

ESTUDIO DE PERFILES PROTEÓMICOS DE PLASMA SANGUÍNEO ASOCIADOS AL CONTENIDO DE GRASA INTRAMUSCULAR EN LA ESPECIE PORCINA*

Marc Tor¹®, Marc Gabarró¹, Lluís Bosch², Daniel Villalba¹, Josep Reixach³, Joan Estany¹
¹ Departament de Producció Animal. Universitat de Lleida. Rovira Roure, 191. 25198 Lleida.
² Departament d'Enginyeria Química, Agrària i Tecnologia Agroalimentària. Universitat de Girona. 17071. Girona. ³Selección Batallé S.A. 17421. Riudarenes.
®e-mail: mtor@prodan.udl.es

INTRODUCCIÓN

La proteómica, entendida como el análisis sistemático y a amplia escala de las proteínas expresadas por un genoma, puede ayudar a profundizar en las bases de la fisiología y en la localización de marcadores útiles en mejora genética animal. Seguramente el enfoque proteómico más frecuente consiste en la digestión previa de la mezcla proteica compleja, seguida de separación cromatográfica y de la secuenciación de los péptidos diferenciadores mediante espectrometría de masas en tándem. Cuando las diferencias entre muestras son claras, a nivel de presencia/ausencia de un péptido, la elección de los péptidos a secuenciar sencilla, puesto que el interés se centra en aquellos que se expresan únicamente en uno de los tratamientos. Cuando las diferencias son de nivel de expresión, es necesaria la cuantificación previa de los perfiles, para detectar cuales son las señales proteicas de interés (Listgarten *et al.*, 2007). En la actualidad existen diversas estrategias en ese sentido (Wiener *et al.* 2004) y en los dos últimos años han surgido diversas aplicaciones informáticas para el tratamiento tridimensional de este tipo de perfiles. En este trabajo se presentan resultados preliminares de un estudio de perfiles proteómicos de plasma sanguíneo, realizados en dos tipos genéticos porcinos divergentes para el contenido de grasa intramuscular (GIM). El objetivo es optimizar los parámetros de trabajo para la realización, cuantificación y alineamiento de los perfiles proteómicos y evaluar su repetibilidad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Perfiles proteómicos

Se ha obtenido plasma sanguíneo de cerdos de dos tipos genéticos (Du y DuxPi) obtenidos según el protocolo descrito en Tor *et al.* (2007). El primer pool se constituyó con muestras equirepresentadas de plasma de 6 cerdos Du y el segundo pool con 6 muestras de cerdos DuxPi, cada uno de ellos medio hermano de uno del primer pool. De cada pool se realizaron dos digestiones distintas (E y B pool Du; H y I pool DuxPi). La depleción previa de la albúmina e inmunoglobulinas de la muestra se realizó mediante el sistema ProteoPrep® (ref.: PROTBA, Sigma, St. Louis, MO, USA). La cuantificación del contenido proteico del suero depletado se realizó mediante un método basado en sal de tretrazolio (ref.: 77371, Fluka, Buchs, Switzerland). La digestión de las muestras se realizó mediante una solución ácida de tripsina (Trypsin proteomics grade, product code T6567, Sigma, St. Louis, MO, USA), a una relación enzima sustrato de 1:50. La mezcla de péptidos resultante se liofilizó y guardó congelada a -80°C hasta el momento de su análisis. Previamente a la inyección de la muestra en el sistema HPLC/MS se reconstituyó la muestra y se filtró mediante filtro Vivaspin 500 (50 kDa) a 12.000 x g durante 30 minutos a 20 °C. La separación cromatográfica se realizó mediante un sistema 2D-HPLC. Para ello se utilizaron dos columnas conectadas en serie. La primera de intercambio iónico fuerte (SCX; PolySULFOETHYL A, 200x2.1mm; 5µm; 300Å; Columbia, USA) y la segunda de fase inversa (RP; Symmetry300 C4; 2,1x150mm; 5µm; 300Å; Milford, USA). La elución de la columna

* Trabajo financiado por la CICYT (ref. proyecto: AGL2003-05361)

SCX se realizó en 10 etapas de 30 minutos de duración (de 0 a 500 mM CH₃COONH₄). A cada etapa de la primera columna le corresponde un ciclo de elución de la columna RP mediante un gradiente agua-ACN (95/5 a 0/100 %) durante 30 minutos.

Herramientas bioinformáticas

La comparación cualitativa bidimensional de los perfiles se ha realizado mediante el programa Msight 1.0 (Swiss Institute of Bioinformatics, Geneva, Suiza. <http://expasy.org/Msight/>). Para el alineamiento y cuantificación de los perfiles se han utilizado los paquetes MZMine 0.60. (VTT Technical Research Centre of Finland y Computational Systems Biology Research, Turku. <http://mzmine.sourceforge.net/>) y msInspect 1.0.1 (Fred Hutchinson Cancer Research Center, Seattle, USA. <http://proteomics.fhcrc.org/>).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 1 se presenta un perfil proteómico de plasma sanguíneo según la metodología descrita anteriormente. Se obtienen 10 secciones distintas correspondientes a cada una de las fases del sistema 2D-HPLC. En el eje de abscisas se presenta la relación m/z y en el de ordenadas el tiempo de retención en la columna RP. Se observa cierta heterogeneidad entre secciones, tanto en la distribución de los péptidos como en el ruido de fondo, lo cual dificulta el procesamiento de los mismos.



