje de transmisión grueso, transmisión fuerte,</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja energía deseada para evitar la interrupción celular.</li> </ul>

	interruptor de vórtice en el recipiente.	
<b>Aireación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Alta demanda de oxígeno debido al rápido crecimiento.</li> <li>Fuerte inserción de oxígeno, las burbujas grandes se pueden dispersar con el agitador.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Baja demanda de oxígeno debido al crecimiento lento.</li> <li>Deben evitarse las fuerzas de cizallamiento provocadas por el ascenso y el colapso de las burbujas grandes.</li> <li>El equipo de aireación genera pequeñas burbujas (placa de metal sinterizado).</li> </ul>
<b>Sistema de aire residual</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diseñado para 1 o 2 volúmenes de vasos por minuto.</li> <li>Se necesita un separador de gotas/condensador debido al fuerte movimiento del fluido.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diseñado para volúmenes de recipiente de 0,1 por minuto</li> <li>Sin separador de gotas.</li> </ul>
<b>Instrumentación</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Montaje individual generalmente suficiente debido a un menor riesgo</li> <li>Montaje único generalmente suficiente debido al menor riesgo.</li> <li>Instrumentos diseñados para mayores caudales.</li> <li>Ajuste del valor de pH a menudo mediante dosificación de ácido/base.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Montaje redundante para reducir el riesgo causado por un largo tiempo de fermentación</li> <li>Sin control de espuma.</li> <li>Ajuste del valor de pH a menudo mediante la dosificación de dióxido de carbono.</li> </ul>
<b>limpieza automática</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Sistema de control altamente variable para adaptarse a diferentes condiciones</li> <li>Muchas bolas de rociado debido a la complicada geometría del agitador y los accesorios internos (interruptor de flujo).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Una sola bola de pulverización suele ser suficiente.</li> </ul>

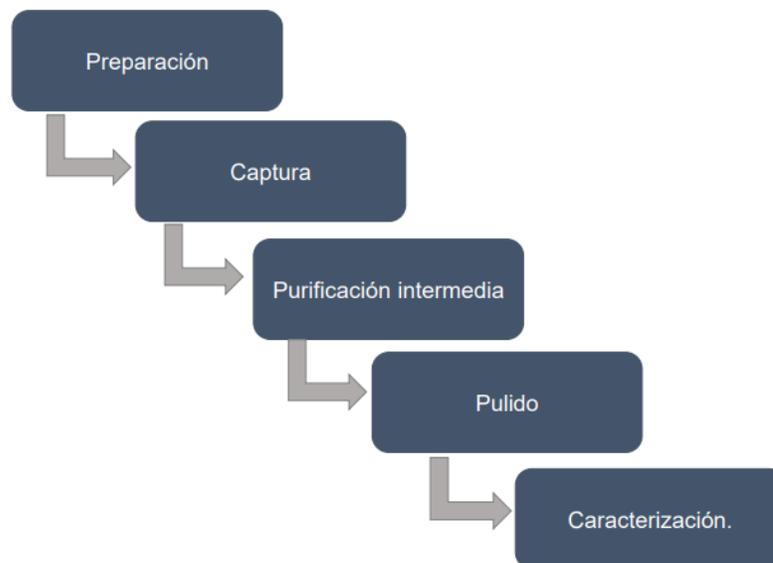
## 12. PROCESOS DE SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS DE USO FARMACÉUTICO

### 12.1 Purificación.

Consiste en una serie de procesos que tienen como objetivo la separación y purificación de una sola proteína o complejo, puesto que es fundamental para la caracterización de la función, estructura e interacciones de la proteína de interés. Cada paso de purificación es capaz de eliminar una o más clases de impurezas, mientras que los pasos de separación aprovechan las diferencias en el tamaño de las proteínas, las propiedades fisicoquímicas, la afinidad de unión y la actividad biológica.<sup>51,53</sup>

Para realizar este proceso se es necesario seguir un protocolo de purificación, este dependerá de la proteína que se requiere purificar y de la célula utilizada para la expresión de la proteína recombinante. Para muchos investigadores la elección inicial suele ser *Escherichia coli*, ya que es el sistema preferido para las investigaciones de laboratorio y el desarrollo inicial en actividades comerciales, además de ser un punto de referencia para la comparación entre las otras plataformas de expresión. A pesar de que las células de mamíferos cultivadas ofrecen una mejor opción para producir proteínas de mamíferos correctamente plegadas y funcionales con modificaciones postraduccionales apropiadas, los bajos niveles de expresión de proteínas recombinantes en estas células presentan un desafío para su purificación. Para lograr un rendimiento y una pureza satisfactorios depende de la captura altamente selectiva y eficiente de estas proteínas de los lisados celulares crudos, es por ello el empleo de protocolos específicos.<sup>29,51,53</sup> Sin embargo, cualquier protocolo debe seguir el esquema general que se observa en la **Figura 14**.

**Figura 14. Esquema general en el proceso de purificación.**



\*Extraída de: Corchero, 2018

### 12.1.2 Preparación de la muestra.

El proceso comienza con la preparación de la muestra, que consiste en la recolección de células, la ruptura celular (en caso de que nuestra proteína objetivo sea intracelular) y la clarificación. Durante este proceso existen varias consideraciones que influirán en su desarrollo, es importante mencionar que todos los pasos de preparación son importantes. La recolección de células implica la separación entre la célula y sobrenadante (caldo de clarificación). Para ello, las principales operaciones empleadas son la centrifugación, la filtración, la sedimentación y la flotación. En la industria, comúnmente se utiliza la técnica de centrifugación, donde previamente se requiere de la preparación de un extracto mediante amortiguadores o soluciones con sales específicas, tomando en cuenta las propiedades físico-bioquímicas, la función de la proteína de interés y la meta de la investigación <sup>29</sup>.

Posterior a este proceso, se realiza la ruptura celular mediante diferentes metodologías, donde la selección dependerá de la fragilidad de la proteína de interés, las más utilizadas son los métodos químicos (como los métodos enzimáticos o los detergentes), los métodos mecánicos (como la sonicación, homogenización o la prensa francesa).

Todos los métodos tienen ventajas y desventajas, y nunca son completamente efectivos (**Tabla 7**), debido a que no todas las células oponen la misma resistencia a la lisis, es por lo que se tiende a utilizar combinaciones de métodos, como, por ejemplo, sonicación seguida de un tratamiento con detergente. El rompimiento de las membranas celulares permite la interacción de la proteína de interés con proteínas de la misma célula que tienen la capacidad de romper los enlaces peptídicos (enzimas proteasas). Por este motivo es fundamental añadir inhibidores de proteasas en el amortiguador, para así mantener la integridad de las proteínas en la **Tabla 8**, se muestran los principales aditivos estabilizadores que se utilizan en esta etapa. <sup>29,52</sup>

El resultado de este proceso es la obtención de una solución con una mezcla de especies químicas (biomoléculas, metabolitos, etc.), fragmentos de membranas celulares, y en algunos casos de pared celular. El paso siguiente es clarificar el extracto, para posteriormente realizar la purificación cromatográfica. Si la proteína de interés es soluble en el amortiguador, los restos celulares se separan mediante la centrifugación seguida de filtración. Los procesos de clarificación son pasos críticos en la producción de proteínas terapéuticas ya que afectan el rendimiento, la consistencia de la proteína y la reproducibilidad

Mediante la centrifugación, las proteínas se suspenden en el medio líquido y se colocan en un tubo de la centrifuga, luego se coloca en un rotor y se hace girar a una velocidad determinada por la aceleración angular aplicada a la muestra, normalmente medida en comparación con g. <sup>42,50</sup>

El fundamento de este proceso radica en la sedimentación de partículas cuya densidad es mayor que la del solvente, generándose un sedimento donde las partículas livianas

flotan hacia la parte superior, esto es debido a la existencia de un equilibrio con la fuerza de centrífuga (**Figura 15**).<sup>52</sup>

Es importante mencionar que los factores que influyen en una centrifugación son: Densidad de muestra y solución, temperatura/ viscosidad, distancia de desplazamiento de partículas y la velocidad de rotación. Después de este paso, se realiza un precipitado con sal de sulfato de amonio, este proceso se le conoce como diálisis, las cual separa las moléculas disueltas por su tamaño y a través de la filtración la proteína de interés puede separarse<sup>29,52</sup>

**Tabla 7: Métodos físicos y químicos implementados en la ruptura celular.**

	<b>Método</b>	<b>Fundamento</b>	<b>Tipo de muestra</b>	<b>Comentarios</b>
<b>Métodos Físicos</b>	<b>Sonicación</b>	En la sonicación se aplica energía sonora (ultrasonido) mediante una sonda vibratoria sumergida en el líquido donde se encuentra la suspensión celular. Este tipo de energía mecánica agita las partículas en líquido generando la ruptura de las membranas celulares y la liberación del contenido celular medio.	Células eucariontes y procariontes en suspensión.	Es ideal para obtener proteínas citoplasmáticas. Es importante mantener la muestra en el hielo para evitar que el calor generado durante el procedimiento desnaturalice las proteínas de interés.
	<b>Homogenización</b>	La homogenización puede ser realizada empleando distintos instrumentos como una licuadora o un politrón que emplean navajas, perlas de vidrio y un agitador, prensa francesa, homogeneizador de vidrio tipo Potter-Elvehjem. En todos los casos se busca triturar el tejido y/o someterlo a presiones altas con la finalidad de romper las células mecánicamente.	Tejidos de plantas, hongos o animales.	El proceso es muy sensible y se debe tener cuidado para evitar dañar los componentes subcelulares que se está tratando de aislar.
	<b>Ciclos de congelado y descongelado</b>	Involucra el congelamiento de las células en un baño de hielo seco/etanol o en un congelador siguiendo el descongelamiento del material a temperatura ambiente o a 37°C. La	Extractos celulares acuosos.	Se requieren de múltiples ciclos para que la lisis se lleve a cabo de manera eficiente.

		formación de los cristales de hielo genera la ruptura de la membrana celular haciéndola más permeable y potenciando la liberación de su contenido.		
<b>Métodos Químicos</b>	<b>Choque osmótico</b>	En este método las células son expuestas a una solución hipnótica lo que genera que las células se hinchen y se rompan. Se puede aplicar una agitación mecánica suave para favorecer la lisis.	Eritrocitos.	Es uno de los métodos más suaves para generar la lisis celular junto con los ciclos de congelado y descongelados.
	<b>Detergentes</b>	Los detergentes rompen la barrera lipídica de las membranas solubilizando las proteínas e interrumpiendo la interacción lipido-lipido, lipido-proteína y proteína. Los detergentes, al igual que los lípidos, se asocian entre ellos y se unen a superficies hidrofóbicas. Se componen de una cabeza polar hidrofílica y una cola no polar hidrofóbica.	Células mamíferas y bacterianas en suspensión.	Los detergentes son iónicos y bipolares, como los de la serie Tritón-X, son más suaves y menos desnaturizantes, por lo cual, son comúnmente empleados para estos fines.
	<b>Enzimáticos</b>	Algunas células poseen, membrana plasmática y además una pared celular rígida que confiere a las células forma, protección y rigidez. Estas paredes pueden ser digeridas con enzimas específicas.	Levaduras, plantas y bacterias en suspensión.	Para plantas pueden ser utilizadas la celulasa, para hongos quitinasas y en bacterias lisozima

\*Extraída de: Ramírez 2021

**Tabla 8:** Principales aditivos estabilizadores.<sup>44</sup>

Sustancia	Concentración	Descripción
EDTA	10 mm	Reduce el daño por oxidación, quela iones metálicos.
Sacarosa o glucosa	25 mm	Estabiliza las membranas lisosomales, reduce la liberación de proteasas.
Detergentes	0.001%-1%	Reduce la perdida debida a la asociación con componentes celulares o la auto agregación. Solubilización de proteínas pocos solubles.
Glicerol	5%-10%	Se utiliza para la estabilización y se puede utilizar hasta un 50% si es necesario.
Nucleasas (DNasa y RNasa)	1–20 µg/ml cada uno (o Benzonase™ según las recomendaciones del fabricante)	Degradación de ácidos nucleicos, reduce la viscosidad de la solución de muestra

Tomada de: Handbook, 2015.

Sin embargo, el uso de la filtración sucesiva ha podido eliminar residuos de diferentes tamaños, se puede reducir los rendimientos de la filtración porque cada paso puede disminuir una parte de la muestra. Prevenir dicho consumo es particularmente importante con cultivos de células mamíferas, que pueden ser costosos y difíciles de producir. Mediante el uso de los filtros de profundidad, los filtros de profundidad Clarisolve™ de una sola etapa, se puede clarificar flujos de fluidos con alto contenido de sólidos que tienen una distribución de tamaño de partícula de aproximadamente 0.5–200 micrones, evitando riesgos de pérdida de muestra.<sup>5253</sup>

**Figura 15. Centrifugación de proteínas.** <sup>53</sup>



\*Tomado de: Scientific, 2022.

### **12.1.3 Captura.**

Esta fase tiene como objetivo el aislamiento de la concentración de la proteína de interés, una correcta estabilización del producto. Las proteínas se transfieren a un medio que conservará la potencia/actividad y con una temperatura de -4°C. La búsqueda de la concentración óptima es fundamental, ya que la columna de cromatografía solo puede soportar flujos y presiones limitadas. Así, una disminución en el volumen de trabajo significa una disminución en el tiempo de procesamiento. Puesto que el foco del proceso está en la capacidad y la velocidad de realizarlo, se puede ser recomendable comprometer la resolución para maximizar la capacidad y/o la velocidad de separación. Sin embargo, es importante mantener en cuenta las siguientes consideraciones.<sup>53,54</sup>

1. Las proteínas presentes originalmente en la muestra deben mantenerse como sea posible.
2. Todos los componentes adicionales (otras proteínas, sales y tampones, etc.) deben eliminarse en la medida de lo posible.
3. Deben conservarse las PTM de las proteínas de la muestra;
4. La composición de la muestra debe ser compatible con todos los procedimientos de análisis posteriores.

En esta fase generalmente implica el uso de cromatografía de afinidad (AF), cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC) y cromatografía de intercambio iónico (IEX). La cromatografía de intercambio iónico se convierte en el segundo método común en el paso de captura, mientras que la cromatografía de afinidad es la más favorable.<sup>60</sup>

### **12.1.3 Purificación intermedia.**

Este proceso funciona como una purificación inicial simple y rápida que se reintegra posteriormente. La cromatografía de afinidad es, actualmente, el método más común, para simplificar este proceso, las etiquetas de purificación por afinidad se fusionan con la proteína de interés, esta etiqueta puede ser colocada en el extremo amino o carboxilo, la posición se determina en función a la estrategia de sistema de expresión y a los objetivos de la investigación. Cabe mencionar que las etiquetas de afinidad más utilizadas son la etiqueta His, el glutatión S-transferasa (GST) y la proteína de unión a maltosa (MBP). Estas permiten una mejor optimización en la separación de la proteína con el resto de los contaminantes que aun la acompañan después de la clarificación.<sup>29,60</sup>

### **12.1.4 Separación (pulido).**

El proceso consiste en eliminar la mayor cantidad posible de impurezas que se generan durante la separación y las cuales no son deseadas en el producto final. Este se solapa con la filtración intermedia, ya que se recurre a la realización de más cromatografías.<sup>52,70</sup>

Normalmente durante el proceso de purificación se conlleva la pérdida de una fracción del producto, las cuales pueden ser significativas. El número de pasos de separación debe mantenerse lo más bajo posible y el rendimiento de los pasos lo más alto posible. De hecho, Willey y colaboradores mencionan que el rendimiento escalonado compite con la

pureza del producto. Por ejemplo, en las separaciones cromatográficas el producto y la impureza se separan, pero en la mayoría de los casos, ambos se superponen, lo que significa que solo se puede lograr un alto rendimiento aceptando las impurezas que están presentes en la parte superpuesta. Es importante mencionar que los rendimientos globales que maneja la industria oscilan entre 30% y 70%, sin embargo, los requerimientos parciales que se realiza en cada etapa de purificación deben situarse entre el 90- 95%. El rendimiento total del proceso, como en el de cada etapa, se calcula según la siguiente expresión<sup>52,70</sup> (**Figura 16**).

**Figura 16: Expresión utilizada para determinar el rendimiento del proceso.**

$$\text{Rendimiento del Proceso en \%} = \frac{\text{Cantidad de producto en la salida}}{\text{Cantidad de producto en la salida}} \times 100.$$

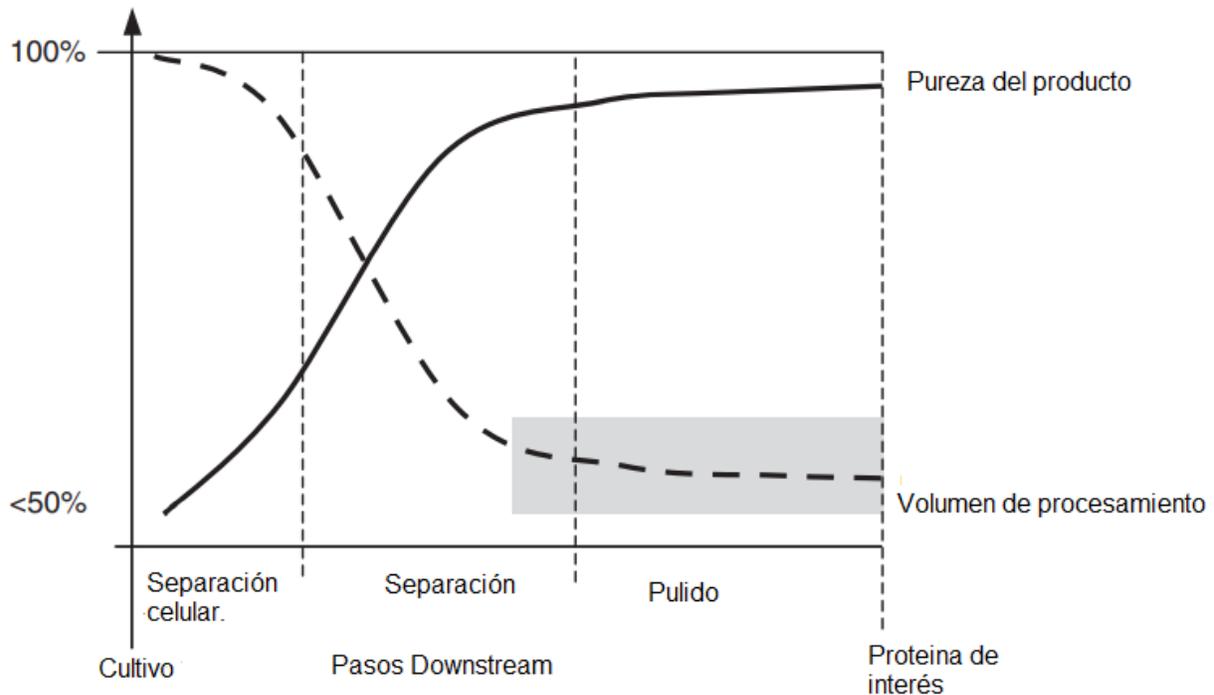
En la **Figura 17** se muestra la pureza y volumen del producto desde el cultivo hasta el producto final (proteína de interés). El área sombreada indica el cambio del volumen que puede ocurrir durante el pulido.<sup>72</sup>

### 12.1.5 Caracterización de proteínas

En esta etapa se pueden identificar los rendimientos relativos de varias líneas o cepas celulares, las proteínas candidatas y/o con propiedades deseables (p.ej., alta actividad enzimática in vitro, solubilidad a pH fisiológico), se puede examinar las PTM, así como el descarte de moléculas que presenten riesgo en la inmunogenicidad potencial y problemas que afecten en la vida media (p. ej., moléculas fácilmente oxidadas o desamidadas.<sup>53</sup> Este proceso es fundamental para la determinación de la seguridad y eficacia de las proteínas terapéuticas, así también se evita el riesgo de desperdiciar recursos en material proteico de calidad inadecuada, y además proporciona un medio para garantizar que diferentes lotes de la misma proteína tengan propiedades similares. Esto significa que la caracterización de una proteína en los procesos de producción siempre tiene tres aspectos:<sup>46</sup>:

- Identificación del componente proteico mayoritario.
- Identificación de los componentes minoritarios.
- Cuantificación de los componentes minoritarios (caracterización de impurezas relacionadas tanto con el proceso como en el producto)

**Figura 17: Pureza y volumen durante los procesos de purificación**



\*Extraída de: Willey y col, 2015

### **13. TÉCNICAS ANALÍTICAS PARA LA SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS TERAPÉUTICAS.**

Durante el proceso se ocupan diferentes técnicas analíticas, principalmente se recurre al uso de cromatografía y electroforesis seguida de espectrometría de masas para la separación y caracterización de la proteína de interés. Las técnicas convencionales para la purificación de proteínas se basan en la cromatografía, como la cromatografía de intercambio iónico (IEC), la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y la cromatografía de afinidad, para el análisis de proteínas selectivas, se puede utilizar el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y la transferencia Western. Estas técnicas pueden estar restringidas al análisis de unas pocas proteínas individuales, pero también incapaces de definir el nivel de expresión de las proteínas. Las técnicas de electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), electroforesis en gel bidimensional (2-DE) y electroforesis en gel diferencial bidimensional (2D-DIGE) se utilizan para la separación de muestras de proteínas complejas.<sup>47</sup>

### 13.1 Breve historia de la Cromatografía:

Las técnicas implementadas en la separación y en la purificación se han desarrollado en paralelo con el descubrimiento y el estudio posterior de las proteínas. En la **Tabla 9**, se puede observar la evolución de estas técnicas.

