



**NUEVAS
ESTRATEGIAS PROTEÓMICAS
PARA LA CARACTERIZACIÓN DE
PROTEÍNAS DE BAJA
ABUNDANCIA EN MUESTRAS
CLÍNICAS**

GRADO EN QUÍMICA

Ángel Camilo López Regueiro

Santiago de Compostela, Julio 2017



Dr. Don ANTONIO MOREDA PIÑEIRO, Profesor Titular de Química Analítica, y **Dra. Doña MARÍA DEL PILAR BERMEJO BARRERA**, Catedrática de Universidad, ambos en el Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de Santiago de Compostela,

INFORMAN,

Que la memoria adjunta titulada “Nuevas estrategias proteómicas para la caracterización de proteínas de baja abundancia en muestras clínicas” para optar al Grado en Química ha sido realizada por **Don Ángel Camilo López Regueiro** bajo su dirección en los laboratorios GETEE del Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología.

Considerando que constituye un Trabajo de Fin de Grado, autorizan su presentación en la Facultad de Química de la Universidad de Santiago de Compostela.

Santiago de Compostela, 11 de julio de 2017

Fdo. D. Antonio Moreda Piñeiro

Fdo. Dña. M^a del Pilar Bermejo Barrera

Índice

I.	RESUMEN.	1
II.	INTRODUCCIÓN.	3
	1. Enfermedad de Alzheimer.	3
	1.1. Patogenia.	4
	2. Proteómica.	5
	2.1. Biomarcadores.	6
	2.2. Fosfoproteómica.	6
	2.3. Metalómica.	7
	2.4. Muestras en el estudio proteómico.	7
	3. Estudio del proteoma: fases y técnicas analíticas.	9
	3.1. Depleción y fraccionamiento.	9
	3.1.1. Cromatografía de afinidad.	11
	3.2. Separación.	12
	3.2.1. Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)	12
III.	OBJETIVOS.	16
IV.	REACTIVOS Y EQUIPOS.	17
V.	PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.	19
	1. Obtención de suero.	19
	2. Cromatografía líquida.	19
	3. Precipitación de las proteínas y resuspensión.	19
	4. Isoelectroenfoque y Electroforesis en Gel de 2 Dimensiones.	20
	5. Adquisición y análisis de las imágenes obtenidas de los geles en 2 dimensiones (2-DE).	21
VI.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	22
	1. Dilución 1:10 frente a dilución 1:5.	22
	2. Elección del pH de las tiras IPG.	24
	3. Tamaño del gel.	24
	4. Porcentaje de polimerización del gel.	25
	5. Condiciones nativas y desnaturalizantes.	26
	6. Tinciones.	27
	7. Secado.	27
VII.	CONCLUSIONES.	36
VIII.	BIBLIOGRAFÍA.	37

I. RESUMEN

Castellano

La enfermedad de Alzheimer es un proceso neurodegenerativo del sistema nervioso central caracterizada por la muerte neuronal progresiva en ciertas áreas del cerebro. Esta enfermedad es el tipo más habitual de demencia, que en 2013 contaba con 44 millones de afectados y se estima que aumente a 65 millones en 2030. Actualmente, la muestra clínica más estudiada es el líquido cefalorraquídeo, por lo que el hallazgo de biomarcadores indicadores de la enfermedad en muestras cuya obtención sea más sencilla se presenta como una interesante alternativa a estudiar. En este trabajo se han desarrollado y estandarizado diferentes técnicas para el estudio de muestras de suero, centrándose en el campo de la proteómica, realizando la separación de las proteínas de alta abundancia de las de baja abundancia por cromatografía de afinidad, para la subsiguiente separación de éstas por electroforesis bidimensional 2D-PAGE. Se han estudiado las diferentes condiciones de electroforesis (nativas o desnaturizantes), el pH de las tiras o la dilución de la muestra; y con respecto a los geles de poliacrilamida su tinción, el grado de polimerización, el tamaño y el secado. Las metodologías se aplicaron a muestras de personas sanas, pacientes con deterioro cognitivo que evolucionaría a Alzheimer y pacientes con Alzheimer, realizando un análisis de imagen comparativo de estas situaciones.

Gallego

A enfermidade de Alzheimer é un proceso neurodegenerativo do sistema nervioso central caracterizada pola morte neuronal progresiva en certas áreas do cerebro. Esta enfermidade é o tipo máis habitual de demencia, que en 2013 contaba con 44 millóns de afectados e estímase que aumente a 65 millóns en 2030. Actualmente, a mostra clínica máis estudada é o líquido cefalorraquídeo, polo que o achado de biomarcadores indicadores da enfermidade en mostras cuxa obtención sexa máis sinxela preséntase como una interesante alternativa a estudar. Neste traballo desenvóléronse e estandarizáronse diferentes técnicas para o estudo de mostras de soro, centrándose no campo da proteómica, realizando a separación das proteínas de alta abundancia das de baixa abundancia por cromatografía de afinidade, para a subseguinte separación destas por electroforese bidimensional 2D-PAGE. Estudáronse diferentes condicións de electroforese (nativas ou desnaturizantes), o pH da tira ou a dilución da mostra; e con respecto aos xeles de poliacrilamida a tinción, o grado de polimerización, o tamaño e o secado. As metodoloxías foron aplicadas a mostras de persoas sas, pacientes con deterioro cognitivo que evolucionaría a Alzheimer e pacientes con Alzheimer, realizando unha análise de imaxe comparativa destas situacións.

Inglés

Alzheimer's disease is a neurodegenerative process of the central nervous system characterized by progressive neuronal death in certain areas of the brain. This disease is the most common type of dementia, which affected 44 million people in 2013. This number is estimated to increase to 65 million in 2030. Currently, the most studied clinical sample is cerebrospinal fluid, so the finding of biomarkers of this disease in samples whose extraction is simpler is presented as an interesting alternative to study. For this purpose, different techniques for the study of serum samples have been developed and standardized, focusing on the field of proteomics. The separation of high abundance proteins from low abundance ones is carried out by affinity chromatography, for the subsequent separation by 2D-PAGE two-dimensional electrophoresis. Different electrophoresis conditions have been tested (native or denaturing), as well as the pH of the strips and the dilution of the sample; and with respect to the polyacrylamide gels their staining, degree of polymerization, size and drying. The methodologies were applied to samples of healthy individuals, patients with cognitive impairment that would evolve to Alzheimer's and Alzheimer's patients, performing a comparative image analysis of these situations.

II. INTRODUCCIÓN

1. Enfermedad de Alzheimer

La demencia es un síndrome causado por una enfermedad del cerebro, usualmente de naturaleza crónica o progresiva, en la cual hay una alteración de múltiples funciones corticales superiores, incluyendo la memoria, el pensamiento, la orientación, la comprensión, el lenguaje, la capacidad de aprender y de realizar cálculos y la toma de decisiones. Las deficiencias de las habilidades cognitivas están comúnmente acompañadas, y ocasionalmente precedidas, por un deterioro del control emocional, del comportamiento social o de la motivación ^[1].

La demencia afecta a cada persona de manera diferente dependiendo del impacto de la enfermedad, así como de la personalidad premórbida del individuo, estableciéndose tres etapas: la fase temprana, que se desarrolla entre el primer y segundo año; la fase media que tiene lugar entre el segundo año y el cuarto o quinto; y la fase avanzada, a partir del quinto año (Tabla 1).

La enfermedad de Alzheimer (*Alzheimer Disease, AD*) es la forma más común de la demencia y se caracteriza por ser un tipo de demencia que comienza con un fallo sutil y poco reconocible de la memoria y que, lentamente, se vuelve más grave hasta incluso poder ser incapacitante. Otros síntomas comunes incluyen confusión, mal juicio, alteración del lenguaje, agitación, abstinencia y alucinaciones; mientras que también se pudieron observar convulsiones, incontinencia o mutismo. La muerte suele provenir de la inanición general, la desnutrición y la neumonía ^[2].

Actualmente, la demencia senil afecta a más de 44 millones de personas en todo el mundo (Figura 1), siendo la AD la afección atribuible a un 50-75% de los casos ^[3,4]. La importancia socio-familiar, así como el coste económico, que conlleva esta afección conduce a desarrollar nuevas técnicas de diagnóstico precoz, con el fin de minimizar o eliminar el avance de la enfermedad.

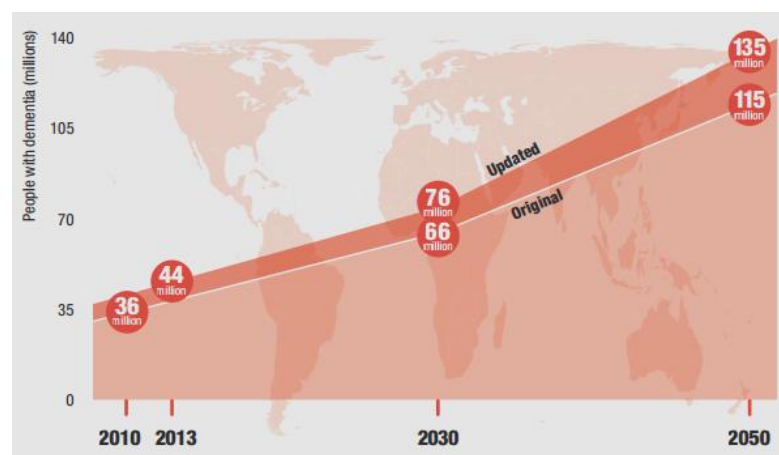


Figura 1. Aumento del número de personas con demencia en el mundo (2010-2050), comparando estimaciones actualizadas ^[3].

Tabla 1. Fases del desarrollo de la demencia y síntomas asociados^[1].

	Descripción	Síntomas
Fase temprana	La persona tiende a ser ignorada ya que se confunde como un componente normal en el proceso de envejecimiento. Es difícil establecer su inicio debido a su carácter gradual.	<ul style="list-style-type: none"> -La persona se torna olvidadiza. -Dificultad de comunicación. -Pérdida de orientación espacial. -Pérdida de la noción del tiempo (hora, día, mes, año, estaciones). -Dificultad en la toma de decisiones y en la realización de tareas. -Cambios en el ánimo (menor actividad, menor motivación, pérdida de interés).
Fase media	Los problemas se vuelven más obvios y limitantes.	<ul style="list-style-type: none"> - La persona se torna muy olvidadiza (eventos recientes, nombres de personas). -Dificultad para comprender el tiempo, fechas, lugares y eventos. -Dificultad en el habla y la comprensión. -Necesidad de ayuda en el cuidado personal. -Incapacidad de vivir sólo de manera segura. -Cambios del comportamiento: deambular, gritar, perturbación del sueño, alucinaciones. -Comportamiento inapropiado para la comunidad (agresividad, desinhibición).
Fase avanzada	Casi total dependencia e inactividad. Las alteraciones de la memoria son más serias y el lado físico de la enfermedad se vuelve más obvio.	<ul style="list-style-type: none"> -Desconocimiento de la fecha y el lugar en el que se encuentra. -Alta dificultad de comprensión. -No reconoce a familiares, amigos u objetos conocidos. -Incontinencia renal e intestinal. -Alta incapacidad móvil. -Cambios de comportamiento: agresiones y agitación no verbal.

1.1 Patogenia

El estudio de la AD apoya un modelo en el que un péptido denominado amiloide β , o A β , se acumula en el cerebro a lo largo del tiempo e inicia una cadena de acontecimientos que desemboca en la AD. El A β se crea cuando la proteína transmembranosa precursora de la proteína amiloide (APP) es escindida secuencialmente por las enzimas conversoras del A β (BACE) y la γ -secretasa. Las mutaciones en APP o en los componentes de la γ -secretasa provocan AD al aumentar

la velocidad en la que se genera el A β (Figura 2). Otro factor de riesgo es una variante de la apolipoproteína E denominado $\epsilon 4$ (ApoE4). Cada alelo de ApoE4 que esté presente aumenta el riesgo de presentar AD y reduce la edad de inicio. Se desconoce la forma en la que ApoE4 influye en la acumulación de A β ; puede aumentar la agregación o el depósito de A β o disminuir su eliminación ^[5].

Los depósitos grandes de A β son una característica de la AD en estado terminal, pero los agregados pequeños de A β también pueden ser patógenos, ya que alteran la neurotransmisión y son tóxicos para las neuronas y las terminaciones sinápticas. Los depósitos grandes, en forma de placas, también provocan la muerte neuronal y una respuesta inflamatoria local que pueden dar lugar a un mayor daño celular, al mismo tiempo que pueden alterar la comunicación entre regiones debido a los efectos mecánicos en los axones y dendritas ^[5].

La presencia de A β provoca la hiperfosforilación de la proteína tau de unión a los microtúbulos neuronales. Este aumento del grado de fosforilación causa la redistribución de la proteína tau desde los axones hacia las dendritas y los cuerpos celulares, donde se agrega en ovillos y contribuye también a la disfunción neuronal y a la muerte celular ^[5].

