

Recibido: 4 de noviembre de 2015. Aceptado: 18 de diciembre de 2015

Implementación de una metodología para la separación de proteomas de plasma humano mediante electroforesis bidimensional

Resumen

En este trabajo se implementaron las condiciones para la separación de proteomas de plasma sanguíneo por electroforesis bidimensional. En muestras de plasma de infante y adulto se evaluaron dos sistemas de pretratamiento de la muestra para reducir el rango dinámico de las proteínas: inmunodepleción de proteínas abundantes y enriquecimiento de proteínas de baja abundancia. Los proteomas se separaron por electroforesis bidimensional y las imágenes se analizaron con el programa Melanie 7.0. Se encontró que ambos métodos de pretratamiento fueron reproducibles y permitieron ver las diferencias en los proteomas de infante y adulto, como muestran los análisis de componentes principales y de clasificación jerárquica tipo heatmap. El porcentaje de recuperación de proteínas fue mayor con la inmunodepleción en comparación con el enriquecimiento proteico. Estos resultados permitieron concluir que con la inmunodepleción, se tiene mayor control de las proteínas eliminadas y por tanto menor pérdida de información, lo que permite su aplicación en estudios exploratorios para la identificación de potenciales biomarcadores de enfermedad.

Palabras clave: marcadores biológicos, proteómica, plasma, cromatografía de afinidad, electroforesis bidimensional.

Implementation of a methodology to separate human plasma proteomes by two-dimensional electrophoresis

Abstract

The conditions to separate blood plasma proteomes by two-dimensional electrophoresis were implemented. In plasma samples from infant and adult two sample pretreatment systems to reduce the proteins dynamic range were evaluated: Immunodepletion of abundant proteins and protein-enrichment of low abundance proteins. Proteomes were separated by two-dimensional electrophoresis and the images were analyzed using Melanie 7.0. It was found that both pretreatment methods were reproducible and allowed to see the differences in the proteomes of infant and adult, as evidenced by the principal component analysis and heatmap, a type of hierarchic classification. The percent recovery of proteins was greater with the immunodepletion method, compared to the protein enrichment system. With these results, we conclude that reducing the complexity of plasma by immunoaffinity showed better control of unrecovered proteins and therefore less loss of information, which allows its application on exploratory studies to identify potential biomarkers of disease.

Keywords: biological markers, proteomics, plasma, affinity chromatography, two-dimensional electrophoresis.

Implementação de uma metodologia para a separação do proteoma do plasma humano por eletroforese bidimensional

Resumo

O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições para a separação de proteomas do plasma sanguíneo por eletroforese bidimensional para sua aplicação na procura de potenciais biomarcadores. Trabalhou-se com amostras de plasma de crianças e adultos, avaliando dois sistemas de pretratamento da amostra para diminuir o espectro dinâmico das proteínas, imunodepleção de proteínas abundantes e enriquecimento de proteínas de baixa abundância. Os proteomas foram separados por eletroforese bidimensional e as imagens foram analisadas com o programa Melanie 7.0. Foi encontrado que ambos métodos de pretratamento foram reproduzíveis e permitiram observar as diferenças nos proteomas de crianças e adultos, como foram evidenciadas com as análises de componentes principais e de classificação hierárquica tipo heatmap. A porcentagem de recuperação de proteínas foi maior na imunodepleção do que obtido pelo enriquecimento proteico. Estes resultados permitiram concluir que com a imunodepleção há um controle mais eficiente das proteínas eliminadas e assim uma menor perda de informação, isto permite sua aplicação em estudos exploratórios orientados na identificação de potenciais biomarcadores da doença.

Palavras-Chave: marcadores biológicos, proteômica, plasma, cromatografia de afinidade, eletroforese em gel bidimensional.

Introducción

El conjunto de proteínas expresado por un organismo, tejido o célula, es conocido como proteoma. Este proteoma es único y específico para cada estado biológico particular y su estudio permite un acercamiento a la(s) proteína(s) responsables del fenotipo de interés (1). La investigación proteómica se basa en la separación de las proteínas presentes en una muestra mediante técnicas de alta resolución, tales como electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2DE, por su nombre en inglés) (2) o cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por su nombre en inglés) (3), ambos acoplados a la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) (4).

