



“Nuevas estrategias para la mejora de la sensibilidad y la selectividad en el análisis de biomarcadores proteómicos y miRNómicos en fluidos biológicos mediante CE-MS”

Autor: Roger Però Gascón

Directores: Dra. Victòria Sanz Nebot y Dr. Fernando Benavente Moreno

Grupo de investigación: Bioanàlisi, Departamento de Ingeniería Química y Química Analítica, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, España.

Fecha de defensa: 3 de noviembre de 2020

Resumen:

En las últimas décadas, el análisis de compuestos biomarcadores en muestras biológicas se ha convertido en una herramienta fundamental para el diagnóstico, seguimiento y pronóstico de diversas enfermedades. Las principales dificultades en muchos casos son la baja concentración de los biomarcadores, la complejidad de la matriz de la muestra y la limitada disponibilidad de muestra. En esta tesis doctoral se presentan nuevas estrategias para la mejora de la sensibilidad y la selectividad en el análisis de péptidos, proteínas y microARNs (miRNAs) biomarcadores en fluidos biológicos mediante electroforesis capilar acoplada a la espectrometría de masas (CE-MS).

La CE-MS es una técnica excelente para la separación de biomoléculas cargadas y su identificación inequívoca. Sin embargo, para obtener separaciones rápidas, eficaces y de elevada resolución, los métodos de separación electroforéticos deben ser optimizados convenientemente. En esta tesis se han desarrollado criterios de calidad basados en la selectividad para la predicción y optimización de las separaciones de mezclas complejas en CE y se ha investigado la separación e identificación de los péptidos beta amiloides, biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer.

Al tratarse de una técnica a microescala, una limitación importante de la CE es su baja sensibilidad en términos de concentración para la mayoría de analitos a causa del pequeño volumen de inyección de muestra. La extracción en fase sólida en línea con la electroforesis capilar (SPE-CE) es una excelente estrategia para disminuir los límites de detección. En esta tesis se han investigado diferentes metodologías de SPE-CE-MS unidireccional empleando sorbentes selectivos, como los sorbentes de inunoafinidad, afinidad a aptámero, afinidad a metal inmovilizado y el carburo de silicio, para el análisis de proteínas intactas (transtiretina y α -sinucleína), digestos de proteínas y miRNAs en fluidos biológicos. También se ha investigado el potencial de la SPE-CE-MS con una nanoválvula para el análisis de péptidos en fluidos biológicos y se han comparado las ventajas e inconvenientes de esta configuración novedosa respecto a la SPE-CE-MS unidireccional.

Finalmente, se han investigado nuevas estrategias para el análisis rápido y eficiente de digestos de proteínas. La tripsina es la enzima proteolítica más comúnmente utilizada y la digestión se realiza habitualmente en disolución, requiriéndose largos tiempos de digestión. Con el objetivo de disminuir el volumen de muestra, su manipulación y el tiempo total de análisis, en esta tesis se ha desarrollado una metodología de análisis de proteínas empleando microrreactores empaquetados con partículas con tripsina inmovilizada en línea con la CE-MS (IMER-CE-MS).