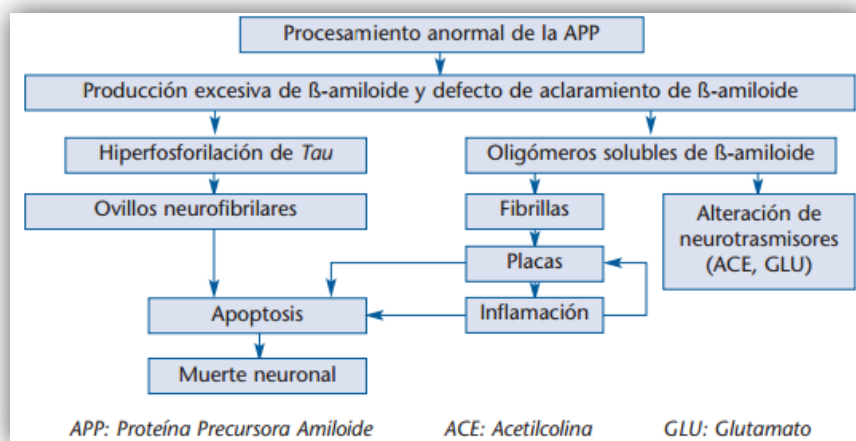


Figura 2. Representación esquemática de los procesos derivados de la enfermedad de Alzheimer que llevan a la muerte neuronal ^[6].

2. Proteómica

En el año 1994 Wilkins introdujo el término “proteoma”, siendo éste una adaptación del término “genoma”. De esta forma, el proteoma se define como una mezcla compleja de proteínas presentes en una entidad biológica ^[7].

La Proteómica es la ciencia que estudia de manera dinámica el proteoma expresado en un organismo en determinados momentos puntuales y bajo condiciones concretas establecidas, como puede ser en el caso de una enfermedad ^[8]. Existen tres

ramas en la Proteómica que, estudiando distintos aspectos, pretenden caracterizar el proteoma ^[9]:

- La Proteómica de expresión, que se encarga del estudio de la abundancia relativa de las proteínas y de sus modificaciones postraduccionales ^[9].
- La Proteómica estructural, que pretende caracterizar la estructura tridimensional de las proteínas ^[9].
- La Proteómica funcional, cuya finalidad es determinar la localización y distribución de las proteínas, así como de las interacciones que se producen entre las mismas y otras moléculas con el fin de determinar su función ^[9].

Uno de los principales objetivos de esta disciplina es proporcionar información útil acerca de los cambios en los perfiles proteicos entre situaciones distintas, como es el caso de un individuo que padece la enfermedad de Alzheimer, un individuo con deterioro cognitivo leve (*Mild Cognitive Impairment*, MCI) y un individuo sin patología neurológica. De esta forma, resulta interesante el estudio de diversas matrices biológicas con la finalidad de caracterizar un biomarcador que diferencie las distintas patologías mentales de una persona.

2.1 Biomarcadores

Un biomarcador es una sustancia molecular que se mide con la finalidad de indicar la presencia de una condición anormal dentro de un paciente. Este puede ser un gen, proteína o metabolito que se ha demostrado que se correlaciona con las características de una enfermedad específica ^[10]. Los biomarcadores se pueden utilizar para muchos propósitos, incluyendo la detección temprana de una enfermedad (ya que las enfermedades producen cambios específicos en los perfiles moleculares de los fluidos y tejidos biológicos), el seguimiento de la respuesta a una terapia o la predicción del resultado clínico. Para que una sustancia sea un potencial biomarcador debe cumplir con la condición de que sea específico para el estado de una enfermedad, así como que variables de la muestra biológica (dieta, los antecedentes genéticos, estilo de vida, edad, sexo, etnia) no influyan en la variabilidad del mismo. Además, debe poseer una sensibilidad y especificidad tan cercana al 100% como sea posible y medirse en un espécimen de sencilla obtención, cuyo análisis sea preciso, económico, fácil de realizar y reproducible ^[10].

2.2 Fosfoproteómica

Las proteínas pueden dar lugar a diversas isoformas como consecuencia de distintas modificaciones postraduccionales (PTMs), aumentando considerablemente la complejidad de los proteomas, ya que las proteínas pueden ser modificadas en distintos lugares y por distintos grupos funcionales. Las PTMs de las proteínas pueden ser: fosforilación, metilación, acetilación, glicosilación, lipidación y ubiquitinización ^[10]. De entre todas las modificaciones postraduccionales, una de las más estudiadas es la fosforilación por su reversibilidad e importancia en la regulación de la actividad de la

proteína. Los procesos de fosforilación y desfosforilación (Figura 3) están controlados por las quinasas y fosfatasas que además producen cambios conformacionales en la proteína haciendo que la correspondiente enzima se active o desactive ^[10]. Se han observado diferentes patrones de fosforilación en diversas enfermedades neurodegenerativas, como en el caso de la ya mencionada proteína tau, cuya hiperfosforilación se da en la AD ^[11].

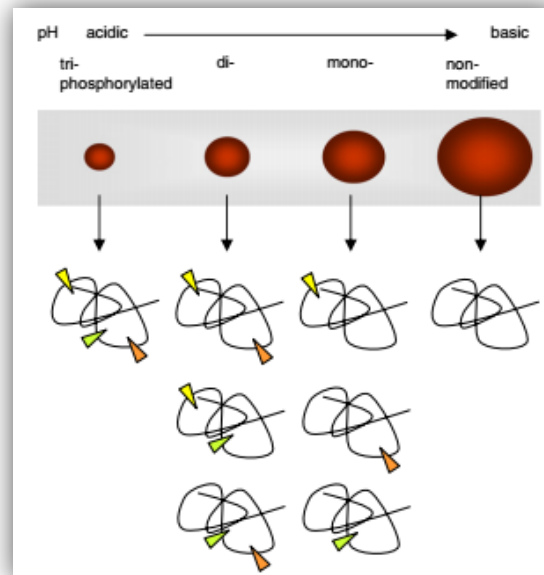


Figura 3. Los grupos fosfato que se unen a una proteína modifican el punto isoeléctrico (volviéndose más ácido) y la masa molecular de la proteína ^[12].

2.3 Metalómica

El estudio del conjunto de metales (o semimetales) complejados a proteínas se denomina metalómica ^[13]. Un gran número de proteínas (próximo al 30% de las proteínas totales) contiene iones metálicos o semimetálicos en su estructura, siendo un 40% de estos elementos cruciales para mantener la función biológica de la proteína ^[13]. Cada vez son más los estudios que relacionan la alteración de niveles de metales en traza en sangre con enfermedades neurodegenerativas, ya que metales esenciales como el zinc (Zn), aluminio (Al), hierro (Fe) o cobre (Cu) muestran alteraciones en individuos con AD diagnosticada ^[14].

2.4 Muestras en el estudio proteómico

Para la caracterización de las proteínas alojadas en un fluido biológico es importante considerar cual será el fluido a estudiar, puesto que varían tanto el método de extracción como los valores normales de referencia a la hora de llevar a cabo una comparativa.

En el ámbito de las enfermedades neurodegenerativas, existen estudios respecto a diversos fluidos biológicos, entre los que se incluyen el líquido

cefalorraquídeo, el suero y el plasma. Estos dos últimos pese a proceder de la sangre, guardan diferencias significativas entre ellos.

En cuanto a los análisis en líquido cefalorraquídeo, su obtención no está exenta de controversia para los estudios de biomarcadores en sujetos con MCI que en muchos casos no derivarán en AD. Así, son preferibles aquellos estudios que empleen muestras de origen sanguíneo, en los que la toma de muestra es menos invasiva, ya que en el caso de la obtención de líquido cefalorraquídeo se realiza por punción lumbar.

Respecto al suero y al plasma, éstos no pueden compararse directamente en el estudio proteómico debido a que sus perfiles proteicos difieren ^[10]. El plasma es la porción líquida de sangre no coagulada después de eliminar la variedad de células que se encuentran en la misma. Para obtener plasma, se extrae sangre del paciente a un vial en presencia de un anticoagulante y la muestra se centrifuga para eliminar los elementos celulares. Los anticoagulantes más utilizados son la heparina, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y citrato sódico. El suero es plasma sanguíneo sin fibrinógeno u otros factores de coagulación, por lo tanto en la toma de muestra no se adiciona ningún tipo de sustancia anticoagulante, así, se forman coágulos de fibrina, los cuales se eliminan mediante centrifugación, obteniendo finalmente el suero. La eliminación del coágulo da como resultado un contenido proteico más bajo en suero que en plasma.

El contenido de proteínas en sangre (tanto en suero como en plasma) está dominado por proteínas de alta abundancia que constituyen el 99% del contenido proteico en sangre (Figura 4). Por lo tanto, sólo el 1% de todo el proteoma sanguíneo está compuesto de proteínas que se consideran de baja abundancia y de particular interés en la búsqueda de potenciales biomarcadores, siendo un paso necesario la disminución o eliminación de las proteínas de alta abundancia para la detección de las de baja abundancia.

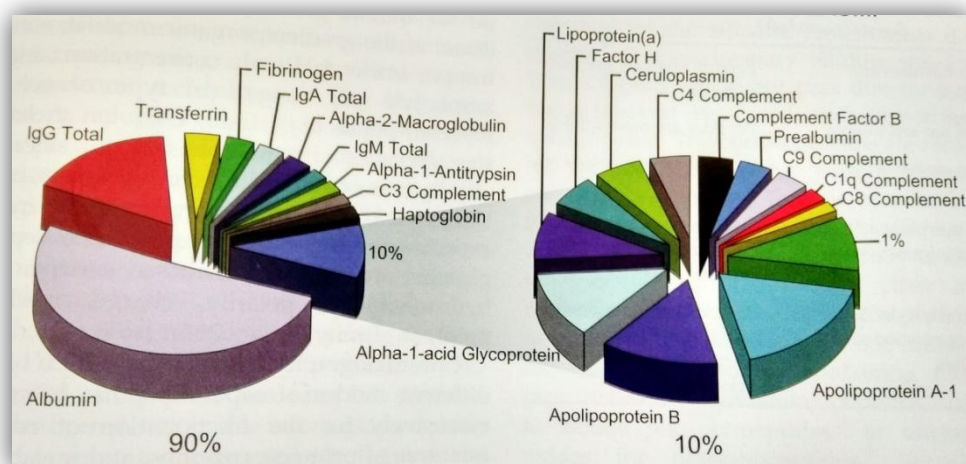


Figura 4. Un total de 22 proteínas constituyen el 99% de la masa proteica en suero ^[10].

3. Estudio del proteoma: fases y técnicas analíticas

La estrategia para el descubrimiento de biomarcadores proteicos tiene como objetivo la identificación de todas las proteínas existentes en una muestra, para lo cual es necesaria una gran resolución para discriminar entre los componentes del proteoma, así como suficiente sensibilidad para detectar compuestos presentes en menor abundancia. La naturaleza dinámica del proteoma es un problema que complica su cobertura completa, por lo que se requiere el desarrollo de métodos analíticos eficaces que impliquen: depleción, fraccionamiento, concentración y separación ^[10]; con la finalidad de detectar el mayor número posible de compuestos. El proteoma se compone de decenas de miles de polipéptidos/proteínas que poseen una amplia gama de propiedades físicas y químicas (tamaño, acidez, basicidad, hidrofobicidad, etc) que les confieren diferentes opciones para su fraccionamiento y separación.

3.1 Depleción y fraccionamiento

Las fases de depleción y fraccionamiento pueden realizarse de forma simultánea, y es que la eliminación de proteínas de la muestra clínica junto con su distribución en fracciones es realizable utilizando la misma técnica analítica, como es el caso de la cromatografía de líquidos, basada en la interacción de los compuestos de interés con el soporte sólido (fase estacionaria) y la fase móvil.

La depleción es un paso esencial en el análisis del proteoma que consiste en la eliminación de proteínas y otros compuestos de la muestra que pueden interferir con el procedimiento analítico, afectando a la exactitud de los resultados o a la capacidad de detectar especies de menor abundancia ^[10]. Los beneficios de la depleción son:

- La detección de proteínas de baja abundancia que se encuentran enmascarados en la muestra ^[10].
- La rotura de la unión entre metabolitos y proteínas ^[10].
- La minimización de la supresión de la ionización cuando se utiliza la espectrometría de masas como dispositivo de detección ^[10].

El fraccionamiento de la muestra, un procedimiento para simplificar mezclas complejas, es un paso importante en la búsqueda de biomarcadores en muestras clínicas, y no debe ser confundido con el concepto de la distribución en alícuotas ^[10]. La distribución en alícuotas es un procedimiento simple en el que la muestra se divide en porciones más pequeñas, mientras que el fraccionamiento es la división de los contenidos de la muestra (péptidos, proteínas) en varias fracciones basándose en las propiedades físicas y químicas. Con la ayuda del fraccionamiento, es posible la detección de proteínas de baja abundancia, resultando en un aumento en el número de compuestos que pueden ser identificados.

El fraccionamiento de mezclas proteicas, previo a su separación y posible análisis de MS, se fundamenta en las propiedades físicas y químicas de las proteínas (tamaño, hidrofobicidad, polaridad, carga, punto isoeléctrico o afinidad), que las hacen susceptibles a diferentes métodos de fraccionamiento, pudiendo ser manipuladas las siguientes variables utilizando la cromatografía líquida:

- Las propiedades de la fase móvil tales como la concentración del modificador orgánico, el pH del tampón o la concentración de sales, entre otras.
- El tipo de columna: fase inversa (C8, C18), intercambio iónico (basándose en la carga efectiva de las proteínas), exclusión por tamaños, fase normal (sílice) o afinidad (uso de anticuerpos, lectina, aptámeros, metal, etc).