Muchos factores relacionados con la toma, almacenamiento y procesamiento de la muestra, influyen en la calidad de los proteomas separados. Es bien sabido que la implementación de esta metodología requiere de personal experimentado para conseguir una alta reproducibilidad, garantizando de esta manera la confiabilidad de los resultados.

Este tipo de estudios se puede realizar en muestras de tejido y en fluidos biológicos como la orina y derivados sanguíneos (2,5), lo que refleja el estado fisiopatológico de un organismo. Particularmente, el análisis proteómico en plasma y suero se ha convertido en una importante herramienta para el descubrimiento de biomarcadores proteicos, aunque su caracterización exhibe algunos desafíos relacionados con el amplio rango dinámico que abarca más de 10 órdenes de magnitud en términos de concentración de proteínas (6). En relación a lo anterior, se han propuesto estrategias para reducir la complejidad del plasma y el suero sanguíneo, entre las que destacan: la precipitación selectiva de proteínas, la depleción de proteínas de alta abundancia y el enriquecimiento de proteínas de baja abundancia, pero el uso de estas estrategias es aún controversial (6-9).

Si bien ambos derivados sanguíneos ostentan gran potencial para la búsqueda de biomarcadores, durante la separación del suero, algunas proteínas pueden quedar atrapadas de manera inespecífica al formarse el coágulo y quedar excluidas de análisis posteriores, mientras que durante la obtención del plasma ocurre menor pérdida proteica y menor degradación *ex-vivo* (10,11).

Los biomarcadores pueden ser usados para el diagnóstico temprano y el seguimiento de enfermedades, además de la evaluación de la respuesta a tratamientos, con el fin de alcanzar mayores tasas de sobrevivencia. En el caso del cáncer, por ejemplo, el diagnóstico temprano usualmente se logra mediante la implementación de métodos invasivos que implican una mayor comorbilidad para el paciente y un alto costo. La investigación de biomarcadores en tejidos de fácil acceso como la sangre, resulta conveniente al ser un método mínimamente invasivo y dar resultado con un grado de comorbilidad bajo.

En este trabajo, con el fin de desarrollar una metodología para obtener mapas 2DE de alta resolución y reproducibilidad, se compararon dos métodos para reducir la complejidad del plasma humano, basados en la inmunodepleción de proteínas abundantes o el enriquecimiento de proteínas de baja abundancia. A la vez, se establecieron las condiciones de preparación de la muestra, previo al análisis mediante electroforesis bidimensional usando muestras de plasma sanguíneo de un adulto y de un infante. Estas condiciones experimentales podrán ser usadas en estudios posteriores para la identificación de potenciales biomarcadores.

Materiales y métodos

Recolección de las muestras

Se obtuvieron muestras de sangre periférica de un infante y un adulto considerados sanos, mediante venopunción en tubos de recolección

que contenían K_3EDTA como anticoagulante. Para obtener el plasma sanguíneo, las muestras se centrifugaron a 1300 x g por 10 minutos a 4 °C. A continuación, el plasma se separó de la fracción celular y se centrifugó nuevamente a 1300 x g por 10 minutos a 4 °C para obtener la fracción plasmática pobre en plaquetas, como recomienda la Organización del Proteoma Humano (HUPO) (11) y se almacenaron a -70 °C hasta su análisis. Las muestras usadas para esta fase de estandarización se recolectaron en el marco de dos proyectos dirigidos al estudio de cáncer colorrectal en adultos y leucemia linfocítica aguda en niños, aprobados por los Comités de Ética e Investigaciones del Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá, Colombia y de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, una vez firmados los consentimientos informados respectivos.

