



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**GRADO EN BIOQUÍMICA**

**D.<sup>a</sup> Ana Gallego Santomé**

**APLICACIÓN DE MÉTODOS DE PROTEÓMICA  
BASADOS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS  
PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS DE ORIGEN  
LÁCTEO**

Trabajo Fin de Grado

*Junio 2025*

# ÍNDICE

<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>7</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN GRÁFICO .....</b>	<b>9</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>16</b>
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Materiales .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Origen y preparación de la muestra .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. Procesado de muestras para la medida de la cantidad de proteína total.....</b>	<b>18</b>
<i>3.3.1. Preparación de muestras y patrones.....</i>	<i>19</i>
<i>3.3.2. Medida de la cantidad de proteína .....</i>	<i>20</i>
<b>3.4. Procesado de muestras de desarrollo de método para análisis HPLC-TOF MS.....</b>	<b>21</b>
<i>3.4.1.Preparación de disoluciones para el proceso de digestión .....</i>	<i>22</i>
<i>3.4.2.Proceso de digestión .....</i>	<i>24</i>
<b>3.5. Procesado de muestras para la cuantificación de proteínas mediante HPLC-MS/MS .....</b>	<b>25</b>
<i>3.5.1. Preparación de Mix de péptidos marcados.....</i>	<i>25</i>
<i>3.5.2. Proceso de digestión .....</i>	<i>26</i>

3.6.	<b>Análisis de muestras mediante HPLC-TOF MS</b>	<b>26</b>
3.7.	<b>Análisis de muestras mediante HPLC-MS/MS</b>	<b>29</b>
<b>4.</b>	<b>DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>4.1.</b>	<b>Desarrollo del método MRM para cuantificación de las caseínas</b>	<b>32</b>
4.1.1.	<i>Resultados del análisis de muestras mediante HPLC-TOF MS y análisis bioinformático</i>	32
4.1.2.	<i>Resultados del análisis de muestras mediante HPLC-TOF MS y optimización de transiciones</i>	34
<b>4.2.</b>	<b>Cuantificación de las caseínas mediante HPLC-MS/MS con el método desarrollado</b>	<b>36</b>
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIÓN</b>	<b>45</b>
<b>6.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>46</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>48</b>
7.1.	<b>Funciones biológicas y tecnológicas de salud de cuatro proteínas lácteas seleccionadas para cuantificación mediante MRM</b>	<b>48</b>
7.2.	<b>Código monolítero de aa</b>	<b>49</b>
7.3.	<b>Péptidos de CAS<math>\alpha</math>1 detectados en Protein Pilot</b>	<b>50</b>
7.4.	<b>Péptidos de CAS<math>\alpha</math>2 detectados en Protein Pilot</b>	<b>55</b>
7.5.	<b>Péptidos de CAS<math>\beta</math> detectados en Protein Pilot</b>	<b>57</b>
7.6.	<b>Péptidos de CAS<math>\kappa</math> detectados en Protein Pilot</b>	<b>64</b>

## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

**CAS:** Caseína

**CAS- $\alpha$ 1 o CASA1:** Caseína alfa 1

**CAS- $\alpha$ 2 o CASA2:** Caseína alfa 2

**CAS- $\beta$  o CASB:** Caseína beta

**CAS- $\kappa$  o CASK:** Caseína kappa

**CAS- $\gamma$ :** Caseína-  $\gamma$

**CAS- $\lambda$ :** Caseína-  $\lambda$

**MRM** (*Multiple Reaction Monitoring*): Monitoreo de Reacciones Múltiples

**HPLC** (*High Performance Liquid Chromatography*): Cromatografía Líquida de Alta Resolución

**UPLC** (*Ultra Performance Liquid Chromatography*): Cromatografía Líquida de Ultra Alta Resolución

**LC-MS** (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*): Cromatografía Líquida acoplada a Espectrometría de Masas

**FM:** Fase móvil

**AmBi** (*Ammonium Bicarbonate*): Bicarbonato de amonio

**BSA** (*Bovine Serum Albumin*): Albumina de suero bovino

**Lys-C** (*Lysine-C*): Lisina-C

**DTT** (*1,4-Dithiothreitol*): 1,4-Ditiotreitól

**IAM** (*Iodoacetamide*): Iodoacetamida

**TOF** (*Time Of Flight*): Tiempo de vuelo

**ESI** (*Electrospray Ionization*): Ionización de tipo electrospray

**DDA** (*Data-Dependent Acquisition*): Adquisición dependiente de datos

**IDA** (*Information-Dependent Acquisition*): Adquisición dependiente de información

**CE** (*Collision Energy*): Energía de colisión

**AA/aa**: Aminoácidos

**PTMs** (*Post-Translational Modifications*): Modificaciones Postraduccionales

**Q1**: Cuadrupolo 1

**Q3**: Cuadrupolo 3

**RSD** (*Relative Standard Deviation*): Desviación Estándar Relativa

\*La nomenclatura código monolítico o código de una letra para designar a los aa se encuentra en el *Anexo 7.2*

## RESUMEN

### APLICACIÓN DE MÉTODOS DE PROTEÓMICA BASADOS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA EL ESTUDIO DE PROTEÍNAS DE ORIGEN LÁCTEO

La leche y sus derivados son una fuente esencial de proteínas en la dieta humana, especialmente de caseínas, que representan aproximadamente el 80 % del contenido proteico total. Estas proteínas no solo desempeñan funciones nutricionales, sino que también influyen en la textura, estabilidad y valor tecnológico de los productos lácteos. Debido a su importancia, es necesario contar con métodos analíticos que permitan identificarlas y cuantificarlas de forma precisa y específica en distintas matrices alimentarias. Durante este trabajo se busca el desarrollo de un método de análisis basado en espectrometría de masas en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) acoplado a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS/MS), con el objetivo de identificar y cuantificar de manera simultánea cuatro tipos principales de caseínas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ ) en productos de origen lácteo. Para ello, se ha seguido un enfoque de proteómica *bottom-up*, que consiste en la digestión enzimática de las proteínas presentes en la muestra antes de su análisis. Además, se ha empleado el método AQUA (*Absolute Quantification*), que permite una cuantificación absoluta gracias al uso de péptidos sintéticos marcados isotópicamente que se comportan de manera idéntica a sus homólogos endógenos. Tras la optimización de las condiciones cromatográficas y espectrométricas, el método se aplicó a cinco matrices lácteas: leche, batido, yogur, helado y queso tanto en su estado de materia prima como de producto final. Los resultados revelaron variaciones en la concentración de las diferentes caseínas atribuibles al procesamiento industrial. Este estudio demuestra la utilidad de aplicar técnicas de proteómica para el análisis de proteínas lácteas.

**Palabras clave:** Cuantificar, Caseínas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ ), proteómica, MRM, *bottom-up*, método AQUA, HPLC-MS/MS

## RESUMO

### APLICACIÓN DE MÉTODOS DE PROTEÓMICA BASEADOS NA ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA O ESTUDO DE PROTEÍNAS DE ORIXE LÁCTEO

O leite e os seus derivados son unha fonte esencial de proteínas na dieta humana, especialmente das caseínas, que representan aproximadamente o 80 % do contido proteico total. Estas proteínas non só cumpren funcións nutricionais, senón que tamén inflúen na textura, estabilidade e valor tecnolóxico dos produtos lácteos. Debido a súa importancia, é necesario dispoñer de métodos analíticos que permitan identificalas e cuantificalas de forma precisa e específica en distintas matrices alimentarias. Durante este traballo búscase o desenvolvemento dun método de análise baseado na espectrometría de masas en modo MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) acoplada a cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS/MS), co obxectivo de identificar e cuantificar simultaneamente catro tipos principais de caseínas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  e  $\kappa$ ) en produtos de orixe láctea. Para iso, seguiuuse un enfoque de proteómica *bottom-up*, que consiste na dixestión enzimática das proteínas presentes na mostra antes do seu análise. Ademais, empregouse o método AQUA (*Absolute Quantification*), que permite unha cuantificación absoluta grazas ao uso de péptidos sintéticos marcados isotopicamente que se comportan de maneira idéntica aos seus homólogos endóxenos. Unha vez optimizadas as condicións cromatográficas e espectrométricas, o método aplicouse a cinco matrices lácteas: leite, batido, iogur, xeados e queixo, tanto en estado de materia prima como de produto final. Os resultados amosaron variacións nas concentracións das diferentes caseínas atribuíbles ao procesado industrial. Este estudo demostra a utilidade de empregar técnicas de proteómica no estudo das proteínas lácteas.

**Palabras clave:** Cuantificar, Caseínas ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ ), proteómica, MRM, *bottom-up*, método AQUA, HPLC-MS/MS

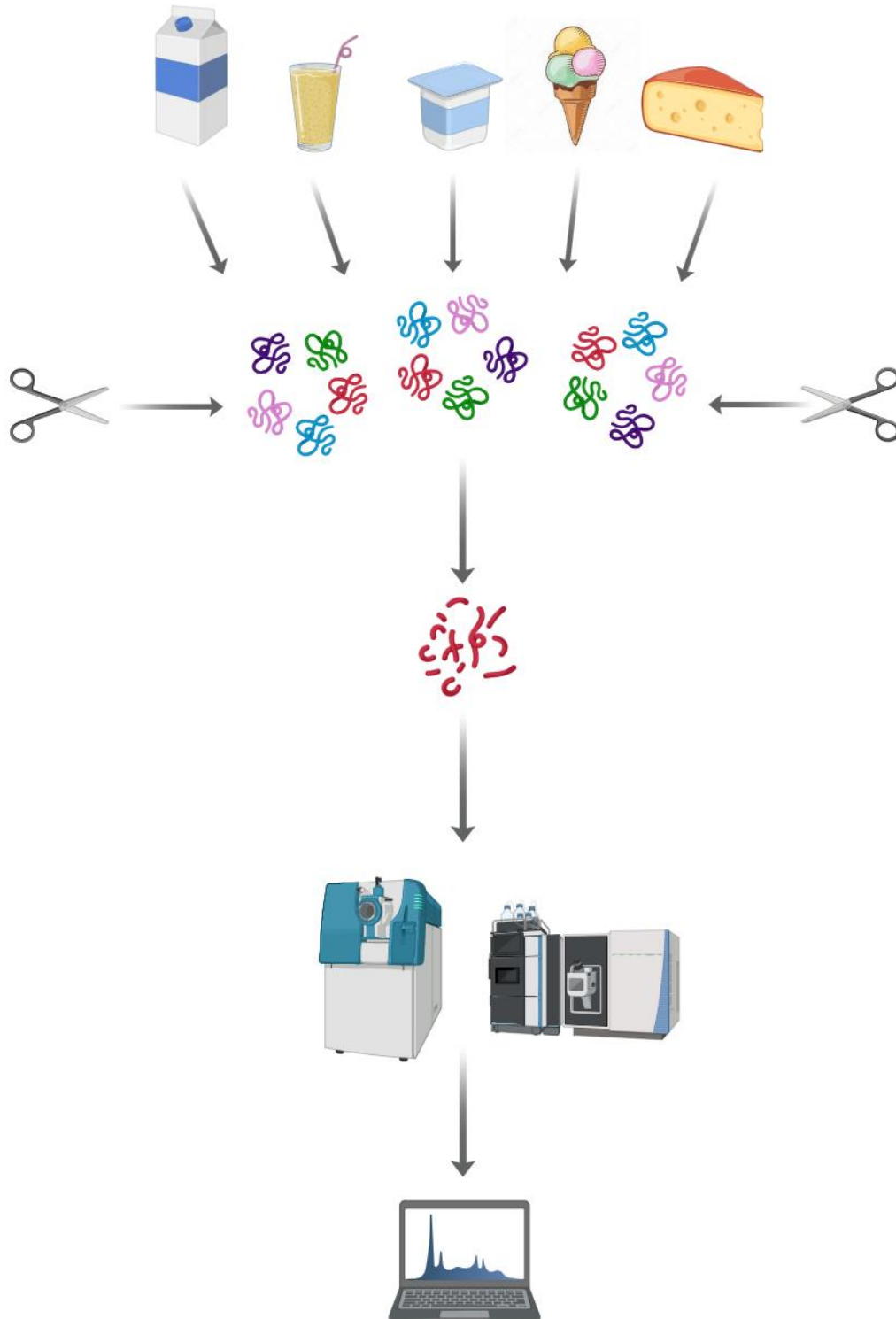
## ABSTRACT

### APPLICATION OF MASS SPECTROMETRY-BASES PROTEOMICS METHODS FOR DE STUDY OF DAIRY PROTEINS

Milk and its derivatives are an essential source of protein in the human diet, especially caseins, which represent approximately 80% of the total protein content. These proteins not only perform nutritional functions but also influence the texture, stability, and technological value of dairy products. Due to their importance, analytical methods are needed to accurately and specifically identify and quantify them in different food matrices. This study seeks to develop an analytical method based on mass spectrometry in MRM (Multiple Reaction Monitoring) mode coupled with high-performance liquid chromatography (HPLC-MS/MS), with the aim of simultaneously identifying and quantifying four main types of caseins ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ , and  $\kappa$ ) in dairy products. To this end, a bottom-up proteomics approach was followed, which consists of the enzymatic digestion of the proteins present in the sample before analysis. Furthermore, the AQUA (Absolute Quantification) method was used, which allows absolute quantification thanks to the use of isotopically labeled synthetic peptides that behave identically to their endogenous counterparts. After optimizing the chromatographic and spectrometric conditions, the method was applied to five dairy matrices: milk, milkshake, yogurt, ice cream, and cheese, both as raw materials and as final products. The results revealed variations in the concentration of the different caseins attributable to industrial processing. This study demonstrates the usefulness of applying proteomic techniques for the analysis of dairy proteins.

**Keywords:** Quantify, Caseins ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$  y  $\kappa$ ), proteomics, MRM, *bottom-up*, AQUA method, HPLC-MS/MS

## RESUMEN GRÁFICO



**Figura 1.** Resumen gráfico de “Aplicación de métodos de proteómica basados en espectrometría de masas para el estudio de proteínas de origen lácteo” (Elaboración propia, creado con BioRender.com)

## 1. INTRODUCCIÓN

La leche destaca por su elevado valor nutricional, al ser una fuente importante de nutrientes esenciales que contribuyen a la salud humana. Esta se caracteriza por ser tanto una suspensión coloidal como una emulsión de aspecto blanquecino y tener un sabor entre dulce y salado. Su composición incluye mayoritariamente agua, acompañada de otros nutrientes clave como hidratos de carbono (destacando la lactosa), lípidos, proteínas, minerales y otros compuestos nitrogenados, tal y como se resume en la *Tabla 1*.

*Tabla 1. Composición de la leche*

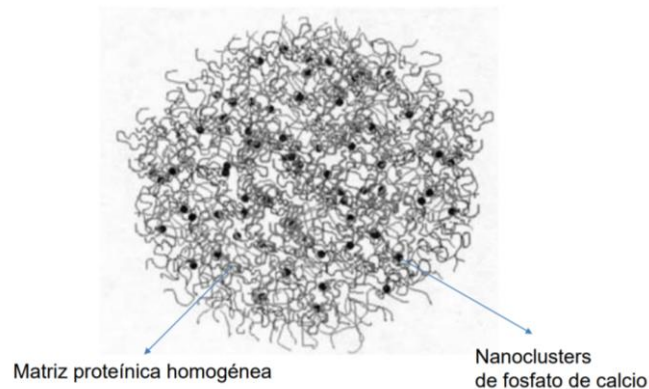
COMPUESTO	COMPOSICIÓN (%)
Agua	87%
Lípidos	3,8%
Proteínas (y otras sustancias nitrogenadas)	3,2%
Hidratos de carbono	5,1%
Minerales y sales	0,9%

No obstante, la importancia de este alimento reside en las proteínas que la constituyen, que son aproximadamente el 3,2% del total en función de factores como la alimentación y la genética del animal, así como de la estación del año y la localización geográfica en la que se ha producido la leche.