Michel y col. ^[15] realizaron la depleción de plasma materno y de fluido amniótico concentrado de pacientes al término del embarazo utilizando una columna cromatográfica Multiaffinity de inmunodepleción, con la finalidad de retirar de los fluidos biológicos seis proteínas de alta abundancia (albúmina, IgG, anti-1-tripsina, IgA, tranferrina y haptoglobina). Esta opción también fue utilizada por Heller y col. ^[16] en plasma sanguíneo.

Por otra parte, Zhang y col. ^[17] realizaron el fraccionamiento de muestras de suero humano en la búsqueda de biomarcadores utilizando tres resinas diferentes: intercambio iónico, columnas basadas en lectina (retiene proteínas glicosiladas) y columnas que quelatan metales como níquel y cobre. Esto les sirvió para concluir que proteínas como la haptoglobina y la hemoglobina se encuentran en concentraciones elevadas en suero de pacientes con AD, así como observar diferencias en múltiples proteínas (la subunidad de 10kDa de vitronectina, la α 1-glicoproteína ácida, la apolipoproteína B100, el fragmento del factor H y la glicoproteína rica en histidina) entre pacientes control y pacientes con AD.

Además, también se trabaja con técnicas que no utilizan cromatografía líquida, como es en el caso de Sussulini y col. ^[13], que optaron por el uso de un kit comercial (*ProteinMiner*) cuya tecnología consiste en el tratamiento de muestras de suero con una serie de hexapéptidos que son capaces de capturar las proteínas de baja abundancia (enriqueciéndolas) y eliminar el exceso de las de alta abundancia, lo que permite la identificación de especies difícilmente detectables.

En conclusión, una de las técnicas más utilizadas para la depleción y fraccionamiento de la muestra es la cromatografía de afinidad, la cual fue utilizada también para la realización de este trabajo.

3.1.1 Cromatografía de afinidad

La cromatografía de afinidad es una poderosa herramienta en el análisis de compuestos bioquímicos, ya que se emplean interacciones específicas entre un componente inmovilizado sobre un soporte (ligando de afinidad) y el compuesto complementario al mismo ^[18].

Hay tres etapas para el proceso de separación por cromatografía de afinidad (Figura 5). La primera etapa es la inyección de la muestra, la cual es bombeada a través de la columna, y todas las especies no retenidas pasan a través de la misma, salvo el analito complementario, que es retenido por su ligando afín ^[18]. Después de que todos los componentes no retenidos pasen por la columna, se inicia la segunda etapa del proceso cromatográfico, produciéndose un cambio en la fase móvil aplicada, lo que provoca la interrupción de las fuerzas de unión entre el analito y el ligando de afinidad, por lo que el analito es eluido de la columna ^[18]. Existen dos categorías de tampones de elución:

- Tampones bioespecíficos de elución ^[18]: contienen una especie que interactúa específicamente con el ligando de afinidad o analito para efectuar la elución. El uso de este tipo de tampón añade una segunda etapa de especificidad, ya que no solo es específica la retención, sino también la elución. Este tipo de elución bioespecífica es la que se lleva a cabo en columnas con lectina que retienen proteínas glicosiladas ^[18].
- Tampones generales ^[18]: afectan a la elución por medios no específicos, a través de la interrupción de los enlaces producidos o las fuerzas intermoleculares débiles entre el analito y el ligando de afinidad. Este tipo de elución utiliza cambios de pH, de fase móvil, la inclusión de modificadores orgánicos o el uso de condiciones desnaturizantes (como puede ser la adición de urea). La desventaja de este esquema de elución es que las especies que se adsorben inespecíficamente al soporte pueden eluir con el analito ^[18].

La tercera etapa del proceso de cromatografía de afinidad es el reequilibrado de la columna con la primera fase móvil, antes de la inyección de la siguiente muestra ^[18].

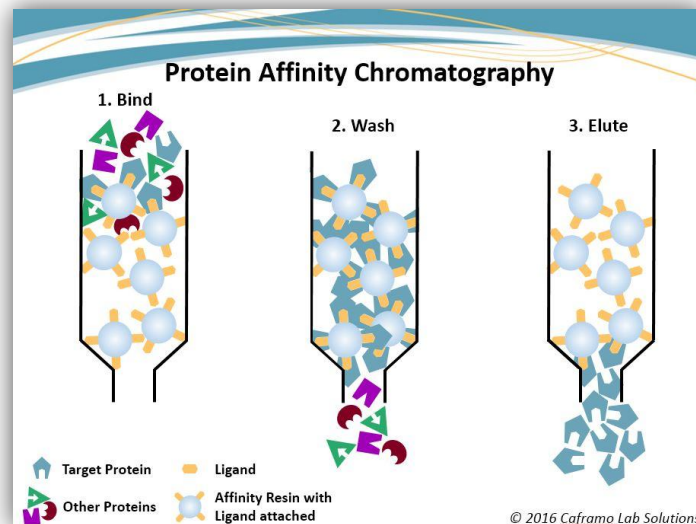


Figura 5. Esquema representativo de la cromatografía de afinidad, en la que se ven la fase de carga, elución de los compuestos no retenidos y la elución del analito ^[19].

3.2 Separación

Una vez que se ha deplecionado y fraccionado la muestra, todavía se sigue teniendo una mezcla compleja de proteínas, por lo que surge la necesidad de técnicas analíticas que permitan la separación de proteínas valiéndose de sus propiedades físicas y químicas. De esta forma, se desarrolla una técnica denominada electroforesis bidimensional, inicialmente puesta en marcha por O'Farrel en 1975 ^[20].

3.2.1 Electroforesis bidimensional (2D-PAGE)

Se define electroforesis como el movimiento de partículas cargadas a causa de un campo eléctrico externo ^[18], por lo tanto es deducible que esta técnica utilizará un campo eléctrico para, aprovechándose de la naturaleza anfótera de las proteínas, separar las proteínas formando una matriz de dos dimensiones. Para la primera dimensión se realiza un isoelectroenfoque (IEF), en el cual las proteínas se separan en un gradiente continuo de pH en función de su punto isoeléctrico (pI, que es el pH al cual la proteína tiene carga neta igual a cero); en la segunda dimensión, o SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis), las proteínas se separan en función de su peso molecular, y la dirección del movimiento en esta segunda etapa es perpendicular a la primera. Como resultado, se obtiene una serie de puntos o spots, cada uno de los cuales pertenece a una proteína ^[21].

- **ISOELECTROENFOQUE**

El IEF proporciona una resolución alta, ya que posibilita la separación de proteínas que difieren en su carga, además de una alta reproducibilidad, debido a que actualmente se utilizan tiras que contienen geles con un gradiente de pH inmovilizado, las tiras IPG (*immobilized pH gradients*), que generan este gradiente al contener sustancias no anfóteras denominadas inmovilinas, que están covalentemente ligadas a

una matriz copolimerizada de gel de acrilamida ^[21]. Las inmovilinas comprenden diversidad valores de pK_a y son capaces de soportar la corriente eléctrica indefinidamente sin ser alteradas, conduciendo a capacidades de amortiguación específicas sobre el intervalo de pH de la tira (siendo las más habituales las tiras que comprenden pH entre 3-10 y entre 4-7), obteniendo el gradiente inmovilizado^[21]. Por lo tanto, cuando la proteína tiene carga positiva (la proteína está en una región de pH por debajo de su pI) migrará hacia el ánodo (negativo), mientras que si la proteína tiene carga negativa (la proteína está en una región de pH por encima de su pI) migrará hacia el cátodo (positivo) ^[21]. Cuando la proteína alcanza la región de pH que corresponde a su pI la migración cesa, puesto que en este punto no tiene carga neta, habiéndose completado el “enfoco” de la proteína y pudiendo permanecer en este punto durante largos períodos de tiempo ^[21].

Para que el IEF se produzca con mayor facilidad, se utilizan anfolitos, que son compuestos de bajo peso molecular que poseen carga eléctrica y colaboran en la migración de las proteínas hasta su pI, favoreciendo además la solubilización de la muestra en el tampón requerido ^[22]. Por ello, es conveniente añadir un pequeño porcentaje de anfolitos de un rango de pH mucho más amplio que el utilizado en la tira ^[22].

De esta forma, el IEF inmoviliza a las proteínas en el gel de las tiras IPG, pero también es posible que esta inmovilización se produzca en fase líquida, como es el caso del OFFGEL, en el que la muestra es fraccionada en diversas porciones líquidas que contienen proteínas con un rango de pI estrecho. Sus ventajas e inconvenientes se encuentran resumidas en la Tabla 2, en las que destacan la recuperación de proteínas en fase líquida, lo que permite un análisis directo de las fracciones de proteína aisladas mediante técnicas avanzadas de separación tales como MS/MS; así como la alta resolución en los pI, porque cada una de las fracciones líquidas (suelen ser 12 o 24 fracciones) se encuentra contenida en un “pocillo” en los que la variación en el pI se encuentra entre $\pm 0,26$ a $\pm 0,27$ unidades de pI ^[21].

Tabla 2. Ventajas y desventajas de la tecnología OFFGEL ^[21].

Tecnología OFFGEL	
Ventajas	Inconvenientes
Recuperación de las proteínas en fase líquida	Largo tiempo de separación (de unas horas hasta 2-4 días)
Alta resolución en los pI (tiras IPG)	Número moderado de proteínas identificadas
Poca influencia de los reactivos de OFFGEL sobre el rendimiento de otras técnicas de separación	Posible precipitación de proteínas de carga neutra

Tanto en el caso del isoelectroenfoque en el gel de la IPG como en el caso del OFFGEL (Figura 6), el hecho de que las proteínas migran desde cualquier punto de la tira a la posición de su pI permite que la muestra pueda ser cargada a lo largo de todo el sistema de separación.

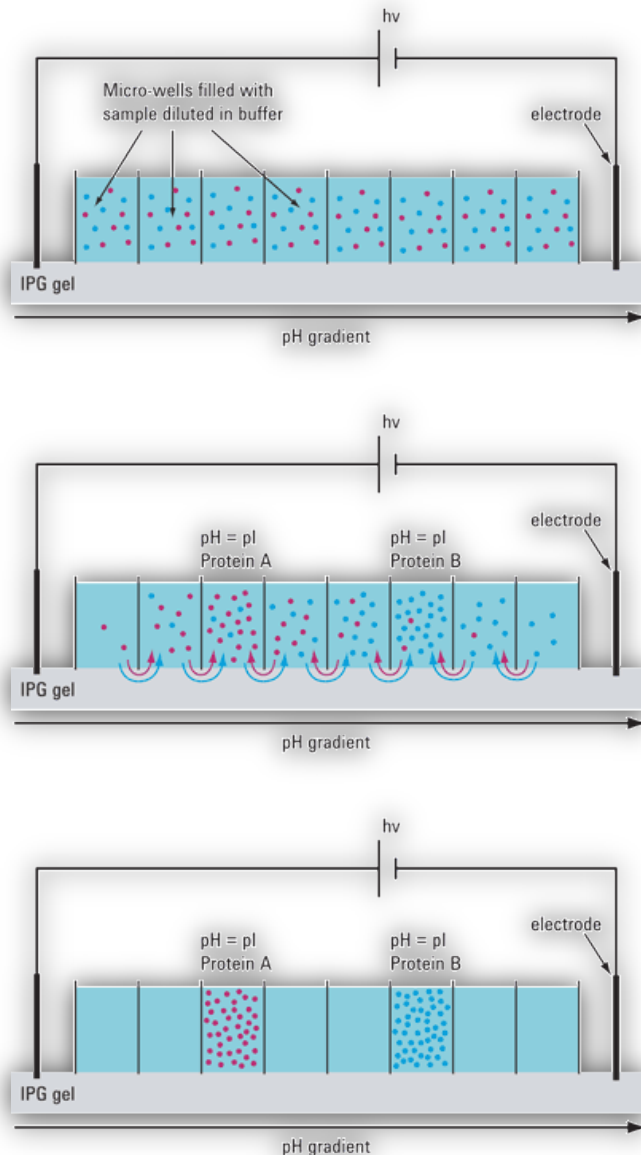


Figura 6. Fraccionamiento basado en el pI siguiendo la tecnología OFFGEL ^[23].

- **SDS-PAGE**

Esta dimensión cuenta con dos variables indispensables para su realización. La primera de ellas es la utilización de dodecilsulfato de sodio (SDS), que es un detergente y desnaturante de proteínas especialmente eficaz; mientras que la segunda variable es el uso de un soporte en el que separar las proteínas en función de su masa molecular ^[18]. De forma habitual, se utilizan geles de agarosa o de poliacrilamida, ya

que en su preparación se puede controlar el tamaño de poro, lo que determinará el movimiento de las proteínas en relación a la masa ^[18]. Las proteínas cuyo tamaño electroforético sea más pequeño avanzarán más lejos ^[18] (Figura 7).