Reducción de la complejidad del plasma

Se evaluaron dos estrategias para reducir la complejidad del plasma sanguíneo. La primera estrategia consistió en la inmunodepleción de dos de las proteínas más abundantes del plasma mediante cromatografía de afinidad. Se empleó el sistema ProteoPrep® Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion, PROTIA (Sigma Aldrich, Missouri, USA), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Rápidamente, una vez equilibrada la columna, se cargaron 50 µL de plasma sanguíneo en buffer de equilibrio (buffer Tris pH 7,4 de baja fuerza iónica), se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 8000 x g por un minuto. El eluido se aplicó nuevamente a la columna para asegurar la adecuada depleción de albúmina e inmunoglobulina, IgG. Finalmente, se hizo un lavado con 125 µL de buffer de equilibrio, que se reunió con la muestra deplecionada de interés obtenida en los pasos previos, y se almacenó a -20 °C. Teniendo en cuenta que la albúmina es una proteína transportadora y con el fin de estudiar si durante el proceso de depleción hubo retención inespecífica de proteínas, se recuperó la fracción de proteínas retenidas o eliminadas por el sistema y se almacenó a 4 °C para análisis posteriores.

La segunda estrategia se basó en el enriquecimiento de proteínas de baja abundancia mediante la aplicación del sistema cromatográfico ProteoMiner™ Small Capacity (Bio-Rad, California, USA), según las recomendaciones del fabricante. Una vez realizados los pasos de equilibrio de la columna, se aplicaron 200 µL de plasma, se incubó por dos horas a temperatura ambiente y se centrifugó a 1000 x g por un minuto.

El material recogido, denominado proteínas no retenidas, se almacenó a -20 °C con el fin de analizarlo mediante 2DE para observar la fracción eliminada por el sistema. Posteriormente se realizaron lavados a la columna con el buffer de equilibrio para eliminar componentes con uniones inespecíficas. La fracción retenida de interés se obtuvo mediante tres eluciones sucesivas con 20 µL del buffer de elución (urea 8M, CHAPS 2% p/v y ácido acético 5% v/v) después de una incubación de 15 minutos y centrifugación a 1000 x g por un minuto. Esta fracción de interés se almacenó a -20 °C.

Precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)

Con el propósito de remover interferentes que afectaran el análisis 2DE (12), se precipitaron las proteínas de las muestras de interés antes de su separación. Plasmas sin tratar y tratados con alguno de los sistemas de reducción de la complejidad de la muestra, se precipitaron mediante el método TCA (2). Un total de 100 µg de proteína se mezcló con TCA, a una concentración final de 10% v/v. La mezcla se incubó a 4 °C por una hora y luego se centrifugó a 15000 x g por 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet se lavó con 50 µL de acetona fría tres veces. Finalmente, se realizó un lavado con una solución acetona: agua (90:10). El pellet se secó a temperatura ambiente y se suspendió en las soluciones buffer a probar.

La cuantificación de proteínas en plasma se realizó usando el sistema Pierce™ 660 nm Protein Assay (Thermo Scientific, Rockford, USA), usando albúmina sérica bovina (BSA) como estándar de proteína.

Electroforesis SDS-PAGE

Se separó un total de 25 µg de proteína de cada una de las muestras de plasma en un gel en gradiente de poli(acrilamida entre el 5% al 15% p/v, bajo condiciones reductoras con ditioneitol (DTT, por su nombre en inglés), a 80 V, 40 mA y corriente continua por 3 horas en el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell (Bio-Rad, California, USA). Para la separación electroforética se usó buffer de electroforesis compuesto por Tris base 25 mM, glicina 0,20 M y SDS 0,10% p/v; también se usó albúmina humana (MP Biomedicals, California, USA) como referencia. Se corrieron dos geles en paralelo, de los cuales, uno se tiñó con azul de Coomassie coloidal G-250 (ver **Visualización de proteínas**) y el otro se utilizó para evaluar la presencia de IgG por inmunoensayo.