Hasta principios del siglo XX, las únicas tecnologías de separación disponibles eran métodos como la filtración, la precipitación y la cristalización. En 1840 Felix Hoppe-Seyler preparó los primeros cristales de hemoglobina. Hofmeister, en 1889 utilizó la cristalización repetida para purificar ovoalbúmina. Durante la Segunda Guerra Mundial, se desarrolló el fraccionamiento de plasma de Cohn para la purificación de albúmina y otras proteínas plasmáticas. Este método de precipitación y otros, por ejemplo, la precipitación con sulfato de amonio, todavía se utilizan en la actualidad.<sup>47</sup>

En 1903, el botánico Mikhail Tswett describió su trabajo sobre la separación de pigmentos vegetales en una columna de carbonato de calcio. Más tarde, en 1906, introdujo el término cromatografía y en 1910, cromatografió un extracto de yema de huevo en una columna de inulina. Así durante las siguientes décadas, se fueron desarrollando otros métodos importantes de separación de proteínas como: la electroforesis y la cromatografía de afinidad (AC) y la cromatografía de intercambio iónico (IEX). En la **Tabla 9**, se pueden observar que a través de los años han ido evolucionando las técnicas para la separación y caracterización de proteínas.<sup>47,51</sup>

Es importante mencionar que el término “cromatografía” significa en griego “escritura de color”, o “registro de color”. En 1952, los británicos Archer J. P. Martin y Richard L. M. Synge recibieron el Premio Nobel de Química por la descripción, aplicaciones y variaciones de la cromatografía. Estos científicos, a partir de 1941, empezaron a desarrollar distintas formas de cromatografía, tanto al variar la fase móvil (líquida, de reparto, de gases) como al cambiar la fase inmóvil (sílice y distintos silicatos, papel, capa fina) o al utilizar diferentes composiciones de los disolventes de la fase móvil.<sup>42,51</sup>

**Tabla 9: Evolución de las técnicas de separación y caracterización<sup>42</sup>.**

Método	Año	Descubridor
Precipitación	1789	Fourcroy
Cristalización de ovulina	1889	Hofmeister
Cromatografía	1903	Tswett
Ultra centrifugación	1924	Svedberg
Electroforesis de límite móvil	1937	Tiselius
Cromatografía de intercambio de iones	1940s	The Manhattan Project
Partición bifásica	1955	Albertsson

Cromatografía de exclusión molecular (filtración en gel) †	1955,1959	Lindqvist & Storgårds, Porath & Flodin, Ingelman.
Cromatografía de hidroxapatita	1956	Tiselius, et al.
Sephadex	1959	Pharmacia (GE Healthcare)
Electroforesis en gel de poliacrilamida	1959	Raymond y Weintraub
Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)§	1941,1966	Martin ad Synge
Sefarosa	1967	Pharmacia( Healthcare)
SDS-PAGE	1967	Shapiro, et al.
Química de acoplamiento de afinidad-ligando para cromatografía de afinidad	1967	Axén, et al.
Cromatografía de afinidad.	1968	Cuatrecasas et al.
Cromatografía de fase inversa	1970s	Kirkland; Molnar & Horvath
Adsorbente de Proteína A para la purificación de IgG	1972	Hjelm, et al; Kronvall
Cromatografía de interacción hidrofóbica	1973	Porath, Hjertén
Cromatografía bidimensional	1975	O'Farrel
Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados	1975	Porath, Hjertén
Cromatoenfoco	1977	Sluyterman & Wijdenes
Electroforesis capilar	1981	Jorgenson y Luckacs
Cromatografía líquida rápida de proteínas	1982	Pharmacia Biotech (GE Healthcare)
Marcado por afinidad de histidina	1988	Smith et al; Houchuli et al.
Diseño AKTA	1996	Pharmacia Biotech (GE Healthcare)
Tomada de: Handbook, 2015.		

### 13.1.2 Procesos Cromatográficos

Los procesos de separación bajo el término “cromatografía” se basan principalmente en dos efectos fisicoquímicos diferentes. Uno de ellos es un mecanismo de adsorción-desorción en el que la molécula se une o no a una superficie sólida (cromatografía de afinidad); el otro efecto se basa en las diferentes velocidades de migración de las

moléculas, debido a su afinidad con las superficies sólidas, cuando se transportan en un líquido que fluye, este último se denota como flujo continuo.

Es por lo que esta técnica consta de dos fases: estacionaria y móvil. Las propiedades de cada molécula determinarán su tiempo de permanencia en la fase estacionaria (tiempo de retención). La separación será según las diferencias entre las propiedades de la proteína a purificar (la proteína objetivo) y las propiedades de otras sustancias en la muestra.<sup>42</sup>

La fase estacionaria (polímero) es empaquetada dentro de un cilindro, y en la parte superior se coloca la muestra. Las moléculas se desplazan a través de la fase estacionaria mediante el bombeo de la fase móvil (amortiguador) con un flujo a velocidad controlada. Para detectar las proteínas que salen de la columna, la fase móvil pasará por un detector UV (280 nm), generando una señal hacia un software, que finalmente se representará como una gráfica (cromatograma), donde los picos o montañas representan la presencia de proteínas, y los valles la ausencia de éstas.

Es decir, cuando una muestra es introducida y transportada por el eluyente a lo largo de la columna, algunos de sus componentes tendrán interacciones más poderosas con la fase estacionaria que otros, generando perfiles de concentración que filtrarán la columna cromatográfica a diferentes velocidades. Las especies menos retenidas eluirán antes de la columna que los más retenidos, permitiendo eventualmente la recolección de los productos de interés con un alto grado de pureza.<sup>46</sup>

Basado en la interacción entre la fase estacionaria y las características de la proteína de interés, las técnicas cromatográficas se pueden resumir en cinco clases:<sup>52</sup>

- a. Afinidad,
- b. Intercambio iónico,
- c. Interacciones hidrofóbicas,
- d. Exclusión por tamaño
- e. Cromatografía de modo mixto

De acuerdo con diferentes autores la cromatografía por afinidad es una de las técnicas más utilizadas en la industria farmacéutica, ya que permite obtener buenos resultados y un alto nivel de pureza con un solo paso de purificación, esto debido a que utiliza como etiqueta una estructura que se encuentra exclusivamente en la proteína terapéutica. Sin embargo, suelen haber proteínas que no aceptan cambios, aunque estos sean mínimos en su secuencia (p.ej. la incorporación de una etiqueta), ya que pierden rápidamente su actividad biológica. En este caso, se recurre a otros métodos menos específicos, como la cromatografía de intercambio iónico o la filtración en gel, etc. (**Tabla 10**), la elección dependerá de las propiedades fisicoquímicas de la proteína objetivo. Aunque el uso de estas puede llegar a tener menor especificidad que la de cromatografía por afinidad, se pueden combinar varios métodos y crear un protocolo de purificación en varios pasos, (captura, purificación intermedia y pulido).<sup>46,52,72</sup>

**Tabla 10: Propiedades más usadas en la elección del tipo de cromatografía.**

<b>Propiedad de la proteína</b>	<b>Método</b>	<b>Consideraciones.</b>
Reconocimiento de ligando específico (de específico o no específico)	Cromatografía de afinidad (AC)	Se puede usar para la purificación de un solo paso debido a su alta selectividad, se puede usar en la captura, purificación y pulido.
Unión de iones metálicos	Cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados (IMAC)	Se utiliza Imidazol como eluyente, las condiciones de elución muy corrosivas, se debe tratar de reciclar para minimizar contaminación. La separación se puede realizar dentro de un amplio rango de pH, fuerza iónica y temperatura, y el medio acepta una variedad de aditivos.
Carga	Cromatografía de intercambio iónico (IEX)	Su uso puede ser en cualquier paso del procedimiento de purificación. Puede unir la molécula objetivo, se puede usar para unir impurezas, lo que permite que la proteína objetivo pase por la columna. Se puede repetir a diferentes valores de pH para separar varias proteínas que tienen propiedades de carga diferentes.
Tamaño	Filtración en Gel (GF)	Método poderoso para la purificación de proteínas que han pasado uno o varios pasos de purificación iniciales, puede eliminar las impurezas restantes; también oligómeros o agregados de la proteína objetivo.
Hidrofobicidad	Cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) Cromatografía de fase inversa (RPC)	° HIC, es un método adecuado para la captura o pasos intermedios en un protocolo de purificación. Es un excelente método de purificación después de la precipitación con sulfato de amonio o la elución con alto contenido de sal durante IEX. ° RPC se usa para análisis de verificación de pureza cuando la actividad y la estructura terciaria no son de un enfoque. Las proteínas tienden a desnaturalizarse y unirse fuertemente al medio RPC y pueden ser muy difíciles de eluir. Sin embargo, en la fase de pulido, cuando se han eliminado la mayoría de las impurezas de proteínas, el RPC es excelente, en particular para las proteínas diana pequeñas que se desnaturalizan con menor frecuencia con los solventes orgánicos.
Tamaño, hidrofobicidad, especificidad de unión y de carga	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	°Posee la capacidad de separación con alta resolución debido a la amplia gama de eluyentes disponibles que se pueden ajustar con precisión la selectividad de separación. posible riesgo de volatilización de muestra.

		<p>°El equipo necesita ser capaz de trabajar a alta contrapresión. La eficiencia de estas columnas no debe perderse en el resto del equipo.</p> <p>°Los instrumentos de HPLC tienen un coste elevado.</p>
Punto Isoeléctrico	Cromatoenfoco	La capacidad del método es baja, y lo ideal es que se utilice para muestras parcialmente puras. Se genera un gradiente de pH en la columna a medida que interactúan el tampón y el medio de cromatografía.
*Modificado de: Handbook, 2015; Wiley, 2015		

No obstante, es considerable mencionar que la cromatografía puede ser preparativa y analítica, en este trabajo se mencionaran ambos terminos:

- **La cromatografía preparativa** consiste en la separación de los componentes de una mezcla para su posterior procesamiento, se puede considerar un método de purificación.
- **La cromatografía analítica** permite cuantificar y determina la presencia y concentración de analito en la muestra.

Es importante mencionar que, para controlar la separación o resolución ( $R_s$ ) de los componentes en la muestra, la cromatografía se basa en tres factores:

- Retención o tener valores  $k$  (factor de retención) mayores a uno.
- Selectividad ( $\alpha$ ) o migración diferencial de analitos en la columna.
- Poder de separación o eficiencia de la columna ( $N$ ), la capacidad de la columna para separar muchos componentes en el cromatograma.

Para llevar a cabo el análisis isocrático en el que la composición de la fase móvil permanece constante, la relación de  $R_s$  con  $k$ ,  $\alpha$  y  $N$  se describe mediante la ecuación de resolución que se muestra en la **Figura 18**<sup>73</sup>:

**Figura 18:** Ecuación de resolución utilizada en cromatografía.

$$R_s = \frac{k}{k+1} \frac{\alpha-1}{\alpha} \frac{\sqrt{N}}{4}$$

\*Extraída de: Willey, 2011.

### 13.1.2 Componentes generales de la cromatografía:

- **Fase Estacionaria.**

Está compuesta por una fase sólida que comúnmente es un gel, el cual es esencial para la separación, determina el comportamiento de separación y las condiciones hidrodinámicas. Los geles de cromatografía consisten en partículas porosas con un tamaño de 10 a 300  $\mu\text{m}$ ; una partícula que se compone de una estructura (matriz) la cual se puede construir a partir de gel de sílice, componentes de dextrano de agarosa, celulosa o polímeros, también consiste en ligandos o iones adjuntos específicos donde la proteína de interés se une.

La elección del gel y de la matriz, va de acuerdo con la cromatografía que se vaya a implementar para el proceso de separación. En la **Tabla 11, y Tabla 12** se puede observar los principales geles y matrices utilizados en cromatografía.<sup>73</sup>

Para la correcta selección de una columna analítica deberán considerarse los siguientes aspectos<sup>52</sup>

1. **Selección del tamaño de poro:** Dependerá de la masa molar del analito.
2. **Selección del empaquetado químico:** Dependerá del método cromatográfico.
3. **Selección del tamaño de partícula:** Dependerá del método cromatográfico, sin embargo, el tamaño de partícula estándar es de 5 $\mu\text{m}$ , aunque también pueden utilizarse tamaños entre 1.3 $\mu\text{m}$  y 3 $\mu\text{m}$ .
4. **Diámetro interno de la columna:** Define cuánto material (masa o volumen) se puede inyectar en la columna. Cuanto menor sea el diámetro, menor será la cantidad de material que se pueda inyectar manteniendo una aceptable resolución. El diámetro interno más implementado es el de 4.6 mm.
5. **Longitud de la columna:** Las columnas más utilizadas presentan una longitud de 100mm, 150mm o 250mm juntamente con un tamaño de partícula de 5 $\mu\text{m}$ . Si se desea acortar el tiempo de cromatografía, se deben emplear columnas con una longitud menor (30mm, 50mm o 75mm) pero con un tamaño de partícula  $\leq 3,5\mu\text{m}$

**Tabla 11:** Ejemplos de materiales para la matriz y sus marcas.

Marca	Material	Aplicación
<b>Lichroprep®</b>	Silice gel	HPLC
<b>Sepharose®</b>	Agarosa dextrano	IEX, HIC, afinidad
<b>Sephadex®</b>	A base de dextrano	SEC, IEX, afinidad
<b>Cellufine®</b>	Celulosa	IEX, SEC, HIC, afinidad
<b>Polystyrene® Amberlite®</b>	Poliestireno, - o co/ mono polímero	HIC, IEX
<b>Fractogel®, Toyopearl®</b>	Metacrilato – copolímero	IEX, afinidad, SEC

\*Tomada de: Wiley, 2011

**Tabla 12:** Geles utilizados en cromatografía.

Tipo de cromatografía	Material	Observaciones
IEX	C, CM S, SP A, DEAE, QMA Q, QA, QAE, TMAE,	Intercambiador catiónico débil
HIC	Fenil, butil, C4, C8, C18	Intercambiador catiónico fuerte
Afinidad	Proteína A, Heparina, Quelato, arginina.	Intercambiador aniónico débil

Tomada de: Wiley, 2011.

- **Fase Móvil**

Es un fluido que penetra a través o a lo largo de la fase estacionaria, en una dirección determinada. Puede ser un líquido, un gas o un fluido supercrítico. Para la selección del disolvente a emplear en esta fase es necesario del conocimiento de la polaridad del analito, y la solubilidad con el analito. Además, el analito no debe reaccionar con ninguna de las sustancias que componen el disolvente.<sup>52</sup>

Un adecuado punto de partida para optimizar la separación cromatográfica es el empleo de una mezcla de agua y un disolvente orgánico polar (metanol o acetonitrilo), con una mayor proporción de agua (p. ej.: cercano al 100%), y observar cómo varían los tiempos de elución y la resolución de los analitos al disminuir la proporción acuosa y aumentar la proporción del disolvente orgánico. Así se podrá mejorar la resolución cromatográfica y también podrá evitarse que los picos cromatográficos de dos componentes de una muestra se solapen<sup>54</sup>

En la **Tabla 13**, se pueden observar los principales disolventes implementados en diferentes métodos cromatográficos, mientras que en la **Tabla 14** se pueden observar las generalidades y consideraciones que tiene cada una de las cromatografías.

No obstante, es importante enfatizar las siguientes consideraciones durante proceso de realización de la fase móvil<sup>54</sup>

1. **pH de la fase móvil:** Para el ajuste del pH de la fase móvil es importante el conocimiento del pKa y de la polaridad del analito. La selección de un pH adecuado resultara en que el analito esté o no ionizado. Las soluciones tampón deben añadirse a la fase móvil cuando el analito sea un compuesto con propiedades iónicas, la concentración debe ser suficientemente elevada como para poder controlar el pH de la fase móvil, pero no excesiva para evitar la posible precipitación de las sales del tampón en presencia de disolventes orgánicos, una adecuada concentración está comprendida entre 10 mmol/l y 50 mmol/l.
2. **Temperatura del método cromatográfico:** La temperatura influye en diferentes parámetros como la solubilidad, la difusividad, la viscosidad y la polaridad de la

fase móvil. Es importante conocer la temperatura de desnaturalización, para evitar riesgo en la caracterización del analito de interés. En ocasiones es considerable utilizar elevadas temperaturas (>40 °C), debido a que la viscosidad de la fase móvil se reduce y la velocidad de difusión aumenta, provocando que la tasa de transferencia de masa del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil se incremente y, consecuentemente, la eficacia, la resolución y la separación cromatográficas.