El contenido proteico total se clasifica en dos grupos: proteínas solubles e insolubles. La fracción soluble es la que está presente en el suero, mientras que la fracción insoluble (representada por aproximadamente el 80% de las proteínas totales) se compone principalmente por las caseínas, proteínas que definen la calidad de este alimento.

Las caseínas, se clasifican dentro de una familia denominada fosfoproteínas, es decir, proteínas que tienen unido un grupo fosfato mediante un enlace covalente, gracias a una modificación postraducional llamada fosforilación. Se sintetizan únicamente en la

glándula mamaria del animal y se hallan fundamentalmente, formando estructuras denominadas “micelas de caseína” permaneciendo en suspensiones coloidales (*Figura 2*), que son aquellos agregados ricos en calcio, fósforo y aminoácidos, fuente nutricional que favorece tanto al desarrollo del crecimiento como al aporte de energía en los mamíferos.



**Figura 2.** Modelo nanocluster de micela de caseína, De Kruif & Holt (2003) Ramírez Cahero, H. F. (s.f.). VI. Modelos micelares. Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Química. Recuperado el 1 de mayo de 2025

Para la leche de origen bovino, las caseínas se clasifican en cuatro grupos: alfa 1 ( $\alpha_1$ ), alfa 2 ( $\alpha_2$ ), beta ( $\beta$ ) y kappa ( $\kappa$ ), mientras que en la leche humana las caseínas presentes en mayor medida son las CAS- $\beta$  y CAS- $\kappa$ , además de encontrarse también la caseína-  $\gamma$  derivada de la degradación de la CAS- $\beta$  y la caseína-  $\lambda$  derivada de la CAS- $\alpha_1$ . Sus proporciones relativas en leche se detallan en la *Tabla 2*.

**Tabla 2.** Tipos de caseínas y su proporción relativa en leche bovina. Adaptada de: Rijnkels, (2002); Farrell Jr et al. (2006); Livney, (2010); Barbosa et al. (2012)

TIPO DE CASEÍNA	PROPORCIÓN RELATIVA (%)	CONTENIDO EN LECHE (g/L)
CAS- $\alpha_1$	39-46	12-15
CAS- $\alpha_2$	8-11	3-4
CAS- $\beta$	25-35	9-11
CAS- $\kappa$	8-15	3-4

Estas moléculas de origen proteico cuya masa molecular oscila entre los 19-25 kDa, son de tamaño muy reducido como se puede observar en la *Tabla 3*, lo que favorece su elevada estabilidad. Asimismo, la hidrofobidad superficial que poseen contribuye a una mayor flexibilidad y a una desnaturalización fácil gracias a su estructura.

**Tabla 3.** *Propiedades moleculares de las caseínas. Adaptada de: Farrell Jr et al. (2004) y Broyard & Gaucheron, (2015)*

TIPO DE CASEÍNA	PESO MOLECULAR (kDa)
CAS- $\alpha$ 1	23,58
CAS- $\alpha$ 2	25,23
CAS- $\beta$	24,03
CAS- $\kappa$	19,02

Con todo, el estudio y análisis de las proteínas que contiene la leche y sus derivados es de gran interés para el ser humano, en cuanto a salud y optimización de los procesos industriales a nivel de alimentación necesarios para su producción.

La metodología más empleada en proteómica para la cuantificación de proteínas comprende las técnicas ELISA o Western Blot. Sin embargo, éstas requieren de materiales y reactivos específicos para cada proteína, cuyo desarrollo implica tiempo y esfuerzo siendo más estrictivas que los nuevos métodos basados en espectrometría de masas acoplados a cromatografía líquida que permiten la detección simultánea de varias proteínas de forma específica en un sólo análisis, utilizando espectrómetros de masas de triple cuadrupolo en modo MRM.

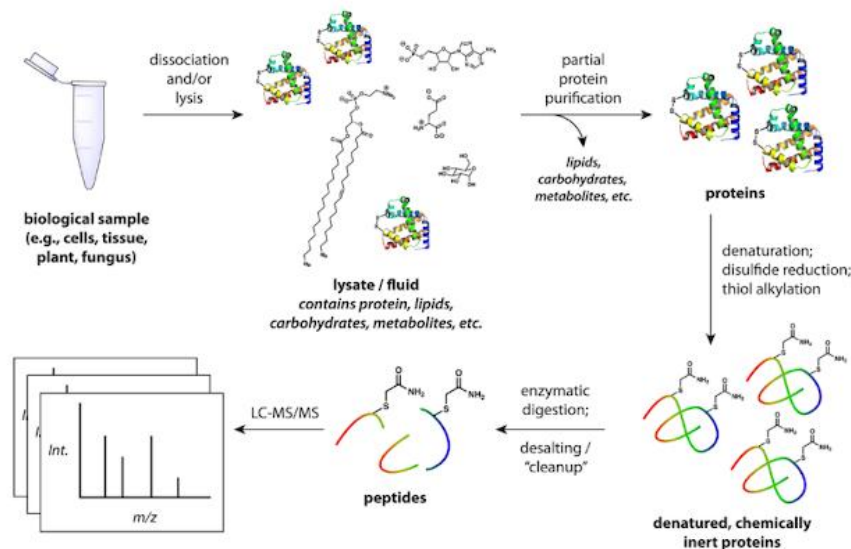
MRM es una técnica de espectrometría de masas empleada para cuantificar proteínas a través de sus péptidos derivados en base a las intensidades de señal correspondientes. Se basa en seleccionar péptidos (iones precursores específicos) y monitorizar sus fragmentos (iones producto) en un espectrómetro de masas del tipo triple cuadrupolo. Son, por tanto, unos métodos altamente sensibles y específicos y que

aumentan la selectividad a la hora del análisis de muestras complejas como son las matrices alimentarias.

En este estudio, se va a desarrollar un método MRM basado en una estrategia “bottom-up” o también denominada como proteómica “shotgun” para la cuantificación específica y simultánea de las caseínas alfa 1 ( $\alpha_1$ ), alfa 2 ( $\alpha_2$ ), beta ( $\beta$ ) y kappa ( $\kappa$ ) en productos lácteos. Para la cuantificación se va aplicar la aproximación AQUA que consiste en añadir a las muestras péptidos marcados isotópicamente en una concentración conocida similar a la concentración de sus homólogos naturales presentes en la muestra.

El enfoque “bottom-up” es el flujo de trabajo más común para identificar proteínas y caracterizar sus secuencias de aminoácidos y modificaciones postraduccionales mediante espectrometría de masas. Este método requiere de una digestión proteolítica de las proteínas antes del análisis. Del análisis de los péptidos en el digerido se puede obtener la secuencia de aminoácidos de la proteína (mapa peptídico) y la comparación de dicha secuencia con bases de datos de proteínas, lo que permite la identificación de dicha proteína, así como de los aminoácidos que presentan modificaciones como puentes disulfuro o glicosilaciones.

El procesado de muestra que se lleva a cabo para hacer un estudio con enfoque “bottom-up” se muestra en la *Figura 3*.



**Figura 3.** Flujo de trabajo de proteómica mediante un enfoque “bottom-up”

Shuken, S. R. (2023). An Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Journal of Proteome Research.*, 22(7), 2151–2171. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00838>

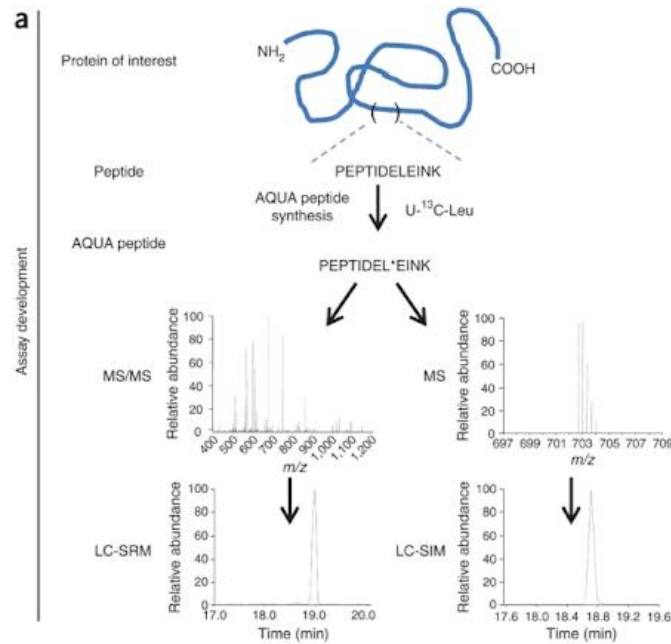
En primer lugar se lisan las células o tejidos que se encuentran en la muestra para liberar su contenido, se purifican parcialmente las proteínas, es decir, se eliminan los demás componentes que no tengan naturaleza proteica, posteriormente se desnaturalizan y se hace una digestión con diferentes enzimas como la tripsina, que corta los enlaces peptídicos en los extremos carboxilo terminal de los aminoácidos K y R, la Lys-C que actúa escindiendo el extremo carboxilo terminal de la K o ambas, lo que conlleva una fragmentación de proteínas en péptidos más pequeños. Por último, se analizan mediante HPLC-MS/MS.

Además, el método “*bottom-up*” no solo tiene aplicación en la caracterización e identificación de proteínas, sino que también tiene aplicación para su cuantificación. Así, y aunque existen diferentes métodos para la cuantificación de proteínas mediante espectrometría de masas, me voy a centrar en el método AQUA (*Absolute Quantitation*) (*Nat Protoc. 2011 February ; 6(2): 175–186. doi:10.1038/nprot.2010.196.*).

Este método permite una cuantificación absoluta de las proteínas y sus modificaciones postraduccionales de una manera sensible y específica en mezclas complejas mediante la adición a la muestra de péptidos marcados isotópicamente con isótopos estables como son:  $^{18}\text{O}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^2\text{H}$  o  $^{15}\text{N}$ .

Estos péptidos AQUA sintéticos son indistinguibles de sus homólogos endógenos con respecto al tiempo de retención, la eficacia de ionización y el mecanismo de fragmentación; sólo se diferencian del péptido endógeno en la masa que poseen, por lo que son un estándar ideal. Así utilizando la cantidad conocida del péptido AQUA que se ha agregado y la relación de la intensidad de ambos péptidos (AQUA y endógeno) se puede calcular la cantidad de péptido endógeno.

El flujo de trabajo para el desarrollo de un método de cuantificación con péptidos AQUA se muestra en la *Figura 4*.



**Figura 4.** Esquema del flujo de trabajo de un método empleando péptidos marcados isotópicamente

Kettenbach, A. N., Rush, J., & Gerber, S. A. (2011). Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides. *Nature Protocols*, 6(2), 175–186. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.196>

Una vez seleccionada la proteína de interés se selecciona un péptido específico de esa proteína para la síntesis de su equivalente marcado isotópicamente (es muy importante que el péptido elegido sea exclusivo de la proteína de interés y que la única diferencia con el péptido endógeno sean la presencia de los isótopos). Una vez sintetizado el péptido AQUA, este se adiciona en una concentración conocida a la muestra (idealmente una concentración similar a la que contiene la muestra de péptido endógeno)

Para el análisis de la muestra que contiene la mezcla de péptidos, tanto los péptidos AQUA como endógenos, se utiliza un HPLC acoplado a un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo con un método MRM optimizado para la detección de ambos péptidos. Por norma general para cada péptido se seleccionan las dos transiciones (m/z ion precursor--m/z ión fragmento) más intensas, la de mayor intensidad se utiliza para cuantificar y la segunda para la confirmación de identidad del pico. Finalmente, a partir de la señal obtenida para el péptido AQUA se determina la cantidad del endógeno.

## 2. OBJETIVOS

En el presente trabajo de fin de grado se tiene como **objetivo general** el desarrollo de un método analítico mediante HPLC-MS/MS que permita la detección y cuantificación simultánea de las caseínas alfa 1 ( $\alpha_1$ ), alfa 2 ( $\alpha_2$ ), beta ( $\beta$ ) y kappa ( $\kappa$ ) y el estudio de su aplicación en una gama de productos lácteos heterogéneos (leche, batido, helado, yogur y queso).

Los **objetivos específicos** de este proyecto fueron:

1. Realizar la digestión trípica de diferentes matrices lácteas y analizar los digeridos mediante HPLC-TOF MS para separar e identificar los péptidos generados en la digestión a partir de cada caseína
2. Procesar los datos obtenidos para seleccionar de entre los péptidos detectados para cada caseína al menos un péptido específico que se utilizará para su cuantificación.
3. Para los péptidos seleccionados seleccionar las dos transiciones (masa ión precursor-masa ión fragmento) que producen mejor señal y optimizar las condiciones cromatográficas y del espectrómetro de masas de triple cuadrupolo para su detección mediante HPLC-MS/MS
4. Evaluar el proceso de digestión en las matrices lácteas: leche, batido, yogur, helado y queso.
5. Análisis por duplicado de una muestra de materia prima y una muestra de producto final para cada matriz utilizando el método analítico HPLC-MS/MS desarrollado.

## 3. MATERIAL Y MÉTODOS

### 3.1. Materiales

AmBi (Calidad LC-MS, Sigma-Aldrich), Urea (Scharlau), Agua (H<sub>2</sub>O, Calidad LC-MS, Supelco), acetona (Calidad HPLC, Pureza  $\geq$  99,8%, Fisher Scientific), BSA (2,0mg/ml en solución salina ultrapura al 0,9 % con azida sódica al 0,05 %, Thermo Scientific), Pierce Bradford Plus Protein Assay Kit (Thermo Scientific), DTT (Sigma-Aldrich), IAM (Pureza  $\geq$  99%, Sigma-Aldrich), estándares de péptidos marcados isotópicamente: YLGYLEQLL- $\{^{13}\text{C}_6 \text{ }^{15}\text{N}_4 \text{ Arg}\}$  para CASA1, FALPQYL- $\{^{13}\text{C}_6 \text{ }^{15}\text{N}_2 \text{ Lys}\}$  para CASA2, GPFPII- $\{^{13}\text{C}_5,^{15}\text{N Val}\}$  para CASB, YIPIQYVLS- $\{^{13}\text{C}_6 \text{ }^{15}\text{N}_4 \text{ Arg}\}$  para CASK (Life Protein), Metanol (Calidad LC-MS, Supelco), Trypsin/Lys-C (Mass Spec Grade, Promega), Ácido Fórmico (Calidad LC-MS, Fisher Chemical), Acetonitrilo (AcN, Calidad LC-MS, Supelco), Ácido trifluoroacético (TFA, Calidad HPLC, Scharlau).

### 3.2. Origen y preparación de la muestra

En el presente estudio se trabajará con cinco muestras diferentes obtenidas entre los años 2024-2025 de productos lácteos: leche, batido, yogur, helado y queso procedentes de diferentes clientes de la empresa, de los cuales no se aportará ningún tipo de dato por motivos de confidencialidad.