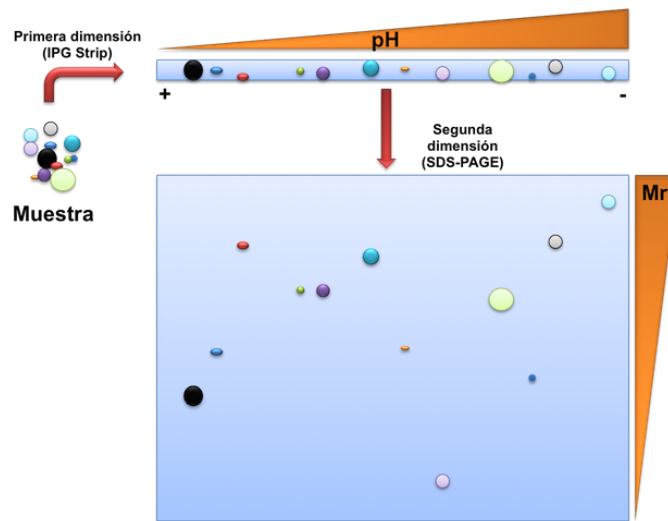


Figura 7. Electroforesis bidimensional, realizada mediante el IEF en una tira IPG y el SDS-PAGE sobre un gel ^[24].

La alternativa al SDS-PAGE para la variante OFFGEL se realiza mediante unos chips (LOC, *Lab-on-chip*) en los que se cargan las fracciones en el mismo, junto con los agentes reactivos, y son analizados por un bioanalizador, obteniendo una segunda dimensión virtual en un ordenador, teniendo como ventaja que este bioanalizador es capaz de realizar una cuantificación de la cantidad de proteína que hay en una fracción.

III. OBJETIVOS

El objetivo principal del presente Trabajo Fin de Grado es la aplicación de técnicas proteómicas basadas en la electroforesis en gel de poliacrilamida bidimensional (2D-PAGE) para la caracterización de proteínas y metaloproteínas de suero sanguíneo. Para ello, se llevará a cabo:

1. La optimización de las condiciones de la depleción de las proteínas de alta abundancia.
2. La estandarización de las condiciones de separación electroforética para proteínas y metaloproteínas.
3. La identificación de spots significativos cuya caracterización pueda resultar en la determinación de un posible biomarcador de la AD.

IV. REACTIVOS Y EQUIPOS

REACTIVOS

- Buffer A y Buffer B empleados en la depleción de proteínas de alta y baja abundancia (Agilent Technologies, EEUU).
- Metanol 100% (Merck, Alemania).
- Cloroformo (Merck, Alemania).
- Agua Milli-Q (Millipore, Bedford, Estados Unidos)
- Tampón de rehidratación con urea/tiourea 2-DE: 7M urea (Sigma-Aldrich, EEUU), 2M tiourea (Sigma-Aldrich, EEUU), 2% (w/v) CHAPS (Sigma-Aldrich, EEUU), 0.5% (v/v) anfolitos (Serva, Alemania), 0.002% azul bromofenol (Sigma-Aldrich, EEUU), 50nM DTT (Serva, Alemania).
- Anfolitos 0.5% (v/v): 0.1% (pH 3-10) y 0.05% (pH 2-4 y 9-11) (Serva, Alemania).
- SDS equilibration solution buffer I: 6M urea (Sigma-Aldrich, EEUU), 75nM Tris-HCl pH 8.8 (Sigma-Aldrich, EEUU), 20 % glicerol (w/w) (Sigma-Aldrich, EEUU), 2% SDS (Sigma-Aldrich, EEUU), 0.002% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich, EEUU), 1% (w/v) DTT (Serva, Alemania).
- SDS equilibration buffer solution II: 6M urea (Sigma-Aldrich, EEUU), 75nM Tris-HCl pH 8.8 (Sigma-Aldrich, EEUU), 20% glicerol (w/w) (Sigma-Aldrich, EEUU), 2% SDS (Sigma-Aldrich, EEUU), 0.002% azul de bromofenol (Sigma-Aldrich, EEUU), 4 % (w/v) iodoacetamida (Sigma-Aldrich, EEUU).
- Tampón de electroforesis: 14.4 g/L de glicina (Sigma-Aldrich, EEUU), 3.03 g/L de Tris Base (Sigma-Aldrich, EEUU) y 5 ml de SDS al 10% (Sigma-Aldrich, EEUU).
- Disolución acuosa metanol/acético (10%/7%) (Merck, Alemania).
- Sypro Ruby (Lonza, Suiza).

EQUIPOS

- Agilent 1260 Infinity Quaternary LC VL (Agilent Technologies, EEUU).
 - o Multiple Affinity Removal System (MARS) Human 6 (4.6 mm id × 100 mm) (Agilent Technologies, EEUU)
- Sigma 2K15 centrifuga refrigerada (SIGMA Laborzentrifugen GmbH, Alemania).
 - o Agilent Spin Concentrators for Proteins (Agilent Technologies, EEUU).
 - o Microtubos MCT-150-C 1,5 mL Clear (Axygen, EEUU).
 - o Tubos Eppendorf (Eppendorf, Alemania).
- Protean IEF Cell (BioRad, EEUU).
 - o Tiras IPG 4-7 de 7 cm y 17 cm (Biorad, EEUU)
- Proteome Plus Dodeca (BioRad, EEUU).
- Typhoon FLA 7000 (GE Healthcare, Reino Unido).
 - o ProgenesisSameSpots versión 4.5 (Nonlinear Dynamics, EEUU).
- Secador de gel de electrophoresis (BioRad, EEUU).
- Centrífuga de mesa (Beckman Coulter, EEUU).
- Micropipetas de 500 µL ,100 µL, 10 µL y 2 µL (Eppendorf, Alemania).

MUESTRAS

Las muestras de suero sanguíneo de pacientes control, pacientes con deterioro cognitivo leve, y pacientes con Alzheimer fueron suministradas por el Laboratorio Clínico de Investigaciones en Neurociencias (*Clinical Neurosciences Research Laboratory*, LINC) del Instituto de Investigaciones Sanitarias del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (IDIS-CHUS).

V. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. Obtención de suero

Una vez incluido el paciente/control en el estudio, se extrajo una muestra sanguínea para la posterior determinación de biomarcadores. Cada extracción constó de 1 tubo de 4,5 mL de bioquímica con separador para la extracción de suero. Se dejó reposar cada tubo durante 10 minutos a temperatura ambiente para la formación del botón celular y, a continuación, los tubos fueron centrifugados a 3.000 rpm durante otros 10 minutos. El suero se repartió en 2 alícuotas de 1 mL. Las alícuotas fueron congeladas a -80°C hasta la realización de los test.

2. Cromatografía líquida

Se inyectaron 60 µL de suero de cada muestra (diluido 1:5 con Buffer A, resultando en un volumen total de 300 µL tras la adición de 240 µL de Buffer A) para su fraccionamiento utilizando la columna de inmutofinidad. Esta columna permite la obtención de dos fracciones: una fracción con las proteínas minoritarias (entre el minuto 2 y el minuto 12) y otra fracción con las proteínas mayoritarias (entre el minuto 12 y el minuto 13,5); ya que retiene de forma selectiva albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina y haptoglobina (Tabla 3). Las dos fracciones fueron entonces concentradas a un volumen final de 500 µL usando centricones 3K.

Tabla 3. Programa de elución de la columna *Multiple Affinity Removal System Human 6*.

	Tiempo/min	% Buffer A	% Buffer B	Tasa de flujo	Presión máxima/bar
1	0,00	100,00	0,00	0,500	120
2	10,00	100,00	0,00	0,500	120
3	10,01	0,00	100,00	1,000	120
4	17,00	0,00	100,00	1,000	120
5	17,01	100,00	0,00	1,000	120
6	28,00	100,00	0,00	1,000	120

3. Precipitación de las proteínas y resuspensión

Se realizó la precipitación de las proteínas con la finalidad de resuspenderlas en el buffer con el que se realizaría a posteriori el isoelectroenfoque. Para ello se utilizó el método clásico de precipitación con MeOH/CHCl₃. Este consiste en una preconcentración inicial de las fracciones desde 500 µL a 100 µL centrifugando a 14.000 G durante 20 minutos, volumen al cual se le adicionan 400 µL de MeOH 100%, 100 µL de CHCl₃ y 300 µL de agua milli-Q (intercalando entre las adiciones el uso del vórtex para homogeneizar la mezcla), para después centrifugar la disolución a 14.000 rpm durante 5 minutos. Tras este proceso, se observan las proteínas suspendidas en la interfase, por lo que se retira la capa superior con cuidado de no eliminar proteína. A continuación, se añaden 300 µL de MeOH y se centrifuga a 14.000 rpm durante 10

minutos, tiempo tras el cual las proteínas precipitan, procediendo a la eliminación del sobrenadante, y su secado al aire, obteniendo un precipitado que se puede resuspender en el buffer.

El precipitado resultante se resuspendió en 860 µL de tampón de rehidratación con urea/tiourea 2-DE, donde el DTT es añadido justo antes de su uso. La cantidad de tampón de rehidratación fue variando a lo largo de los experimentos, dado que esta era una condición a estandarizar en cuanto a la resolución de los geles.

4. Isoelectroenfoque y Electroforesis en Gel de 2 Dimensiones (2-DE)

En los experimentos para la primera dimensión (IEF) se utilizaron tiras IPG (*immobilized pH gradients*) de 17 cm, con un rango de pH de 4-7 para el estudio proteómico y de 7 cm con rango de pH 4-7 para el futuro estudio de los complejos metal-proteína (mediante LA-ICP-MS). En ambos casos se usó el equipo Protean IEF Cell. Para ello, se utilizaron 300 µL de tampón de rehidratación en el caso de la tira de 17 cm y 125 µL en el caso de la tira de 7cm, a los que se le adicionaron anfolitos.

La mezcla se centrifugó a 12.000 rpm durante 5 minutos para eliminar los restos de sales y posibles proteínas que no se hayan resuspendido. La muestra se colocó en strips, donde se realizó una hidratación activa de 12 horas a 50 V/tira a 20 grados, recubriendo la tira con aceite mineral para evitar la evaporación del buffer. El voltaje final al que se somete cada tira es de 60.000 V/tira de 17cm y de 20.000V/tira de 7cm, siguiendo el protocolo de la Tabla 4.

Tabla 4. Programa de voltajes aplicados a las tiras IPG para la realización del IEF.

Tira de 7 cm	Tira de 17 cm
250 V lineal durante 15 minutos	250 V lineal durante 15 minutos
4.000 V lineal durante 2 horas	10.000 V lineal durante 3 horas
4.000 V lineal hasta alcanzar los 20.000 V	10000 V lineal hasta alcanzar los 60.000 V

Una vez alcanzados los 60.000 V/20.000 V, se retiraron las tiras y se equilibraron durante 15 minutos en SDS *equilibration solution buffer* I y otros 15 minutos con el SDS *equilibration buffer solution* II, sometiénolas a continuación a una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% utilizando el Proteome Plus Dodeca. Para ello, se empleó el correspondiente tampón de electroforesis, y las tiras se corrieron a un amperaje constante de 10mA por gel durante 12 horas, hasta que el frente alcanzó el borde inferior. Los geles se fijaron en disolución acuosa metanol/acético (10%/7%) y se tiñeron con Sypro Ruby durante 12 horas. A continuación, se realizó la destinción durante 1 hora en la misma solución de fijación, se lavaron en agua milli Q y se procedió a su escaneado utilizando el Typhoon.

5. Adquisición y análisis de las imágenes obtenidas de los geles en 2 dimensiones (2-DE)

Los geles 2-DE se escanearon utilizando el escáner de fluorescencia Typhoon. Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el programa ProgenesisSameSpots. El alineamiento de los distintos geles fue realizado tanto manual como automáticamente. Todos los geles se compararon entre sí, y el análisis estadístico lo realizó el propio programa, que calcula tanto el valor p como el estadístico de ANOVA de una vía. Se consideró que una proteína estaba diferentemente expresada entre dos condiciones, cuando el $p < 0.05$ y/o el *foldchange* fuese mayor de 1.8.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En primer lugar, se procedió a la optimización de la dilución de las muestras de suero para su fraccionamiento, así como a la elección del pH de las tiras IPG. En el primer caso, el experimento fue realizado con suero de un paciente control, y tuvo como finalidad la correcta obtención de la fracción con las proteínas minoritarias y la fracción con las proteínas mayoritarias. En el segundo caso, la finalidad fue la selección de cuál sería el punto isoeléctrico de los posibles biomarcadores de la AD.