**Tabla 13: Principales disolventes implementados en cromatografía.**

Solución tampón	pKa
Formiato de amonio	3.8
	9.2
Acetato de amonio	4.8
	9.3
Ácido cítrico/citrato monobásico	3.1
Citrato diabásico/ citrato diibásico/citrato tribásico	4.7
	5.4
Acido fosforico/ dihidrogeno fosfato	2.1
Formiato/ ácido fórmico	3.8
Acetato/acido acético	4.8
Tris-(hidroximetil)-aminometano/ ion Tris-(hidroximetilinio)-aminometano	8.3

Tomado de Rigo, et al, 2017:

**Tabla 14: Generalidades y consideraciones de las técnicas cromatográficas**

Componentes	Propiedades	Exclusión molecular	Afinidad	Intercambio iónico	Interacción hidrofóbica	Fase reversa
Fase móvil	Características fisicoquímicas	Peso molecular de las proteínas	Interacción específica con un ligando	Carga superficial	Hidrofobicidad	Hidrofobicidad
	Interacción con matriz	Inespecífica, controlada adicionando sales	Reversibles electroestáticas	Electrostática	Hidrofóbica	Hidrofóbica
	Consideraciones	Solución clarificada, filtrada desgacificada, 4°C en las condiciones de pH y fuerza iónica de acuerdo con la proteína de interés. Uso de inhibidores de proteasas durante la ruptura celular				
Fase estacionaria	Matriz	Dextranos, agarosa, sephadex, sepacryl	Dextranos, agarosa, celulosa, silica, poliacrilamida.	Silica, metacrilato, agarosa.	Agarosa, poliestireno, silica.	Apolar, silanol, éter, octadecil
	Ligando/Grupo	No es necesario	Estable y compatible con la proteína	Sulfopropil, metil, sulfonato, dietilamidoetil, dietilaminopropil.	Butilo, octilo, fenilo, éter.	N-aquilo o hidrocarbonos, aromáticos.
	Consideraciones	Mantener la resina siempre hidratada y con el empaquetamiento homogéneo. Almacén en etanol 20%, 4°C				
Proceso	Condiciones iniciales de la muestra	Volumen de la muestra limitando	Unión específica. Volumen de la	Baja fuerza iónica, no hay	Alta fuerza iónica, volumen de la	Fase móvil es polar

		(<10% del volumen total)	muestra no limitante.	volumen limitante de la muestra.	muestra no limitante.	
	Condiciones finales de la muestra	Muestra diluida	Elución específica muestra concentrada.	Muestra al final, alta fuerza iónica o cambio de pH, muestra concentrada	Baja fuerza iónica, muestra concentrada.	Muestra con alta concentración de solventes no polares u orgánicos, concentrada y baja fuerza iónica.
	Elución	Flujo depende de la fase móvil y del movimiento browniano	Ligando competitivo, pH, fuerza iónica, polaridad.	Desprendimiento en relación con fuerza iónica de menor a mayor, concentración de sal, flujo temperatura, pH.	Disminución de salinidad.	Solventes no polares, orgánicos, acetonitrilo o metanol.
	Resolución	Tamaño y uniformidad de partículas, altura y empaque de la columna, velocidad de flujo y concentración de muestra	Alta resolución, capacidad desde 5 y hasta 250 mg por mL de resina, en general procesos de un solo paso.	Alta resolución, capacidad y velocidad, en general en proceso de más de un paso.	Buena resolución, capacidad y velocidad, en general en procesos de más un paso	Alta resolución.
	Consideraciones	Flujo de acuerdo con las especificaciones de la resina, en general				1mL min <sup>-1</sup>
<b>Desventajas</b>		Dilución de la muestra	No existen ligandos para todas las proteínas	No se trata de resinas particularmente específicas. Se debe considerar la diálisis para remover el exceso de sales		Riesgo de desnaturalización de la muestra. Utilizada principalmente para péptidos.

\*Estas separaciones son luego seguidas por tinción y/o análisis por espectrometría de masas. La tabla ofrece una descripción general de los métodos de separación. Extraída de: Ramirez, 2021

### 13.2 Breve historia de la Electroforesis.

El término electroforesis refiere a una técnica separativa que emplea un campo eléctrico aplicado que actúa sobre partículas cargadas usando su movimiento a través de una matriz. Esta técnica se basó en las leyes de electrolisis de Faraday en 1791, los estudios de Helmholtz sobre el campo eléctrico, donde se observó que, en los extremos de un capilar de vidrio horizontal lleno de una solución acuosa con partículas cargadas, la superficie interior de la pared del tubo adquiriría carga negativa, mientras que la capa de solvente cerca de la pared y la superficie de la partícula cargada adquiriría una carga opuesta.<sup>55</sup>

Así también mediante la formulación de Koahlraush sobre el orden de migración electroforética, la cual describe el orden de migración electroforética de iones y su concentración relativa, se pudo construir la electroforesis de desplazamiento (más tarde llamada isotacoforesis), a través de la descripción de los límites móviles se logró separar y observar componentes en una muestra mediante esta técnica. Posteriormente se descubrió que se podían obtener límites de movimiento electroforético agudo de

especies ionizadas en tubos de vidrio en forma de U y la existencia de una caída de potencial eléctrico sobre el límite.<sup>55</sup>

La comprensión de los iones en soluciones de agua que presentó Arrhenius en su teoría de la *disolución*, permitió que Tiselius trabajara en electroforesis, así fue que en 1930 publicó su tesis, "*La Moving Boundary Method of Studying the Electrophoresis of Proteins*", donde presentaba una nueva técnica para el estudio de las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, su trabajo le valió el premio Nobel en 1948, ya que logró desarrollar el concepto de frente móvil "*moving boundary*", que más tarde se conoció como electroforesis de zona. Mediante la implementación de geles, papel filtro como apoyo a los medios de soporte en 1940 y 1950, la técnica se fue utilizando más en distintos laboratorios.<sup>55, 46</sup>

En la década de 1960, los métodos de electroforesis en gel (SDS) se volvieron cada vez más sofisticados y mediante técnicas relacionadas se convirtieron en el auge de la biología molecular, así como la base para una amplia gama de métodos p. ej., las huellas digitales de proteínas, la hibridación Southern y procedimientos de transferencia, secuenciación del DNA, etc.<sup>55</sup>

Sin embargo, el análisis de extractos celulares complejos por este método hizo evidente el hecho de que la resolución no era lo suficiente para separar todos los componentes proteicos. Es por lo que se introdujo la electroforesis bidimensional (2-D), uno de los primeros informes de este acoplamiento, electroforesis bidimensional exitoso que desnaturaliza IEF a SDS PAGE se publicó en 1974. Al principio el método mostraba poca sensibilidad, sin embargo, la situación cambió drásticamente con el artículo seminal de O'Farrell, debido a su combinación, dicho artículo presentaba una descripción muy detallada del protocolo y detección por autorradiografía, mostrando a la vez cientos de puntos de proteína en un solo gel. Muchos investigadores quedaron impresionados con los resultados y el poder del método, por lo que la electroforesis 2D se extendió rápidamente por todo el mundo.<sup>55,42</sup>

### **13.2.1 Procesos electroforéticos.**

Se basa en la movilidad de estas a través de una matriz porosa cuando son sujetas a un campo eléctrico. El movimiento de estas dependerá de la capacidad de separación de moléculas bajo el fundamento de su punto isoeléctrico, donde la velocidad será proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. El uso de esta técnica puede tener dos propósitos<sup>52</sup>:

- Analítico: Identificación y caracterización física de los componentes de la muestra
- Preparativo: Separación preparativa de componentes de una muestra

Es importante mencionar que la separación de proteínas puede llevarse a cabo en estado nativo o desnaturalizante, la elección dependerá de las características bioquímicas y del análisis de las proteínas. Existen diferentes variantes de la técnica electroforética, en condiciones desnaturalizantes las proteínas se ponen en contacto con un detergente

catiónico que despliega las cadenas y les confiere carga negativa a todas las proteínas de la muestra.<sup>52,54</sup>

El proceso de la electroforesis que se realiza en gel de acrilamida (PAGE, por sus siglas en inglés *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*), implica el movimiento de la proteína dependiendo de la carga, del tamaño y forma, al preparar el gel de acrilamida, se puede controlar la porosidad, transparencia e inocuidad. Esta técnica también se puede utilizar en condiciones desnaturizantes mediante empleo del detergente Dodecil Sulfato sódico (SDS) en un gradiente de pH en gel de poliacrilamida, lo cual permite un alto poder de resolución, además esta requiere cantidades de microgramos de proteína.<sup>52,54</sup>

Por el contrario, los sistemas tampón nativos no dissociables, en los que las proteínas se someten a electroforesis en su forma nativa, están diseñados para fraccionar una mezcla de proteínas de manera que se conserven la interacción de subunidades, la conformación de la proteína nativa y la actividad biológica. Las proteínas en sistemas nativos que no se disocian se separan en función de su relación carga/ masa.<sup>73</sup>

Sin embargo, una de las variantes que se implementa mayormente en los laboratorios de investigación es la electroforesis en gel dimensional 2-D, donde la base de su alto poder de resolución es su bidimensionalidad, es decir, la separación secuencial de proteínas mediante dos criterios físicos, donde<sup>46</sup>:

- En primera dimensión mediante isoelectroenfoque (IEF) las separa según su punto isoeléctrico (pI). IEF incluso combate la difusión, un movimiento natural de moléculas que ampliaría el pico o mancha de proteínas en geles; tan pronto como las proteínas se difunden alejándose de su pI, se cargan y son forzadas a regresar a la posición de su pI, lo que significa que no solo se pueden separar proteínas diferentes sino también isoformas de carga de la misma proteína. (Libro de proteínas)
- En una segunda dimensión: las separa por su peso molecular por SDS-PAGE, ya que se emplea Dodecil Sulfato sódico (detergente) y PAGE que es el gel donde se corren las proteínas, en este proceso se emplea un gradiente de pH en gel de poliacrilamida.

El gran éxito de la electroforesis en gel 2D de alta resolución proviene del inmenso poder de resolución y la relativa robustez del enfoque; más de 4 000 isoformas de proteínas se pueden separar y mostrar en un solo experimento, migrando como "manchas" claramente separadas y aproximadamente redondas. Estos puntos se pueden analizar posteriormente mediante una variedad de métodos, incluido el análisis de transferencia Western y MS.<sup>73</sup>

### **13.2.2 Componentes Electroforéticos.**

#### **Soporte**

La separación de proteínas se puede realizar mediante geles de agarosa o de poliacrilamida (que suelen desarrollarse, en horizontal y el vertical). En ambos casos se prepara con una concentración adecuada para el tamaño de poro<sup>73</sup>.

➤ Agarosa

Los geles de agarosa son bastante rígidos y fáciles de manejar. Su tamaño de malla es alto, al preparar el gel, la agarosa y el buffer se calientan hasta disolver la agarosa. Generalmente se usa al 0.5% al 2%.

- Los estándares de gel agarosa: Geles: 35-38, se derriten a 90-95°C
- Agarosa de bajo punto de fusión: Geles a 35°C, se derrite a 65°C (usualmente se usan para separar fragmentos de DNA fragmentos)

La cámara que se utiliza principalmente en este gel es en forma horizontal, donde la caja contiene en el extremo lateral los electrodos de platino. Dado que la electroforesis en este gel es mayormente utilizada en la separación de DNA, en la **Tabla 15** se puede observar los rangos de separación de tamaños en función de la concentración de agarosa utilizada.<sup>42,73</sup>

**Tabla 15:** Rango de separación de tamaños (kb) en función a la concentración de agarosa.

Agarosa %	Estándar
0.3	1 kB- 40 kb
0.5	700 pb-25kb
0.8	500 pb-25 kb
1.0	250 pb-12 kb
1.2	150 pb-6kb
1.5	80 pb- 4 kb
2.0	60 pb- 2.5 kb

\*Extraída de: Willey 2015, Handbook 2021.

➤ Acrilamida

Estos geles separan la mayoría de las proteínas. Están formados por monómeros de acrilamida polimerizados en largas cadenas de un reactivo entrecruzante que mantiene la estructura estable (p. ej N,N'-metilenbiamida), se utilizan normalmente en aproximadamente un 3 % de acrilamida y la bisacrilamida "entrecruzada", normalmente en una proporción de 40:1 en peso. En SDS PAGE se utilizan típicamente porcentajes más altos, que van desde alrededor del 7 % hasta alrededor del 20%, cuanto mayor sea el tamaño de poro, menor resistencia al avance encontrara las moléculas para un mismo poro (**Tabla 16**) Estos geles requieren aditivos para ayudar a polimerizar el gel, como el persulfato de amonio como iniciador y teatrametilandiamina (TEMED) como catalizador de la reacción. Es importante mencionar que la cámara implementada en este gel es de forma vertical<sup>42,73</sup>

**Tabla 16:** Rango de separación de tamaño (kDa) en función de la concentración de acrilamida.

Concentración de gel acrilamida	Rango de separación lineal (kDa)	Separación útil (kDa)
8%	35-92	32-200
10%	25-68	20-150
12.5%	19-55	15-100
15%	12-43%	8-65
20%	8-20%	6.5-25

\*Tomado de: Handbook, 2015

### ➤ Gradientes de pH móviles (Tampones)

En principio, esta aplicación es muy simple: se genera una mezcla de diferentes sustancias amortiguadoras, con diferentes valores de pKa y se agrega a los amortiguadores necesarios para moldear el gel.

Para la preparación inicial es necesario de un buffer de carga, el cual debe tener una alta densidad que permita que la muestra se introduzca en el pocillo del gel, además de colorantes que indiquen cuando debe detenerse la electroforesis. Existen varios tipos de buffers de carga, en la **Tabla 17** se presentan los más utilizados.<sup>73</sup>

**Tabla 17: Buffer comúnmente utilizados en la electroforesis**

Tipo de Buffer	Descripción
<b>Buffer de carga tipo I (6x):</b>	0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 40% sacarosa, en agua. Almacenar a 4°C.
<b>Buffer de carga tipo II (6x)</b>	0.25% azul de bromofenol; 0.25% xileno cianol; 30% glicerol, en agua. Almacenar a 4°C.
<b>Solución de bromuro de etidio</b>	Es un agente intercalante que se usa como colorante fluorescente para la visualización. Concentración 0.5 µg/ml.
<b>Azul de Bromofenol</b>	como marcador del frente de avance de la electroforesis, su color ayuda a visualizar durante la carga de muestra en los pocillos.
<b>Tapón TEA (Tris-Acetato-EDTA)</b>	La composición del buffer TAE 1X es Tris-acetato de 0.04 M, EDTA 1 mM, pH 8,0.

\*Tomado de: Handbook, 2015

El gel de SDS PAGE, por lo general contiene TRIS (tris acetato), SDS, Glicerol DTT/B mercaptoetanol y azul de bromofenol como marcador. En la electroforesis el gel de la primera dimensión se equilibra en tampón SDS/TRIS pH 6.8, mientras que la segunda dimensión se equilibra con TRIS SDS y una concentración de urea ( 6 M), esta debe deducirse de acuerdo al propósito del investigador, así mismo tiempo, las proteínas

suelen reducirse de forma reversible con DTT o DTE. Luego, esta reducción reversible.<sup>42,46</sup>

- **Sistemas tampón continuos.**

La composición del tampón de gel y el tampón de ejecución son esencialmente idénticas en todo el gel. Consisten en un único gel de separación y utilizan los mismos iones de tampón al mismo pH en todos los depósitos de muestra, gel y electrodo.

- **Sistemas tampón discontinuos.**

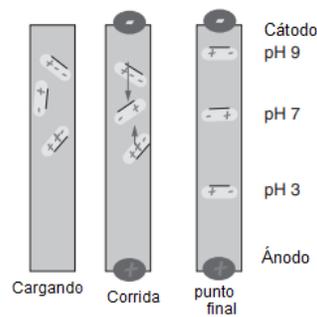
Los sistemas de tampón discontinuos emplean diferentes iones de tampón, pH en el gel, y en los depósitos de electrodos. Las muestras se cargan en un gel de apilamiento que es el gel de resolución de poro pequeño. Este sistema permite aplicar al gel volúmenes relativamente grandes de muestras de proteínas diluidas y la resolución es mucho mayor que la se obtiene con los sistemas continuos.<sup>73</sup>

- **Movilidad de iones y apilamiento de proteínas**

Cuando se aplica una corriente a través de la barra de gel, las sustancias migrarán de acuerdo con su pKa: las más ácidas (cargadas negativamente a valores de pH muy bajos) migrarán más rápido hacia el ánodo (+ polo). Los ligeramente menos ácidos son los siguientes en la línea, en el medio de la varilla tendremos sustancias neutras con tantas cargas positivas como negativas a pH 7, en el cátodo (polo -) estará en la mayoría de las sustancias básicas (cargadas positivamente a valores de pH muy altos), seguidas por sustancias menos básicas a neutras hasta la mitad de la barra. Una vez que se establece este gradiente de pH, nuestras proteínas lo seguirán y se separarán de acuerdo con su pI (**Figura 19**). A continuación, se muestra los principales iones empleados en el sistema de electroforesis.<sup>42,73</sup>

- El cloruro (-), suministrado por el tampón de gel, sirve como ion principal porque tiene la mayor atracción hacia el ánodo en relación con otros aniones en el sistema.
- La glicina (-), el anión primario proporcionado por el tampón en funcionamiento sirve como ion final, porque solo tiene una carga negativa parcial y permanece detrás de los iones de cloruro más cargados en un entorno cargado.
- Tris Base (+) es un ion común presente tanto en el gel como en los tampones de ejecución. Durante la electroforesis, los iones del gel y del tampón en el sistema Tris-Glycine forman un pH operativo de 9.5 en la región de separación del gel.

**Figura 19:** Migración de las proteínas posterior al tratamiento con buffers y a la aplicación de corriente.



Extraída de: Willey, 2015

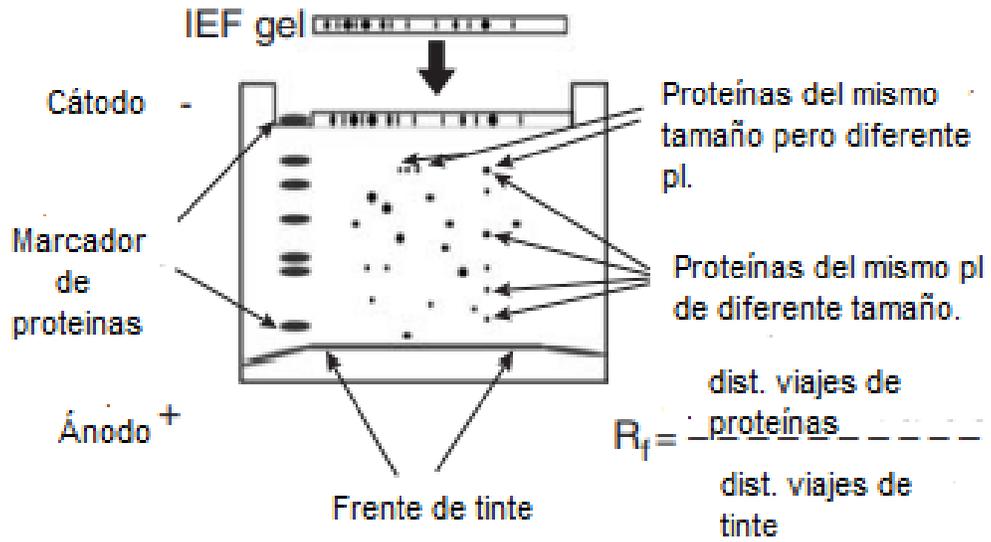
### 13.2.3 Visualización

En la separación basada en gel, la mayoría de las proteínas se mantienen dentro del gel y deben fijarse y visualizarse en el gel. Sin la fijación, las proteínas se difundirían bastante rápido, aproximadamente en una hora, las manchas serían tan nítidas como antes, y si el gel no está entre placas de vidrio sino en un líquido, las proteínas se difundirían directamente fuera del gel. Por lo tanto, la mayoría de los procedimientos de tinción incorporan la fijación de proteínas como primer paso, este proceso es irreversible, ya que la proteína se desnaturaliza. Se pueden observar en la **Tabla 17** algunos ejemplos donde los buffers son incorporados con el fijador.