Western blot para reconocimiento de IgG humana

Las proteínas separadas se electrotransferieron a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad, California, USA) durante 2 horas a 200 mA en la cámara de transferencia Mini-Trans-Blot® Module for Mini-PROTEAN® Tetra Cell. La membrana se incubó en solución de bloqueo de leche al 5% p/v en buffer tris salino TBS (Tris 25 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,5 mM, pH 7,4) por una hora y, posteriormente, se realizaron tres lavados con el buffer TBS. La membrana se incubó con el anticuerpo primario Anti-IgG Humano policlonal de conejo (DAKO, Glostrup, DK), en una dilución 1:2000 en solución de bloqueo 1% p/v en TBS, durante toda la noche y, después de los lavados, se incubó con el conjugado Anti-IgG de Conejo marcado con peroxidasa de rábano (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) en una dilución 1:10000 durante una hora. Finalmente, como método de revelado se usó el Enhance Chemiluminescence System Amersham™ ECL™ Prime (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Electroforesis bidimensional

Primera dimensión—enfoque isoeléctrico (IEF, por su nombre en inglés)

Se suspendieron 100 µg de proteínas plasmáticas, sin tratar y tratadas, precipitadas con TCA en 125 µL del buffer de rehidratación 2DE con solo urea 8 M o con la variante urea 7 M/tiourea 2 M, para solubilizar las proteínas. De manera alternativa y con el fin de hacer un acople directo a la 2DE como recomienda el sistema ProteoPrep®, se probó el buffer urea 7 M/tiourea 2 M como buffer de rehidratación para plasma tratado sin precipitar.

Las tiras IPG (Immobilized pH gradient, en inglés) pH 3-10 de 7 cm (Bio-Rad, California, USA) se hidrataron pasivamente durante una hora con la muestra solubilizada, seguido del IEF en el PROTEAN® IEF Cell (Bio-Rad, California, USA) con un programa de seis pasos en modalidad rampa rápida. Esta modalidad consistió en una rehidratación activa por 11 horas a 50 V, 200 V por una hora, 500 V por una hora, 1000 V por una hora, 2000 V por una hora, 4000 V/h hasta acumular 10000 V y un paso final de seguridad de 500 V por cinco horas, que mantiene el enfoque de las proteínas. Una vez finalizado el programa, las tiras IPG se almacenaron a -70 °C.

Segunda dimensión—electroforesis SDS-PAGE

Concluido el IEF, las proteínas se sometieron a un proceso de equilibrio que consiste en la reducción de puentes disulfuro por aplicación de DTT 130 mM y su posterior alquilación o bloqueo de los grupos tiol por acción de yodoacetamida (IAA, por su nombre en inglés) 135 mM. Cada paso se realizó en 2,5 mL de buffer de equilibrio (urea 6 M, SDS 2% p/v, Tris-HCl

375 mM a pH 8,8 y glicerol 20% v/v), durante 15 minutos con agitación suave. Terminado el proceso de equilibrio, se eliminó el exceso de DTT y/o IAA lavando las tiras por inmersión repetida en buffer de electroforesis.

La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de poli(acrilamida al 12% p/v en condiciones desnaturizantes en el equipo Mini-PROTEAN® Tetra Cell. Los geles se corrieron a 80 V por 40 minutos, 100 V por una hora y 120 V hasta completar la separación electroforética. Para cada muestra de plasma tratado con los dos sistemas de reducción de la complejidad, se corrió la 2DE por triplicado.

Visualización de proteínas

Se realizó tinción con azul de Coomassie coloidal G-250 (13). El protocolo consistió en la incubación de los geles en 20 mL de la solución de fijado de proteínas (etanol 50% v/v y ácido fosfórico 2% v/v) durante toda la noche y seguido de tres lavados con agua ultrapura. Posteriormente, los geles se incubaron en 20 mL de la solución de tinción (etanol 18% v/v, ácido fosfórico 2% v/v y sulfato de amonio 15% p/v) por una hora. Sin retirar la solución anterior, se aplicó una solución con azul de Coomassie coloidal G-250 al 2% p/v en etanol para llevar a una concentración final de 0,02% p/v. La anterior mezcla se homogenizó usando agitación suave por 72 horas y el exceso del agente de tinción se eliminó mediante lavados con agua ultrapura. El estuche Pierce Silver Stain (Thermo Scientific, Illinois, USA), que consiste en un método de tinción con plata, caracterizado por ser muy sensible (14), se utilizó para visualizar las proteínas eliminadas por los dos sistemas de reducción de complejidad.