1. Comparativa entre la dilución 1:10 frente a la dilución 1:5 de la muestra al realizar su fraccionamiento

En el manual de instrucciones de la columna de inmunoafinidad empleada para el fraccionamiento de la muestra, se recomienda la dilución 1:5 de las muestras de suero para una correcta depleción de las seis proteínas de alta abundancia que es capaz de retener (albúmina, IgG, antitripsina, IgA, transferrina y haptoglobina). Esta dilución es llevada a cabo con la disolución comercial de composición desconocida con el nombre genérico Buffer A, que es a su vez una de las fases móviles empleadas en la cromatografía líquida que dará lugar al fraccionamiento. De esta forma, se realizaron dos diluciones distintas, con la finalidad de comprobar con que dilución se ajusta mejor el cromatograma resultante con el cromatograma idóneo propuesto por el manual de la columna:

- Dilución 1:5 → 60 μ L de suero + 240 μ L de Buffer A (Figura 8)
- Dilución 1:10 → 30 μ L de suero + 270 μ L de Buffer A (Figura 9)

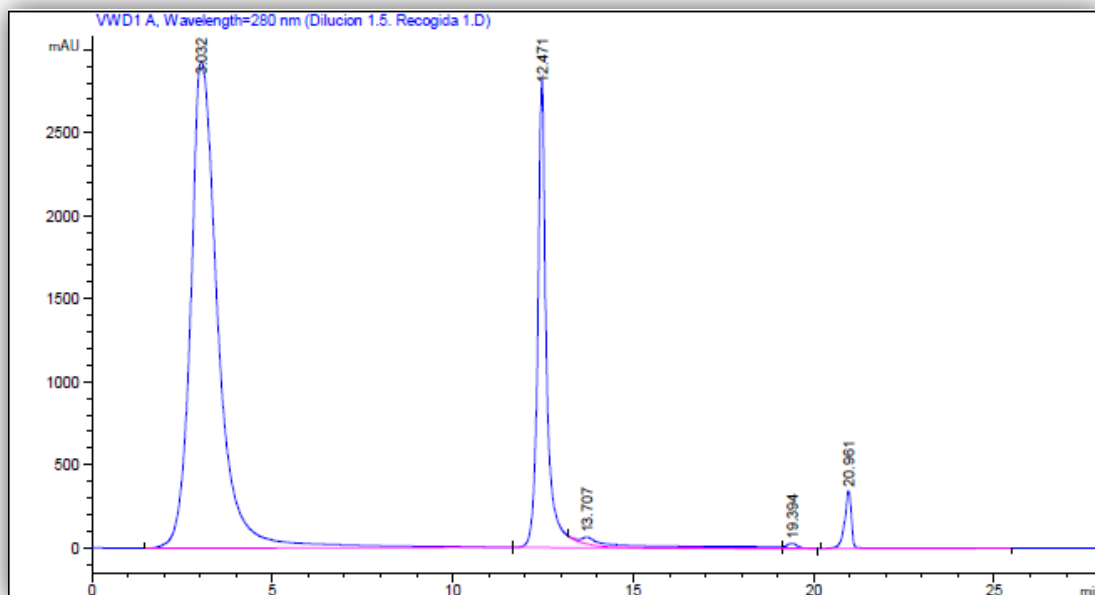


Figura 8. Cromatograma de una muestra de suero diluida 1:5 con Buffer A.

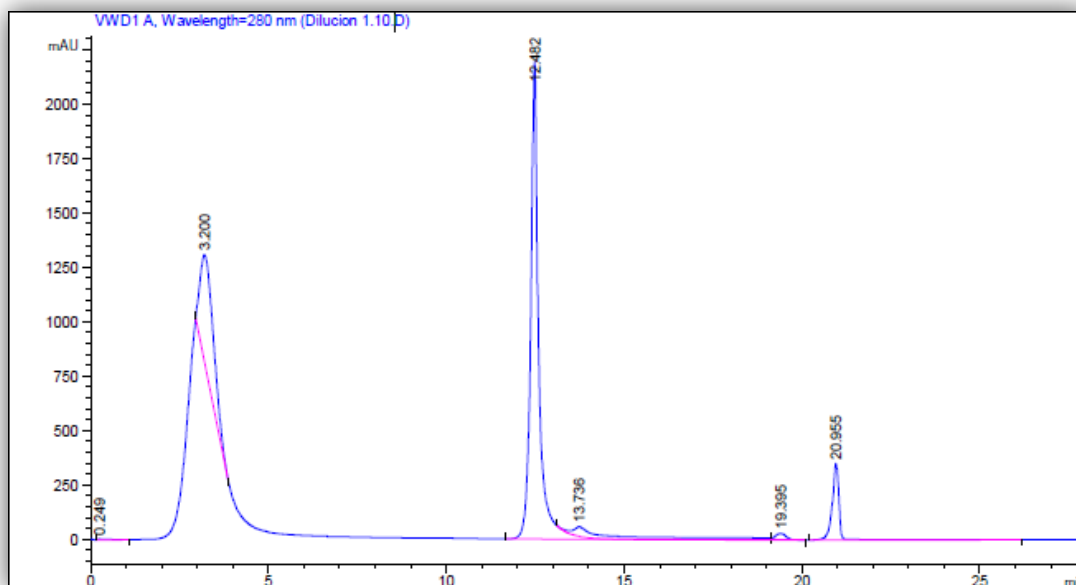


Figura 9. Cromatograma de una muestra de suero diluida 1:10 con Buffer A.

Al encontrar un mejor ajuste en la dilución 1:5 respecto a la dilución 1:10, se optó por realizar ésta en las muestras de suero del posterior estudio, es decir, las muestras de pacientes con AD, de pacientes con deterioro cognitivo y de pacientes control. Además, de esta forma se disminuye el consumo de reactivos.

La interpretación del cromatograma es simple, el primer pico del cromatograma (cuyo máximo se encuentra en torno al minuto 3) corresponde con la elución de las proteínas de baja abundancia, ya que son las proteínas de alta abundancia las que quedan retenidas en la columna por interacciones antígeno-anticuerpo, mientras que al producirse un cambio en la fase móvil al Buffer B (también disolución comercial de composición desconocida) en el minuto 10 (Tabla 3, página 19), se provoca la elución de las proteínas de alta abundancia, viéndose reflejado en el pico que se observa en torno al minuto 12. Los siguientes cambios de fase móvil tienen como objetivo el reequilibrado de la columna, de esta forma se produce una limpieza de la columna por si queda algún compuesto en ella para poder efectuar una siguiente inyección con la columna limpia. El programa completo tiene una duración total de 28 minutos.

Por lo tanto, en las distintas muestras de suero, se deben recoger dos fracciones. La primera fracción corresponde a la de las proteínas de baja abundancia, y comprenden el eluato desde el minuto 2 (en el que empiezan a eluir estas proteínas) hasta el minuto 12, esto se justifica ya que aunque en apariencia el pico regresa a la línea base en torno al minuto 5, en realidad no es así, ya que se sigue obteniendo señal hasta aproximadamente el minuto 12, es decir, en este tiempo continúan eluyendo proteínas de baja abundancia que son necesarias para el estudio, ya que entre ellas podría encontrarse un candidato a biomarcador de la AD cuando se realice el

fraccionamiento de las muestras clínicas del estudio. La segunda fracción corresponde a las proteínas de alta abundancia, y comprende el eluato entre el minuto 12 al minuto 13,5.

2. Elección del pH de las tiras IPG

De manera comercial se encuentran disponibles tiras IPG con un rango de pH comprendido entre 4-7 y entre 3-10. Se escogieron las tiras de pH 4-7, ya que al comprender un rango más corto de pH (hay 3 unidades de diferencia entre el pH más alto y más bajo, frente a las 7 que existen en la otra tira y refiriéndose a tiras de la misma longitud), la separación a partir del pI de la proteína tiene una mayor resolución, es decir, la separación discrimina entre proteínas con pI muy similares. Este factor es de alta importancia a la hora de localizar modificaciones post-traduccionales como pueden ser las fosforilaciones, ya que provocan pequeñas diferencias en los pI de la proteína (en el caso de las fosforilaciones, al aumentar el número de las mismas el pI se torna más ácido), manifestándose en forma de spots de idéntica masa molecular pero distinto pI, dando lugar a manchas consecutivas en el eje horizontal a la misma altura en el eje vertical.

Una vez optimizados estos dos parámetros (referidos a la fase de fraccionamiento de la muestra y al isoelectroenfoque), se procedió a realizar experimentos que optimizasen los parámetros referidos a los geles, es decir, a la segunda dimensión (SDS-PAGE). Para ello, se trabajó en los siguientes aspectos: el tamaño del gel, el porcentaje de polimerización del gel, las condiciones de electroforesis de las proteínas, la tinción del gel y el secado del gel.

3. Tamaño del gel

Partiendo de una muestra de suero de un paciente control, se realizaron geles de distinto tamaño: geles con una longitud de 7cm y geles con una longitud de 17 cm (Figura 10). Para su comparación, fueron realizados en las mismas condiciones: dilución 1:5, 12 % poliacrilamida y tinción Sypro Ruby.

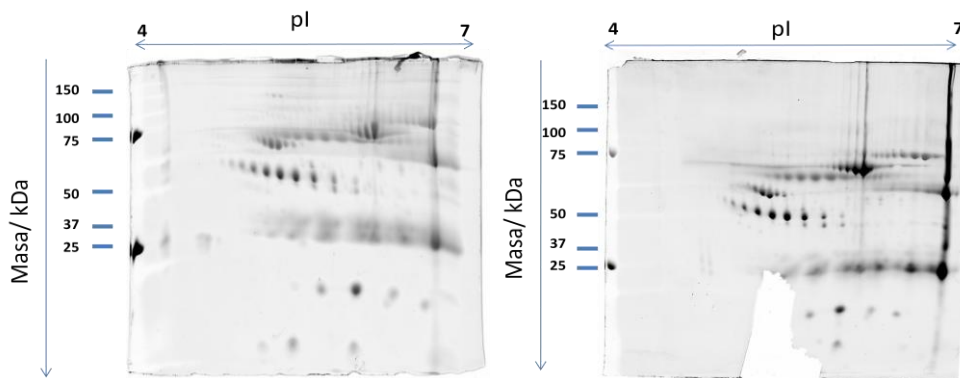


Figura 10. Geles correspondientes a la fracción de proteínas de alta abundancia. El rango de pH es de 4-7 y su longitud es de 7cm en el gel de la izquierda y 17 cm en el de la derecha. Tinción Sypro Ruby.

Obsérvese que en el gel de 17 cm (a la derecha en la Figura 10) le falta un fragmento, esto es debido a la facilidad que tiene para romperse en la manipulación del mismo, pero de todas formas, sirve para afirmar que los geles son comparables independientemente del tamaño. Es por ello, que para la futura identificación de proteínas se utilizarán los geles de 17 cm, ya que al ser de mayor tamaño, son más fáciles de aislar los spots. Por otro lado, se realizarán geles de 7 cm para el futuro estudio del perfil metálico de las proteínas, ya que su conservación y transporte es más sencillo, disminuyendo además el área de ablación, ya que este estudio se llevará a cabo con un equipo de LA-ICP-MS.

Estos dos geles (Figura 10) sirven también como ejemplo para poner de manifiesto la utilización de un indicador para la segunda dimensión, y es que se impregna un papel adsorbente, que se posiciona en un extremo de la parte superior del gel, con una disolución que contiene proteínas de 25 kDa y 75 kDa, por lo que al aplicar el voltaje necesario para la migración de las proteínas según su masa molecular, estas también migran, visibilizándose por tanto unos spots que son indicativos del posicionamiento de las proteínas según su masa, y por lo tanto son de ayuda a la hora de establecer un eje con los valores numéricos correspondientes a la masa molecular. Estos dos spots indicadores se observan como dos manchas en el extremo izquierdo de los geles, coincidente con 25 kDa y 75 kDa.

4. Porcentaje de polimerización del gel

Con la finalidad de optimizar el porcentaje de polimerización del gel, y por lo tanto el tamaño de poro, se realizaron, utilizando suero de un paciente control, geles con un porcentaje de polimerización del 12% de poliacrilamida y del 20 % de policrilamida (Tabla 5). Como resultado, se obtuvieron geles con una mayor resolución al utilizar un porcentaje de polimerización del 12% de poliacrilamida, o lo que es lo mismo, con un mayor tamaño de poro, ya que se observó que había una mayor separación entre los spots, al permitir un mayor avance de las proteínas con menor masa molecular.

Tabla 5. Reactivos utilizados para en la polimerización de geles al 12% y al 20% de poliacrilamida.

Reactivos	Polimerización del 12%	Polimerización del 20%
H ₂ O	3,3 mL	1 mL
30% acrylmide mix	4,0 mL	10,67 mL
1,5 M Tris (pH 8,8)	2,5 mL	4 mL
10% SDS	0,1 mL	160 µL
10% ammonium persulfate	0,1 mL	160 µL
TEMED	0,004 mL	16 µL

5. Condiciones nativas y condiciones desnaturalizantes

Estudios previos muestran que el enlace metal-proteína se conserva en la mayoría de las proteínas después de una separación por 2D-PAGE ^[13], siendo uno de los desafíos más importantes cuando se trabaja con especies metálicas el mantener la integridad del enlace metal-proteína ^[14]. Es por ello que se realizó un experimento para comparar una separación que utilice condiciones nativas (no desnaturalizantes) con las habituales condiciones desnaturalizantes. El factor determinante entre trabajar en condiciones nativas o desnaturalizantes es el uso de dodecilsulfato de sodio (SDS), que es un detergente y desnaturalizante de proteínas, cuya adición interrumpe prácticamente todas las interacciones no covalentes de la molécula, provocando que si un metal está débilmente unido al complejo proteico, este se desvincularía de la proteína, provocando una determinación incorrecta de las metaloproteínas.

Para ello, a la hora de realizar este experimento en condiciones nativas (Figura 11) es necesario eliminar el SDS, así como todos los agentes desnaturalizantes, en las fases de resuspensión de proteínas y en el equilibrado de la tira. Además, tampoco se añade SDS cuando se polimerizan los geles (Tabla 5).