En cambio, si se realiza la tinción posterior al tratamiento de la proteína, es necesario secar el gel (idealmente entre hojas de celofán), este procedimiento no influye en el análisis por espectrometría de masas, si los geles se mantienen húmedos, deben fijarse las proteínas o estas se difundirán fuera de ellos, de aquí la importancia de la fijación y secado. En la **Tabla 18**, se pueden observar los diferentes métodos de tinción en geles.

Si se puede detectar una proteína en cualquier tinción de Coomassie, esta también se podrá identificar mediante MS o MS/MS. Si puede ver la banda/el punto fácilmente en una fotocopia de un escaneo incluso se podría identificar las PTM. Los marcadores de tamaño se pueden utilizar en la visualización para así detectar las bandas comparando su valor de  $R_f$  con el valor  $R_g$  de las proteínas marcadas, en la **Figura 20** se puede observar un ejemplo en electroforesis 2D<sup>73</sup>.

Figura 20: Forma de visualizar las proteínas en gel electroforético.



\*Tomado de:

**Tabla 18: Métodos de tinción implementados en electroforesis**

Método	Ventajas	Desventajas
<b>Tinción Coomassie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se une preferentemente (en una reacción reversible) a los residuos de tirosina.</li> <li>• Se pueden detectar proteínas de 10 a 50 ng o más en geles.</li> <li>• Posee un margen de error de alrededor del 50-150 %, se puede deducir la cantidad absoluta de proteína a partir de proteínas estándar, ya sea en un ensayo después de leer la densidad óptica (DO) a 595 nm en solución o en geles comparando las intensidades de las bandas/ de proteínas estándar de concentración conocida.</li> <li>• Bastante específicas para las proteínas, lo que significa que dan resultados 'limpios' para proteínas incluso si hay RNA o DNA presente.</li> <li>• El tiempo de tinción suele durar de 20 a 60 minutos y la decoloración de 2 a 6 horas.</li> <li>• Solución de tinción reutilizable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Durante el proceso de decoloración puede haber cambios en la solución de tinción.</li> <li>• Los líquidos reutilizados pueden inducir reacciones químicas no deseadas.</li> <li>• Las esponjas que se implementan contienen polímeros que pueden interferir con la espectrometría de masas.</li> <li>• Las tinciones de Coomassie no son los métodos de detección más sensibles</li> </ul>
<b>Tinción de plata.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se basa en las diferencias en el potencial electroquímico para posteriormente desencadenar la formación de precipitados de plata molecular a partir de una solución con iones de plata.</li> <li>• Es muy barato y no hay necesidad de depender de equipos costosos.</li> <li>• Solo requiere del uso de reactivos de buena calidad.</li> <li>• La banda que se genera es permanente, fuerte y puede durar años en geles secos.</li> <li>• Se generan buenas señales para la identificación.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El proceso es muy sensible, puede ocurrir espontáneamente, la tinción puede ser difícil de controlar.</li> <li>• Implica muchos más pasos de lavado e incubación.</li> <li>• La tinción implica un tiempo práctico de varias horas.</li> <li>• La tinción no es específica de las proteínas.</li> <li>• Las bandas no son tan compatibles con la EM.</li> </ul>
<b>Manchas de Zinc</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La sensibilidad de la tinción es similar al de Coomassie coloidal.</li> <li>• La fijación de la proteína en la pieza de gel, lavar es más sencilla que las tinciones anteriores.</li> <li>• Útil para eluir la proteína completa de un gel.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No se producen manchas uniformes, al menos que se utilicen kits.</li> <li>• Riesgo de pérdida de proteína en los lavados de corte.</li> <li>• La banda solo es visible en gel húmedo y es difícil de escanear o fotografiar.</li> </ul>
<b>Marcaje Fluorescente.</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Las tinciones son sensibles, la tinción es fácil de realizar y el rango de la señal lineal puede ser muy grande,</li> <li>• Se necesita menos proteína para el análisis.</li> <li>• se necesitan menos repeticiones</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solo se puede ver con un lector (relativamente costoso), la escisión manual de puntos no es posible.</li> </ul>
<b>Marcaje con isótopo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Permite identificar y cuantificar la abundancia de proteínas.</li> <li>• Eficacia y etiquetado preciso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Proceso complejo</li> <li>• Técnico sensible</li> </ul>

\*Extraído de: Handbook, 2015

### 13.2.4 Análisis.

La última verificación de identidad de la proteína purificada es la digestión (tripsinización) y el análisis comúnmente realizado con Espectrometría de masa ESI-MS seguido de la comparación con una base de datos de secuencias de proteínas. Durante este proceso no importa cómo se haya teñido un gel o cómo se hayan detectado las proteínas, todas las imágenes del gel deben digitalizarse para análisis posteriores.

De acuerdo con la literatura consultada las principales bases de datos consultadas se pueden observar en la **Tabla 18** utilizadas son las siguientes<sup>73</sup> :

**Tabla 18: Bases de datos comunmente utilizadas en el análisis de proteínas.**

Nombre	Comentarios	Fuente
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uni-Prot/Swiss-Prot</li> <li>• Uni-Prot/TrEMBL</li> <li>• Ensembl</li> <li>• Entrez-Protein-(NCBI nr)</li> </ul>	<p>Estas son bases de datos de tipo tradicional, que contienen proteínas o secuencias de ADN o ARN, con niveles variables de anotación y redundancia/superposición entre secuencias. Se utilizan para que los motores de búsqueda hagan coincidir los datos de MS y MS/MS con las entradas de las bases de datos. Espere actualizaciones mensuales, algunas interconexiones en único nombres de entrada para cada base de datos. Swiss-Prot es la única base de datos que se anota completamente de forma manual. Todos los demás se anotan automáticamente y se curan manualmente. Todos tienen algún tipo de GUI basado en web y herramientas como PBLAST para encontrar secuencias similares/idénticas.</p>	<p><a href="http://www.uniprot.org">http://www.uniprot.org</a>  <a href="http://www.ensembl./index.html">http://www.ensembl./index.html</a>  <a href="http://www.ebi.ac.uk/pdbe">http://www.ebi.ac.uk/pdbe</a>  <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/index.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Database/index.html</a></p>
<b>GOA</b>	<p>Por sus siglas en inglés <i>The Gene Ontology Annotation</i> . El proyecto tiene como objetivo obtener datos de alta calidad para cada función de proteína, localización. Alimenta datos en Uniprot, NCBI</p>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/GOA">http://www.ebi.ac.uk/GOA</a>
<b>PDBe</b>	<p>Es la versión europea de base de datos para proteínas estructuras 3D.</p>	<a href="http://www.ebi.ac.uk/pdbe">http://www.ebi.ac.uk/pdbe</a>
Extraída de: Willey, 2021		

Es primordial el uso de softwares en espectrometría de masas los cuales se destacan ProSightPC, esta permite la la identificación de proteínas de “top down”, mediante la búsqueda de espectros en una base de datos de proteínas "anotada al azar", que se genera considerando casi todos los PTM esperados. Otro software es PPIITA: a diferencia de ProSightPC, este es un método independiente de precursores, utiliza solo fragmentos de iones para la identificación de proteínas y es capaz de identificar especies

de proteínas con PTM inesperados en los extremos N o C, sin embargo puede identificar directamente especies de proteínas con PTM en los extremos N y C. Por otro lado, para el análisis de imágenes de electroforesis en 2D existen varios softwares comerciales, tales como: PDQuest (BioRad), ImageMaster (GE Healthcare) , Melanie II , ProteomeWeaver , GELLAB y Delta2D. Estos programas usan técnicas básicas de preprocesamiento para mejorar la apariencia de las imágenes, así como técnicas de segmentación y registro que asisten en la detección de las proteínas.<sup>74</sup>

### **13.3 Espectrometría de masas (MS).**

La espectrometría de masas es el resultado de los avances tecnológicos del trabajo de Wilhelm Wien, JJ Thomson y Francis Aston en el año 1922 fue motivo de premio nobel. La MS se utiliza para medir la relación masa/ carga  $m/z$  de átomos y/o moléculas en una muestra, actualmente existen diferentes equipos, sin embargo, todos tienen tres características en común, las cuales son<sup>73</sup>:

- Medio de Ionización
- Analizador de masas
- Medio de detección.

Es importante mencionar que el principal objetivo de estos análisis de es generar datos que puedan compararse con experimentos simulados en la computadora, para que posteriormente esta sea identificada en la base de datos.

#### **a) Medio de ionización.**

Es esencial para cumplir cualquier análisis de MS, el cual dependerá del tipo de muestra y aplicación, los cuales se pueden clasificar en métodos de fase gaseosa, de desorción y pulverización (**Tabla 19**).<sup>73,42</sup>

#### **b) Analizador de masas:**

Estos permiten la separación de iones, en la tabla se muestra los analizadores de uso común (**Tabla 20**).<sup>73,42</sup>

**Tabla 19: Medios de ionización usados en Espectrometría de masas.**

<b>Métodos de fase gaseosa</b>	<b>Métodos de desorción</b>	<b>Métodos de pulverización</b>
Ionización de electrones	Ionización por desorción laser asistida por matriz MALDI	Ionización por electropulverización ESI
Ionización de electrones	Bombardeo atómico rápido FAB	Ionización por electropulverización de desorción DESI
Plasma acoplado inductivamente ICP	Fuentes de ionización térmica	
	Fuentes de ionización de plasma	
	Fuentes de iones metálicos líquidos LMIS	

\*Tomado de: Handbook, 2015.

**Tabla 20: Analizadores de masas de uso común en Espectrometría de masas.**

<b>Tiempo de Vuelo (ToF)</b>	Los iones se separan de acuerdo con su relación $m/z$ en función del tiempo que pasa a través de un tubo de vuelo hasta llegar a un detector
<b>Cuadrupolo</b>	La trayectoria de los iones que ingresan al cuadrupolo es desviada por el potencial eléctrico de manera que es proporcional a su valor de $m/z$ , mediante el cambio de potencia se pueden detectar.
<b>Sector magnético</b>	Se emplean campos magnéticos los cuales dispersan los iones en trayectorias de acuerdo con sus relaciones $m/z$ .
<b>Trampa de iones</b>	Mediante los electrodos se forma un anillo donde los iones se separan y detectan mediante la descarga de iones con oscilaciones inestables desde el sistema hasta el detector.
<b>Orbitrap</b>	Mediante dos electrodos se forma una trampa donde los iones quedan atrapados por su atracción electrostática.
<b>Espectrometría de masas en tándem Ms</b>	Son métodos híbridos que involucran más de un tipo de espectrómetro de masas para aumentar la especificidad y / o la capacidad de resolución de más.

\*Tomado de: Handbook, 2015.

Sin embargo, existe la combinación de algunos tipos de fuentes de ionizador que han demostrado eficacia, sensibilidad entre sí, además comprenden los instrumentos

comerciales más comúnmente disponibles Una de las combinaciones pueden ser las siguiente.<sup>56,73</sup>

- **MALDI-TOF:** Es la combinación del sistema láser y el ToF, permite que la ionización y el análisis de masas sean ideales. Dado que MALDI es una técnica de ionización suave, la formación molecular y los compuestos de interés no necesitan etiquetarse para su detección, cuando el láser dispara en la matriz/punto de muestra que se mantiene en vacío, los iones se forman y aceleran el tubo de ToF, por lo que se empieza a medir en el espectro masas.

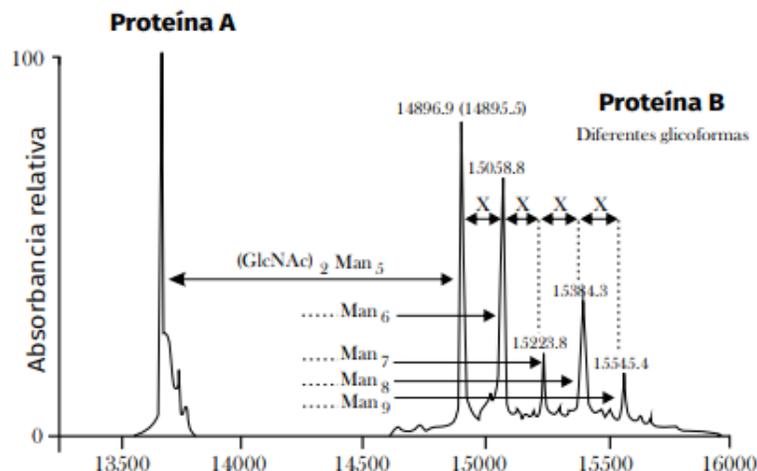
### Medios de detección

El tipo de detector es el elemento clave para los sistemas MS, este convierte una corriente de iones separados en masa en una señal medible. Existen diferentes tipos de detectores, el uso de cada uno será dependiendo de factores que incluyen el rango dinámico, la retención de información espacial, el ruido y la idoneidad para la masa analizador. Los detectores de uso común son los siguientes.<sup>56</sup>

- Multiplicador de electrones EM
- Copa Faraday FC
- Dinodo de conversación de fotomultiplicador
- Detectores de matriz

Debido a la existencia de diferentes tipos de ionización y analizadores, hay combinaciones de técnicas que podrían construirse, permitiendo un mejor resultado en el análisis. Las técnicas de separación de gases y líquidos se utilizan a menudo junto con MS para aumentar la sensibilidad y facilitar la interpretación. En la **Tabla 21** se muestran algunos de los acoplamientos más comunes y en la **Figura 21** se muestra un ejemplo de detección de glicofomas a través de espectrometría de masas.<sup>66</sup>

**Figura 21: Ejemplo de detección de glicofomas en espectrometría de masas.**



\*Extraída de: Vega & Reyes, 2020.

**Tabla 21:** Acoplamiento común de la espectrometría de masas<sup>42</sup>

<b>Espectrometría de masas por cromatografía de gases GS-MS</b>	<b>Espectrometría de masas de cromatografía líquida LC-MS</b>
<p>Permite la separación de mezclas complejas, estas pueden ser sólidas, líquidas o gaseosas.</p> <p>El fundamento de su separación es en función de sus puntos de ebullición relativos y su afinidad con la columna.</p> <p>Se emplean altas temperaturas en GC, por lo que su uso es inadecuado para compuestos de alto peso molecular como p. ej. las proteínas, debido a su riesgo de desnaturalización.</p>	<p>Permite la separación de muestras que se encuentren en fase líquida. La muestra se disuelve en un disolvente y se inyecta en la columna cromatográfica.</p> <p>El fundamento de su separación se basa en la afinidad relativa entre los componentes de la muestra y la fase estacionaria.</p>

### **13.4 Western Blot (Ensayo de Inmunodetección).**

Los inmunoensayos se pueden utilizar para la cuantificación/identificación si se produce una curva estándar adecuada, no es necesario purificar la proteína etiquetada siempre que se disponga de un estándar purificado y la especificidad de detección sea suficiente. Mediante el uso de un western blot, se pueden identificar proteínas específicas de una mezcla compleja de proteínas extraídas de las células.<sup>53</sup>

La técnica consiste en utilizar tres elementos para realizar el proceso:

1. Separación por tamaño (Electroforesis).
2. Transferencia a un soporte sólido
3. Marcación de la proteína objetivo utilizando un anticuerpo primario y secundario adecuado para visualizar.

El primer paso del proceso es separar las macromoléculas en una muestra mediante electroforesis en gel. Posteriormente, las moléculas separadas se transfieren a una segunda matriz, generalmente una membrana de nitrocelulosa o difluoruro de polivinilideno (PVDF), enseguida se bloquea la membrana para evitar cualquier unión no específica de anticuerpos a la superficie de la membrana<sup>56</sup>

Primero se prueba una combinación de anticuerpos para poder identificar el anticuerpo específico para la proteína de interés (anticuerpo primario) y otro anticuerpo específico para especie huésped del anticuerpo primario (secundario) A menudo, el anticuerpo secundario forma un complejo con una enzima que, cuando se combina con un sustrato adecuado, produce una señal detectable.

Los sustratos cromogénicos producen un precipitado en la membrana que produce cambios colorimétricos visibles a simple vista. Los métodos de detección más sensibles utilizan un sustrato quimioluminiscente que produce luz como subproducto de la reacción con la enzima conjugada con el anticuerpo. La salida de luz se puede capturar usando una película, aunque los instrumentos de imagen digital basados en cámaras de dispositivo acoplado por carga (CCD) son alternativas populares a la película para capturar señales quimioluminiscentes, también se pueden utilizar anticuerpos marcados con fluorescencia, los cuales mediante un instrumento se puede capturar la señal fluorescente.<sup>53,56</sup>

### 13.5 ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)

ELISA permite el manejo de muchas muestras en paralelo, utiliza antígeno o anticuerpos en superficie sólida donde la adición de anticuerpos conjugados con enzimas permite medir las fluctuaciones en las actividades enzimáticas, las cuales son proporcionales a la concentración de anticuerpos y antígenos en la muestra. La enzima enlazada convierte un sustrato agregado, lo que da lugar a un cambio de color, que se puede medir mediante un espectrofotómetro.<sup>52,57</sup> La especificidad del ensayo depende de los anticuerpos utilizados, el módulo de detección para generar alta sensibilidad y así poder analizar lisados clarificados o fracciones de purificación intermedias o inactivas, en la **Tabla 22** se presentan las ventajas y desventajas. ELISA tiene sus variantes, en la **Tabla 23** se puede observar las características de cada una de estas<sup>57</sup>.

**Tabla 22: Ventajas y desventajas de los métodos directos o indirectos de Western blot**

Método	Ventajas	Desventajas
<b>Método Directo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Requiere un solo anticuerpo</li> <li>• Elimina problemas con la reactividad cruzada de anticuerpos secundarios</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La etiqueta puede interferir con la unión del objetivo</li> <li>• Potencial de fondo alto si la especificidad del anticuerpo para el objetivo es débil</li> <li>• Los anticuerpos primarios conjugados pueden ser costosos</li> <li>• La selección de anticuerpos primarios conjugados puede ser limitada</li> </ul>
<b>Método Indirecto</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amplificación de señal por anticuerpo secundario</li> <li>• Amplia selección de anticuerpos secundarios conjugados</li> <li>• Se puede usar un anticuerpo secundario con varios anticuerpos primarios diferentes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La tinción inespecífica puede aumentar el fondo</li> <li>• Se requieren pasos adicionales cuando se utiliza el método indirecto</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El uso de un anticuerpo secundario no inhibe la unión a la diana del anticuerpo primario</li> <li>• El uso de anticuerpos secundarios marcados ofrece opciones para múltiples métodos de detección</li> </ul>	
*Extraída de: Biotech, 2022.		