Asimismo, se diferenciarán dos grupos de muestras con las que se trabajará a lo largo del proyecto: las muestras “de desarrollo” y las muestras de estudio denominadas como “materia prima” y “producto final”.

Las muestras de desarrollo están constituidas por muestras de producto final representativas de cada una de las matrices mientras que las muestras de estudio están conformados por los mismos derivados lácteos, pero se diferencian que para evaluar el efecto del proceso de producción en el contenido caseínas se incluye un “producto final”

que es aquel que ya está envasado y listo para ser comercializado, es decir, el producto lácteo *per se* como puede ser un helado, y su “materia prima” la leche que se ha utilizado para producirlo.

Las muestras fueron conservadas inicialmente a una temperatura de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Antes del procesado se sometieron a un descongelado gradual, pasando por un congelador cuya temperatura aproximada era de  $-20^{\circ}\text{C}$  y luego a temperatura de refrigeración de aproximadamente  $18,8^{\circ}\text{C}$ .

El procesado de muestra para el desarrollo del método analítico instrumental fue similar al aplicado para la cuantificación mediante HPLC-MS/MS constando de las siguientes etapas:

- 1- Cuantificación de la cantidad de proteína total en las muestras mediante el método de Bradford
- 2- Digestión con tripsina/LysC, (previa adición de un mix de los péptidos marcados isotópicamente con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  a una concentración conocida para el caso de la cuantificación)

### **3.3. Procesado de muestras para la medida de la cantidad de proteína total**

El tener una estimación inicial de la proteína total presente en la muestra es imprescindible tanto para la etapa de desarrollo del método analítico en la optimización del proceso de digestión, ya que la cantidad de enzima Tripsina/LysC a añadir depende de la cantidad de proteína que se vaya a digerir, como también para la etapa de análisis de muestras mediante HPLC-MS/MS para la cuantificación específica de cada caseína, ya que si el objetivo es comparar los resultados entre las muestras de materia prima y de producto final, se debe tomar la misma cantidad de muestra de cada uno.

La cuantificación proteica se llevó a cabo por duplicado empleando el kit comercial Pierce Bradford Plus Protein Assay, basado en el método colorimétrico de

Bradford. Debido a su distinta naturaleza el procesado de muestra difiere entre las muestras de leche y batido y las muestras de yogur, helado y queso, que al ser sólidas requieren de una etapa previa de extracción de la proteína.

### 3.3.1. Preparación de muestras y patrones

#### **Reactivos**

- AmBi (Calidad LC-MS, Sigma-Aldrich)
- Urea (Scharlau)
- Agua (H<sub>2</sub>O, Calidad LC-MS, Supelco)
- Acetona (Calidad HPLC, Pureza  $\geq 99,8\%$ , Fisher Scientific)
- BSA (2,0mg/ml en solución salina ultrapura al 0,9 % con azida sódica al 0,05 %, Thermo Scientific)
- Pierce Bradford Plus Protein Assay Kit (Thermo Scientific)

#### **Preparación de disoluciones y patrones de calibrado**

- Buffer de digestión AmBi 50mM + Urea 2M

Se pesan 197,6 mg de AmBi y 6g de urea y se disuelven empleando como disolvente agua hasta enrasar el matraz y llegar a un volumen de 50mL.

- Patrones para la recta de calibrado

Como estándar para construir la recta de calibrado se usa la disolución de BSA que viene en el Pierce Bradford Plus Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Los patrones se preparan mediante diluciones empleando como diluyente agua.

#### **Preparación de muestra**

En cuanto a las dos primeras muestras (leche y batido), se comienza tomando dos alícuotas de 60 $\mu$ L y llevándolas a tubos eppendorf de 2mL; mientras que, en el yogur, helado y queso se pesan dos alícuotas de 50mg de cada muestra y se les añaden 50 $\mu$ L de buffer de digestión AmBi 50mM + Urea 2M y se sonicán durante 30 minutos las muestras

en un baño ultrasonidos (OVAN). A partir de este punto el procesado es el mismo para las cinco matrices.

Una vez sonicadas las muestras, se adicionan a las cinco matrices 1mL de acetona fría y tras una hora de espera se centrifugan para precipitar las proteínas. El sobrenadante se descarta y el pellet restante (donde se encontrarían principalmente las proteínas a cuantificar y otras biomoléculas tales como lípidos, hidratos de carbono y otros) se resuspende en 2mL de agua.

### 3.3.2. Medida de la cantidad de proteína

Inmediatamente después de la resuspensión se pipetea por duplicado 10 $\mu$ L tanto de las diluciones de los patrones de la recta de calibrado, como de las muestras en cada uno de los pocillos de una microplaca de 96 Thermo Scientific™.

Para la medida de la proteína se empleó un kit basado en el método de Bradford “*Pierce Bradford Plus Protein Assay Kit*”. El principio del kit se basa en la unión de un colorante denominado “Azul de Coomassie” a las proteínas que se encuentren en una muestra, generándose un cambio de color proporcional a la concentración proteica, cuantificable mediante espectrofotometría a 594 nm. Tras pipetear los 10 $\mu$ L en la microplaca se añaden 300 $\mu$ L del reactivo de Bradford Plus Protein Assay tanto a las muestras como a los patrones donde se observará un cambio de color de marrón a azul (*Figura 5*) dependiendo de la concentración de proteína (cuanta mayor concentración de proteína haya en la muestra, mayor será la intensidad del color azul que se verá en el pocillo).

Por último, se mide la absorbancia a una longitud de onda de 594nm de cada uno de ellos en un lector de placas (BMG Labtech).



*Figura 5. Microplaca de 96 pocillos en donde se ve la reacción de cambio de color con el reactivo Bradford Plus Protein Assay*

De esta manera, gracias a la recta de calibrado, en la que se representa el valor de la absorbancia-blanco de los patrones de BSA frente a la concentración de proteína en  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  podemos obtener el valor de la concentración de proteína que hay en cada muestra.

### **3.4. Procesado de muestras de desarrollo de método para análisis HPLC-TOF MS**

Como se ha mencionado anteriormente, en los estudios “bottom-up” de proteómica es preciso hacer una digestión enzimática de las proteínas presentes para poder luego analizar la mezcla de péptidos obtenida.

El proceso conlleva la fragmentación de las proteínas que hay presentes en las diferentes muestras en moléculas más pequeñas, denominadas péptidos mediante el uso de una proteasa, una enzima que rompe los enlaces peptídicos. En este caso se empleó un combinado de tripsina/LysC que ha demostrado una mayor eficiencia de digestión que el uso sólo de tripsina.

La digestión es un paso crítico para obtener resultados óptimos tanto en la caracterización como en la cuantificación proteínicas, pues de no conseguir una digestión completa podríamos perder información de parte de la secuencia de ésta o en caso de estar cuantificando la proteína con una aproximación AQUA, obtener un resultado por debajo de la concentración real ya que los moles de péptido cuantificados no se corresponderían con los moles de proteína presentes.

El proceso de digestión optimizado es igual tanto para las muestras de desarrollo que se analizaron mediante HPLC-TOF MS para la identificación de los péptidos.

### 3.4.1. Preparación de disoluciones para el proceso de digestión

#### **Reactivos**

- AmBi (Calidad LC-MS, Sigma-Aldrich)
- Urea (Scharlau)
- Agua (H<sub>2</sub>O, Calidad LC-MS, Supelco)
- DTT (Sigma-Aldrich)
- IAM (Pureza  $\geq$  99%, Sigma-Aldrich)
- Metanol (Calidad LC-MS, Supelco)
- Trypsin/Lys-C (Mass Spec Grade, Promega)
- Ácido Fórmico (Calidad LC-MS, Fisher Chemical)
- Acetonitrilo (AcN, Calidad LC-MS, Supelco)
- Ácido trifluoroacético (TFA, Calidad HPLC, Scharlau).

#### **Preparación de disoluciones**

- Buffer de digestión AmBi 50mM + Urea 2M y Buffer de digestión AmBi 50mM

La preparación de ambas disoluciones buffer se realizan del mismo modo al detallado en el apartado 3.2.1. Téngase en cuenta que al segundo buffer no se le añade urea.

- Disolución DTT 500mM

Se pesan 38,6 mg de DTT en un eppendorf de 1,5mL y se disuelven en 500 $\mu$ L empleando como disolvente agua.

- Disolución IAM 500mM

Se pesan 46,2 mg de IAM en un eppendorf de 1,5mL y se disuelven en 500 $\mu$ L empleando como disolvente agua.

- Disolución Tripsina/Lys-C 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ L

Para la preparación de esta disolución se emplearán los siguientes reactivos: AmBi (Calidad LC-MS, Sigma-Aldrich) y Trypsin/Lys-C (Mass Spec Grade, Promega).

Se coge un volumen de 200 $\mu$ L de AmBi 50mM (pH=8) y se lleva a un eppendorf de 1,5mL donde se le adicionan 20 $\mu$ g de Trypsin/Lys-C.

- FMA: H<sub>2</sub>O + 0,1% Ácido Fórmico

Para la preparación de esta disolución se emplearán los siguientes reactivos: Agua (H<sub>2</sub>O, Calidad LC-MS, Supelco) y Ácido Fórmico (Calidad LC-MS, Fisher Chemical).

Se coge un volumen de 500 $\mu$ L de ácido fórmico y se le adiciona agua hasta enrasar el matraz y llegar a un volumen de 500mL de disolución.

- FMB: Acetonitrilo (AcN) + 0,1% Ácido Fórmico

Para la preparación de esta disolución se emplearán los siguientes reactivos: Acetonitrilo (AcN, Calidad LC-MS, Supelco) y Ácido Fórmico (Calidad LC-MS, Fisher Chemical).

Se coge un volumen de 500 $\mu$ L de ácido fórmico y se le adiciona acetonitrilo hasta enrasar el matraz y llegar a un volumen de 500mL de disolución.

### 3.4.2. Proceso de digestión

En cuanto a las muestras de leche y batido, el proceso comienza tomando dos alícuotas de 100 $\mu$ L, 110 $\mu$ L, 113 $\mu$ L y 714 $\mu$ L de leche y trasvasándolos a tubos falcon de 15mL y tomando dos alícuotas de 45 $\mu$ L de batido y llevándolos a tubos eppendorf de 1,5mL; mientras que, en el yogur, helado y queso se pesan dos alícuotas de 484mg, 71mg y 72 mg respectivamente de cada muestra, se les añaden 50 $\mu$ L de buffer de digestión AmBi 50mM + Urea 2M y se sonicán durante 45 minutos las muestras en un baño ultrasonidos. A partir de este punto el procesado es el mismo para las cinco matrices.

Una vez sonicadas las muestras, se adicionan a las cinco matrices 1mL de acetona fría y tras una hora de espera éstas se centrifugan. Una vez centrifugadas, se les retira el sobrenadante y el pellet (donde se encontrarían principalmente las proteínas a cuantificar y otras biomoléculas tales como lípidos, hidratos de carbono y otros) se resuspende en 1mL de buffer de digestión AmBi 50mM + Urea 2M (pH=8) y se vuelven a sonicar las muestras 25 minutos. Por último, antes de comenzar con el proceso de digestión en sí, se toman 50 $\mu$ L de cada una de las alícuotas y se pasan a nuevos tubos eppendorf de 1,5mL.

Para la digestión, se adicionan a esos 50 $\mu$ L de cada alícuota 8 $\mu$ L de la disolución previamente preparada de DTT 500mM y tras 15 minutos de agitación en el thermoshaker (Thermal Shake Lite, VWR) se añaden 15 $\mu$ L de la disolución de IAM 500mM y se deja incubar 15 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo, se añaden 9 $\mu$ L de DTT y se diluye la suspensión obtenida con 125 $\mu$ L de disolución AmBi 50mM (pH=8).

En este punto del proceso se adicionan 13 $\mu$ L de la disolución Tripsina/Lys-C 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ L que será la enzima que digerirá las proteínas y tras esta adición las muestras quedan durante toda la noche incubando en el thermoshaker a una temperatura de 37°C.

Al día siguiente, la actividad de la tripsina se bloquea por la adición de 10 $\mu$ L de ácido trifluoroacético y se dejan a evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un evaporador (Turbovap® LV, Caliper LifeSciences).

Una vez las muestras estén secas, se redisuelven en 100 $\mu$ L de FMA previamente preparada y se pasa la disolución final a viales de HPLC para poder realizar el análisis.

### 3.5. Procesado de muestras para la cuantificación de proteínas mediante HPLC-MS/MS

El procesado de las muestras para la cuantificación de proteína es el mismo utilizado para las muestras de desarrollo que se analizaron mediante HPLC-TOF MS descrito en el apartado 3.4, pero para poder cuantificar se añaden justo antes de añadir Tripsina/LysC 10  $\mu$ l de un mix con los péptidos marcados de cada proteína para obtener una concentración final en el vial de análisis de 10 nmol/ml para los péptidos de CASA y CASB, y de 5 nmol/ml para los péptidos de CASA2 y CASK. La preparación de dicho mix se describe a continuación

#### 3.5.1. Preparación de Mix de péptidos marcados

##### Reactivos

- YLGYLEQLL- $\{^{13}\text{C}_6 \ ^{15}\text{N}_4 \text{ Arg}\}$  péptido específico de CAS- $\alpha$ 1 marcado isotópicamente (95% pureza, Life Protein)
- FALPQYL- $\{^{13}\text{C}_6 \ ^{15}\text{N}_2 \text{ Lys}\}$  péptido específico de CAS- $\alpha$ 2 marcado isotópicamente (95% pureza, Life Protein)
- GPFPII- $\{^{13}\text{C}_5, ^{15}\text{N} \text{ Val}\}$  péptido específico de CAS- $\beta$  marcado isotópicamente (95% pureza, Life Protein)
- YIPIQYVLS- $\{^{13}\text{C}_6 \ ^{15}\text{N}_4 \text{ Arg}\}$  péptido específico de CAS- $\kappa$  marcado isotópicamente (95% pureza, Life Protein)
- Metanol (Calidad LC-MS, Supelco)

## Preparación de disoluciones

- Mix de péptidos marcados 100 nmol/ml de CASA1 y CASB y 50 nmol/ml de CASA2 y CASK en AmBi 50 mM

Para la preparación de este mix se emplean las disoluciones stock de los péptidos marcados de CAS- $\alpha$ 1, CAS- $\alpha$ 2, CAS- $\beta$  y CAS- $\kappa$ , previamente preparadas empleando como disolvente metanol. De esta manera se obtienen cuatro disoluciones de péptidos de concentración 1mg/mL.

Para ello, se coge un volumen de 128 $\mu$ L de CAS- $\alpha$ 1, 49 $\mu$ L de CAS- $\alpha$ 2, 75 $\mu$ L de CAS- $\beta$  y 63 $\mu$ L de CAS- $\kappa$  de cada una de las disoluciones stock y se traspa a un matraz aforado de 1mL que se enrasa con la disolución de AmBi 50mM (pH=8).

### 3.5.2. Proceso de digestión

Se realiza de nuevo una digestión proteica de la misma manera que la mencionada en el apartado 3.4, pero esta vez se adicionan 10 $\mu$ L de un mix de péptidos marcados isotópicamente con  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  antes de los 13  $\mu$ L de la disolución Tripsina/Lys-C 0,1 $\mu$ g/ $\mu$ L y tras esta adición las muestras quedan durante toda la noche incubando en el thermoshaker a una temperatura de 37°C.