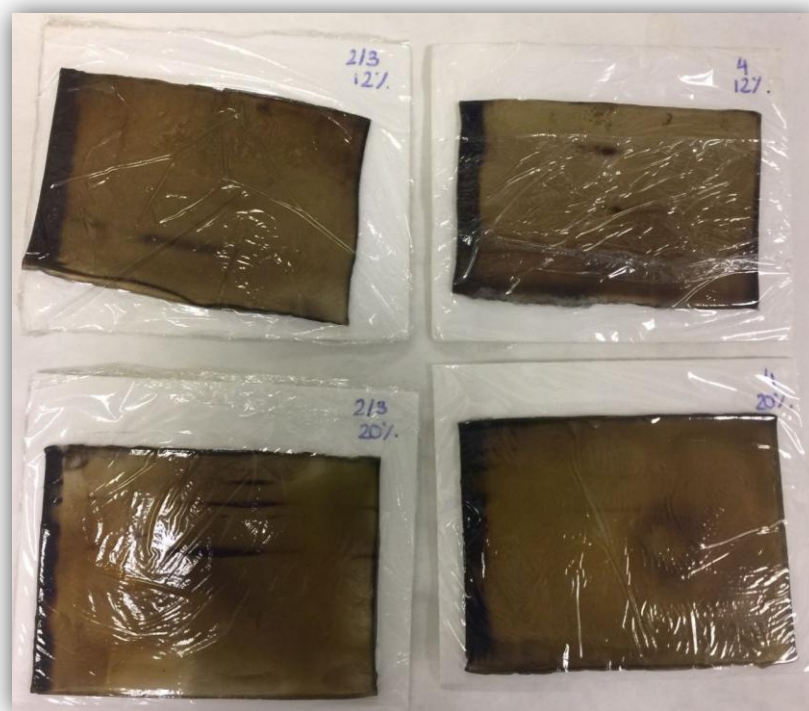


Figura 11. Geles correspondientes a la fracción de proteínas de baja abundancia (etiquetados como 2/3) y proteínas de alta abundancia (etiquetados como 4). El rango de pH es de 4-7 y su longitud es de 7m. El porcentaje de poliacrilamida es del 12% para los geles de arriba y del 20% para los geles de abajo. Se realizó la tinción de plata.

Como resultado, se comprobó que es más difícil interpretar un gel que haya sido realizado en condiciones nativas, dado que en lugar de obtener spots diferenciados, se obtienen bandas de proteínas, cuyo análisis de imagen es más dificultoso, provocando por tanto que tienda a imposibilitarse la identificación de proteínas por técnicas de análisis de masas. Es por ello, que se optó por realizar los experimentos sucesivos en condiciones desnaturalizantes.

6. Tinciones

Se realizaron dos tipos de tinciones en los geles: la tinción Sypro Ruby (Figura 10) y la tinción con nitrato de plata (Figura 11). Dada la compatibilidad de la tinción con nitrato de plata con el LA-ICP-MS que se usará para el estudio del perfil metálico, esta será la tinción que se utilice para el estudio de las metaloproteínas. Por otra parte, la tinción Sypro Ruby es compatible con el uso del equipo MALDI-TOF, por ello, esta será la tinción que se utilice para la identificación de proteínas.

7. Secado

Para el futuro estudio de las metaloproteínas séricas, se ablacionarán los geles de 7cm teñidos con nitrato de plata. Estos geles deben de estar perfectamente secos para no causar interferencias en el equipo de ablación láser que será utilizado. Para este propósito, se realizaron pruebas en el secado de los geles, estudiando dos métodos: el secado a temperatura ambiente y el uso de un desecador al vacío a 80°C. Los mejores resultados se obtuvieron con el uso del desecador, por lo que será el método utilizado cuando se realicen estos geles, que una vez listos podrán ser secados y conservados a baja temperatura hasta su análisis.

En el caso de la identificación de proteínas por espectrometría de masas no es necesario el secado de los geles, ya que en este caso se someterá a una digestión triptica de los spots que, según el análisis de imagen, se consideren significativos.

Recapitulando, se estandarizaron las condiciones de separación de proteínas, para su caracterización, llegando a las conclusiones resumidas en la Tabla 6.

Tabla 6. Resumen de las condiciones estudiadas de la 2D-PAGE.

	MALDI-TOF	LA-ICP-MS
pH de las tiras IPG	4-7	4-7
Tamaño del gel	17 cm	7 cm
Porcentaje de poliacrilamida	12%	12%
Tipo de electroforesis	Desnaturalizante	Desnaturalizante
Tinción	Sypro Ruby	Nitrato de plata
Secado	-	Desecador a 80°C

Además, otro aspecto que se estudió fue la resuspensión de las proteínas, en vista a la realización de réplicas, para responder a la pregunta de, si después de congelar la muestra (refiriéndose en este caso como muestra a las proteínas disueltas en el tampón de rehidratación), sería necesario volver a precipitar y resuspender las proteínas, o si se podría realizar la electroforesis tras descongelar la muestra (proteínas + tampón de rehidratación). Tras la realización de los geles, el resultado fue idéntico para ambas condiciones (Figura 12), por lo tanto se podría realizar la separación electroforética tras descongelar la muestra sin la necesidad de volver a precipitar y resuspender las proteínas.

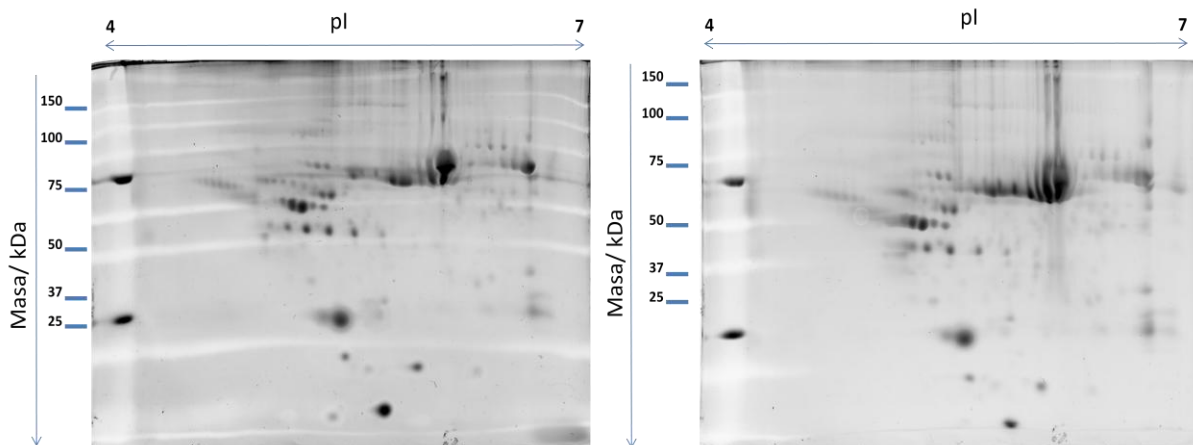


Figura 12. Geles correspondientes a la fracción de proteínas de baja abundancia del paciente C66. El rango de pH es de 4-7 y su longitud es de 7cm. Tinción Sypro Ruby. El gel de la izquierda corresponde a las proteínas precipitadas y resuspendidas tras la congelación, mientras que el de la derecha a las proteínas separadas tras la descongelación de la muestra.

Una vez tenidas en cuenta las consideraciones anteriores, se procedió a realizar el estudio con las muestras clínicas. Para ello, se realizaron los geles para seis muestras de suero de pacientes control, que no padecen ninguna enfermedad neurodegenerativa, los cuales fueron seleccionados aleatoriamente de un grupo de 66 muestras de pacientes, etiquetando a las muestras como C1, C20, C30, C40, C60 y C66. A continuación, se realizaron los geles para seis muestras de suero de pacientes, proporcionados por el servicio de neurología del CHUS, entre los que se incluyen tres muestras de suero de paciente con deterioro cognitivo que evolucionaría a Alzheimer y tres muestras de suero con pacientes con Alzheimer, etiquetando a las muestras como E1, E2, E3, E4, E5 Y E6. Esta primera fase del estudio pretende que, mediante la separación electroforética, el análisis de imagen y la identificación de proteínas; se pueda distinguir entre los pacientes con deterioro cognitivo que evolucionaría a Alzheimer y los pacientes con Alzheimer, por ello, de manera inicial no existe una correlación entre la muestra y la patología que padece el paciente.

Respecto a las muestras de pacientes control, se realizaron con diferentes volúmenes de tampón de rehidratación:

- C1: 435 μL (300 μL + 125 μL + 10 μL)
- C20: 735 μL (300 μL + 300 μL + 125 μL + 10 μL)
- C30: 435 μL (300 μL + 125 μL + 10 μL)
- C40: 560 μL (300 μL + 125 μL + 125 μL + 10 μL)
- C60: 435 μL (300 μL + 125 μL + 10 μL)
- C66: 860 μL (300 μL + 300 μL + 125 μL + 125 μL + 10 μL)

Estas diluciones corresponden a diferentes situaciones. En el caso de C1, C30 y C60 el volumen sería el necesario para elaboración de un gel de 17 cm (300 μL) y un gel de 7 cm (125 μL) (Figura 13).

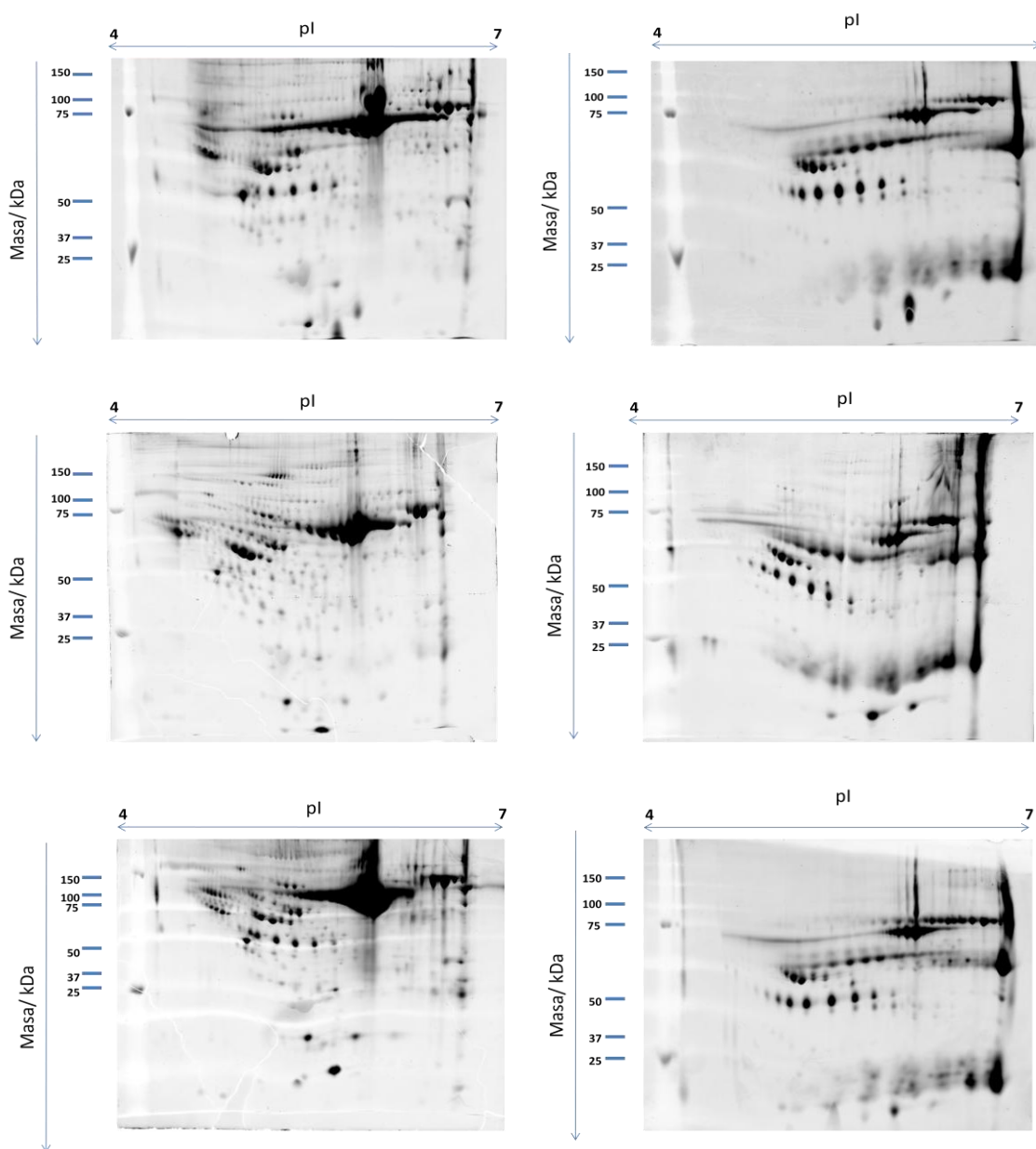
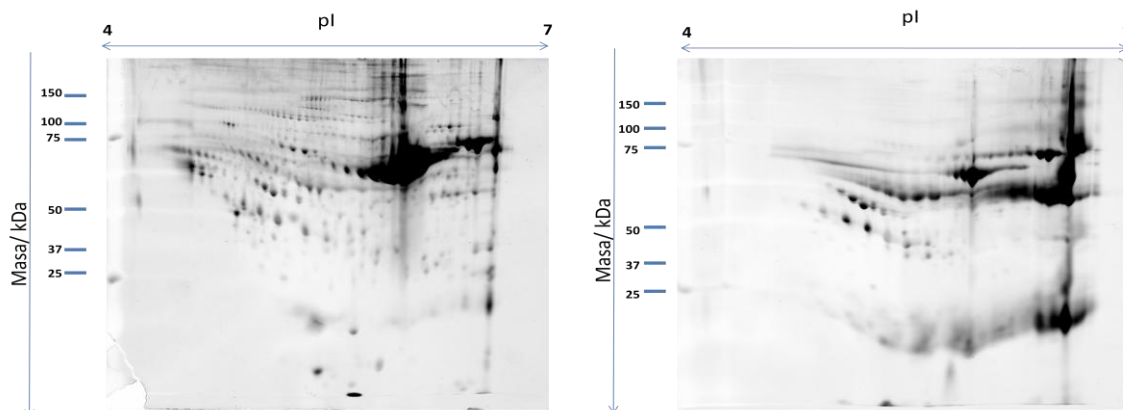


Figura 13. Geles correspondientes a la fracción de proteínas de baja abundancia (izquierda) y alta abundancia (derecha) de las muestras C1, C30 y C60. El rango de pH es de 4-7 y su longitud es de 17cm. Tinción Sypro Ruby.