**Tabla 23: Variantes del método ELISA.**

Tipos de métodos de ELISA	Características	Ventajas	Desventajas
<b>Directo</b>	Simple y rápido. El anticuerpo primario marcado con una enzima se une directamente al antígeno de interés permitiendo la detección y/o cuantificación de este.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No hay posibilidad de reactividad cruzada con el anticuerpo secundario</li> <li>• Menor probabilidad de error debido al uso de un menor número de reactivos y pasos en el procedimiento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Puede dar mayor ruido de fondo.</li> <li>• No hay amplificación de la señal, al no tener anticuerpo secundario se reduce la sensibilidad del ensayo.</li> <li>• El anticuerpo primario debe ir marcado, lo que resta flexibilidad al ensayo.</li> </ul>
<b>Indirecto</b>	Consiste en dos pasos, lo que permite amplificar la señal obtenida. Se utilizan dos anticuerpos, primario y secundario, este último es conjugado con una enzima	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta flexibilidad, puede emplearse con diferentes anticuerpos, lo que se traduce en beneficio económico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protocolo más complejo, incluye pasos de incubación adicionales.</li> <li>• El uso de anticuerpos secundarios puede producir reactividad cruzada.</li> </ul>
<b>Sándwich</b>	El antígeno queda inmovilizado entre dos anticuerpos, uno de captura y otro de detección (pares de anticuerpos) que se unen a dos epítopos distintos de un mismo antígeno.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta flexibilidad, permite hacer la detección tanto por procedimiento directo como indirecto.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• El antígeno debe tener un tamaño adecuado para permitir la unión de 2 anticuerpos.</li> <li>• En ocasiones es difícil encontrarse con los pares adecuados de anticuerpos.</li> </ul>

<b>Competitivo o de inhibición</b>	Se utiliza un antígeno de referencia que competirá con el antígeno de la muestra por unirse al anticuerpo primario.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidad, robustez y consistencia.</li> <li>• Permite la detección de antígenos de pequeño tamaño y en bajas concentraciones</li> <li>• no requiere el procesamiento previo de las muestras al analizar</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protocolo complejo.</li> <li>• Requiere el uso de antígeno de inhibición.</li> </ul>
------------------------------------	---	--	---

\*Extraída de: Biotech, 2022.

#### 14. LIMITACIONES DE LAS TÉCNICAS CONVENCIONALES PARA LA SEPARACIÓN Y CARACTERIZACIÓN.

El proceso de purificación, caracterización e identificación debe ser robusto, confiable, fácil de escalar y capaz de eliminar las impurezas relacionadas con los procesos y los productos, para así garantizar la seguridad del producto. La pureza lograda, la velocidad de desarrollo del proceso, el rendimiento de recuperación general y el rendimiento son algunos de los principales parámetros clave que deben buscarse.<sup>73</sup>

La técnica de cromatografía permite alta resolución, es comúnmente el proceso más utilizado para la purificación y el pulido de proteínas. Sin embargo, la instrumentación del equipo, en los procesos, y medios, conlleva altos costos. Además, los tiempos de ciclo son largos; la industria farmacéutica se enfrenta con limitaciones de rendimiento y escalabilidad en esta técnica.<sup>73</sup>

La electroforesis bidimensional (2D), es otra de las técnicas de uso común en laboratorios, a pesar de los desarrollos más recientes en la separación de proteínas de alto rendimiento basada en LC. Esto se debe a su muy buena reproducibilidad general, la resolución extremadamente alta y su instrumentación barata. También se le contribuye su uso a la inmensa experiencia que se ha acumulado a lo largo de los años y su gran versatilidad con un conjunto diverso de métodos de análisis, que permite la identificación, de la proteína incluso con algunas de las PTM.<sup>73</sup>

Sin embargo, la electroforesis en gel 2D no es fácil de cuantificar de forma absoluta, su enlace con la espectrometría de masas no es muy eficiente en términos de sensibilidad; se corre el riesgo de pérdida del 20 al 90% de proteína utilizada, por lo que se debe cargar alrededor de 1 mg de proteína para recuperar unos 200 µg en todas las manchas del gel, así mismo su rendimiento, y especialmente su capacidad para detectar y cuantificar proteínas de baja abundancia, depende de un método de visualización de proteínas después de la electroforesis.

Aunque las técnicas modernas de detección de alta sensibilidad (tinciones de plata y fluorescencia) pueden operar en el rango bajo de nanogramos, siendo la detección basada en fluorescencia lineal en varios órdenes de magnitud, no ha se permitido la

detección capaz de hacer frente al enorme rango dinámico. Así mismo, las herramientas para el procesamiento de las imágenes son en su mayoría costosas y requieren la intervención manual de un experto.<sup>73</sup>

Por otro lado, las principales limitaciones de espectrometría de masas es el riesgo de obtener identificación errónea que puede ocurrir cuando algunos miembros de un complejo de especies están en la base de datos, pero otros no. La espectrometría de masas con LC-MS-MS y MALDI-TOF/TOF, siendo equipos ampliamente utilizados, se es necesario de un software para los equipos, las bases de datos y de un personal calificado, esto aumenta sustancialmente los costos y, por lo tanto, limitan su uso más amplio.<sup>47</sup>

ProSightPC y pTop, se han desarrollado para el análisis de datos de MS de arriba hacia abajo, la interpretación eficiente de los datos de MS de arriba hacia abajo de alto rendimiento sigue siendo un problema computacional desafiante porque las proteoformas intactas a menudo contienen alteraciones de la estructura primaria desconocidas en comparación con las formas no modificadas en la base de datos de proteínas.<sup>61</sup>

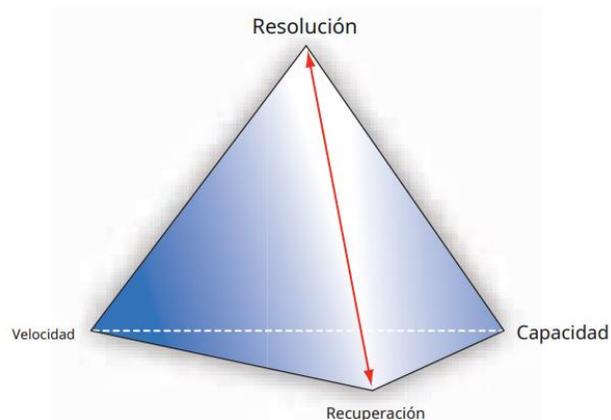
## **15. IMPLIMENTACION DE NUEVAS TECNICAS.**

Dado a la potencial demanda de las proteínas de uso farmacéuticos que ha surgido desde la pandemia de la COVID-19, o su uso en las enfermedades crónicas como el cáncer, las industrias biofarmacéuticas han buscado la implementación o invención de nuevas técnicas que puedan complementarse con las tradicionales para la optimización del proceso de pulido. Los avances en las técnicas han proporcionado a las empresas nuevos métodos para la identificación y caracterización de sus productos, donde uno de los desafíos se ha convertido en elegir la combinación correcta de métodos.

Como se ha mencionado anteriormente la purificación tiene un papel importante en todo el proceso de fabricación de productos biofarmacéuticos más para aquellos que son de fines terapéuticos en humanos. Otro motivo de la búsqueda de nuevas técnicas es la proporción del coste de purificación sobre el coste total de fabricación de las proteínas recombinantes, ya que esta puede suponer desde un 50% hasta un 90% del presupuesto.<sup>58</sup>

Son bastantes los métodos que se han desarrollado en la última década, estos conllevan enfoques que van desde la preparación de la muestra hasta el procedimiento, sin embargo, es importante mencionar que en todos se toman en cuenta los parámetros que se describen y se observan en la **Figura 22.**<sup>42</sup>

**Figura 22: Parámetros importantes en la elección de los métodos de separación y caracterización de proteínas terapéuticas**

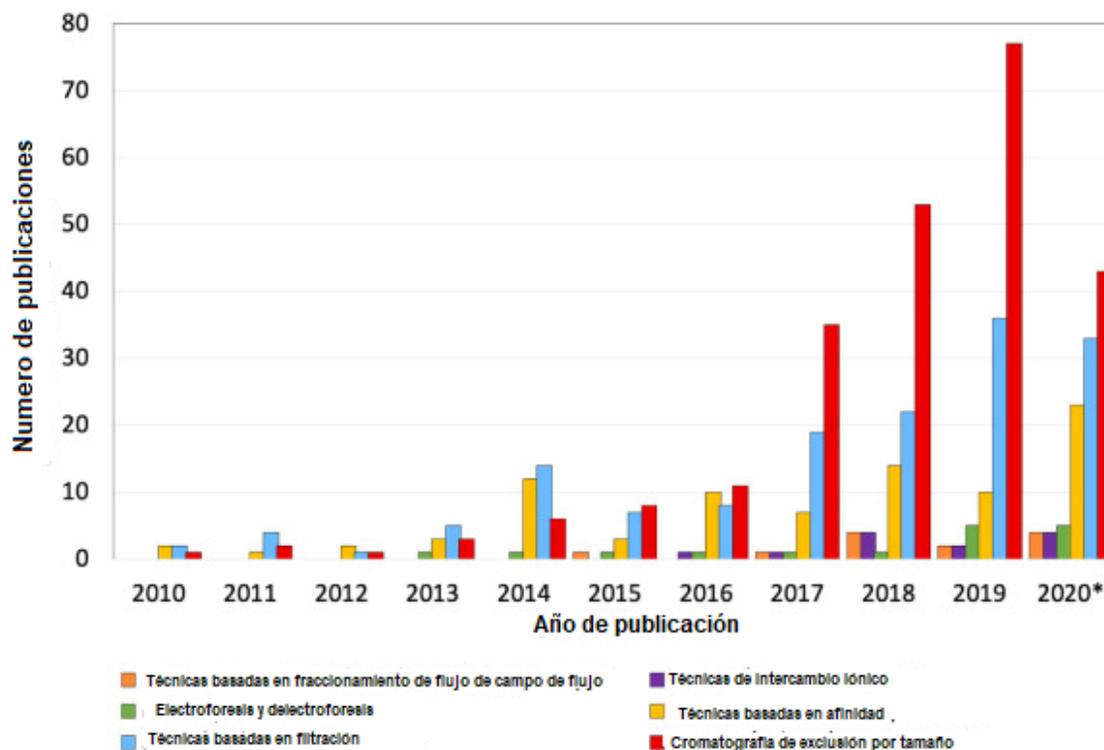


\*Extraída de: Handbook, 2015.

- **Resolución:** La resolución explica en qué medida dos sustancias se pueden separar unos de otros, mediante esta se puede determinar la pureza y el rendimiento del método.
- **Rendimiento:** El rendimiento es una medida de la capacidad y el tiempo de caudal en el que se puede utilizar esta capacidad. Cuanto mayor sea la capacidad (capacidad de carga) o menor el tiempo de procesamiento, respectivamente, mayor será el rendimiento.
- **Tasa de flujo:** Es decir, el volumen de líquido que fluye a través de la columna por unidad de tiempo, este determina el tiempo del proceso, además la carga y la elución, y otros pasos pueden aumentar el tiempo total y pueden optimizarse.
- **Caída de presión:** La caída de presión resulta de la resistencia al flujo del gel, cuanto mayor sea la resistencia, mayor será la presión para empujar la solución hacia la entrada de la columna a una velocidad razonable. La caída de presión es un factor esencial para la construcción de la columna y por lo tanto los costos de inversión.

En los últimos seis años se han introducido técnicas basadas en afinidad, así como las técnicas basadas en filtros. En la **Figura 23** se puede observar el aumento del uso que ha surgido desde el 2016 hasta el año 2020. Las técnicas de cromatografía de exclusión por tamaño son las que se encuentran en mayor desarrollo, es por ello que se describirán a continuación para así poder conocer las razones por las cuales son de interés dentro del campo de las proteínas terapéuticas.<sup>58</sup>

**Figura 23: Técnicas modernas de aislamiento, separación y fraccionamiento de proteínas.**



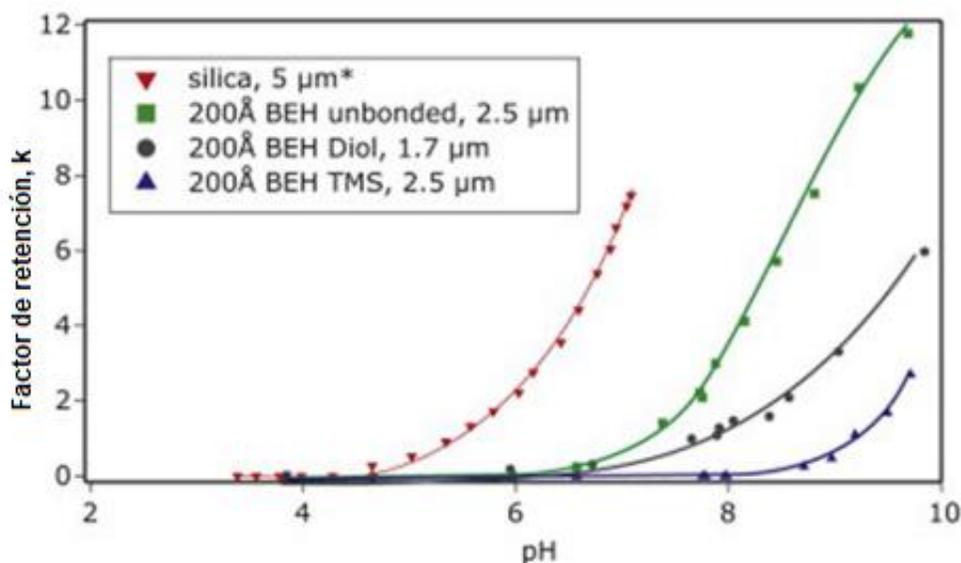
\*Extraída y modificada de: Liangsupree, 2021.

### 13.1. Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) moderna.

El uso de la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) moderna permite a los investigadores la separación mediante una fase estacionaria porosa con el uso de columnas relativamente pequeñas (p.ej. 150 x 4.6 mm). En el 2018 Goyon et al, menciona que la dimensión estándar de las columnas modernas es de 150 mm x 4.6 mm, las cuales suelen estar rellenas llenas de partículas de menos de 3  $\mu\text{m}$ . Si se toma en cuenta que las columnas tradicionales son de tamaños de 300 mm x 8mm, las cuales son usadas a caudales y presión bajos, hace que SEC moderna sea tendencia, ya que esta permite disminuir los volúmenes de columnas y los tamaños de partículas para aumentar el rendimiento, el cual es de 3 a 5 veces más del método convencional.<sup>59</sup>

Recientemente se reconoció el potencial de tales columnas (**Figura 24**) y varios proveedores de columnas han lanzado sus propios materiales SEC de menos de 3  $\mu\text{m}$  desde 2016. La estabilidad de presión de estas columnas también se mejoró considerablemente, ya que pueden operar hasta 250–480 bar. Se pueden aplicar altas velocidades de fase móvil y el tiempo de análisis se reduce a 4–8 min, tomando en cuenta que el tiempo convencional es de 25 a 40 min.<sup>59</sup>

Figura 24: Factor de retención de columnas utilizadas en SEC moderna.



\*Tomada de: Goyan et al, 2018.

Dentro del estudio realizado por Goyan et al 2018, se compara la acidez del silanol de tres tipos de columnas mediante el gráfico del factor de retención de iones, el cual es de litio en función del pH basado en el método de Méndez et al. Se puede observar que BACH200 presenta mayor factor de retención respecto al pH al que se somete, en base a esto y a la literatura consultada, este tipo de columna empaca partículas de 1.7 µm, además se considera como el precursor de la SEC moderna. Recientemente es la más implementada, ya que la columna permitió un aumento significativo en el rendimiento del método, gracias a las dimensiones más pequeñas de la columna de 4.6 mm x 150 mm frente a los 7.8 mm x 300 mm de las columnas SEC convencionales.<sup>59</sup>

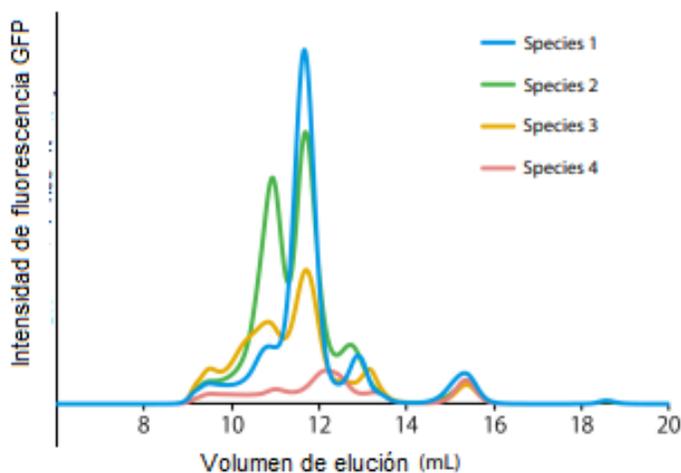
## 15.2 Cromatografía de exclusión por tamaño con detección de fluorescencia (FSEC).

Es importante mencionar que otra variante es la cromatografía de exclusión (FSEC) basada en proteína verde fluorescente (GFP) la cual permite que se fusione con la proteína objetivo. En FSEC, la muestra se analiza mediante un detector de fluorescencia para detectar una señal específica de proteínas fusionadas con GFP, en resumen, el objetivo de esta técnica es separar y monitorear una muestra marcada con fluorescencia.

Los perfiles de cromatografía de fluorescencia resultantes permiten analizar rápidamente el nivel de expresión, la monodispersidad y la estabilidad de las proteínas purificadas y sin purificar a una escala del orden de los nanogramos. FSEC basado en la fusión GFP es adecuado para la detección de alto rendimiento de paneles de ortólogos, mutaciones y proteínas incluso de membrana en diferentes condiciones. Además, la homogeneidad de la proteína fusionada con GFP se puede evaluar a partir de la forma del pico. Se pueden observar en los cromatogramas cuando un pico amplio o picos múltiples sugiere

agregación de la proteína fusionada con GFP. Por el contrario, un pico único muy nítido y alto indica un alto potencial para estudios estructurales. Para ejemplificarlo en la **Figura 25** se toman los resultados obtenidos del estudio realizado por [Morita 2022](#).<sup>60</sup>

**Figura 25:** Ejemplo de Intensidad de fluorescencia GFP en 4 especies diferentes.



\*Extraída de: Morita, 2022.

Como se puede observar el perfil de la especie 1 muestra un solo pico alto, la especie 2 muestra dos picos, lo que de acuerdo con Azusa, 2022, indica que en la muestra participan dos estados diferentes de la misma especie; en la especie 3 ocurrió alguna agregación heterogénea en la muestra ya que el perfil es muy disperso. Dado que el perfil de la especie 4 no muestra un pico evidente, se puede suponer que el nivel de expresión fue bajo o que la solubilización fue insuficiente. En base al cromatograma, la muestra de la especie 1, se puede considerar como óptima para el análisis estructural.

Cabe mencionar que FSEC tiene una amplia gama de aplicaciones, entre ellas en la identificación rápida de proteínas de uso farmacéutico, ya que con esta técnica se permite evaluar las propiedades no solo de las proteínas de membrana, sino también de una amplia gama de proteínas diana en cada paso, desde la expresión hasta la purificación. Sin embargo, se presentan ciertas desventajas en esta técnica, debido a que GFP al ser una proteína altamente estable, su fusión a veces provoca falsos positivos en la detección de FSEC. Además, si no logra manipularse bien la muestra, las proteínas de membrana pueden agregarse o precipitarse inmediatamente después de la eliminación de GFP, esto dependerá de la topología de la membrana de la proteína que se esté analizando, puesto que GFP puede llegar a ser difícil de aplicar.

### 15.2.3 ESPECTROMETRIA DE MOVILIDAD IONICA DE CAMPO

La espectrometría de movilidad iónica asimétrica de campo (FAIMS) es otra de las innovaciones que MS ha tenido, esta permite la separación, caracterización de iones a través de sus diferencias en su movilidad en campos eléctricos altos y bajos.