Al día siguiente, la actividad de la tripsina se bloquea por la adición de 10 $\mu$ L de ácido trifluoroacético y se dejan a evaporar a sequedad bajo corriente de nitrógeno en un evaporador (Turbovap® LV, Caliper LifeSciences).

Una vez las muestras estén secas, se redisuelven en 100 $\mu$ L de FMA previamente preparada y se pasa la disolución final a viales de HPLC para poder realizar el análisis.

## 3.6. **Análisis de muestras mediante HPLC-TOF MS**

El análisis mediante el uso del espectrómetro de masas TOF a un analizador de masas de alta resolución, permite determinar masas exactas de los péptidos y obtener sus espectros de fragmentación. Además, es un instrumento de análisis ideal para analizar mezclas complejas de péptidos, ya que cubre un amplio rango de  $m/z$ , lo que es muy útil después de una digestión enzimática, donde se generan péptidos de diferentes masas.

El tratamiento con herramientas bioinformáticas de los datos obtenidos permite determinar su secuencia y/o identificar las proteínas de origen de los péptidos por comparación con bases de datos, como puede ser *Uniprot*.

Para la detección e identificación de los péptidos presentes en las diferentes muestras de desarrollo se utilizó un equipo compuesto por un UPLC Agilent 1290 unido a un espectrómetro de masas AB Sciex TripleTOF 5600, donde los compuestos presentes en la muestra son ionizados mediante ionización por electrospray y finalmente acelerados hacia un analizador y separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) en el TOF.

Así, llegan al detector y producen una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador. El resultado obtenido se denomina cromatograma y de cada pico obtenido se puede obtener el espectro de masas. Para la obtención en el mismo análisis de los espectros de fragmentación, se trabaja en modo IDA de forma que cuando un ión precursor es detectado en el “survey scan” es fragmentado y el espectro de masas de fragmentación es adquirido.

Las condiciones cromatográficas y de masas del método de análisis se optimizaron para conseguir la mejor separación posible de los péptidos presentes en las muestras y se muestran en la *Tabla 4* y *Tabla 5*.

**Tabla 4.** Condiciones cromatográficas para la separación de los péptidos

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS	
<b>Equipo</b>	Agilent 1290 infinity + Autosampler 1200
<b>Flujo</b>	0,2 mL/min

<b>Columna</b>	Waters CORTECS UPLC T3 1,6 $\mu$ m 2,1 x 150mm	
<b>Temperatura de columna</b>	35°C	
<b>Temperatura del inyector</b>	Temperatura ambiente	
<b>Volumen de inyección</b>	10 $\mu$ L	
<b>GRADIENTE</b>		
<b>FMA</b>	H <sub>2</sub> O + 0,1% Ácido Fórmico	
<b>FMB</b>	AcN + 0,1% Ácido Fórmico	
<b>Tiempo (min)</b>	<b>%FMA</b>	<b>%FMB</b>
0	95	5
2	95	5
45	5	95
55	5	95
56	95	5
60	95	5

*Tabla 5. Condiciones del espectrómetro de masas TOF*

<b>CONDICIONES ESPECTRÓMETRO DE MASAS</b>	
<b>Equipo Masas</b>	TripleTOF5600 <sup>+</sup>
<b>Fuente</b>	Sciex DuoSpray™ Ion source for TripleTOF®systems
<b>Modo de ionización</b>	ESI (+)

<b>Modo de adquisición</b>	<b>DDA (IDA con <i>Switch Criteria</i>)</b>
<b>CE (eV)</b>	10
<b>Temperatura</b>	550°C
<b>Ion Spray Voltage</b>	5500
<b>Polaridad</b>	Positive
<b>Switch Criteria</b>	Masas entre 100 y 1250 Con cargas entre 1 y 5 Tolerancia de masas 50 mDa Excluir iones anteriores durante 15 segundos después de 3 eventos

### 3.7. Análisis de muestras mediante HPLC-MS/MS

Tras la selección previa de los péptidos específicos detectados para cada caseína en el TOF y para la optimización de las transiciones de cada péptido se pinchan de nuevo las muestras de desarrollo empleando un equipo compuesto por un sistema Acquity UPLC H-Class PLUS (Waters) unido a un espectrómetro de masas AB Sciex QTrap 5500, donde los compuestos presentes en la muestra son ionizados y acelerados hacia un analizador en donde son separados en función de su relación masa/carga ( $m/z$ ) en el triple cuadrupolo.

Este está compuesto por un cuadrupolo “Q1” que selecciona el ion precursor y solo permite el paso de este, un cuadrupolo “Q2” también llamado “celda de colisión” en el que se lleva a cabo la fragmentación del ion precursor y un cuadrupolo “Q3” en el que se seleccionan los iones producto (procedentes del ion precursor) con una determinada relación  $m/z$ .

Al llegar al detector se produce una señal eléctrica que es procesada, ampliada y enviada a un ordenador obteniendo finalmente los espectros de masas de interés.

Las condiciones cromatográficas y de masas del método de análisis se optimizaron para conseguir la mejor separación posible de los péptidos presentes en las muestras y se muestran en la *Tabla 6* y *Tabla 7*.

**Tabla 6.** Condiciones cromatográficas UPLC H-Class PLUS

CONDICIONES CROMATOGRÁFICAS		
<b>Equipo</b>	Acquity UPLC H-Class PLUS (Waters)	
<b>Columna</b>	ACQUITY™ Premier HSS T3 1,8µm 2,1 x 150mm	
<b>Temperatura de columna</b>	35°C	
<b>Temperatura del inyector</b>	Temperatura ambiente	
<b>Volumen de inyección</b>	10µL	
GRADIENTE		
<b>FMA</b>	H <sub>2</sub> O + 0,1% Ácido Fórmico	
<b>FMB</b>	AcN + 0,1% Ácido Fórmico	
Tiempo (min)	%FMA	%FMB
0	90	10
2	60	40
6	40	60
6,10	5	95
8	5	95
8,10	90	10
10	90	10

*Tabla 7. Condiciones del espectrómetro de masas QTrap*

<b>CONDICIONES ESPECTRÓMETRO DE MASAS</b>		
<b>Equipo Masas</b>	QTrap 5500	
<b>Curtain Gas (CUR)</b>	20	
<b>Collision Gas (CAD)</b>	Medium	
<b>Ion Spray Voltage</b>	5500	
<b>Temperatura</b>	600°C	
<b>Ion Source Gas 1 (GS1)</b>	55	
<b>Ion Source Gas 2 (GS2)</b>	60	
<b>TRANSICIONES</b>		
<b>Tipo CAS</b>	<b>Q1</b>	<b>Q3</b>
CAS- $\alpha$ 1_1	634,356	991,557
CAS- $\alpha$ 1_2	634,356	771,472
CAS- $\alpha$ 2_1	490,284	761,456
CAS- $\alpha$ 2_2	490,284	648,372
CAS- $\beta$ _1	742,500	685,482
CAS- $\beta$ _2	742,500	441,307
CAS- $\kappa$ _1	626,358	975,562
CAS- $\kappa$ _2	626,358	488,285

Una vez desarrollo el método HPLC-MS/MS las muestras de estudio: “materia prima” y “producto final” fueron sometidas al mismo y análisis mediante HPLC-MS/MS para poder determinar su contenido en casa una de las caseínas.

## 4. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

### 4.1. Desarrollo del método MRM para cuantificación de las caseínas

#### 4.1.1. Resultados del análisis de muestras mediante HPLC-TOF MS y análisis bioinformático

A partir de los espectros de MS de alta resolución y de fragmentación obtenidos y con ayuda del software de Sciex *Protein Pilot*<sup>TM</sup> se pudo establecer la secuencia de aminoácidos de cada péptido y una vez determinada su secuencia se comparó con la base de datos de secuencias de proteínas *UniProt* que contiene más de 500.000 secuencias conocidas de proteínas, lo que permitió determinar si el péptido detectado estaba contenido en la secuencia de alguna de ellas y así identificar su proteína de origen.

Más tarde, esos datos que obtuvimos de una digestión experimental se compararon con el programa bioinformático *Skyline*, cuya función es la de realizar una digestión teórica *in silico* de la proteína de interés marcando los sitios en donde la tripsina debería cortar la secuencia aminoacídica. Tras esto seleccionamos los péptidos de las caseínas que hemos podido detectar experimentalmente, todos ellos recogidos en los *Anexos 7.3-7.6* y seleccionamos uno de cada (*Tabla 8*) según unas reglas de selección de péptidos para el desarrollo de métodos MRM (*Tabla 9*) y de ese seleccionamos varias transiciones.

Con estas transiciones se crea un método MRM inicial y se analizan los digeridos de las muestras de desarrollo. El análisis de los resultados obtenidos se lleva a cabo de nuevo con ayuda de *Skyline*, de modo que al final nos quedamos con las dos transiciones que proporcionen mejor señal para cada péptido en el método MRM definitivo.

*Tabla 8. Selección de péptidos finales*

SELECCIÓN DE PÉPTIDOS FINALES					
Nombre de la CAS	Confianza (%)	Secuencia	Masa del Ion Precursor	Carga del péptido	Tiempo de retención (min)
CAS $\alpha$ 1	99	YLGYLEQLLR	634,36	2	24,76
CAS $\alpha$ 2	93,6	FALPQYLK	490,28	2	21,13
CAS $\beta$	97,7	GPFPIIV	742,45	1	30,82
CAS $\kappa$	99	YIPIQYVLSR	626,36	2	22,92

*Tabla 9. Reglas para la selección de péptidos para el desarrollo de métodos MRM*

REGLAS PARA LA SELECCIÓN DE PÉPTIDOS	
<b>ESPECIFICIDAD (UNIQUENESS)</b>	La secuencia de aa del péptido debe ser completamente única de la proteína en estudio
<b>NO DEBEN CONTENER “MISSED TRYPTIC CLEAVAGE SITES”</b>	No deben contener K o R internas ya que podrían causar variaciones en la eficiencia de la digestión y se podrían producir diferentes formas del mismo péptido
<b>LONGITUD ENTRE 5-25 AA</b>	-Péptidos específicos tienen que tener mínimo 5 aa

	<p>-Péptidos muy cortos pueden ser enmascarados por el disolvente de LC/MRM-MS</p> <p>-Péptidos demasiado largos pueden ionizar con poca eficiencia y fragmentar poco en MS/MS</p>
<b>NO DEBEN CONTENER EN LA SECUNCIA</b>	<p>-Cisteína, Metionina...</p> <p>-AA que puedan contener PTMs</p>

#### 4.1.2. Resultados del análisis de muestras mediante HPLC-TOF MS y optimización de transiciones

Con las transiciones seleccionado a partir de los datos del análisis HPLC-TOFMS se creó un método MRM inicial y se analizan los digeridos de las muestras de desarrollo. El análisis de los resultados obtenidos se llevó a cabo de nuevo con ayuda de Skyline, de modo que al final nos quedamos con las dos transiciones que proporcionaban mejor señal para cada péptido.

De este modo se optimizaron las transiciones para los péptidos seleccionados y para sus correspondientes péptidos marcados en el último aminoácido (*Tabla 10*) que se compraron a un proveedor de síntesis de péptidos a medida. En el método MRM definitivo se incluyeron dos transiciones por péptido (*Tabla 11* y *Tabla 12*) la más intensa nombrada como 1, es la utilizada para cuantificación y la segunda para confirmación.

**Tabla 10.** *Secuencia de aminoácidos de los péptidos marcados*

TIPO DE CASEÍNA	SECUENCIA AMINOACÍDICA
CAS- $\alpha$ 1	YLGYLEQLL- $\{13C6, 15N4\}$ Arg}
CAS- $\alpha$ 2	FALPQYL- $\{13C6, 15N2\}$ Lys}
CAS- $\beta$	GPFPII- $\{13C5, 15N\}$ Val}
CAS- $\kappa$ .	YIPIQYVLS- $\{13C6, 15N4\}$ Arg}

*Tabla 11. Transiciones finales para los péptidos naturales*

TRANSICIONES FINALES		
PÉPTIDO NATURAL	TRANSICIÓN 1	TRANSICIÓN 2
CAS $\alpha$ 1_1	634,356	991,557
CAS $\alpha$ 1_2	634,356	771,472
CAS $\alpha$ 2_1	490,284	761,456
CAS $\alpha$ 2_2	490,284	648,372
CAS $\beta$ _1	742,500	685,482
CAS $\beta$ _2	742,500	441,307
CAS $\kappa$ _1	626,358	975,562
CAS $\kappa$ _2	626,358	488,285

*Tabla 12. Transiciones finales para los péptidos marcados*

TRANSICIONES FINALES		
PÉPTIDO MARCADO	TRANSICIÓN 1	TRANSICIÓN 2
CAS $\alpha$ 1*_1	639,6	1002,1
CAS $\alpha$ 1*_2	639,6	781,9
CAS $\alpha$ 2*_1	494,7	656,8
CAS $\alpha$ 2*_2	494,7	769,9
CAS $\beta$ *_1	748,5	625,8
CAS $\beta$ *_2	748,5	447,6
CAS $\kappa$ *_1	632,1	493,6
CAS $\kappa$ *_2	632,1	986,1

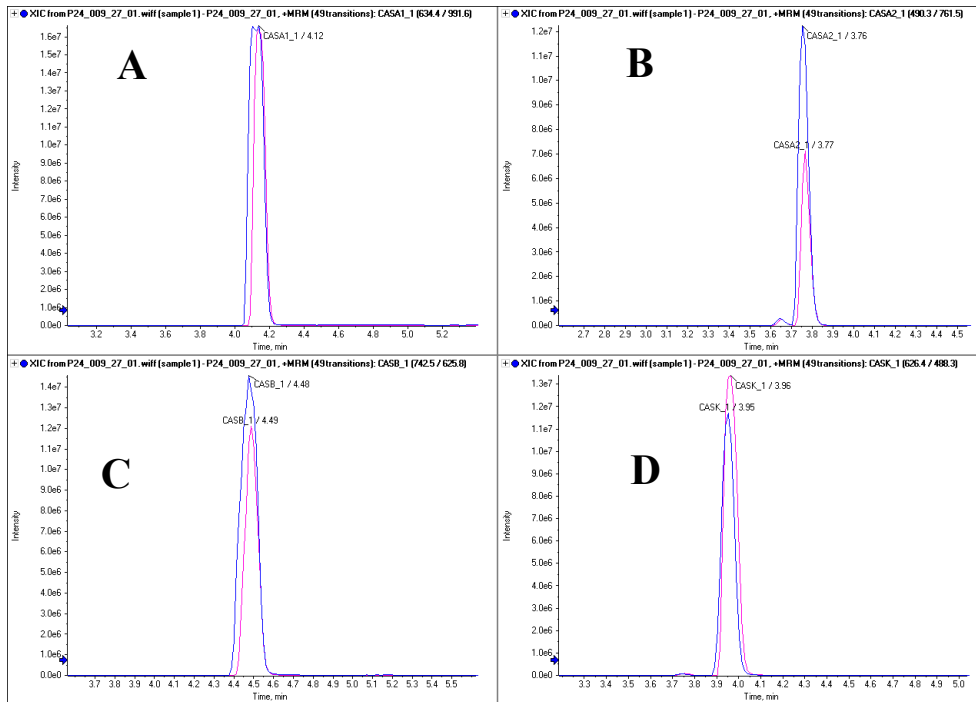
## 4.2. Cuantificación de las caseínas mediante HPLC-MS/MS con el método desarrollado

Tras la cuantificación de la proteína total de cada muestra, se procedió a tomar la cantidad de muestra necesaria para tener 2 mg de proteína total y a su digestión enzimática.