Figura 1. Estructura bidimensional de un perfil proteómico y detalle tridimensional. Cada una de las 10 secciones del perfil corresponde a una fracción de la columna SCX eluida en la columna RP.

En la Figura 2 se presenta la distribución de los perfiles correspondientes a las digestiones E (DU) y H(DuxPi), alineados y cuantificados con aplicaciones bioinformáticas distintas: MzMine y msInspect. Se esperaría *a priori* que las dos aplicaciones llegaran al mismo resultado, pero tal como se observa en la figura aparecen diferencias notables, tanto en la distribución de los picos como en sus intensidades. Ambos programas utilizan algoritmos distintos para la cuantificación y alineamiento. Estos requieren de una optimización empírica de diversos parámetros, que puede condicionar los resultados finales. En la Figura 3, utilizando ya únicamente la aplicación MzMine, se presenta la distribución de las cuatro digestiones agrupadas dos a dos. Cabe destacar que, cuando se comparan perfiles dentro de pool (casos EB y HI), el número de pares alineados (620 y 318 respectivamente) es muy

superior a cuando se alinean perfiles de pools distintos (53 pares aproximadamente). Además la correlación entre las abundancias de los picos alineados es también superior, del orden de 0,7 vs. 0,4. La variabilidad observada dentro de pool es debida al método analítico y atribuible en gran parte al proceso de digestión enzimática de la muestra.

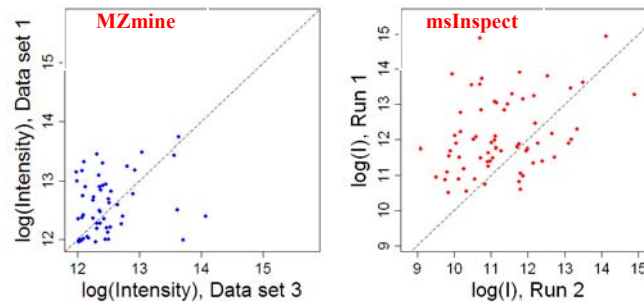


Figura 2. Scatterplots de una digestión del pool DU(E) y una digestión del pool DuxPi (H). Datos de la sección 3 cuantificados y alineados mediante MZmine y msInspect.

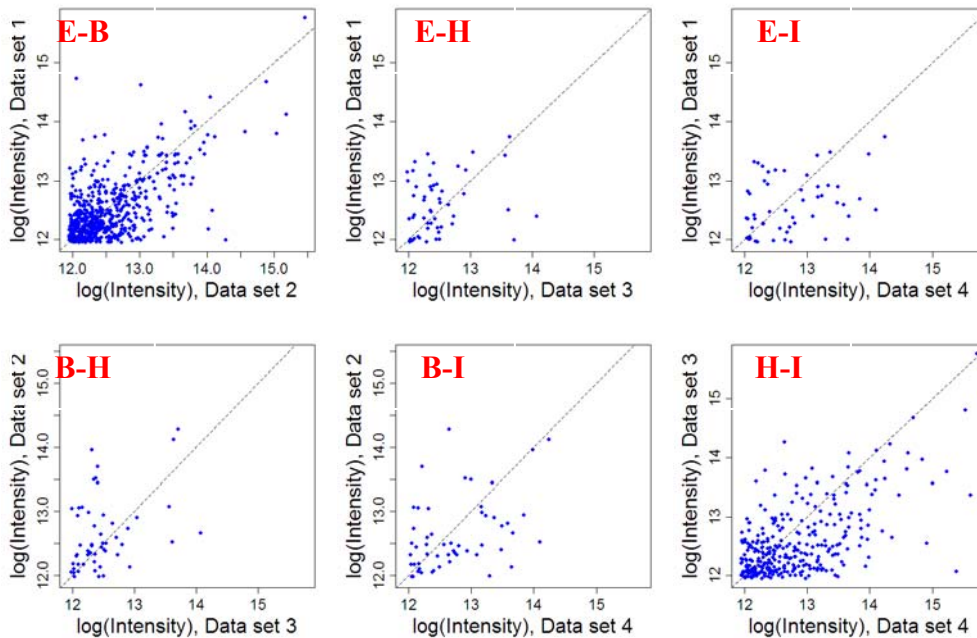


Figura 3. Scatterplots de 2 digestiones del pool DU (E, B) y dos digestiones del pool DuxPi (H, I). Datos de la sección 3 y cuantificados y alineados por MZmine.

Tanto la metodología de preparación de la muestra como el método de cuantificación y alineamiento afectan a la repetibilidad de los perfiles obtenidos. La gran complejidad del proteoma hace muy difícil que los perfiles proteómicos obtenidos sean completos y estos dependen, en gran medida, de la metodología empleada en su realización, alineamiento y cuantificación. Es por tanto fundamental tenerla en cuenta en la interpretación de resultados.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Listgarten J., Neal R., Roweis S.T., Wong P., Emili, A. 2007. *Bioinformatics* 15: e198 - e204.
- Tor M., Bosch L., Reixach J., Estany J., 2007. Diferencias en el perfil fisiológico y contenido de grasa intramuscular en un diseño experimental de medios hermanos maternos Duroc y Duroc x Pietrain. XII Jornadas sobre Producción Animal.
- Wiener M.C., Sachs J.R., Deyanova E.G., Yates N.A. 2004. *Analytical Chemistry* 76 (20): 6085-6096.