Gerbasi et al 2022, implementaron FAIMS en fase gaseosa después de LC en fase reversa y antes de MS, utilizando mezclas de células de 0-30 kDa derivadas de CD3+ en campos eléctricos con voltajes de compensación de -40 V a + 30 V, lo cuales permitieron que FAIMS mejorara su señal-ruido del analito de interés, en relación con el fondo (**Figura 26**) en el análisis *Top-down* de proteínas.<sup>75</sup>

De acuerdo con los resultados de dicho estudio, la combinación de técnicas de alta resolución con FAIMS, lograron obtener un aumento del 62% en las identificaciones de proteínas, un aumento del 8% en las identificaciones de proteoformas. El proceso consistió en monitorear la señal de iones precursores en incrementos de voltaje (CV) de 10 V, desde -30 V hasta +20 V, sin en el uso de flujo de gas portador suplementario.<sup>75</sup>

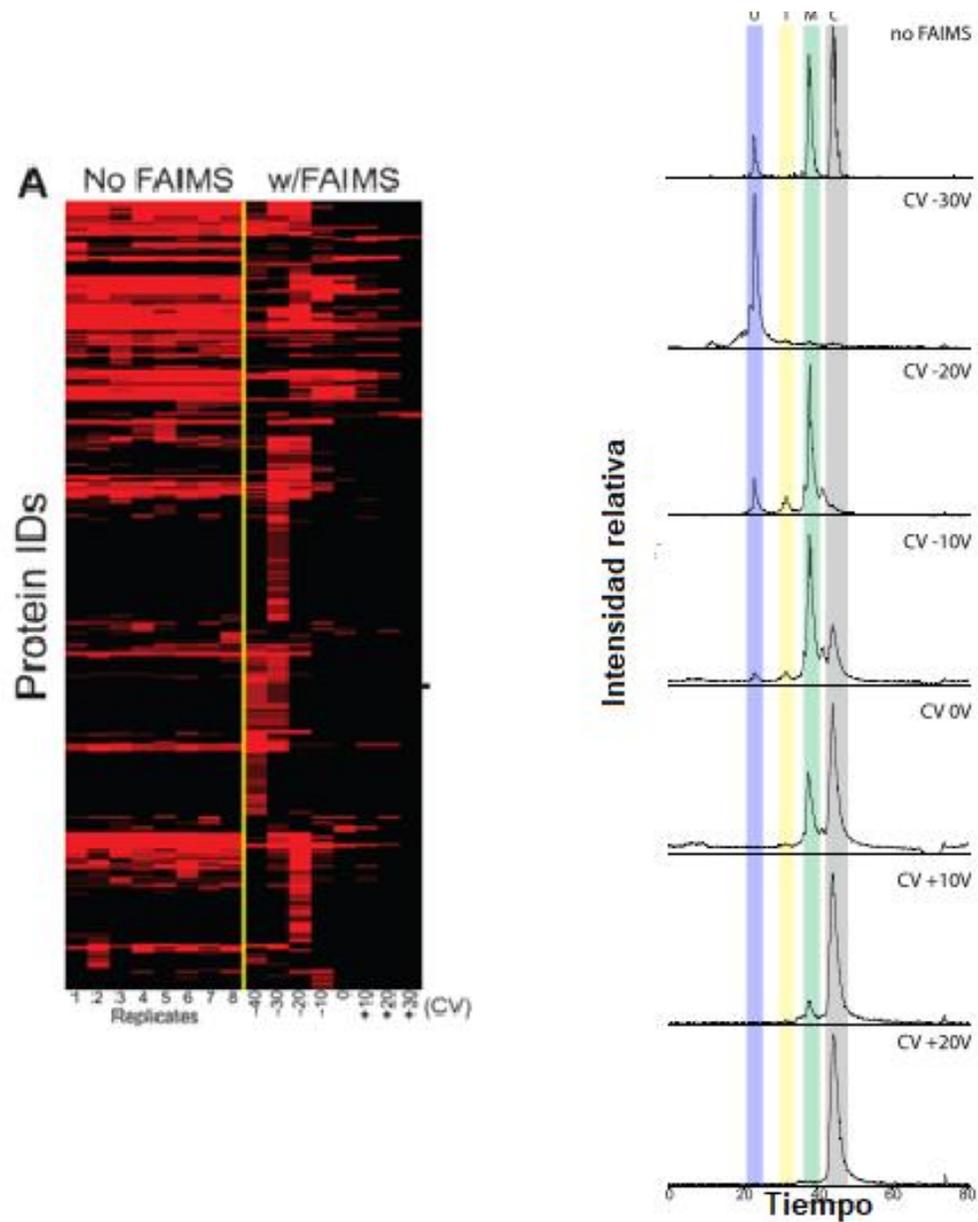
En la **Figura 26** se puede observar que el estudio comparo las muestras sin y con FAIMS, donde esta última permitió la identificación de proteínas en sus tiempos de retención. Es importante mencionar que las especies de proteínas mas grandes prefirieron generalmente CV más positivos. La proteína más intensa que demostró el cromatograma de iones totales (TIC) fue la anhidrasa carbónica (29 kDa), seguida de la mioglobina (16.7 kDa) y la ubiquitina (8.6 kDa). El tripsinógeno (24kDa) fue el pico menos intenso, eluyendo entre ubiquitina y mioglobina.

Por otro lado, en la **Figura 27** En el inciso A) se muestra el histograma de proteoformas de células T CD3+ identificadas en cada voltaje de compensación (CV), en el inciso B) y C) se observan los diagramas de Venn de proteínas y proteoformas identificadas. Como se puede observar, en el estudio de Gerbasi et al 2022, se logró obtener una mayor identificación de proteínas en CV de -20 y -30, se podría decir que esta técnica puede ser optima para la identificación de proteínas de mayor tamaño molecular.<sup>75</sup>

Con base a la información recopilada FAIMS acoplada a técnicas analíticas de alta resolución tiene potencial en el campo de la proteómica ya que puede funcionar como un filtro de peso molécula efectivo para la identificación de proteoformas, teniendo la ventaja de que esta tiene selectividad efectiva en muestras complejas debido a la movilidad de voltaje que se empleen, teniendo así una caracterización más profunda.

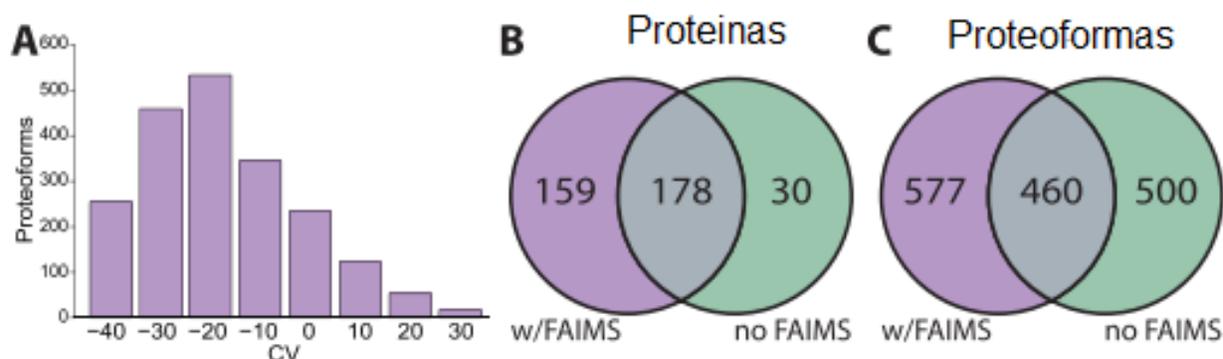
El desarrollo de las nuevas técnicas se centra en la optimización de las actuales reduciendo el riesgo de la perdida de muestra, para ello es importante tener desde el inicio, una correcta manipulación y preparación de la muestra.<sup>75</sup>

**Figura 26:** Mapa de calor a nivel de proteínas de células T CD3+ identificadas sin y con FAIMS aplicando diferentes CV y cromatograma de las proteínas identificadas en el estudio realizado por Gerbasi et al 2022.



\*Ext de: Gerbasi, 2022.

**Figura 27:** Resultados obtenidos en las identificaciones de proteínas y proteoformas en el estudio realizado por Gerbasi et al 2022.



Tomado de: Gerbasi et al 2022.

Cabe rescatar que principalmente los objetivos de la innovación de las técnicas se concentran en aumentar la señal/ruido al identificar, detectar, caracterizar proteínas o péptidos específicos con PTM, así como la mejora del rendimiento para que los ensayos sean útiles para la realización de estudios pre /clínicos. Es por lo que hoy en día también se han desarrollado e implementado el uso de nanoporos en la identificación de proteínas de uso farmacéutico, además ha surgido el desarrollo de softwares de alto rendimiento, como por ejemplo TOPIC por sus siglas en ingles (*TOP-down mass spectrometry-based Proteoform Identification and Characterization*) que permiten el acoplamiento de las señales obtenidas en sus bases de datos, a continuación, se describirá el uso de estas técnicas.

#### 15.4 ToPIC software y su acoplamiento en las técnicas para la identificación y caracterización de proteínas

La espectrometría de masas *top-down*, se ha desarrollado rápidamente debido a los avances en las técnicas de separación de proteínas. Tiene ventajas únicas en la identificación y caracterización de proteoformas (moléculas de proteínas específicas) con alteraciones de la estructura primaria, como mutaciones de aminoácidos y modificaciones postraduccionales (PTM). Sin embargo, los softwares tradicionales para el análisis de datos no permiten una interpretación eficiente para los datos top-down de alto rendimiento, generando un problema computacional desafiante porque las proteoformas intactas a menudo contienen alteraciones de la estructura primaria desconocidas en comparación con las formas no modificadas en la base de datos de proteína, ante esta problemática Quiang y colaboradores en el 2016, desarrollaron ToPIC.<sup>61</sup>

Sin embargo, ¿Qué es ToPIC ?, es una herramienta de software que permite la identificación y caracterización de proteoformas de todo el proteoma de alto rendimiento mediante MS top-down que integra algoritmos para filtrado de proteínas, alineamiento espectral, valor E computacional y con modelos bayesianos para la caracterización de mutaciones de aminoácidos desconocidos y PTM. Además, proporciona una interfaz basada en navegador web fácil de usar.<sup>61</sup>

EL objetivo principal de TopPIC es la identificación y caracterización de alteraciones de estructuras primarias desconocidas y el descubrimiento de nuevas proteoformas. Este software consta de dos componentes, el primero incluye algoritmos para el filtrado de proteínas, la alineación espectral y el cálculo de valores E de las PrSM (módulos de reconocimiento de péptidos). El segundo componente utiliza el método MIScore, el cual se basa en modelos bayesianos para la búsqueda de una o dos modificaciones que identifiquen el cambio de masa desconocido en un PrSM informado, mediante este acoplamiento es posible caracterizar de forma automática los cambios de masa desconocidos.<sup>61,73</sup>

Es resumen se puede decir que el primer componente de ToPIC busca un espectro de masas desconvolucionado en una base de datos de secuencias de proteínas para identificar una PrSM con mejor puntuación, la cual se da a través de un algoritmo filtrado basado en listas enlazadas, reduciendo así el número de proteínas candidatas de los miles que se encuentran en la base de datos. Posteriormente el segundo componente permite que un algoritmo se alinee entre el espectro y cada proteína candidata. ToPIC al agregar varios algoritmos de filtrado aumenta la sensibilidad de identificación. Además, este software puede combinar pares espectrales de MS/MS o tripletes generados a partir del modo de fragmentación alternante de los espectrómetros de masas para así tener mejor cobertura de las secuencias de proteínas.<sup>61,73</sup>

Una gran ventaja que tiene este sistema es el tiempo de búsqueda, ya que a través de los algoritmos de filtración se acelera el proceso de identificación las proteínas objetivo, así como la combinación de espectros mejora la cobertura de secuencias de proteínas en proteoformas identificadas, lo que es esencial para una caracterización y localización precisas de las PTM.<sup>61,73</sup>

### **15.5 Cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis de zona capilar, espectrometría de masas en tándem.**

Dentro de los avances tecnológicos también ha surgido la búsqueda de técnicas que permitan la caracterización de proteínas nativas, es decir sin desnaturalización previa. Cabe mencionar que la proteómica nativa requiere alta resolución y separación, principalmente la separación se ha realizado en fase líquida acoplada de ionización por electropulverización nativa.

Sin embargo, la electroforesis de zona capilar (CZE)-MS/MS tiene un gran potencial para la proteómica nativa debido a la alta eficiencia de separación de proteínas intactas, las

interfases, su capacidad para la separación de alta resolución y la detección altamente sensible de complejos de proteínas en condiciones nativa.

Un estudio realizado por Shen et al en el 2018, desarrollaron un acoplamiento de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) a CZE-MS para el análisis de proteínas provenientes de células de *Escherichia coli*. Para CZE-MS/MS, se utilizó la interfaz de flujo de vaina bombeada electrocinéticamente comercializada (CMP Scientific, Brooklyn, NY) para acoplar CZE a MS. El electrolito de fondo (BGE) y el tampón envolvente fueron de NH<sub>4</sub> Ac 50 mM (pH 6.9) y NH<sub>4</sub> 25 mM (pH 6.9). Se utilizó un espectrómetro de masas Q-Exactive HF (Thermo Fisher Scientific), los análisis CZE-MS/MS se tomaron de las fracciones de SEC.<sup>63</sup>

La ejecución nativa de CZE-MS/MS obtuvo 15 picos principales y se acercó a una ventana de separación de 1 hora. El software TopPIC se usó para la búsqueda en la base de datos de los espectros de MS/MS para la identificación de proteoformas., dentro del análisis se observó que Q-Exactive HF no puede aislar iones con una relación masa-carga (m / z) superior a 2500 para la fragmentación.<sup>63</sup>

En este estudio se enfocaron en la identificación de complejos de proteínas con masa <30 kDa. Se obtuvo como resultado la identificación de un total de 144 proteínas, 23 complejos de proteínas y 672 proteoformas con una tasa de descubrimiento falso (FDR) del 1 % a nivel de espectro y una FDR del 5 % a nivel de proteoforma, además se logró identificar metalproteínas (**Tabla 24**), PTM como acetilación N-terminal, fosforilación, tiocarboxilación C-terminal, 4' fosfopanteteína, biotinalación y enlace difusuro (**Tabla 25**).<sup>63</sup>

**Tabla 24: Algunos de los metales identificados en las proteínas del estudio realizado por Shen 2018.**

Cofactor	MW /(Da)
Mg+2	24
K+	39
Ca (2+)	40
Mn (2+)	55
Fe (2+)	56
Ni (2+)	58.7
Co (2+)	59
Cu (2+)	64
Zn ((2+)	65

• Extraído de: Shen, 2018.

**Tabla 25:** Lista de algunas de las Modificaciones postraduccionales (PTM) detectadas en el estudio de Shen et al 2018.

PTM's	Nombre de la proteína	Error de masa (Da)	E-value
<b>C-terminal tiocarboxilación</b>	Subunidad portadora de azufre de molibdopterina sintasa	-0.09	2.90E-08
<b>Fosforilación en histidina</b>	Componente EIIA específico de glucosa del sistema PTS	-0.07	1.79E-29
<b>Biotinilación</b>	Proteína transportadora de biotina carboxilo de acetil-CoA carboxilasa	-0.2	2.28E-17
<b>4'- fosfopanteína</b>	Proteína transportadora de acilo	-0.92	6.42E41
<b>Enlace disulfuro</b>	Peroxirredoxina Bcp	-0.94	4.35E22
	Proteína de intercambio tiol:disulfuro DsbA	-2.4	1.84E18
	Tiorredoxina 1	-0.01	2.90E-34
	Glutaredoxin 3	0.00	2.40E-27
	Proteína de biogénesis Fe/S NfuA	-0.00	3.88E26
	Supuesta proteína transportadora de azufre YeeD	-0.02	9.86E-14
	Proteína no caracterizada YbgS	-0.02	1.91E-11
	50S proteína ribosomal L31	-0.03	1.22E18

\*Tomado de: Shen, 2018.

### 15.6. Técnicas basadas en Nanoporos para la identificación y caracterización de proteínas de uso farmacéutico.

La demanda de tecnologías que pueden operar a mayor velocidad y producir lecturas más largas ha resultado del desarrollo de nuevos enfoques de identificación, uno de los enfoques es la búsqueda de la portabilidad y mayor apertura de secuenciación.

La nanotecnología surgió en la década de los noventa, sin embargo, presento gran auge en el campo de la proteómica desde la invención del dispositivo de bolsillo MiniON en el 2014 por la plataforma ONT (Por sus siglas en ingles *Oxford Nanopore Technologies*), el cuál aplica la tecnología de secuenciación de nanoporos para análisis de ácidos nucleicos.

Un nanoporo funciona como contador molecular, es un poro sintético que permite diseñar canales de proteínas con el que se permite la detección de biomoléculas en membranas

lipídicas de 5-6 nm, es comúnmente implementado en microfluidos. Pueden ser creados por proteínas que perforaran membrana (bioporo) o de materiales como silicona y grafeno, es por lo que los nanoporos pueden clasificarse en sintéticos y biológicos. El primer nanoporo para la detección de una sola biomolécula utilizó un poro de proteína biológica,  $\alpha$ -hemolisina, para la detección de ARN y ADN monocatenario

Basados en el éxito de la detección y caracterización de ácidos nucleicos, los nanoporos se convirtieron en una alternativa viable para el reconocimiento de secuencias primarias los cuales son basados en una sola molécula, siendo esto importante en un análisis conformacional de péptidos. Los nanoporos de  $\alpha$ -hemolisina se han utilizado para estudiar proteínas, y complejos proteína.<sup>67</sup>

Las aplicaciones potenciales que compromete la detección de nanoporos de proteínas nativas y no modificadas, se pueden resumir en 1) detectar y cuantificar la concentración de una proteína en solución, 2) Analizar el tamaño y la carga de la proteína, 3) Controlar las interacciones o reacciones de unión entre proteínas o una proteína y un ligando para la proporción de datos cinéticos y de equilibrio, 4) Resolver cambios conformacionales en la estructura.<sup>67</sup>

#### 15.6.1 Clasificación de nanoporos<sup>67</sup>:

- **Biológicos (Bioporos):** Son dispositivos compuestos por un solo poro de proteína recombinante incrustado en una bicapa lipídica. La  $\alpha$ -hemolisina es un poro proteico heptamérico con un diámetro interior de 1 nm, unas 100.000 veces más pequeño que el de un cabello humano. Este diámetro tiene la misma escala que muchas moléculas individuales, incluido el ADN. De acuerdo con Varongchayakul et al 2018 y Oxford Nanopore consideran que es un poro es muy estable. Recientemente se están evaluando los poros de proteínas como ClyA, aerolisina, Nfp, y FraC.
- **Nanoporos sintéticos (De estado sólido):** Un nanoporo de estado sólido suele ser un orificio de tamaño nanométrico formado en una membrana sintética (generalmente SiNx o SiO<sub>2</sub>). El poro generalmente es fabricado mediante la escultura de iones enfocados, perforación con haz de electrones, ruptura dieléctrica controlada o perforación directa con láser. Dentro de los nanoporos sintéticos se encuentran los poros de vidrio, híbridos y los nanoporos con sensores integrados. Las técnicas propuestas de estos incluyen detectores basados en electrodos de tunelización, detectores capacitivos y detectores de estado de borde o nano-gap basados en grafeno, la detección a través de estos puede ser una alternativa para la corriente iónica, ya que conserva la información de la señal de corriente iónica con el potencial de lograr una densidad de integración mucho más alta y una velocidad más alta.