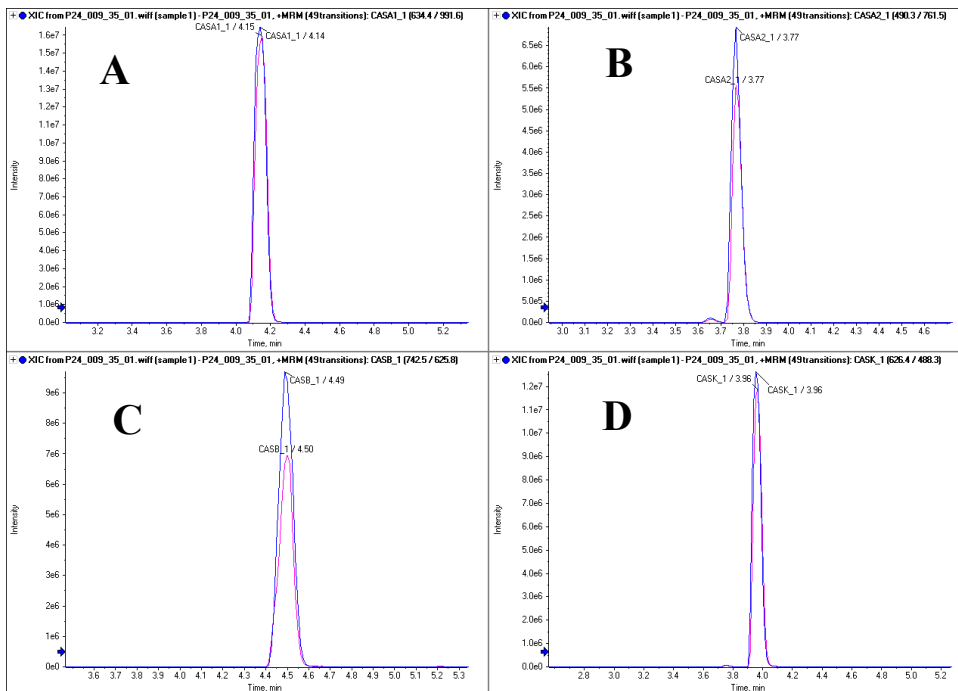
La digestión como ya se ha indicado, se llevó a cabo utilizando una combinación de tripsina y Lys-C, dos proteasas de uso común en estudios de proteómica por su especificidad y eficacia en la rotura de los enlaces peptídicos.

Antes de la digestión, se incorporó un mix de péptidos marcados isotópicamente con isótopos estables de carbono ( $^{13}\text{C}$ ) y nitrógeno ( $^{15}\text{N}$ ). Estos péptidos tienen la misma secuencia que los péptidos naturales específicos seleccionados para la detección selectiva de las principales caseínas presentes en la leche bovina: CAS- $\alpha$ 1, CAS- $\alpha$ 2, CAS- $\beta$  y CAS- $\kappa$ . La adición de estos patrones a una concentración conocida permite una cuantificación de los péptidos naturales/endógenos.

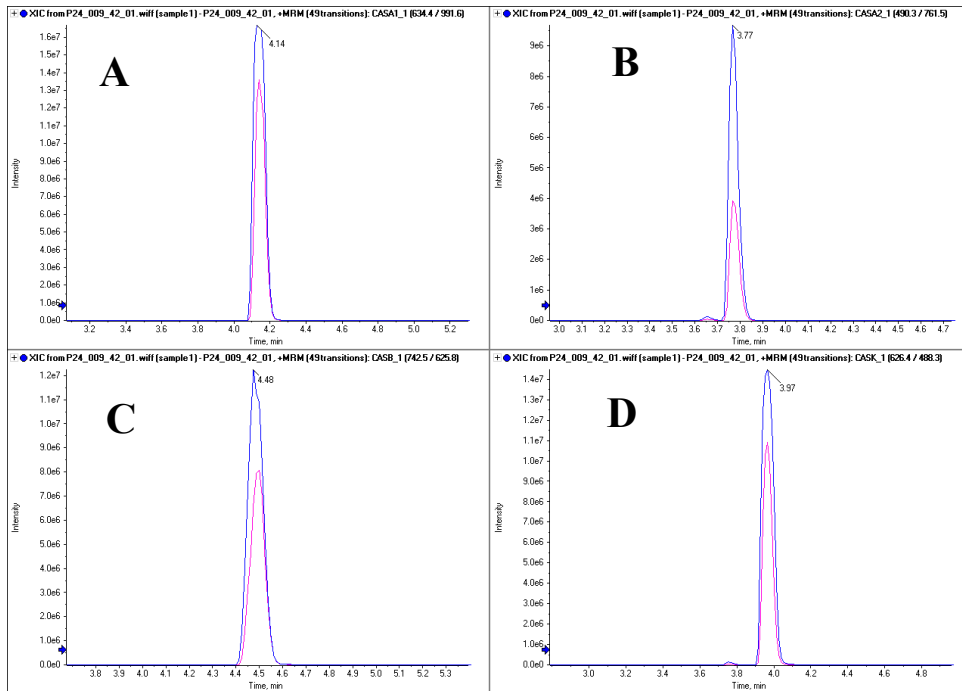
Una vez completado el análisis de las muestras mediante HPLC-MS/MS, se procedió al procesado de los datos obtenidos con el software de Sciex Multiquant. Con este software se integran las áreas de los picos correspondientes a los péptidos naturales y los marcados. Los cromatogramas obtenidos para las muestras de materia prima y su producto final se muestran en las *Figura 6-Figura 10* en los cuales se comparan las áreas del péptido natural de cada caseína: CAS $\alpha$ , CAS $\alpha$ 2, CAS $\beta$  y CAS $\kappa$  entre las muestras.



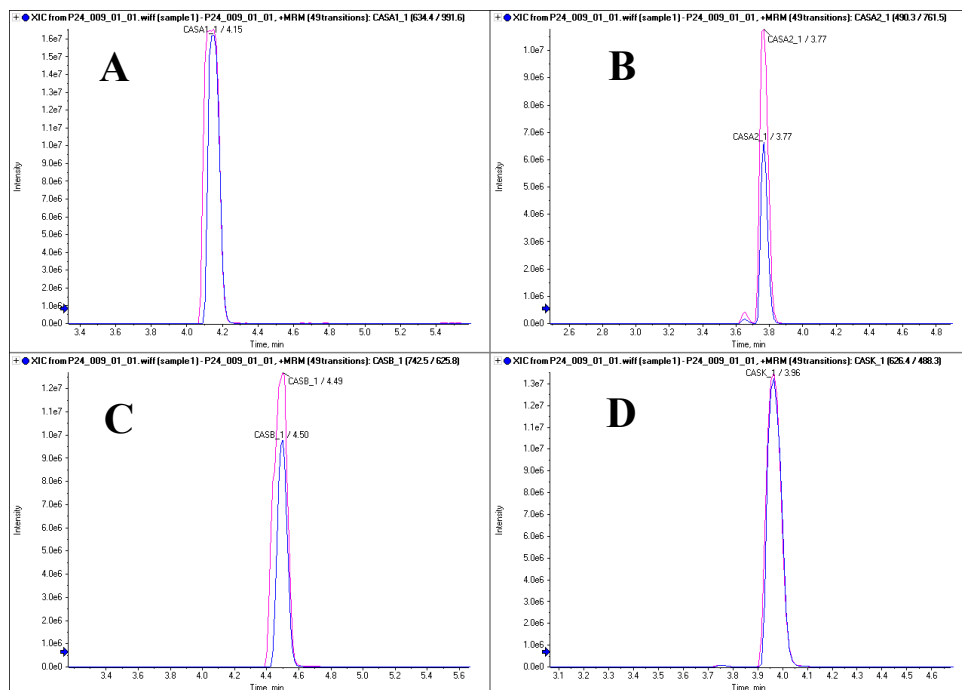
**Figura 6.** Cromatograma comparativo de las áreas de los cuatro tipos de caseínas entre las muestras de materia prima (rosa) y producto final de la leche (azul). A) CAS $\alpha$ 1 B) CAS $\alpha$ 2 C) CAS $\beta$  D) CAS $\kappa$



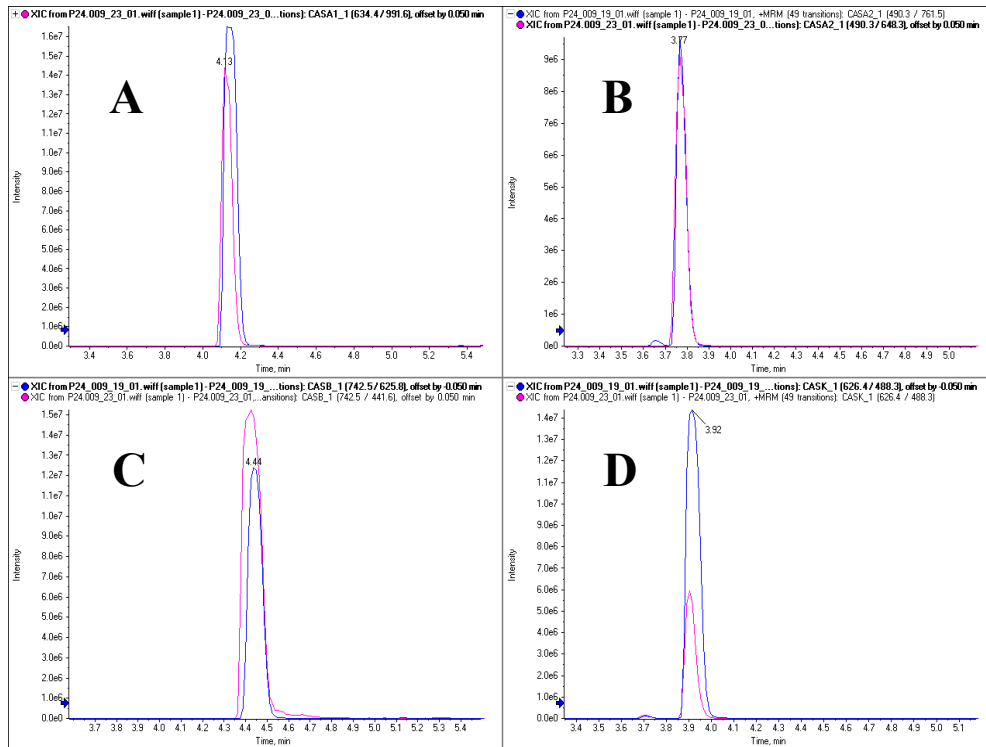
**Figura 7.** Cromatograma comparativo de las áreas de los cuatro tipos de caseínas entre las muestras de materia prima (rosa) y producto final del batido (azul). A) CAS $\alpha$ 1 B) CAS $\alpha$ 2 C) CAS $\beta$  D) CAS $\kappa$



**Figura 8.** Cromatograma comparativo de las áreas de los cuatro tipos de caseínas entre las muestras de materia prima (rosa) y producto final del helado (azul). A) CASa1 B) CASa2 C) CASβ D) CASκ



**Figura 9.** Cromatograma comparativo de las áreas de los cuatro tipos de caseínas entre las muestras de materia prima (rosa) y producto final del yogur (azul). A) CASa1 B) CASa2 C) CASβ D) CASκ



**Figura 10.** Cromatograma comparativo de las áreas de los cuatro tipos de caseínas entre las muestras de materia prima (rosa) y producto final del queso (azul). A) CAS $\alpha$ 1 B) CAS $\alpha$ 2 C) CAS $\beta$  D) CAS $\kappa$

Para la cuantificación de cada caseína se utilizan los valores de áreas de los péptidos natural y su correspondiente marcado aplicando las siguientes fórmulas:

$$\text{Concentration de proteína } \left( \frac{\text{g}}{100\text{g}} \text{ producto} \right) = \frac{\text{Cantidad proteína (g)}}{\text{Peso producto (g)}} \times 100$$

$$\text{Cantidad proteína (g)} = \frac{\text{CNp} * \text{PMW} * 2}{10^9}$$

Dónde PMW= Peso molecular de cada proteína

y CNp= Concentración del péptido natural, calculada como:

$$\text{CNp} \left( \frac{\text{nmol}}{\text{ml}} \right) = n \times \frac{\text{ANp}}{\text{ALp}}$$

Donde:

$n$ = Concentración en vial del péptido marcado añadido

$AN_p$ = Area obtenida para el péptido natural

y  $AL_p$ = Area obtenida para el péptido marcado

Los resultados que se presentan a continuación muestran el comportamiento proteico de los distintos productos lácteos que se estudiaron (leche, batido, yogur, helado y queso), tanto en su estado de materia prima como en su forma final de producto elaborado.

La *Tabla 13* recoge los resultados de esta digestión en unidades de concentración (g/100g) de cada tipo de caseína identificada en las muestras, así como la *Figura 11*. En general, se observa un incremento de la concentración de caseínas entre la materia prima y el producto final en la mayoría de las muestras, sobre todo en la CAS- $\alpha 1$  y CAS- $\beta$ .

En el caso del queso, el aumento de las caseínas es llamativo, ya que, la concentración de CAS- $\alpha 1$  pasó de 1,62 g/100g en la materia prima a 3,41 g/100g en el producto final. Esto se puede explicar por el proceso de concentración de proteínas durante la elaboración del queso, donde se elimina gran parte del suero acuoso, concentrando las caseínas.

Otro ejemplo que destaca es el batido, en donde los productos finales mostraron valores de caseína que duplican o incluso triplican el valor respecto a la materia prima, por ejemplo, la CAS- $\beta$  que pasó de 0,58 a 1,44 g/100g y la CAS- $\alpha 2$  que aumentó de 0,60 a 1,30 g/100g. Esto recalca la idea de que a los batidos ricos en proteínas se les adicionan otros componentes que contienen estas moléculas en grandes cantidades; esto hace que la suma de estas sea mayor ya que previamente se toman en cuenta las que ya contiene la propia leche con el que se elaboran.

Por otro lado, el yogur presenta unos valores diferentes con respecto a las demás muestras debido a que todas las caseínas disminuyeron en el producto final entre dos y tres veces, en relación, a su materia prima destacando la CAS- $\kappa$ , que bajó de 0,36 a 0,14 g/100g o la CAS- $\alpha 2$  que descendió de 0,50 a 0,18g/100g. La disminución observada podría estar relacionada con algún proceso que se lleve a cabo durante la elaboración del yogur, como puede ser la fermentación, que afecta a la recuperación de ciertas proteínas o a la fragmentación.