En C40 se ensayó con un volumen que proporcionaría un gel de 17 cm y dos



geles de 7 cm (Figura 14).

Figura 14. Geles correspondientes a la fracción de proteínas de baja abundancia (izquierda) y alta abundancia (derecha) de la muestra C40. El rango de pH es de 4-7 y su longitud es de 17cm. Tinción Sypro Ruby.

Por otro lado, para C20 resultarían en dos geles de 17 cm y un gel de 7 cm (Figura 15), mientras que para C66 resultarían dos geles de 17 cm y dos geles de 7 cm (Figura 16).

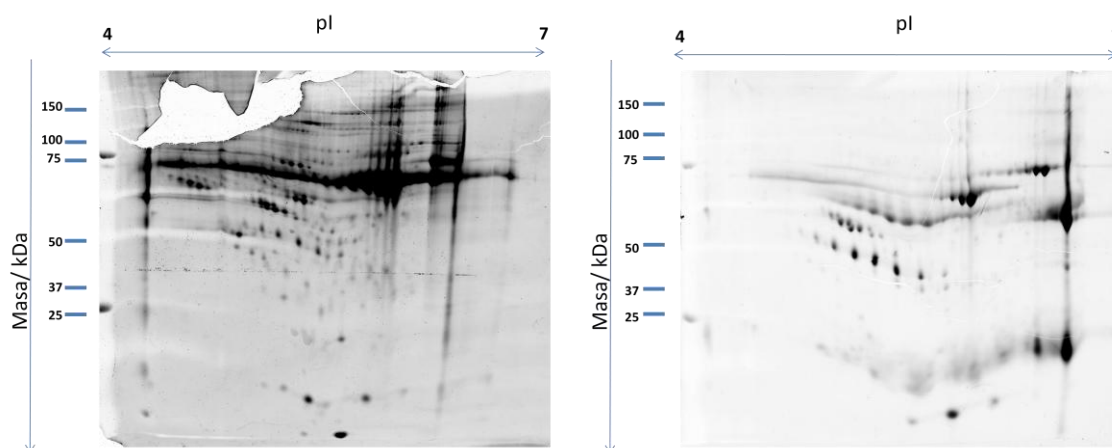


Figura 15. Geles correspondientes a la fracción de proteínas de baja abundancia (izquierda) y alta abundancia (derecha) de la muestra C20. El rango de pH es de 4-7 y su longitud es de 17cm. Tinción Sypro Ruby.

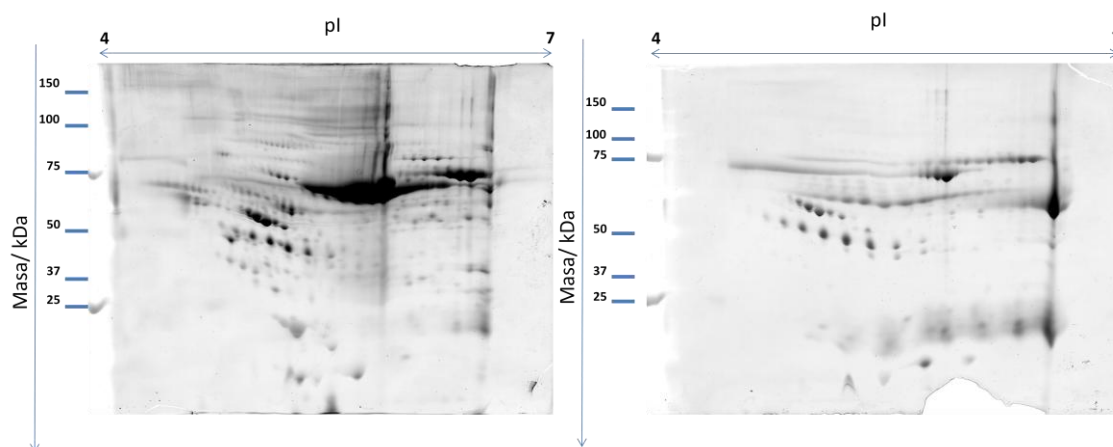


Figura 16. Geles correspondientes a la fracción de proteínas de baja abundancia (izquierda) y alta abundancia (derecha) de la muestra C66. El rango de pH es de 4-7 y su longitud es de 17cm. Tinción Sypro Ruby.

En todos los casos se añadieron 10 μ L de tampón de rehidratación extra para la futura realización de la cuantificación de proteínas en la muestra sérica.

Como conclusión, se decidió que las sucesivas muestras (muestras de pacientes enfermos) se realizarían utilizando 860 μ L de tampón de rehidratación, ya que una mayor dilución conlleva una mayor resolución. Por ejemplo, en las proteínas de baja abundancia disminuye la cantidad de albúmina (que no es deplecionada al 100%). Además se podrían realizar réplicas, en caso de realizar un estudio posterior o si ocurre algún problema en la realización de los geles.

Siguiendo estas consideraciones, se realizó la separación de las proteínas de las muestras de pacientes enfermos (Figuras 17 y 18).

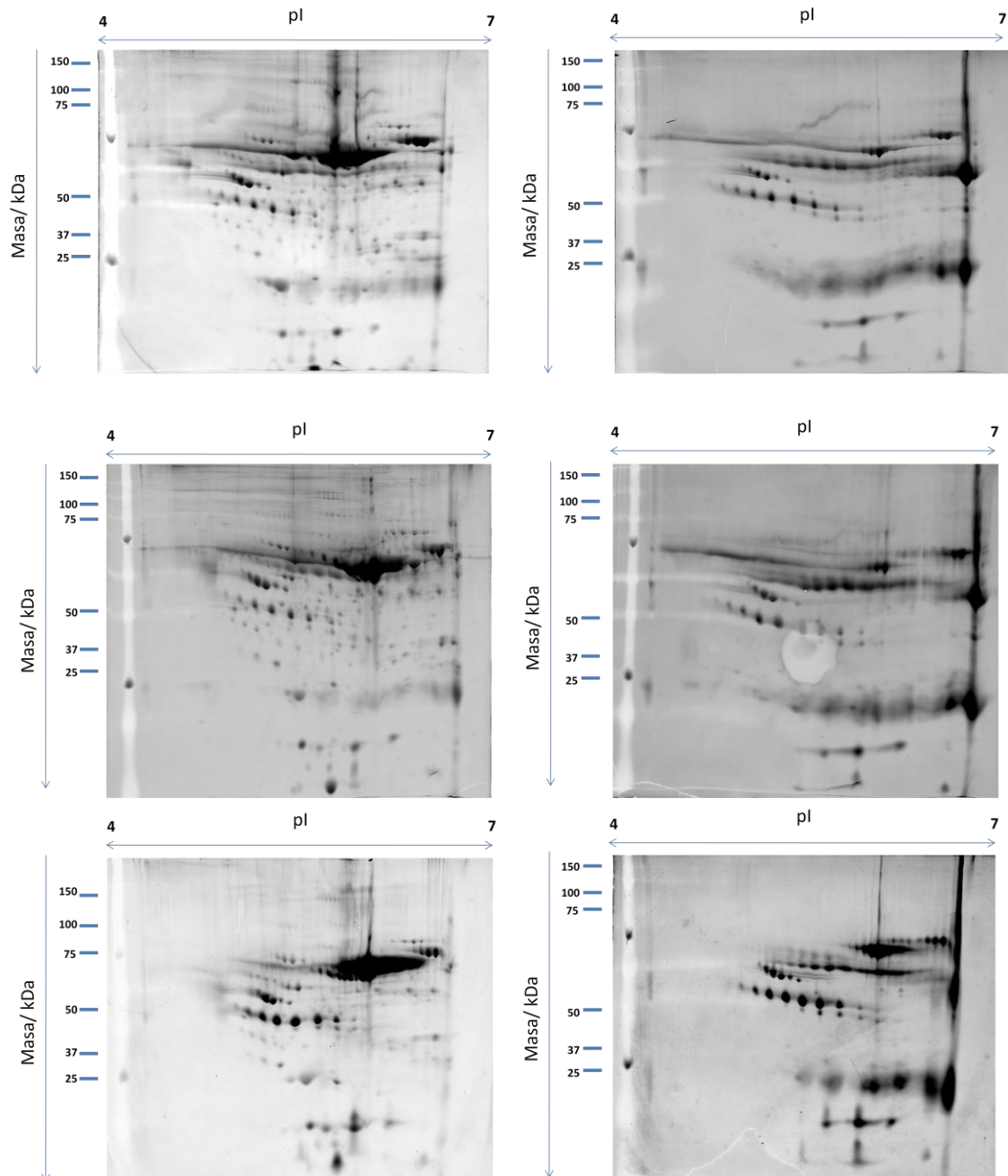


Figura 17. Geles correspondientes a la fracción de proteínas de baja abundancia (izquierda) y alta abundancia (derecha) de las muestras E1, E2 y E3. El rango de pH es de 4-7 y su longitud es de 17cm. Tinción Sypro Ruby.

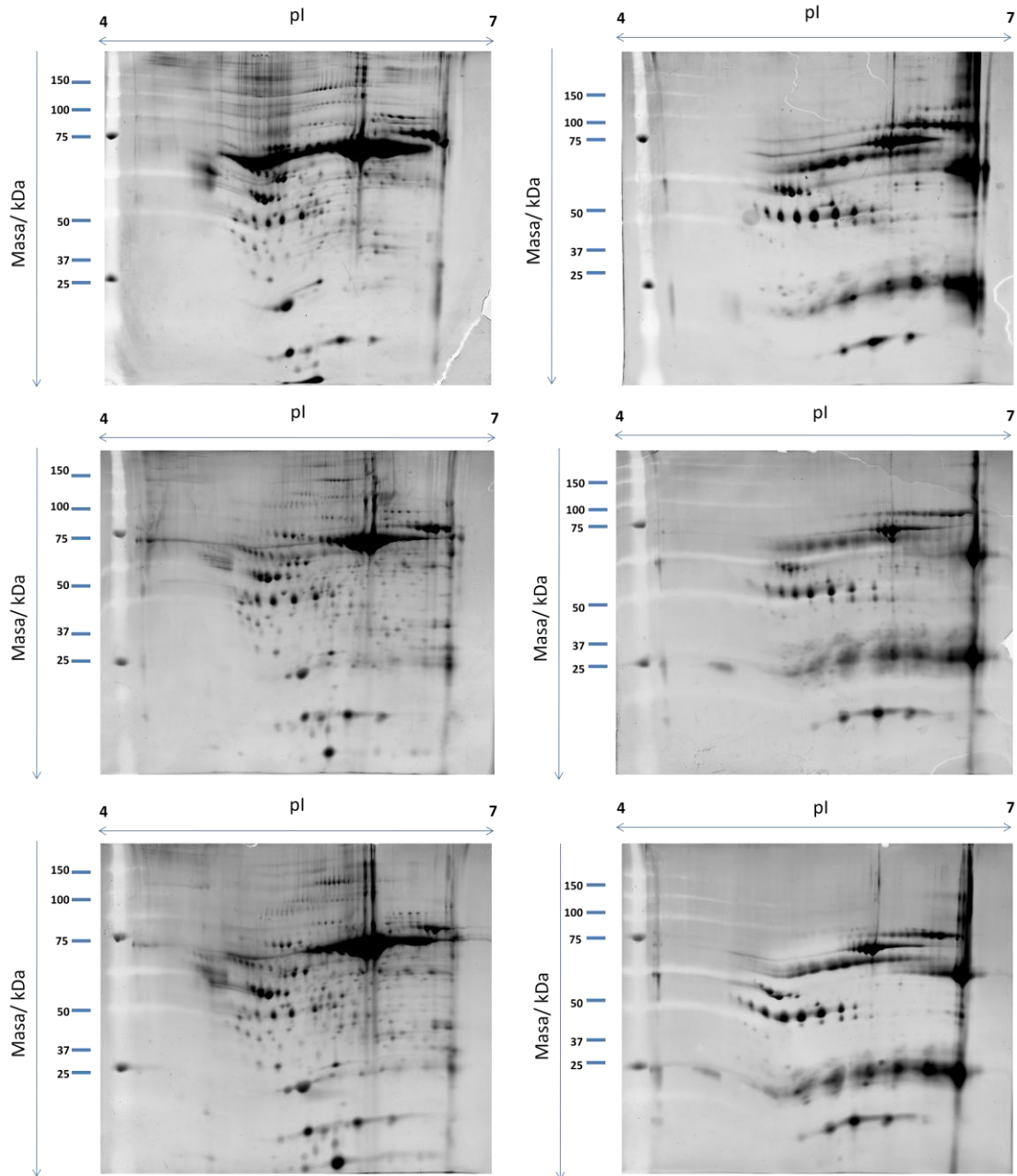


Figura 18. Geles correspondientes a la fracción de proteínas de baja abundancia (izquierda) y alta abundancia (derecha) de las muestras E4, E5 y E6. El rango de pH es de 4-7 y su longitud es de 17cm. Tinción Sypro Ruby.