Para profundizar un poco mas en los tipos de nanoporos, en la **Tabla 26** se pueden observar los más usados actualmente.

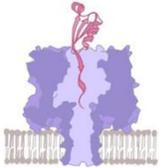
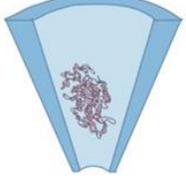
### 15.6.2 Funcionamiento de la técnica:

A modo de resumen esta técnica implementa el uso de un nanoporo, una membrana aislante que separa dos cámaras que contiene una solución electrolítica que permite la ionización de las moléculas, esta es agregada por encima y por debajo del nanoporo, cada uno en contacto con un electrodo y se aplica voltaje para conducir biomoléculas cargadas a través del poro, los iones fluyen libremente a través del poro produciendo una corriente de poro abierto constante. El flujo de iones se ve parcialmente impedido y bajo una fuerza impulsora se obtiene una diferencia en la corriente iónica, así mediante el sensor es capaz de detectar, además debido a su nano escala se puede detectar proteínas de 2 a 10 nm.<sup>65,67</sup>

Esquemáticamente los procesos que se llevan a cabo se muestran en la **Figura 28**, el inciso (a) muestra a los iones que fluyen libremente a través del nanoporo debido a un campo eléctrico aplicado, se genera el bloqueo físico de una proteína de interés que obstruye el flujo de iones, provocando una caída en la corriente del poro. La corriente se restablece una vez que la proteína sale del poro. b) Resultado de una translocación de proteína c) Configuración experimental del sensor de nanoporos. El sensor consiste en una jaula de Faraday para evitar el ruido externo, este es conectado a un escenario frontal (donde se traduce la señal actual al amplificador y a una tarjeta de adquisición de datos, posteriormente los datos son procesados mediante un programa para extraer los eventos de la taza actual.<sup>65,67</sup>

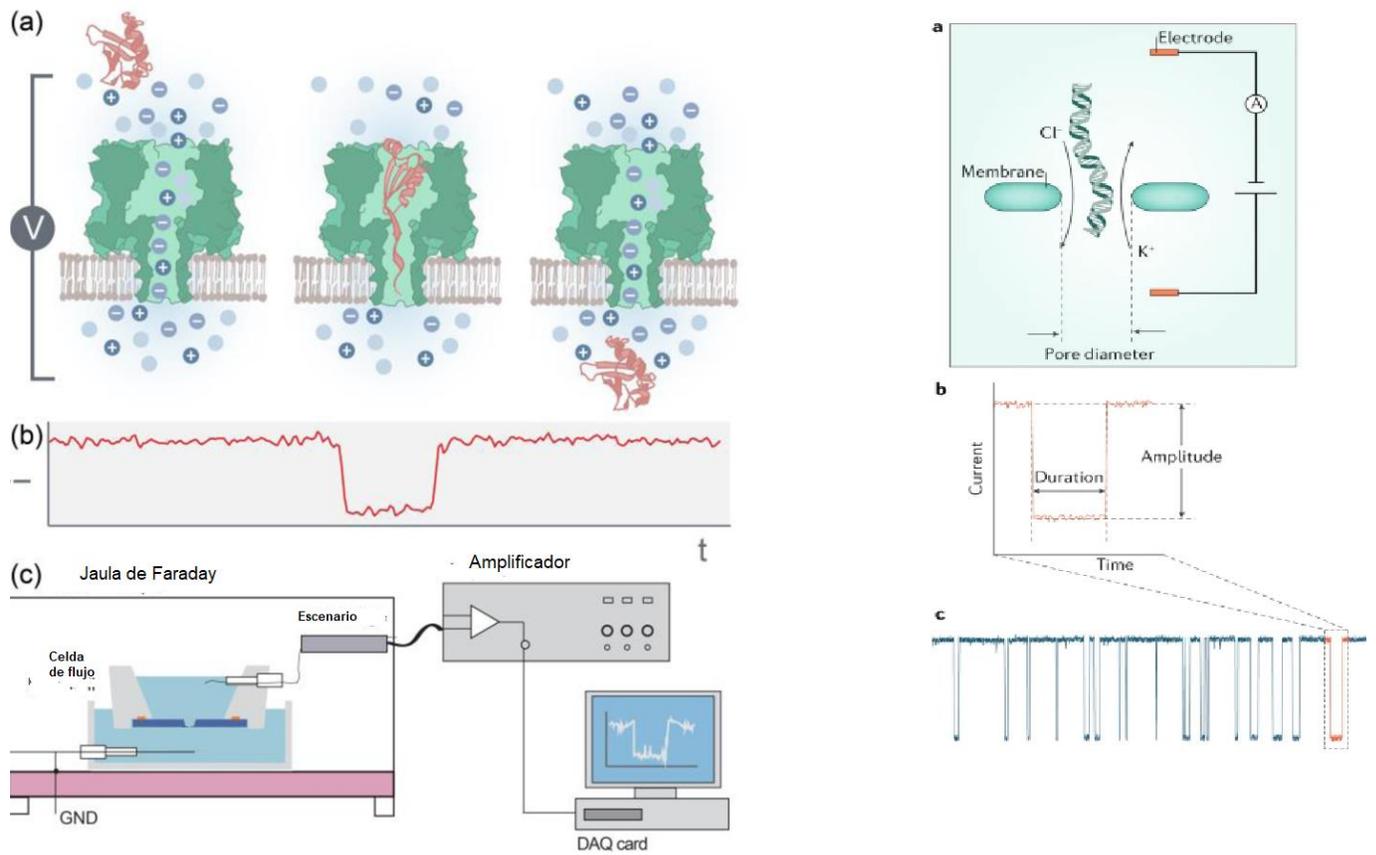
Para la detección del nanoporo es necesario tener en cuenta la geometría del poro, la cual se elige para que sea comparable con la sección transversal de la biomolécula de interés y así maximizar la relación señal, a esto se conoce como translocación, la cual se mide por la corriente de bloqueo fraccional.  $I_B$  es definida como una relación entre la corriente media bloqueada ( $i_b$ ) y la corriente media de poro abierto ( $i_o$ ):  $I_B = i_b / i_o$ . esta se puede expresar de forma matemática en la **Figura 29**.<sup>67</sup>

**Tabla 27: Tipos de nanoporos.**

Tipo de nanoporos	Características	Ventajas	Desafíos
<p>Poros de proteína.</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un poro de proteína biológica suspendido en una membrana lipídica</li> <li>• Técnica de síntesis de proteína recombinante</li> <li>• p. ej., <math>\alpha</math>-hemolisina, ClyA, aerolisina, Nfp, y FraC.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Región de detección bien definida (típicamente 1–2 nm de diámetro, ~1 nm de espesor) Modificación con precisión atómica</li> <li>• Altamente repetible • Bajo ruido eléctrico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Restringe la geometría de los poros y las propiedades químicas de la superficie.</li> <li>• No es compatible con el entorno químico agresivo, como la limpieza con lejía y el tratamiento con plasma.</li> <li>• Mala estabilidad mecánica (debido a la membrana lipídica)</li> </ul>
<p>Poros sólidos</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pequeño orificio incrustado en una membrana independiente en un chip de silicio.</li> <li>• Fresado por haz de electrones o haz de iones, ruptura dieléctrica o perforación con láser.</li> <li>• p. ej. SiNx, HFO2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Diseño geométrico flexible (1-1000 nm de diámetro, hasta un espesor de capa atómica)</li> <li>• Control químico de la superficie</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La perforación con haz de electrones es costosa y lenta</li> <li>• Dificultad para controlar y obtener imágenes de la forma de poro.</li> </ul>
<p>Poros de material de 2D</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pequeño orificio incrustado en una membrana independiente en un chip de silicio.</li> <li>• Fresado por haz de electrones o haz de iones</li> <li>• p. ej. Grafeno, MoS<sub>2</sub></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Modificación química superficial limitada.</li> <li>• Poca estabilidad mecánica</li> <li>• Se desconoce la composición química exacta del borde del nanoporo</li> </ul>
<p>Poros de vidrio</p> 	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Un capilar de vidrio con un extremo cónico.</li> <li>• Extracción de un capilar de vidrio seguido de esculpido con haz de electrones.</li> <li>• p. ej. Borosilicato</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facilidad de fabricación</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tamaño de poro restringido (generalmente &gt; 50 nm)</li> </ul>

\*Tomado de: Varongchayakul et al, 2018.

**Figura 28:** Esquematización del proceso de la técnica basada en nanoporos



\*Extraído de: Varongchayakul et al 2018 y Xue et al, 2020.

**Figura 29: Expresión matemática de la translocación de membrana.**

$$i_o = V/R = V\sigma \left[ \left( \frac{4l}{\pi d^2} \right) + (1/d) \right]^{-1}$$

Donde:

V= Tensión de polarización

R = Resistencia del poro.

$4l/\sigma\pi d^2$  = Restricción geométrica del propio poro (asumiendo un poro cilíndrico)

Es importante mencionar que entre más estrecha sea la región del poro, la caída del campo eléctrico será más grande, y consecuentemente será más rápida la detección.

Por otro lado, dentro de esta técnica existen tres características que son de importancia en los nanoporos.<sup>67</sup>

- 1) Tasa de captura: Es obtenida de la medición del intervalo entre los eventos de la técnica y del ajuste del histograma con la función de decaimiento exponencial. En proteínas la tasa de captura depende de la concentración a granel de la proteína, así como de sus propiedades fisicoquímicas y además el tamaño relativo del poro depende de la concentración a granel de la proteína.
- 2) Amplitud del evento ( $\Delta i$ ): Es proporcional al bloqueo físico del flujo de corriente iónica a través del poro.
- 3) Tiempo de permanencia: Es el tiempo transcurrido entre la caída inicial en la corriente de iones hasta su regreso por encima del mismo nivel, es el reflejo del tiempo en el que la proteína pasa en los poros detectando el volumen.  
Para los nanoporos pequeños, el proceso de translocación puede verse generalmente como un cruce de barrera de energía, por lo tanto, el tiempo de permanencia decae exponencialmente con el voltaje aplicado (el voltaje aplicado reduce la barrera en  $qV$  donde  $q$  es la carga total de proteína y  $V$  es la caída de potencial)

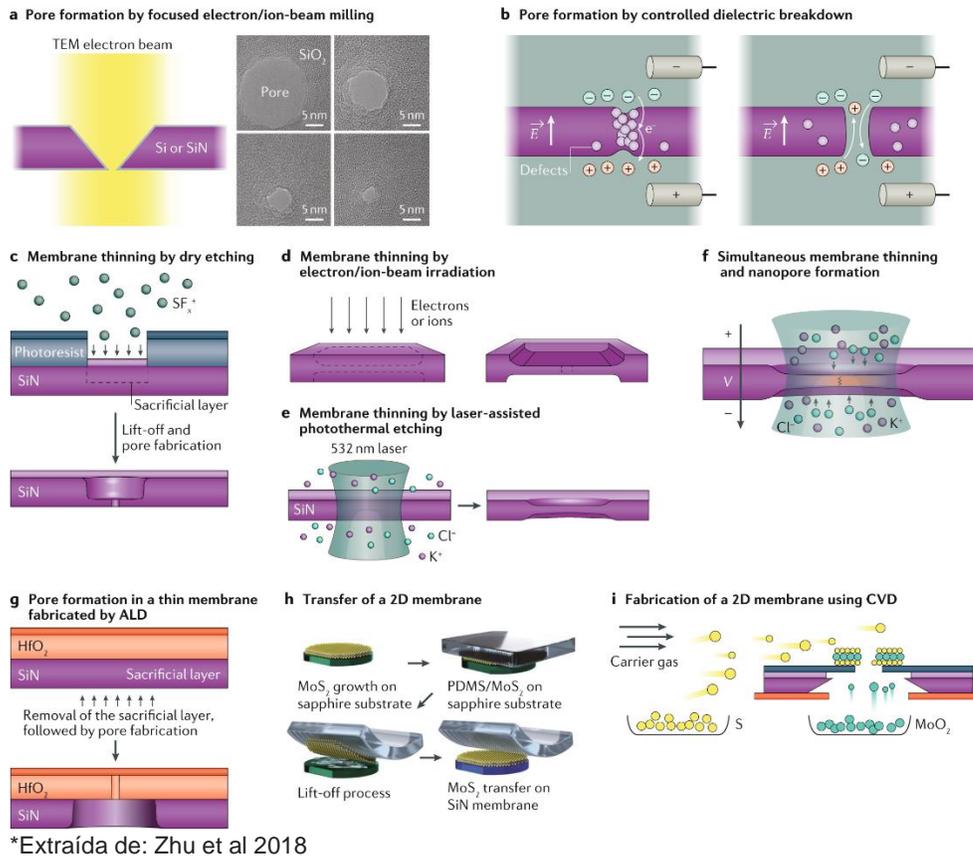
En el estudio realizado por Zhu et al 2018<sup>42</sup> se crearon nanoporos, implementado series de ecuaciones como las que se observó anteriormente, los resultados se muestran en la **figura**, el inciso **a** ilustra la irradiación de electrones que conducen a una reducción gradual del tamaño del nanoporos a 3 nm aproximadamente, aquí se encuentran fotografías que fueron obtenidas del microscopio electrónico de transmisión (TEM). Después se utilizó la ruptura dieléctrica controlada para la fabricación de poros en materiales de membrana como SiN, HfO<sub>2</sub> y SiO<sub>2</sub><sup>69</sup>

Posteriormente, la membrana se sumergió en un electrolito como KCl, NaCl o LiCl y se expuso después a un campo eléctrico(c). Estos autores comentan que los defectos estructurales producidos por la tunelización de la corriente de fuga (inciso d) provocó la ruptura dieléctrica de la membrana y la formación del nanoporo.<sup>69</sup>

La irradiación con haz de iones de helio condujo el adelgazamiento de ambos lados de la membrana de SiN, lo que se ha atribuido a la fluidización y la presión de iones (inciso **e**). Se comenta que el proceso está influenciado por la iluminación láser y también por la composición del electrolito de soporte (**f**). **A través de** la combinación de grabado fototérmico asistido por láser y ruptura dieléctrica controlada se generó el adelgazamiento simultáneo de la membrana y la formación de un nanoporos (g) y la eliminación de la capa produce una membrana delgada y autónoma. Los incisos **h**, **i** muestran las membranas 2D independientes.<sup>69</sup>

El uso de nanoporos, y el procesamiento de muestras por nanogotas en un recipiente para muestras traza (nanoPOTS) han sido dos de los avances más recientes y con mayor aplicación que tienen las técnicas para el análisis de proteínas de uso farmacéutico, esto debido a que permiten el procesamiento de muestras en miniatura.

**Figura 30: Formación del poro de acuerdo con los estudios realizados por Zhu et al 2018**



### 15.6.3 NanoPOTS

Es una plataforma de preparación de muestras de microfluidos que consta de chips de matriz de nanopocillos microfabricados y un sistema robótico de manipulación de líquidos. Está diseñada para el perfil proteómico de muestras biológicas de masa limitada, utilizando espectrometría de masas de cromatografía líquida ultrasensible para medir la expresión global de proteínas.

De acuerdo con Woo et al, 2021, mediante el uso de chips nanoPOTS se reduce la pérdida de muestras en más del 99 % en comparación con otras tecnologías disponibles (Woo, et al 2021). Además, permite una cuantificación global de la abundancia de proteínas en células individuales, por lo que podría proporcionar información directa sobre los fenotipos celulares y las mediciones transcriptómicas del complemento. <sup>48,6564</sup>

### 15.6.4 Componentes del Nanopots

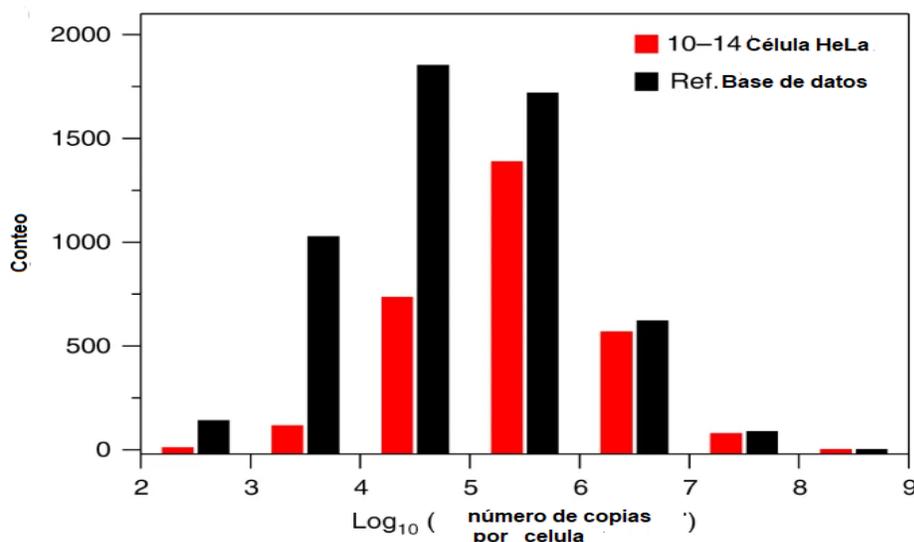
- Un chip de vidrio NanoPOTS es microfabricado con pedestales hidrofílicos modelados fotolitográficamente rodeados por una superficie hidrofóbica para servir como nanopozos para el procesamiento de muestras.

- Consta de portaobjetos de vidrio, este es recubierto con membrana y un espaciador de vidrio, así se minimiza la evaporación del contenido de los nanopocillos durante los diversos pasos de incubación
- Ocupa un sustrato de vidrio el cual facilita la obtención de imágenes microscópicas de las muestras y minimiza la adsorción de proteínas y péptidos debido a su hidrofilia y carga superficial reducida a pH bajo.
- Se utiliza de una plataforma robótica con precisión de posicionamiento submicronica, con la capacidad de manejar con precisión volúmenes de picolitros, reactivos en nanogotas y la recuperación de muestras para análisis posteriores
- Se usa una plataforma robótica con precisión de posicionamiento submicrónica y capacidad para manejar con precisión volúmenes de picolitros para dispensar células, reactivos en nanogotas y la recuperación de muestras para análisis posteriores.

En un estudio realizado por Zhu et al 2018, se pudo evaluar la sensibilidad absoluta de la plataforma global nanoPOTS-LC-MS, mediante etiquetado de epítomos de proteínas enriquecidas (PrEST) y en combinación con el etiquetado de isotopos con aminoácidos en el cultivo celular (SILAC), comparando las proteínas identificadas de 10 a 14 células con las bases de datos notificadas que contenían números de copias de proteínas por célula para células HeLa. En base a los resultados obtenidos los investigadores concluyeron que el límite de detección de nanoPOTS para proteínas es  $<5 \times 10^5$  copias, o  $<830$  zmol.<sup>42</sup>

En la figura se puede observar gráficamente los resultados y la capacidad de detección que tiene el acoplamiento de nanoPOTS con técnicas de analisis de alta resolución.

**Figura 31: Resultados de la evaluación de la sensibilidad absoluta de la plataforma global nanoPOTS-LC-MS**



Extraída de: Zhue et al 2019.