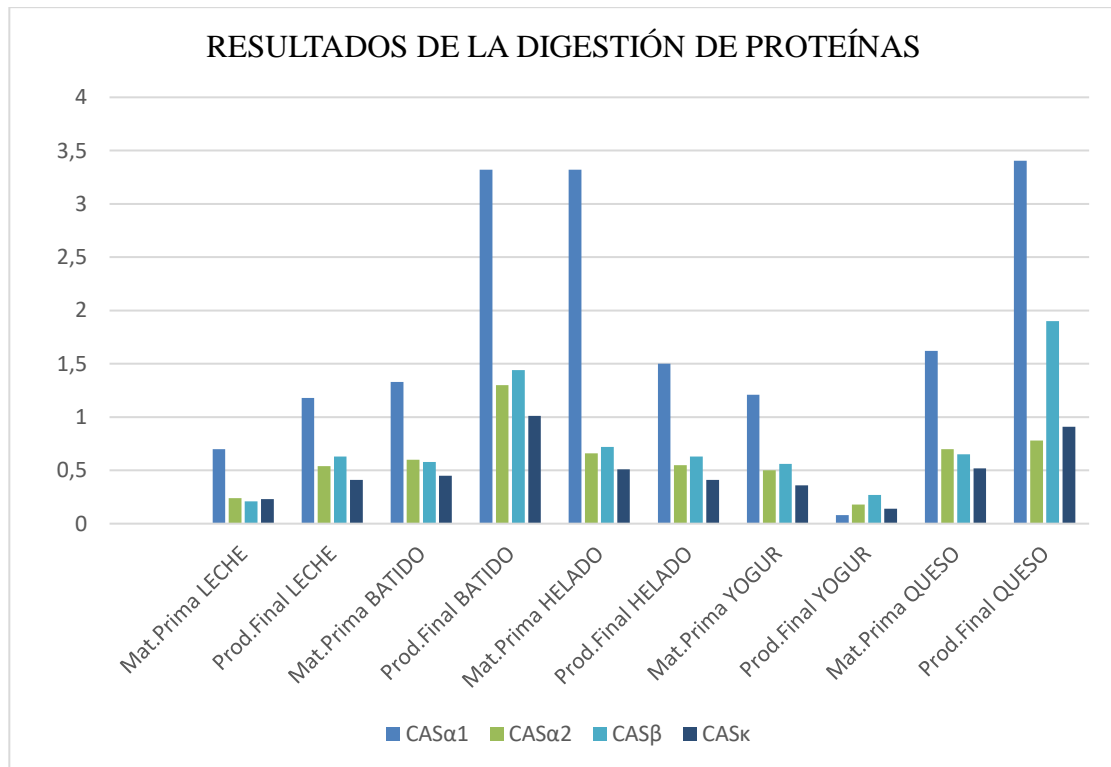
En cuanto a los datos obtenidos sobre la leche, se observa un aumento general de las caseínas triplicando su valor en la CAS- $\beta$  con un valor de 0,21g/100g en la materia prima y un 0,63 g/100g en el producto final y duplicando su valor tanto en la CAS- $\alpha 2$  obteniendo unos valores de materia prima y producto final de 0,24 y 0,54g/100g respectivamente y en la CAS- $\kappa$  con un aumento de 0,23 a 0,41g/100g entre ambas muestras.

*Tabla 13. Resultados de la cuantificación de caseínas*

<b>RESULTADOS DE LA CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS</b>					
<b>ÍTEM</b>	<b>TIPO DE MUESTRA</b>	<b>CAS<math>\alpha 1</math> (g/100g)</b>	<b>CAS<math>\alpha 2</math> (g/100g)</b>	<b>CAS<math>\beta</math> (g/100g)</b>	<b>CAS<math>\kappa</math> (g/100g)</b>
<b>LECHE</b>	Materia Prima	0,70	0,24	0,21	0,23
	Producto Final	1,18	0,54	0,63	0,41
<b>BATIDO</b>	Materia Prima	1,33	0,60	0,58	0,45
	Producto Final	3,32	1,30	1,44	1,01
<b>HELADO</b>	Materia Prima	1,50	0,66	0,72	0,51
	Producto Final	1,21	0,55	0,63	0,41

<b>YOGUR</b>	Materia Prima	1,08	0,50	0,56	0,36
	Producto Final	0,46	0,18	0,27	0,14
<b>QUESO</b>	Materia Prima	1,62	0,70	0,65	0,52
	Producto Final	3,41	0,78	1,90	0,91

*Figura 11. Resultados de la cuantificación de las caseínas*



Otro concepto a tener en cuenta a la hora de comprender los resultados es el valor del RSD o desviación estándar, un indicador de la precisión y reproducibilidad del método. Así, cuanto menor sea su valor mayor será la reproducibilidad entre réplicas, pues la variabilidad de los resultados obtenidos es muy pequeña, es decir, los resultados

son similares o del mismo orden. Por el contrario, valores elevados reflejan una mayor heterogeneidad en los resultados.

En cuanto a los valores del RSD de las caseínas para las muestras de estudio (*Tabla 14*) se toma en cuenta el intervalo comprendido entre los valores 20-25% para definirlo como “aceptable”, ya que solo se ha realizado el estudio con dos réplicas por cada muestra. Los resultados evidentemente serán mayores de los que se obtendrían si se hubiera realizado el estudio procesando más réplicas de una misma muestra.

*Tabla 14. Valores de RSD por tipo de caseína en cada muestra*

<b>VALORES DE RDS (%) POR TIPO DE CASEÍNA</b>					
<b>ÍTEM</b>	<b>TIPO DE MUESTRA</b>	<b>RSD CAS<math>\alpha</math>1 (%)</b>	<b>RSD CAS<math>\alpha</math>2 (%)</b>	<b>RSD CAS<math>\beta</math> (%)</b>	<b>RSD CAS<math>\kappa</math> (%)</b>
<b>LECHE</b>	Materia Prima	6,64	12,71	14,14	6,26
	Producto Final	4,33	6,32	9,07	3,45
<b>BATIDO</b>	Materia Prima	9,18	4,50	6,91	0,50
	Producto Final	24,49	18,60	55,71	30,28
<b>HELADO</b>	Materia Prima	0,39	0,10	1,77	2,01
	Producto Final	16,86	15,87	3,42	17,57
<b>YOGUR</b>	Materia Prima	7,02	5,83	10,32	4,07
	Producto Final	23,90	20,97	2,54	20,77

<b>QUESO</b>	Materia Prima	13,13	12,57	2,37	6,81
	Producto Final	24,32	23,54	11,96	17,11

Como se puede observar, los valores de RSD son bastante heterogéneos entre las distintas matrices y se muestran unos valores más altos en los productos finales comparados con las muestras de materia prima, no obstante, la mayor parte de los valores obtenidos entran dentro del intervalo de aceptación.

Destacan los valores obtenidos para la materia prima del helado, ya que la variación es muy leve entre las dos réplicas, 0,1% para la CAS $\alpha$ 2 y 0,39% para la CAS $\alpha$ 1 y los valores de la materia prima del batido y el producto final de la leche, con valores comprendidos entre 4-9%.

Por la contra, los valores del producto final tanto del batido como del queso también lo hacen, pero de manera opuesta debido a que los valores aumentan saliéndose incluso del rango tomado como aceptable, con unos valores de 55,71% de la CAS $\beta$  y 30,28% de la CAS $\kappa$  para el batido. Para el queso absolutamente todos los valores están muy por encima del rango con unos valores comprendidos entre 36-83%.

A pesar de la limitación en el número de réplicas, los resultados sugieren una reproducibilidad aceptable del método desarrollado. Sin embargo, para afirmar con seguridad la fiabilidad y reproducibilidad de éste se tendría que hacer una validación realizando el método con un número mayor de réplicas y con patrones de las proteínas.

## 5. CONCLUSIÓN

En este estudio se ha conseguido desarrollar un método analítico mediante HPLC-MS/MS para la cuantificación simultánea de CASA1, CASA2, CASB, CASK en diferentes matrices lácteas tras una digestión enzimática de las muestras.

Para llegar al método analítico definitivo se han analizado inicialmente, con un equipo de masas de alta resolución, los digeridos con tripsina/lysC de muestras lácteas para identificar los péptidos generados en la digestión para cada caseína y de entre ellos se han seleccionado péptidos específicos de cada una. Seguidamente se optimizaron las condiciones cromatográficas y espectrométricas para la detección de estos péptidos y sus homólogos marcados isotópicamente en N y C en un equipo HPLC-MS/MS. La cuantificación de dichas proteínas se hace de forma absoluta (AQUA) mediante la adición de esos péptidos específicos marcados isotópicamente que se añaden durante el procesado de muestra en una concentración conocida

Finalmente, el método desarrollado se ha aplicado al análisis de diferentes muestras de materia prima y producto terminado para diferentes tipos de productos lácteos, concretamente: leche, batido, helado, yogur y queso con el objetivo de evaluar la incidencia del proceso productivo en las concentraciones de dichas proteínas. Se han podido obtener unos resultados reproducibles en la mayoría de los casos, con unos valores de desviación estándar dentro del intervalo de aceptación establecido.

En conclusión, el método analítico desarrollado para la identificación y cuantificación simultánea de las principales caseínas presentes en productos lácteos basado en espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida, ha logrado la cuantificación específica de las caseínas de interés y ha demostrado ser un método sensible, selectivo y aplicable a una gran variedad de matrices alimentarias, como la leche, batido, helado, yogur y queso, , aunque sería necesario una fase de validación del método utilizando estándares puros de cada caseína para evaluar la precisión y exactitud del mismo. Además, este estudio ha servido para demostrar la viabilidad del uso de la proteómica para el análisis cualitativo y cuantitativo de proteínas de origen lácteo en diferentes productos industriales.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). (2010). Informe del Comité Científico sobre proteínas lácteas, alergias y sus métodos de análisis. *Revista del Comité Científico*, (13). Recuperado de [https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad\\_alimentaria/evaluacion\\_riesgos/informes\\_comite/PROTEINAS\\_LACTEAS\\_ALERGIAS.pdf](https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/docs/documentos/seguridad_alimentaria/evaluacion_riesgos/informes_comite/PROTEINAS_LACTEAS_ALERGIAS.pdf)
- Agudelo Gómez, D. A., & Bedoya Mejía, O. (2005). Composición nutricional de la leche de ganado vacuno. *Revista lasallista de investigacion*, 2(1), 38–42. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=69520107>
- Miralles, B., & Recio, I. (2022, 9 de noviembre). Calidad y genuinidad de productos lácteos mediante el análisis de las proteínas por espectrometría de masas. *Revista Alimentaria*. Recuperado de <https://revistaalimentaria.es/industria/elaborados/calidad-y-genuinidad-de-productos-lacteos-mediante-analisis-de-proteinas-por-espectrometria-de-masas>
- Gerhardt GmbH & Co. KG. (s.f.). Determinación de N y proteínas en la leche y los productos lácteos. Recuperado de <https://www.gerhardt.de/es/know-how/notas-de-aplicacion/determinacion-de-n-y-proteinas-en-la-leche-y-los-productos-lacteos/>
- Guo, T., Steen, J. A., & Mann, M. (2025). Mass-spectrometry-based proteomics: from single cells to clinical applications. *Nature*, 638(8052), 901–911. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08584-0>
- Haug, A., Høstmark, A. T., & Harstad, O. M. (2007). Bovine milk in human nutrition—a review. *Lipids in Health and Disease*, 6, 25. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-6-25>
- Kettenbach, A. N., Rush, J., & Gerber, S. A. (2011). Absolute quantification of protein and post-translational modification abundance with stable isotope-labeled synthetic peptides. *Nature Protocols*, 6(2), 175–186. <https://doi.org/10.1038/nprot.2010.196>
- López-Expósito, I., Recio, I., Ramos, M., & Amigo, L. (2010). Bioactive peptides derived from milk proteins. *International Dairy Journal*, 20(5), 254–267. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.01.002>

- Microlab Industrial. (s.f.). - Análisis para control de calidad de leche y sus derivados. Recuperado de <https://www.microlabindustrial.com/blog/analisis-para-control-de-calidad-de-leche-y-sus-derivados>
- Padilla Doval, J., & Zambrano Arteaga, J. C. (2021). Estructura, propiedades y genética de las caseínas de la leche: una revisión. *CES medicina veterinaria y zootecnia*, 16(3), 62–95. <https://doi.org/10.21615/cesmvz.5231>
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., & Mann, M. (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry*, 68(5), 850–858. <https://doi.org/10.1021/ac950914h>
- Shuken, S. R. (2023). An introduction to mass spectrometry-based proteomics. *Journal of Proteome Research*, 22(7), 2151–2171. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.2c00838>
- Villamil, R. A., Robelto, G. E., Mendoza, M. C., Guzmán, M. P., Cortés, L. Y., Méndez, C. A., & Giha, V. (2020). Desarrollo de productos lácteos funcionales y sus implicaciones en la salud: Una revisión de literatura. *Revista Chilena de Nutrición: Organo Oficial de La Sociedad Chilena de Nutrición, Bromatología y Toxicología*, 47(6), 1018–1028. <https://doi.org/10.4067/s0717-75182020000601018>
- Walstra, P., Wouters, J. T. M., & Geurts, T. J. (2005). Dairy science and technology, second edition (2a ed.). CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781420028010>
- Zhang, Y., Fonslow, B. R., Shan, B., Baek, M.-C., & Yates, J. R., 3rd. (2013). Protein analysis by shotgun/bottom-up proteomics. *Chemical Reviews*, 113(4), 2343–2394. <https://doi.org/10.1021/cr3003533>
- Zhang, Y., Wang, X., Li, Y., Liu, Z., & Chen, Y. (2025). Structural basis of milk protein allergenicity. *Nature*, 582(7812), 123–128. <https://doi.org/10.1038/s41586-025-08584-0>

## 7. ANEXOS

### 7.1. Funciones biológicas y tecnológicas de salud de cuatro proteínas lácteas seleccionadas para cuantificación mediante MRM

	CASEÍNAS			
Abreviación	CAS $\alpha$ 1	CAS $\alpha$ 2	CAS $\beta$	CAS $\kappa$
Proteína	Caseína- $\alpha$ 1	Caseína- $\alpha$ 2	Caseína- $\beta$	Caseína- $\kappa$
Función Biológica				Estabilización de las micelas de caseína
Propiedades tecnológicas	Propiedades emulsionantes y espumantes	Propiedades emulsionantes y espumantes	Propiedades emulsionantes y espumantes	Propiedades emulsionantes y espumantes, permite la coagulación del cuajo, la relación de CAS $\kappa$ influye en el rendimiento del queso
Aspectos Nutricionales	Portador de iones (Ca, PO <sub>4</sub> , Fe, Zn, Cu), fuente de proteínas, saciedad	Portador de iones (Ca, PO <sub>4</sub> , Fe, Zn, Cu), fuente de proteínas, saciedad	Portador de iones (Ca, PO <sub>4</sub> , Fe, Zn, Cu), fuente de proteínas, saciedad	Portador de iones (Ca, PO <sub>4</sub> , Fe, Zn, Cu), fuente de proteínas, saciedad
Aspectos de salud	Precursor de péptidos bioactivos, inmunomodulador, anticancerígeno, alérgeno de la leche de vaca	Precursor de péptidos bioactivos, principal alérgeno de la leche de vaca	Precursor de péptidos bioactivos, principal alérgeno de la leche de vaca	Precursor de péptidos bioactivos, principal alérgeno de la leche de vaca

## 7.2. Código monolítico de aa

Aminoácido	Abreviatura (3 Letras)	Abreviatura (1 Letra)
Ácido aspártico	Asp	D
Ácido glutámico	Glu	E
Arginina	Arg	R
Lisina	Lys	K
Asparagina	Asn	N
Histidina	His	H
Glutamina	Gln	Q
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Alanina	Ala	A
Glicina	Gly	G
Valina	Val	V
Prolina	Pro	P
Leucina	Leu	L
Fenilalanina	Phe	F
Tirosina	Tyr	Y
Isoleucina	Ile	I
Metionina	Met	M
Triptófano	Trp	W
Cisteína	Cys	C