Una vez obtenidos y escaneados los geles de las muestras de pacientes control y pacientes enfermos, se realizó el análisis de imagen. Como resultado, se obtuvo que spots eran estadísticamente significativos entre ambos grupos de pacientes, esto es, que proteínas se manifiestan en mayor o menor medida en el suero. Estos spots serán sometidos a una digestión trípica y a un análisis de masas para caracterizar a las proteínas y, de esta forma, procurar un posible biomarcador de la AD. A modo de ejemplo, se presentan dos casos de proteínas disminuídas y aumentadas de la fracción de baja abundancia (Figura 19 y Figura 20)

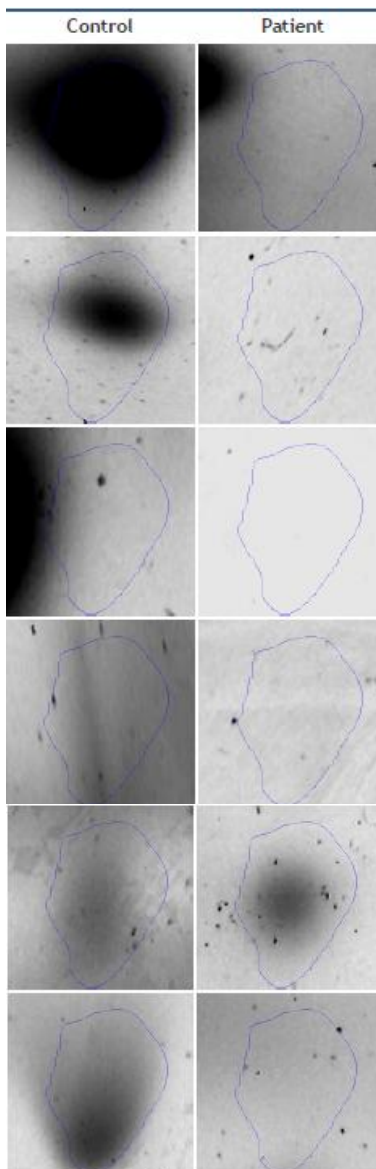
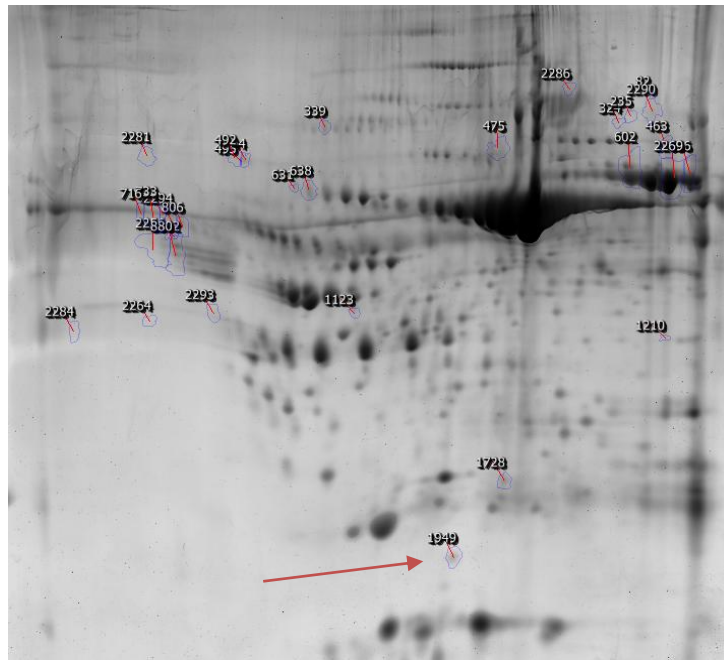


Figura 19. Spots correspondientes a la identificación 1949 (flecha roja) en el gel de referencia (arriba). En los pacientes control este spot se observa más expresado respecto a los pacientes, por lo tanto, se trataría de una proteína que disminuiría su expresión a medida que avanza el desarrollo de la AD.

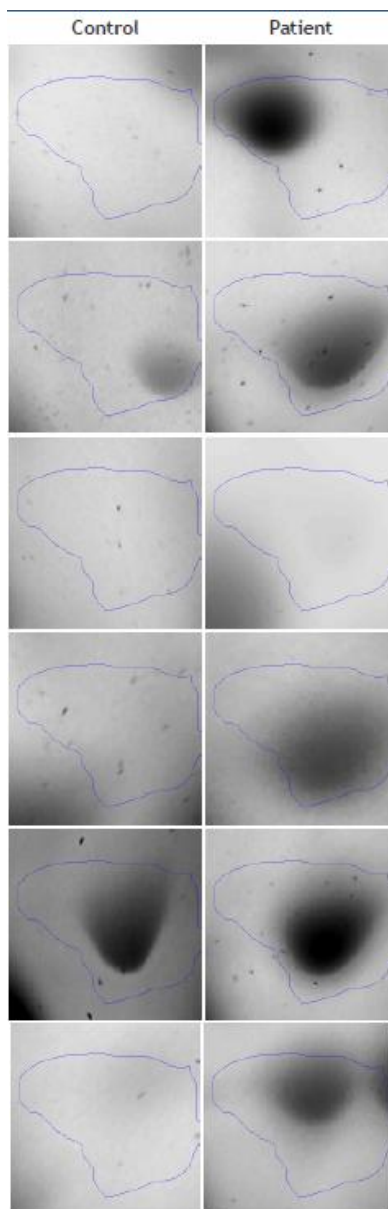
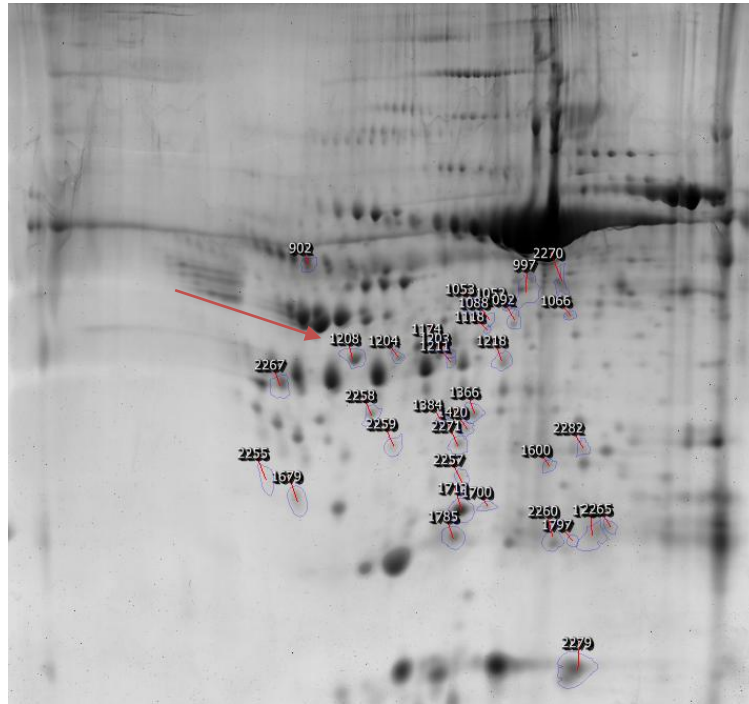


Figura 20. Spots correspondientes a la identificación 1208 (flecha roja) en el gel de referencia (arriba). En los pacientes enfermos este spot se observa más expresado respecto a los pacientes, por lo tanto, se trataría de una proteína que aumenta su expresión a medida que avanza el desarrollo de la AD.

VII. CONCLUSIONES

Castellano

1. La cromatografía líquida, en concreto la cromatografía de afinidad, es una técnica idónea para el fraccionamiento de las proteínas séricas de baja abundancia y de alta abundancia.
2. La electroforesis bidimensional ofrece una alta resolución en la separación de proteínas y metaloproteínas, por lo que permite su identificación en la búsqueda de biomarcadores de la enfermedad de Alzheimer.
3. La multitud de variantes que ofrece la electroforesis bidimensional permite optimizar la técnica para proteínas séricas y para metaloproteínas séricas.

Gallego

1. A cromatografía líquida, en concreto a cromatografía de afinidade, é una técnica idónea para o fraccionamento das proteínas séricas de baixa abundancia e de alta abundancia.
2. A electroforese bidimensional ofrece unha alta resolución na separación de proteínas e metaloproteínas, polo que permite a súa identificación na procura de biomarcadores da enfermidade de Alzheimer.
3. A multitude de variantes que ofrece a electroforese bidimensional permite optimizar a técnica para proteínas séricas e para metaloproteínas séricas.

Inglés

1. Liquid chromatography, mainly affinity chromatography, is an ideal technique for the fractionation of serum proteins of low and high abundance.
2. Two-dimensional electrophoresis offers a high resolution in the separation of proteins and metalloproteins, allowing the identification in the search for biomarkers of Alzheimer's disease.
3. The multitude of variants offered by two-dimensional electrophoresis allows to optimize the technique for serum proteins and for serum metalloproteins.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- [1] DEMENCIA, O.P.A.S. Una prioridad de salud pública. Washington, DC: Organización Panamericana de la Salud, World Health Organization 112 (2013).
- [2] Bird TD. Alzheimer disease overview (2015).
- [3] The Global Impact of Dementia 2013–2050 (Alzheimer's Disease International, Londres, 2013).
- [4] Wortmann M. World Alzheimer report 2014: Dementia and risk reduction. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 11.7 (2015) 837.
- [5] Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. *Patología humana*. Elsevier Health Sciences. (2008).
- [6] Tuneu-Valls L, Rojas-Cano M, Sardans-Marquillas M, Paredes-Pérez E, Gaona-Franco A. Guía de seguimiento farmacoterapéutico de los pacientes con Alzheimer. (2005).
- [7] Pedrouso-López MD. Aplicación de metodologías proteómicas al estudio de la estructura, modificaciones postraduccionales y diferenciación genética de la proteína faseolina en semilla de la judía común (*Phaseolus vulgaris* L.). (2016).
- [8] Torre-Gómez C. Aplicación de técnicas de proteómica para el estudio de enfermedades neuromusculares. (2012).
- [9] Graves PR, Haystead TAJ. Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiology and molecular biology reviews*. 66.1 (2002) 39-63.
- [10] Issaq HJ, Veenstra TD. *Proteomic and metabolomic approaches to biomarker discovery*. Academic Press. (2013).
- [11] Hampel H, Blennow K, Shaw LM, Hoessler YC, Zetterberg H, Trojanowski JQ. Total and phosphorylated tau protein as biological markers of Alzheimer's disease. *Experimental gerontology*. 45.1 (2010) 30-40.
- [12] Rogowska-Wrzesinska A, Le Bihan MC, Thaysen-Andersen M, Roepstorff P. 2D gels still have a niche in proteomics. *Journal of proteomics*. 88 (2013) 4-13.
- [13] Sussulini A, Kratzin H, Jahn O, Banzato CEM, Arruda MAZ, Becker JS. Metallomics studies of human blood serum from treated bipolar disorder patients. *Analytical Chemistry*. 82.13 (2010) 5859-5864.
- [14] González-Domínguez R, García-Barrera T, Gómez-Ariza JL. Characterization of metal profiles in serum during the progression of Alzheimer's disease. *Metallomics*. 6.2 (2014) 292-300.

- [15] Michel PE, Crettaz D, Morier P, Heller M, Gallot D, Tissot JD, Rossier JS. Proteome analysis of human plasma and amniotic fluid by Off-Gel™ isoelectric focusing followed by nano-LC-MS/MS. *Electrophoresis*. 27.5 (2006) 1169-1181.
- [16] Heller M, Michel PE, Morier P, Crettaz D, Wenz C, Tissot JD, Rossier JS. Two-stage Off-Gel™ isoelectric focusing: Protein followed by peptide fractionation and application to proteome analysis of human plasma. *Electrophoresis*. 26.6 (2005) 1174-1188.
- [17] Zhang R, Barker L, Pinchev D, Marshall J, Rasamoeliso M, Smith C, Jackowski G. Mining biomarkers in human sera using proteomic tools. *Proteomics*. 4.1 (2004) 244-256.
- [18] Kaplan LA, Kazmierczak E. *Clinical chemistry: theory, analysis, correlation*. Mosby. (2003).
- [19] <http://www.caframolabsolutions.com/application/homogenizing/protein-affinity-chromatography/> (Fecha de acceso: 14/06/2017).
- [20] O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *Journal of biological chemistry*. 250.10 (1975) 4007-4021.
- [21] García-Otero N. Desarrollo de métodos de preconcentración y de especiación funcional y química multielemental en materia orgánica disuelta y proteínas en agua de mar. (2014).
- [22] García.Vence M. Papel de los receptores endolisosomales de NAADP (TPCs) a nivel cardíaco: estudios en modelos animales y en pacientes de cirugía cardíaca. (2016).
- [23] <https://www.agilent.com/cs/library/brochures/5990-5596EN.pdf> (Fecha de acceso: 16/06/2017)
- [24] <https://proteomeplus.files.wordpress.com/2011/07/esquema-2de2.png> (Fecha de acceso: 16/06/2017)