## Discusión.

La importancia de una buena separación, caracterización de proteínas radica en la obtención de la aprobación regulatoria y llegar con éxito al mercado las proteínas terapéuticas, ya que deben fabricarse en condiciones que garanticen su seguridad y eficacia. Además, las proteínas deben mantener su estructura, plegamiento adecuado y con modificaciones postraduccionales específica, es por ello que se requiera de técnicas que permitan realizar el análisis sin generar afectaciones o pérdidas en la muestra.

Uno de los principales desafíos que tienen las técnicas convencionales es la detección de masa limitada o la pérdida de muestra durante la preparación, siendo una de las razones por las que los investigadores han dedicado a explorar métodos novedosos de procesamiento de muestras y separación, que va desde las innovación de técnicas convencionales hasta la invención de nuevas técnicas que permitan realizar las tareas y los requisitos los cuales se expresen también términos de reproducibilidad, rendimiento, rentabilidad, resolución, sensibilidad, versatilidad y robustez como lo menciona Zhu et al 2017<sup>42</sup>

Las innovaciones que ha tenido espectrometría han presentado cierta ventaja dentro del campo farmacéutico, sin embargo, como se menciona en un estudio realizado por Woo 2021<sup>48</sup>, donde señala que LC-MS es una de las más implementadas, sin embargo, pese a que posee alta sensibilidad y mejor precisión en cuantificación, este no permite detectar la cobertura del proteoma, con rendimientos limitados, ya que cada celda requiere un análisis LC-MS de más de 0.5 h de duración. Por otro lado, las limitaciones que se presentan en FSC, FAIMS es el costo que se implementa en el uso de estas técnicas.

Por otra lado la industria farmacéutica alberga tecnologías que han mostrado ser muy prometedoras y han ganado popularidad entre la comunidad de biofísica de moléculas individuales, mientras que otras están disponibles como pruebas de concepto en solo uno o unos pocos laboratorios, una de las técnicas con mayor auge es la tecnología de nanoporos, mediante esta técnica se permite detectar incluso PTM, esto se corrobora con Restrepo et al en 2019, que mediante la técnica de un nanoporo de Fragaceatoxin C, lograron identificar proteínas individuales midiendo los espectros de péptidos con una resolución de  $\sim 40D$ , proteínas con PTMs (fosforilación, O-glicosilación N-acetilglucosamina), también se menciona que la sensibilidad de esta técnica es suficiente para discriminar entre bases de nucleótidos, proteínas en la secuenciación de nanoporos.<sup>76</sup>

De igual forma el impacto que ha tenido el uso de nanoPOTS dentro de la industria ha impactado ya que de acuerdo con Woo, 2021 se permite el análisis de proteínas con sin pérdida de la cantidad de muestra, con la ventaja de obtener buenos resultados en términos de sensibilidad, esto es importante ya que, de acuerdo con Wiley, 2011, cuanto más difieran entre sí la impureza y la proteína objetivo, menores serán las pérdidas de producto en el paso de separación.<sup>48,73</sup>

## **Conclusiones.**

De acuerdo con la información recopilada se pudo conocer las principales proteínas de interés farmacéutico, así como el desarrollo de producción que conllevan. Dada la importancia que tienen en el campo terapéutico, el desarrollo de las nuevas tecnologías radica en la búsqueda de mejorar la capacidad de separación, identificación, caracterización de la proteína de interés terapéutico. Mediante el estudio bibliográfico se pudo conocer las metodologías y equipos que conllevan desde las técnicas convencionales hasta las más actuales logro conocer las ventajas y limitaciones que poseen. Sin embargo, su uso depende de la capacidad del investigador, el presupuesto, así como los equipos y materiales que dispongan, ya que tanto las nuevas tecnologías y las innovaciones de las tradicionales conllevan características específicas.

Es necesario continuar con las investigaciones en torno a nuevas tecnologías analíticas, las cuales permitan desarrollarse sin el requerimiento de materiales y/o equipos costosos, ya que en América latina no se predispone (como en otros países) el uso comercial de estas, al encontrar alternativas con estas características se podrían desarrollar proteínas terapéuticas que permitan sobrellevar los principales problemas terapéuticos que alberga la población latina

## Bibliografía

1. ATA Scientific Instruments. (2021) Protein analysis techniques explained. [<https://www.atascientific.com.au/3-protein-analysis-techniques/>] (Accessed 5 August 2021)
2. Aboueladab E. (2015) Separation, Identification, and characterization of proteins by Novel techniques and application. *European Journal of Academic Essays* 2(8): 34-40.
3. Giménez G. (2003) Métodos revolucionarios para el análisis de macromoléculas. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia* **69 (1)**: 65-74.
4. Tymoczko J *et al.* (2018) Bioquímica con aplicaciones clínicas. *Reverte 7<sup>th</sup>*: 65-109
5. FDA (2019) Development of Therapeutic Protein Biosimilars: Comparative Analytical Assessment and Other Quality-Related Considerations "Guidance for Industry". [<https://www.fda.gov/media/125484/download>] (Accessed 8 August 2021)
6. Leader B *et al.* (2008) Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification. *Nature Reviews Drug Discovery*, **7(1)**: 21–39.
7. Chava K *et al.* (2013) Building better drugs: developing and regulating engineered therapeutic proteins. *Trends in Pharmacological Sciences*. **34(10)**:534- 546
8. FDA. (2021) New Drug Therapy Approvals 2020. *Center for Drug Evaluation and Research*. [<https://www.fda.gov/drugs/new-drugs-fda-cders-new-molecular-entities-and-new-therapeutic-biological-products/new-drug-therapy-approvals-2020>] (Accessed 12 August 2021)
9. Pradera D. (2021) Naturaleza, tipos y propiedades nutricionales de las proteínas. [<http://delnutrientealadieta.com/2016/02/03/modulo-5-1-naturaleza-tipos-y-propiedades-nutricionales-de-las-proteinas/9/>] (Accessed 12 August 2021)
10. Cox D *et al.* (2005) Lehninger principles of biochemistry. *Omega 4<sup>th</sup>*: 59-74
11. Alberts B *et al.* (2007) Biología molecular de la célula. *Garland Science 5<sup>a</sup> edición*: 175.
12. Ardito F *et al.* (2017) The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *International journal of molecular medicine* **40(2)**: 271–280.
13. Chamberlain L *et al.* (2015). The physiology of protein S-acylation. *Physiological reviews*, **95(2)**: 341–376.
14. Muszbek L *et al.* (1999) The pool of fatty acids covalently bound to platelet proteins by thioester linkages can be altered by exogenously supplied fatty acids. *Lipids* **(34)**1337-1999
15. Niethammer P *et al.* (2002) La señalización conjunta de NCAM a través de balsas lipídicas y el receptor FGF es necesaria para la neuritogénesis . *J Cell Biol* **(157)**: 521–532.
16. Chatterjee J *et al.* (2012) N-Methylation of Peptides and Proteins: An Important Element for Modulating Biological Functions. *Angewandte Chemie International Edition*, **52(1)**: 254–269.
17. Georgiev D *et al.* (2019) On the quantum dynamics of Davydov solitons in protein  $\alpha$ -helices. *Physica A: Statistical Mechanics and Its Applications* **(517)**: 257–269.
18. Alberts B *et al.* (2007) Introducción a la Biología Celular. *Editorial Panamericana 5<sup>a</sup> Edición*: 352
19. Vasudevan D *et al.* (2013) Textbook of Biochemistry for Medical Students. *Jaype Brothers Medical Publishers*, 6<sup>th</sup> : 24-46

20. Sadava D *et al.* (2009) *Life, the Science of Biology*. Macmillan Publishers, 9th: 119.
21. Gerald K. (2008) *Biología celular y molecular: conceptos y experimentos*. Interamericana 4<sup>o</sup> edición: 370- 372.
22. Maloy S *et al.* (2013). *Brenner's Encyclopedia of Genetics*. Academic Press 2<sup>nd</sup>
23. Ree R *et al.* (2018) Spotlight on protein N-terminal acetylation. *Exp Mol Med* (50): 1–13.
24. Tak I *et al.* (2019) Posttranslational Modifications of Proteins and Their Role in Biological Processes and Associated Diseases. *Protein Modificomics*: 1–35.
25. Ramazi S *et al.* (2021). Post-translational modifications in proteins: resources, tools and prediction methods. *Database* (2021): 1-20.
26. Drago M *et al.* (2006) Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. *Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas*, **37 (1)**: 38-44.
27. Vecchio I *et al.* (2018) The Discovery of Insulin: An Important Milestone in the History of Medicine. *Frontiers in Endocrinology*.
28. Swiech K *et al.* (2012) Human cells: new platform for recombinant therapeutic protein production. *Protein expression and purification* **84(1)**: 147-153.
29. Ayyar V. (2011) History of growth hormone therapy. *Indian journal of endocrinology and metabolism* (15) 162–165.
30. Center for Biologics Evaluations Reserch CBER (2021) [<https://www.fda.gov/about-fda/center-biologics-evaluation-and-research-cber/what-are-biologics-questions-and-answers>] (Accessed 22 December 2021)
31. Carter J. (2011) Introduction to current and future protein therapeutics: A protein engineering perspective. *Experimental Cell Research*, **317(9)**: 1261–1269.
32. Research and Markets (2021). Therapeutic Proteins Global Market Report 2021: COVID-19 Impact and Recovery to 2030: [[https://www.researchandmarkets.com/reports/5319142/therapeutic-proteins-global-market-report-2021?utm\\_source=GNOM&utm\\_medium=PressRelease&utm\\_code=ldvbdp&utm\\_campaign=1550879+-+Global+Therapeutic+Proteins+Market+Report+2021%3a+Market+is+Expected+to+Reach+%24155.06+Billion+in+2025+at+a+CAGR+of+12.1%25+-+Forecast+to+2030&utm\\_exec=chdo54prd](https://www.researchandmarkets.com/reports/5319142/therapeutic-proteins-global-market-report-2021?utm_source=GNOM&utm_medium=PressRelease&utm_code=ldvbdp&utm_campaign=1550879+-+Global+Therapeutic+Proteins+Market+Report+2021%3a+Market+is+Expected+to+Reach+%24155.06+Billion+in+2025+at+a+CAGR+of+12.1%25+-+Forecast+to+2030&utm_exec=chdo54prd)] (Accessed 22 December 2021)
33. Market Forest. (2022) Global Protein Therapeutics Market Size, Growth 2021 to 2026. *Market Data Forecast*. [<https://www.marketdataforecast.com/market-reports/global-protein-therapeutics-market>] (Accessed 7 December 2021)
34. Ojeda L *et al.* (2016) Fortalecimiento de la regulación sanitaria en las Américas: las autoridades reguladoras de referencia regional. *Rev Panam de Salud Publica* **39(5)**:294–298
35. Gob.mx (2021) Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios | Gobierno. [<https://www.gob.mx/cofepris/que-hacemos>] (Accessed 15 December 2021).
36. FDA (2018) The Drug Development Process. [<https://www.fda.gov/patients/learn-about-drug-and-device-approvals/drug-development-process>] (Accessed 19 December 2021)
37. Merck. 2021. Protein Expression Systems. [<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/technical-article/protein->

biology/protein-expression/protein-expression-systems] (Accessed 28 December 2021)

**38.** Abyntek Biopharma. (2021) Síntesis de péptidos: Algunas claves. [<https://www.abynetek.com/sintesis-de-peptidos-algunas-claves/>] (Accessed 29 December 2021)

**39.** Chiba C *et al.* (2021) Cell-free protein synthesis: advances on production process for biopharmaceuticals and immunobiological products. *Biotechniques* **70(2)**:126-133.

**40.** Zhang L *et al.* (2021) Development and comparison of cell-free protein synthesis systems derived from typical bacterial chassis. *Bioresour. Bioprocess.* **8(58)**: 1-20

**41.** Brookwell A *et al.* (2021) Biotechnology Applications of Cell-Free Expression Systems. *Life* **11** (12): 1367

**42.** Zhu M *et al.* (2017) Industrial Production of Therapeutic Proteins: Cell Lines, Cell Culture, and Purification. *Handbook of Industrial Chemistry and Biotechnology* **93(10)**: 1639–1669.

**43.** Ouellette R *et al.* (2015) Amino Acids, Peptides, and Proteins. *Principles of Organic Chemistry*: 371–396.

**44.** Instituto Nacional del Cáncer (NIH). (2021) Diccionario de cáncer del NCI. [<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/traduccion>] (Accessed 25 September 2021)

**45.** Roche.com. (2021) Protein Production. [[https://www.roche.com/research\\_and\\_development/what\\_we\\_are\\_working\\_on/research\\_technologies/protein-related\\_technologies/protein\\_production.html](https://www.roche.com/research_and_development/what_we_are_working_on/research_technologies/protein-related_technologies/protein_production.html)] (Accessed 06 January 2022)

**46.** Willey *et al.* (2015) Manufacturing of Pharmaceutical Proteins: From Technology to Economy. *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA 2<sup>nd</sup> edition*: 35-101

**47.** Bilal A *et al.* (2017) Proteomics: Technologies and Their Applications. *Journal of Chromatographic Science* **55 (2)**: 182–196.

**48.** Woo J *et al.* (2021) Preparación de muestras de alto rendimiento y alta eficiencia para proteómica unicelular mediante un chip de nanopocillo anidado. *Nature* **12 (6246)**: 1-9

**49.** Yang Z *et al.* (2021). Recent technical progress in sample preparation and liquid-phase separation-mass spectrometry for proteomic analysis of mass-limited samples. *Analytical Methods* **13(10)**: 1214–1225

**50.** Biology texts (2021) Protein Purification [[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Fundamentals\\_of\\_Biochemistry\\_\(LibreTexts\)/01%3A\\_Unit\\_I-\\_Structure\\_and\\_Catalysis/03%3A\\_Amino\\_Acids\\_Peptides\\_and\\_Proteins/3.03%3A\\_Working\\_with\\_Proteins](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Biochemistry/Fundamentals_of_Biochemistry_(LibreTexts)/01%3A_Unit_I-_Structure_and_Catalysis/03%3A_Amino_Acids_Peptides_and_Proteins/3.03%3A_Working_with_Proteins)] (Access 15 January 2022)

**51.** Scientific F. (2022) Centrifugation Theory. *Fishersci.se* [<https://www.fishersci.se/se/en/scientific-products/centrifuge-guide/centrifugation-theory.html>] (Accessed 4 January 2021)

**52.** Ramírez S *et al.* (2021) Purificación de proteínas. *Mens. Bioquim.* **45 (2021)**: 35-47

**53.** Crossley L *et al.* (2022) Protein Characterization Through the Stages. *BioPharm International*. [<https://www.biopharminternational.com/view/protein-characterization-through-stages>] (Accessed 10 February 2022)

54. Rigo B *et al.* (2017). Desarrollo de procedimientos de medida basados en la cromatografía líquida de alta resolución. *Revista del Laboratorio Clínico* **11(3)**:115-176
55. Vesterberg O (1989) History of electrophoretic methods. *J Chromatogr* **3 (19)** 420;480.
56. Tools.thermofisher.com (2022). Electrophoretic [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/appendix/elec\_blotting/overview.pdf] (Accessed 2 March 2022)
57. Biotech Spain (2021) Tipos de ELISA. [[Tipos de ELISA, ¿conoces las diferencias? - Biotech Spain \(biotech-spain.com\)](https://www.biotech-spain.com/)] (Accessed: 03 March 2022)
58. Liangsupree T *et al.* (2021). Modern isolation and separation techniques for extracellular vesicles. *Journal of Chromatography A* **1636(2021)**:
59. Goyon A *et al.* (2018) Unraveling the mysteries of modern size exclusion chromatography - the way to achieve confident characterization of therapeutic proteins. *Journal of Chromatography B*, **1092(2020)**: 368–378
60. Morita, A (2022) Evaluation of Membrane Protein Properties by Fluorescence-Detection Size-Exclusion Chromatography (FSEC) Using an HPLC System: SHIMADZU. Shimadzu Corporation [https://www.shimadzu.com/an/literature/etc/jpz19004.html] (Accessed 4 March 2022).
61. Qiang K *et al.* (2016) TopPIC: a software tool for top-down mass spectrometry-based proteoform identification and characterization. *Bioinformatics* **32 (22)** 3495–3497.
62. Suzuki H *et al* (2022). TMT Sample Preparation for Proteomics Facility Submission and Subsequent Data Analysis [https://www.jove.com/es/t/60970?language=Spanish] (Accessed 20 February 2022)
63. Shen X *et al* (2018). Native Proteomics in Discovery Mode Using Size-Exclusion Chromatography–Capillary Zone Electrophoresis–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* **2018 (90)**: 10095-1099.
64. Tyler A *et al.* (2018) Evaluation of Oxford Nanopore’s MinION Sequencing Device for Microbial Whole Genome Sequencing Applications. *Sci* **8**, 10931
65. Casandei, A *et al* (2020). Nanopore-Based Protein Sequencing Using Biopores: Current Achievements and Open Challenges. *Small Methods*, **1900595**.
66. Vega N *et al* 2022. Introducción al análisis estructural de proteínas y glicoproteínas[[http://ciencias.bogota.unal.edu.co/fileadmin/Facultad\_de\_Ciencias/Publicaciones/Imágenes/Portadas\_Libros/Química/Introduccion\_al\_analisis\_estructural\_de\_proteinas\_y\_glicoproteinas/Analisis\_estructural\_proteinas\_y\_glicoproteinas.pdf] (Accessed 6 March 2022)
67. Varongchayakul N *et al* (2018). Single-molecule protein sensing in a nanopore: a tutorial. *Chemical Society Reviews*, **47(23)** 8512–8524
68. Blankenship, G., 2021. *Environmental Molecular Sciences Laboratory: A DOE Office of Science User Facility*. [https://www.emsl.pnnl.gov/news/new-nanopots-chip-processes---times-the-number-of-cells-in-a-day/8180] (Accessed 12 March 2022)
69. Intellince M (2022 The Monoclonal Antibodies Market | 2022 - 27 | Industry Share, Size, Growth - Mordor Intelligence. *Mordorintelligence.com*. [<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/monoclonal-antibodies-market>] (Accessed 8 April 2022)
70. Walsh C *et al* (2005) Protein Posttranslational Modifications: The Chemistry of Proteome Diversifications. *Angewandte Chemie International* **44**, 7342-7372.

71. Roldan R. (2018) Desarrollo de procesos de proteínas bioterapéuticas: Aumento de la productividad específica en células HEK293. Universidad Autónoma de Barcelona:2-204
72. Jozala A (2016) Biopharmaceuticals from microorganisms: from production to purification. *Brazilian Journal of Microbiology* **(47)**: 51–63.
73. Willey J, et al. (2011) Introducing Proteomics From concepts to sample separation, mass spectrometry and data analysis. *John Wiley & Sons, Ltd*:1-2021
74. Villegas G et al 2022. Procesamiento de imágenes de electroforesis bidimensional: una revisión. *Redalyc.org*. <https://www.redalyc.org/journal/849/84959429008/html/>>] (Accessed 9 April 2022)
75. Gerbasi R et al (2021) Deeper Protein Identification Using Field Asymmetric Ion Mobility Spectrometry in Top-Down Proteomics. *Analytical Chemistry* **93 (16)**: 6323-6328
76. Restrepo L et al (2019). Label-free detection of post-translational modifications with a nanopore. *Nano Letters* **19 (11)**: 7957-7964