### 7.3. Péptidos de CASa1 detectados en *Protein Pilot*

Confianza	Secuencia	Masa del Ion Precursor	Carga	Tiempo de retención
99,00	AQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	924,47	3	25,94
99,00	EGIHAQQK	455,74	2	10,82
99,00	EGIHAQQKEPM	634,31	2	13,53
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQ	889,95	2	16,14
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQELAY	752,37	3	19,36
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	1069,87	3	25,12
99,00	EKVNELSK	473,76	2	12,03
99,00	EPMIGVNQELAY	682,33	2	21,58
99,00	EPMIGVNQELAYFYPELFR	1149,57	2	27,49
99,00	EQLLR	658,39	1	35,38
99,00	FFVAPFPEVFGK	692,87	2	25,82
99,00	FFVAPFPEVFGKEK	547,96	3	23,98
99,00	GYLEQLLR	994,53	1	35,41
99,00	HIQKEDVPSER	446,57	3	12,08
99,00	HPIKHQGLPQEVN	805,44	2	15,76
99,00	HPIKHQGLPQEVNENLLR	745,75	3	18,74
99,00	HQGLPQEVNENLLR	880,47	2	20,44
99,00	IPNPIGSENSEK	642,82	2	16,28
99,00	KYKVPQL	438,27	2	16,89
99,00	KYKVPQLE	1004,58	1	16,25
99,00	KYKVPQLEIVPNSAEER	667,36	3	18,45
99,00	PEVFGK	676,37	1	33,72

99,00	PFPEVFGK	920,49	1	33,93
99,00	PLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK	922,10	3	26,64
99,00	QEVLENLLRFFVAPFPEVFGK	878,48	3	33,91
99,00	QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPN PIGSENSEK	1179,80	4	26,67
99,00	RYLGYLEQLLR	712,40	2	35,38
99,00	SDIPNPIGSENSEK	743,85	2	17,06
99,00	VPQLEIVPNSAEER	790,92	2	19,51
99,00	YKVPQLEIVPNSAEER	624,67	3	19,69
99,00	YLGYLEQLLR	629,85	2	35,47
99,00	YLGYLEQLLRLLKKYKVPQLE	839,47	3	35,37
99,00	IGVNQELAYFYPELFR	980,00	2	26,70
99,00	QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSF	1077,83	3	30,15
99,00	HQGLPQEVLENLLRF	954,01	2	23,32
99,00	TQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK	1249,07	2	21,22
99,00	PSFSDIPNPIGSENSEK	909,43	2	26,59
99,00	MIGVNQELAYFYPELFR	1045,53	2	27,43
99,00	HQGLPQE	404,70	2	13,56
99,00	EDVPSEER	831,38	1	12,34
99,00	VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK	955,13	3	22,27
99,00	GLPQEVLENLLR	747,91	2	22,16
99,00	VNQELAYFYPELFR	894,95	2	25,25
99,00	LPQEVLENLLR	719,40	2	20,95
99,00	APSFSDIPNPIGSENSEK	944,95	2	20,40
99,00	YVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSEK	1009,48	3	22,90
99,00	GIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	1026,85	3	24,98
99,00	FFVAPFPEVFGKE	757,39	2	26,07
99,00	RPKHPIKHQGLPQEVLENLLR	872,83	3	17,50

99,00	LHSMKEGIHAQQK	377,45	4	11,88
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQEL	1002,00	2	25,07
99,00	EPMIGVNQELAYFYPEL	1014,49	2	23,72
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQE	945,46	2	25,11
99,00	EGIHAQQK	455,74	2	10,73
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	802,66	4	24,96
99,00	EKVNELSK	473,76	2	12,08
99,00	EPMIGVNQELAYFYPEL	1014,49	2	23,72
99,00	EPMIGVNQELAYFYPELFR	1166,57	2	26,81
99,00	FFVAPFPEVFGK	692,87	2	25,87
99,00	FFVAPFPEVFGKEK	547,96	3	24,03
99,00	HIQKEDVPSEK	446,57	3	12,02
99,00	HPIKHQGLPQEVNLNENLLR	745,75	3	18,64
99,00	HQGLPQEVNLNENLLR	880,47	2	20,34
99,00	HQGLPQEVNLNENLLRF	954,01	2	23,37
99,00	IGVNQELAYFYPELFR	980,00	2	26,75
99,00	KYKVPQLE	502,79	2	16,22
99,00	KYKVPQLEIVPNSAEER	667,36	3	18,39
99,00	LPQEVNLNENLLR	719,40	2	21,00
99,00	PFPEVFGK	460,75	2	21,76
99,00	PSFSDIPNPIGSENSEK	909,43	2	26,64
99,00	QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPN PIGSENSEK	1175,54	4	28,42
99,00	SDIPNPIGSENSEK	743,85	2	17,11
99,00	VPQLEIVPNSAEER	790,92	2	19,46
99,00	YKVPQLEIVPNSAEER	624,67	3	19,64
99,00	YLGYLEQLLR	634,36	2	24,76
99,00	YLGYLEQLLRLLKYYKVPQLE	839,47	3	35,32

99,00	IPNPIGSENSGK	606,81	2	16,18
99,00	QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPN PIGSENSGK	929,64	5	26,65
99,00	SDIPNPIGSENSGK	707,84	2	17,01
99,00	PSFSDIPNPIGSENSGK	873,42	2	26,59
99,00	GTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSGK	1241,57	2	26,62
99,00	TQYTDAPSFSDIPNPIGSENSGK	1213,06	2	21,17
99,00	TDAPSFSDIPNPIGSENSGK	1016,97	2	20,77
99,00	VPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSGK	931,12	3	22,26
99,00	YVPLGTQYTDAPSFSDIPNPIGSENSGK	985,47	3	22,84
99,00	APSFSDIPNPIGSENSGK	908,93	2	20,34
99,00	AQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	924,47	3	25,94
99,00	EGIHAQQK	455,74	2	10,82
99,00	EGIHAQQKEPM	634,31	2	13,53
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQ	889,95	2	16,14
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQE	945,46	2	25,11
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQEL	1002,00	2	25,07
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQELAY	752,37	3	19,36
99,00	EGIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	802,66	4	24,96
99,00	EKVNELSK	473,76	2	12,03
99,00	EPMIGVNQELAY	682,33	2	21,58
99,00	EPMIGVNQELAYFYPEL	1014,49	2	23,72
99,00	EPMIGVNQELAYFYPELFR	1166,57	2	26,81
99,00	EQLLR	658,39	1	35,38
99,00	FFVAPFPEVFGK	692,87	2	25,82
99,00	FFVAPFPEVFGKE	757,39	2	26,07
99,00	FFVAPFPEVFGKEK	547,96	3	23,98
99,00	GIHAQQKEPMIGVNQELAYFYPELFR	1026,85	3	24,98

99,00	GLPQEVLNENLLR	747,91	2	22,16
99,00	GYLEQLLR	994,53	1	35,41
99,00	HPIKHQGLPQEVLN	805,44	2	15,76
99,00	HPIKHQGLPQEVLNENLLR	745,75	3	18,64
99,00	HQGLPQE	404,70	2	13,56
99,00	HQGLPQEVLNENLLR	880,47	2	20,34
99,00	HQGLPQEVLNENLLRF	954,01	2	23,32
99,00	IGVNQELAYFYPELFR	980,00	2	26,70
99,00	KYKVPQL	438,27	2	16,89
99,00	KYKVPQLE	1004,58	1	16,25
99,00	KYKVPQLEIVPNSAEER	667,36	3	18,45
99,00	LHSMKEGIHAQQK	377,45	4	11,88
99,00	LPQEVLNENLLR	719,40	2	20,95
99,00	MIGVNQELAYFYPELFR	1045,53	2	27,43
99,00	PEVFGK	676,37	1	33,72
99,00	PFPEVFGK	920,49	1	33,93
99,00	QEVLNENLLRFFVAPFPEVFGK	878,48	3	33,91
99,00	QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSF	1077,83	3	30,15
99,00	QFYQLDAYPSGAWYYVPLGTQYTDAPSFSDIPN PIGSENSGK	1161,79	4	26,57
99,00	RPKHPIKHQGLPQEVLNENLLR	872,83	3	17,50
99,00	RYLGYLEQLLR	712,40	2	35,38
99,00	SDIPNPIGSENSGK	707,84	2	16,95
99,00	VNQELAYFYPELFR	894,95	2	25,25
99,00	VPQLEIVPNSAEER	790,92	2	19,46
99,00	YKVPQLEIVPNSAEER	624,67	3	19,64
99,00	YLGYLEQLLR	629,85	2	35,47
99,00	YLGYLEQLLRLKKYKVPQLE	839,47	3	35,32

#### 7.4. Péptidos de CASa2 detectados en *Protein Pilot*

Confianza	Secuencia	Masa del Ion Precursor	Carga	Tiempo de retención
99,00	AEVATEEVK	488,25	2	13,52
99,00	AINPSKENLCSTFCK	884,92	2	18,07
99,00	ALNEINQFYQK	684,35	2	18,79
99,00	ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK	1015,28	4	28,70
99,00	ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKR	843,64	5	27,76
99,00	ENLCSTFCK	579,75	2	16,46
99,00	EQLSTSEENSK	626,29	2	12,33
99,00	EQLSTSEENSKK	690,34	2	11,56
99,00	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK	903,81	3	27,76
99,00	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKR	955,84	3	26,46
99,00	ITVDDKHYQ	559,78	2	13,83
99,00	ITVDDKHYQK	624,33	2	12,70
99,00	KTVDMESTEVFTEKK	575,27	3	16,37
99,00	LTEEEKNR	1018,58	1	10,80
99,00	LTEEEKNRLNFLK	545,30	3	17,28
99,00	LTEEEKNRLNFLKK	441,25	4	16,03
99,00	MKPWIQPK	514,29	2	16,71
99,00	NAVPITPTLNR	598,34	2	17,73
99,00	NMAINPSK	413,72	2	10,82
99,00	NMAINPSKENLC	695,83	2	16,81
99,00	NMAINPSKENLCSTF	863,40	2	19,81
99,00	NMAINPSKENLCSTFCK	655,98	3	15,76

99,00	NMAINPSKENLCSTFCKEVVR	833,07	3	18,74
99,00	RNAVPITPTLNR	676,39	2	16,67
99,00	TKLTEEEK	489,26	2	11,55
99,00	TKLTEEEKNR	624,33	2	11,22
99,00	TKLTEEEKNRLNFLK	466,51	4	16,90
99,00	TKLTEEEKNRLNFLKK	399,03	5	15,88
99,00	TKVIPYVR	488,30	2	16,09
99,00	TVDMESTEVEFTK	693,83	2	18,46
99,00	VPITPTLNR	505,80	2	17,10
99,00	AMKPWIQPK	350,87	3	13,61
99,00	VDDKHYQK	516,76	2	12,70
99,00	PWIQPK	384,72	2	16,50
99,00	LKTVYQHQQ	572,83	2	11,70
99,00	LQYLYQGPIVLNPWDQVQR	777,43	3	23,75
99,00	LQYLYQGPIVLNPWDQVK	1087,59	2	25,26
99,00	LYQGPIVLNPWDQVK	885,48	2	23,57
99,00	KTVDMESTEVEFTK	516,24	3	14,35
99,00	PSKENLCSTFCK	735,84	2	18,06
99,00	KPWIQPK	448,77	2	16,70
99,00	YQGPIVLNPWDQVQR	906,99	2	26,51
99,00	NPSKENLCSTFCK	792,86	2	18,06
99,00	YLYQGPIVLNPWDQVK	967,01	2	24,50
99,00	CSTFCK	802,32	1	16,53
99,00	AINPSKENLCSTFCK	590,28	3	16,85
99,00	ALNEINQFYQK	684,35	2	18,73
99,00	ALNEINQFYQKFPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVQR	1054,30	4	27,77
99,00	AMKPWIQPK	350,87	3	13,56

99,00	ENLCSTFCK	579,75	2	16,52
99,00	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVK	903,81	3	27,81
99,00	FPQYLQYLYQGPIVLNPWDQVKR	955,84	3	26,37
99,00	ITVDDKHYQ	373,52	3	13,81
99,00	ITVDDKHYQK	634,81	2	12,71
99,00	KPWIQPK	448,77	2	16,61
99,00	LQYLYQGPIVLNPWDQVK	1088,09	2	25,17
99,00	LTEEEKNR	509,76	2	10,68
99,00	LTEEEKNRLNFLKK	441,25	4	15,99
99,00	NAVPITPTLNR	598,83	2	18,63
99,00	NMAINPSK	429,21	2	14,25
99,00	NMAINPSKENLCSTFCK	655,98	3	15,80
99,00	RNAVPIPTLNR	676,39	2	16,62
99,00	TKLTEEEKNR	624,33	2	11,18
99,00	TKVIPYVR	488,30	2	16,12
99,00	VDDKHYQK	516,76	2	12,65
97,74	FALPQYLK	490,28	2	21,13

### 7.5. Péptidos de CAS $\beta$ detectados en *Protein Pilot*

Confianza	Secuencia	Masa del Ion Precursor	Carga	Tiempo de retención
99,00	DKIHPFAQ	478,25	2	15,30
99,00	DKIHPFAQT	528,78	2	15,41
99,00	DKIHPFAQTQS	636,32	2	15,08
99,00	DMPIQAFLLYQEPVLPVVR	1093,59	2	27,54

99,00	DMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPI	899,82	3	30,33
99,00	DMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPII	937,52	3	31,23
99,00	DMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	728,16	4	31,47
99,00	EQQQTEDELQ	624,27	2	14,20
99,00	EQQQTEDELQDK	745,83	2	13,40
99,00	FQSEEQQQTEDELQDK	1031,42	2	16,15
99,00	HKEMPFPK	1013,52	1	14,03
99,00	HKEMPFPKYPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLPLL QSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	1051,55	7	27,38
99,00	HQPHQPLPPTVM	691,35	2	16,86
99,00	IEKFQSEEQQQTEDELQDK	811,36	3	16,48
99,00	IHPFAQTQSLVYFPFGPIPNLQNIPLTQTPVVV PPFLQPEVMGVSK	886,98	6	28,49
99,00	KEAMAPK	387,71	2	10,92
99,00	KEMPFPK	438,74	2	15,16
99,00	LQPEVMGVSK	544,29	2	16,80
99,00	LSLSQSK	762,44	1	16,77
99,00	LTDVENLH	470,74	2	15,78
99,00	PEVMGVSK	846,44	1	16,82
99,00	PIQAFLLYQEPVLGPVR	970,55	2	24,05
99,00	PIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPI	817,79	3	30,33
99,00	PIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPII	855,49	3	31,27
99,00	PIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	888,52	3	31,53
99,00	PVPQK	568,35	1	57,54
99,00	QEPVLGPVR	488,78	2	16,94
99,00	QQQTEDELQDK	672,80	2	14,88
99,00	QQTEDELQ	990,44	1	14,03
99,00	QSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLPPTV MFPPQSVLSLSQSK	1059,36	5	29,23

99,00	QSWMHQPH	525,73	2	14,63
99,00	SLPQNIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	1038,24	3	27,24
99,00	SVLSLSQSK	474,77	2	16,66
99,00	TLTDVENLH	521,26	2	16,94
99,00	VKEAMAPK	873,49	1	12,01
99,00	VKEAMAPKH	505,78	2	11,12
99,00	VLILACLVALALAR	748,47	2	32,73
99,00	YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQP HQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	909,33	7	28,59
99,00	TEDELQDK	489,23	2	12,75
99,00	HQPHQPLPPT	576,30	2	13,52
99,00	IHPFAQTQSLVYPPFGPIPN	741,72	3	24,23
99,00	EAMAPK	314,66	2	11,63
99,00	LPLLLQSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQS K	792,63	5	26,98
99,00	PPTVMFPPQSVLSLSQSK	972,02	2	28,59
99,00	PPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	820,79	3	28,48
99,00	LLYQEPVLGPVRGPFPII	1004,58	2	31,29
99,00	LLYQEPVLGPVRGPFPI	948,04	2	26,03
99,00	LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	1054,12	2	31,54
99,00	QSLTLTDVENLH	685,35	2	20,12
99,00	PPFLQPEVMGVSK	714,88	2	30,77
99,00	EVMGVSK	366,19	2	13,71
99,00	FTESQSLTLTDVENLHLPLLLQSWMHQPHQPLP PTVMFPPQSVLSLSQSK	963,17	6	28,10
99,00	SLSQSK	649,35	1	16,76
99,00	YPVEPFTESQSLTLTDVENLH	1210,09	2	23,39
99,00	DMPIQAFLLYQEPVL	888,97	2	29,75
99,00	IPPLTQTPVVVPPFLQPEVM	734,75	3	29,11

99,00	IHPFAQTQSLVYPPFGPIPNSLPQN	921,48	3	24,33
99,00	AFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	1163,17	2	29,38
99,00	FTESQSLTLTDVENLH	917,45	2	21,07
99,00	AFLLYQEPVLGPVR	801,46	2	24,04
99,00	YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPL	984,85	3	29,26
99,00	DKIHPFAQTQSLVYPPFGPIPNSLPQN	1002,52	3	23,71
99,00	QSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	828,92	4	22,88
99,00	YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPLL	1022,54	3	30,44
99,00	AFLLYQEPVLGPVRGPFPI	1057,10	2	27,87
99,00	ESQSLTLTDVENLHLPLPLL	1116,61	2	29,09
99,00	FTESQSLTLTDVENLHLPLPLL	1240,67	2	29,49
99,00	PPQSVLSLSQSK	635,85	2	26,92
99,00	YPVEPFTESQSLTLTDVEN	1085,02	2	23,05
99,00	VLPVPQKA	426,27	2	16,12
99,00	PVLGPVRGPFPIIV	730,95	2	31,47
99,00	YQEPVLGPVRGPFPIIV	941,03	2	31,47
99,00	YQEPVLGPVRGPFPI	834,96	2	24,42
99,00	TLTDVENLHLPLPLL	844,48	2	28,19
99,00	LYQEPVLGPVRGPFPIIV	997,58	2	27,14
99,00	LPLPLLQSWMHQPH	566,31	3	25,14
99,00	YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQ	1065,23	3	29,57
99,00	EPVLGPVR	424,75	2	16,74
99,00	LYQEPVLGPVRGPFPII	948,04	2	31,27
99,00	SWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	796,91	4	22,83
99,00	YQEPVLGPVRGPFPII	891,50	2	25,88
99,00	QTPVVVPPFLQPEVMGVSK	684,71	3	25,28
99,00	NSLPQNIPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	1076,26	3	27,05

99,00	FLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	1127,65	2	31,55
99,00	FLLYQEPVLGPVR	765,94	2	23,36
99,00	SLTLTDVENLHLPLLLQ	1008,57	2	28,54
99,00	YPVEPFOTESQSLTLTDVENLHLPLP	947,15	3	27,91
99,00	AFLLYQEPVLGPVRGPFPII	1113,63	2	31,29
99,00	QSLVYPPFGPIPNLQPN	984,52	2	24,50
99,00	TLTDVENLHLPLLLQ	908,51	2	27,28
99,00	PVVVPPFLQPEVMGVSK	912,01	2	27,08
99,00	SLTLTDVENLHLPLLL	944,54	2	29,41
99,00	FLLYQEPVLGPVRGPFPII	1078,12	2	28,84
99,00	SLTLTDVENLHLPLP	831,46	2	26,40
99,00	FTESQSLTLTDVENLHLPLP	1127,58	2	26,66
99,00	FLLYQEPVLGPVRGPFPI	1021,58	2	27,58
99,00	IPPLTQTPVVVPPFLQPEVMG	753,75	3	28,78
99,00	TLTDVENLHLPLP	731,40	2	24,52
99,00	QSLTLTDVENLHLPLP	895,49	2	26,17
99,00	QTPVVVPPFLQPEVMG	869,46	2	26,89
99,00	NIPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	896,50	3	27,04
99,00	QEPVLGPVRGPFPI	753,43	2	23,85
99,00	QSLTLTDVENLHLPLPL	943,52	2	30,19
99,00	QEPVLGPVRGPFPIIV	859,50	2	26,16
99,00	QSLTLTDVENLHLPLLL	1000,06	2	31,59
99,00	TQSLVYPPFGPIPNLQPN	1035,04	2	24,39
99,00	EPVLGPVRGPFPII	745,94	2	25,63
99,00	QSLTLTDVENLHLPLLLQ	1064,09	2	30,45
99,00	KVLPVPQK	454,80	2	14,25
99,00	QTQSLVYPPFGPIPNLQPN	1090,55	2	25,70

99,00	AVPYPQR	831,47	1	14,26
99,00	QEPVLGPVRGPFPII	801,45	2	28,05
99,00	MPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	932,20	3	30,77
99,00	MPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPI	861,48	3	29,60
99,00	MHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	971,17	3	22,13
99,00	MPIQAFLLYQEPVLGPVR	1036,07	2	26,71
99,00	TDVENLH	829,40	1	16,96
99,00	QTEDELQ	864,38	1	13,89
99,00	IPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	842,48	3	24,71
99,00	IHPFAQT	813,42	1	16,01
99,00	MGVSK	522,28	1	13,18
99,00	VPYPQ	603,31	1	15,17
99,00	LVYPPGPIPNSLPQ	819,95	2	25,14
99,00	YQEPVLGPVRGPFPI	778,41	2	22,39
99,00	AFLLYQEPVLGPVRGPFPI	1000,55	2	26,52
99,00	FLLYQEPVLGPVRGPFPI	965,03	2	26,25
99,00	LLYQEPVLGPVRGPFPI	891,50	2	24,24
99,00	LTLTDVENLHLPLPLLQ	965,06	2	28,63
99,00	LVYPPGPIPNSLPQN	876,97	2	24,38
99,00	LTLTDVENLHLPLPLL	901,03	2	29,56
99,00	AFLLYQEPVLGPVR	801,46	2	23,75
99,00	AFLLYQEPVLGPVRGPFPII	1114,14	2	28,89
99,00	AFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	1163,17	2	29,34
99,00	DMPIQAFLLYQEPVLGPVR	734,73	3	25,93
99,00	DMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPI	899,82	3	30,39
99,00	DMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPII	937,52	3	31,15
99,00	DMPIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	975,87	3	30,34

99,00	EPVLGPVR	433,76	2	16,79
99,00	EQQTEDELQDK	745,83	2	13,44
99,00	FLLYQEPVLGPVR	765,94	2	23,42
99,00	FLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	1127,66	2	29,24
99,00	FQSEEQQTEDELQDK	1031,42	2	16,06
99,00	FTESQSLTLTDVENLHLPLPLL	1240,67	2	29,44
99,00	FTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPHQPLP PTVMFPPQSVLSLSQSK	963,17	6	28,20
99,00	HKEMPFPK	507,26	2	13,97
99,00	HKEMPFPKYPVEPFTEQSLTLTDVENLHLPLPLL QSWMHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	1226,63	6	27,45
99,00	HQPHQPLPPTVM	461,24	3	16,85
99,00	IEKFQSEEQQTEDELQDK	811,68	3	16,92
99,00	IHPFAQTQSLVYPPFGPIPNLQNIPLTQTPVVV PPFLQPEVMGVSK	760,42	7	28,39
99,00	IPPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	858,49	3	26,98
99,00	KEAMAPK	387,71	2	11,73
99,00	LLYQEPVLGPVRGPFPII	1004,58	2	27,37
99,00	LTLTDVENLHLPLPLL	901,03	2	29,50
99,00	LVYPPFGPIPNLQNI	876,97	2	24,43
99,00	MHQPHQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	728,63	4	22,16
99,00	MPIQAFLLYQEPVLGPVR	1036,07	2	26,61
99,00	PIQAFLLYQEPVLGPVR	970,56	2	25,36
99,00	PIQAFLLYQEPVLGPVRGPFPIIV	888,51	3	30,04
99,00	PPFLQPEVMGVSK	714,88	2	26,69
99,00	PPLTQTPVVVPPFLQPEVMGVSK	820,79	3	27,03
99,00	PPQSVLSLSQSK	635,85	2	22,82
99,00	QEPVLGPVR	497,79	2	16,85
99,00	QEPVLGPVRGPFPII	809,97	2	25,54

99,00	QSLTLTDVENLHLPLPLL	1008,58	2	29,12
99,00	QSLTLTDVENLHLPLPLLQ	1072,60	2	28,30
99,00	QSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQPPLPPTV MFPPQSVLSLSQSK	885,80	6	27,95
99,00	QTPVVVPPFLQPEVMG	869,46	2	26,83
99,00	QTPVVVPPFLQPEVMGVSK	1026,56	2	25,22
99,00	QTQSLVYPPFGPIPNSLPQN	733,05	3	24,13
99,00	SLTLTDVENLHLPLP	831,46	2	26,45
99,00	SVLSLSQSK	474,77	2	16,70
99,00	TLTDVENLH	521,26	2	16,90
99,00	VKEAMAPK	873,49	1	11,66
99,00	YPVEPFTESQSLTLTDVEN	1085,02	2	22,95
99,00	YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPLL	1022,54	3	30,40
99,00	YPVEPFTESQSLTLTDVENLHLPLPLLQSWMHQP HQPLPPTVMFPPQSVLSLSQSK	1060,72	6	28,60
99,00	YQEPVLPVVRGPFPI	834,96	2	30,38
99,00	YQEPVLPVVRGPFPII	891,50	2	25,85
99,00	YQEPVLPVVRGPFPIIV	941,03	2	26,55
93,55	GPFPIIV	742,45	1	30,81

### 7.6. Péptidos de CAS<sub>k</sub> detectados en *Protein Pilot*

Confianza	Secuencia	Masa del Ion Precursor	Carga	Tiempo de retención
99,00	EQNQEQPIR	571,28	2	12,70
99,00	HPHPHLSFM	551,77	2	16,95
99,00	HPHPHLSFMAIPPK	536,95	3	17,28

99,00	HPHPHLSFMAIPPKK	869,47	2	16,24
99,00	HPHPHLSFMAIPPKKNQDK	741,39	3	15,23
99,00	KNQDKTEIPTIN	700,87	2	16,10
99,00	LSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYPY YAKPAAVR	1092,33	4	22,57
99,00	MAIPPKK	784,47	1	12,97
99,00	NQDKTEIPTIN	636,83	2	17,06
99,00	PIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQFL PYPYYAKPAAVR	994,13	5	25,41
99,00	PVALINNQFLPYPYYAKPAAVR	835,79	3	22,99
99,00	QEQNQEQUIR	626,80	2	14,21
99,00	QEQNQEQUIRCEK	835,38	2	13,54
99,00	QEQNQEQUIRCEKDER	1035,47	2	13,16
99,00	QVLSNTVPAK	528,80	2	14,92
99,00	SCQAQPTTM	1023,44	1	14,27
99,00	SCQAQPTTMAR	601,78	2	10,73
99,00	SNTVPAK	716,39	1	11,22
99,00	SPAQILQWQVLSNTVPAK	660,70	3	21,62
99,00	VLSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYP YYAKPAAVR	1117,09	4	22,70
99,00	YIPIQYVLSR	626,36	2	22,92
99,00	YIPIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQ FLPYPYYAKPAAVR	874,63	6	25,40
99,00	YIPIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQ FLPYPYYAKPAAVRSPAQILQWQVLSNTV PAK	1201,48	6	26,19
99,00	YPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYPYYAK	703,96	5	24,13
99,00	YPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYPYYAK PAAVR	669,18	6	23,22
99,00	FMAIPPKK	466,28	2	15,83

99,00	IPIQYVLSR	544,83	2	20,75
99,00	VLSNTVPAK	464,77	2	14,11
99,00	HPHPHLSF	486,25	2	15,31
99,00	PIQYVLSR	488,78	2	23,55
99,00	NQEPIRCEK	651,32	2	11,99
99,00	GLNYYQQKPVALINNQFLPYPYAKPAAV R	875,72	4	22,60
99,00	YYQQKPVALINNQFLPYPYAKPAAVR	804,68	4	22,01
99,00	YPSYGLNYYQQKPVAL	952,48	2	21,40
99,00	AQILQWQVLSNTVPAK	898,50	2	22,79
99,00	YPSYGLNYYQQKPVALIN	1066,04	2	21,74
99,00	EVIESPPEINTVQVTST	921,97	2	20,09
99,00	YPSYGLNYYQQKPVA	895,94	2	19,42
99,00	EVIESPPEINTVQVTSTAV	1007,02	2	21,35
99,00	QILQWQVLSNTVPAK	862,99	2	22,54
99,00	YQQKPVALINNQFLPYPYAKPAAVR	763,91	4	21,72
99,00	NQEPIR	442,73	2	12,40
99,00	NQDKTEIPTINTIASGEPTS	1058,52	2	19,76
99,00	SPAQILQWQVLSNTV	833,45	2	23,37
99,00	SPAQILQWQVLSNT	783,92	2	23,42
99,00	EVIESPPEINTVQVTST	921,97	2	20,05
99,00	EVIESPPEINTVQVTSTAV	1007,02	2	21,40
99,00	FMAIPPKK	466,28	2	15,69
99,00	HPHPHLSF	324,50	3	15,40
99,00	HPHPHLSFM	352,18	3	17,04
99,00	HPHPHLSFMAIPPK	536,95	3	17,33
99,00	HPHPHLSFMAIPPKK	868,97	2	16,30
99,00	MAIPPKK	784,48	1	12,92

99,00	PIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQFL PYPYYAKPAAVR	994,33	5	25,69
99,00	QEQNQEPIR	626,80	2	14,26
99,00	QEQNQEPIRCEK	835,38	2	13,58
99,00	SCQAQPTTMAR	625,78	2	13,10
99,00	SPAQILQWQVLSNTVPAK	991,04	2	23,18
99,00	YIPIQYVLSR	626,36	2	22,82
99,00	YIPIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQ FLPYPYYAKPAAVR	874,63	6	25,30
99,00	YIPIQYVLSRYPSYGLNYYQQKPVALINNQ FLPYPYYAKPAAVRSPAQILQWQVLSNTV PAK	1201,48	6	26,23
99,00	YPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYPYYAK	1172,59	3	24,06
99,00	YPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYPYYAK PAAVR	1003,27	4	23,18
99,00	YPSYGLNYYQQKPVALINNQFLPYPYYAK PAAVR	1003,27	4	23,24