Análisis de imágenes 2DE

Las imágenes de los geles 2DE se adquirieron usando el documentador VersaDoc™ MP 4000 (Bio-Rad, California, USA) por medio de un protocolo estándar con luz blanca para geles con tinción de azul de Coomassie. El análisis de imagen se realizó con el programa Melanie 7.0 (Geneva Bioinformatics SA, GeneBio) utilizando parámetros para la detección de spots. Las imágenes se alinearon automáticamente entre réplicas técnicas, y luego entre grupos, seguido de una revisión y corrección manual en los casos necesarios.

Análisis estadístico

Los valores de densidad óptica de los spots observados, entre geles y entre grupos, se normalizaron usando el programa Melanie 7.0 y se exportaron en formato .XML. Para el análisis diferencial entre los perfiles proteómicos del infante y del adulto, se usó un método de agrupamiento basado en un análisis multivariado tipo heatmap. Esto con el fin de obtener una representación gráfica de la similitud entre los geles de infante y adulto por código de colores basado en la media de los valores de densidad óptica. El color negro indica que no hay diferencias con respecto a la media (Z-score = 0), mientras que los colores verde y rojo indican un aumento o disminución de más de una desviación estándar por encima de la media, respectivamente.

Igualmente, se realizaron Análisis de Componentes Principales (PCA, por su nombre en inglés) en dos dimensiones, que corresponden a los dos componentes con mayor variabilidad entre los geles, permitiendo la obtención de una representación de las distancias o diferencias entre los grupos. Se utilizó la prueba estadística de análisis de varianza ANOVA para identificar los spots con diferencias significativas en los valores de densidad óptica entre grupos ($p < 0,001$). Todos los análisis y gráficas se generaron usando el programa R versión 3.0.2., en Sistema Operativo Unix/Linux.

Resultados y discusión

Análisis SDS-PAGE de plasmas no tratados y tratados

En este estudio se encontró una concentración de proteína de 70,98 mg/mL en la muestra de adulto y de 85,22 mg/mL en la de infante. Para los dos estados fisiológicos estudiados se obtuvo tasas de recuperación de proteínas similares con ambos sistemas empleados a pesar de la diferencia en la concentración inicial de proteína: 22% en adulto y 23% en infante con ProteoPrep® y 2,0%, tanto en adulto como en infante con el sistema ProteoMiner™. Sin embargo, comparando entre los dos sistemas, las tasas de recuperación fueron muy diferentes. Con el sistema ProteoMiner™ la tasa de recuperación fue significativamente inferior, generando inconvenientes al momento de obtener la cantidad de proteína necesaria para análisis posteriores.

En la Figura 1A se muestra el patrón de separación electroforética de las muestras de plasma de adulto (carriles 1-4) e infante (carriles 6-9); muestras sin tratar y tratadas con los sistemas de reducción de la complejidad plasmática. Con los dos sistemas se evidencia un aumento en el número de bandas de proteína en las muestras tratadas (carriles 2 y 7 con ProteoMiner™; carriles 3 y 8 con ProteoPrep®) en comparación con las no tratadas (carriles 1 y 6). Esto se relaciona con la reducción de

la concentración de proteínas de mayor abundancia como la albúmina (banda a ~67 kDa; control en carril 10) y la inmunoglobulina G (cadena pesada de ~50 kDa y ligera de ~25 kDa), como se confirma en el análisis por inmunoensayo contra la cadena pesada (Figura 1B).

De acuerdo a lo anterior, ambos métodos empleados resultaron efectivos en la reducción de la concentración de albúmina e IgG de plasma humano, permitiendo la detección de un mayor número de bandas, especialmente de bajo peso molecular, en comparación con el plasma no tratado.

Al comparar los perfiles electroforéticos unidimensionales, la separación de proteínas fue más eficiente con el sistema ProteoPrep®, lo cual se evidencia por la mejor definición de las bandas en todo el rango de peso molecular.

Establecimiento de las condiciones para los análisis 2DE

Los métodos de precipitación proteica son comúnmente usados para remover contaminantes no proteicos como lípidos y sales, puesto que interfieren en los análisis 2D-PAGE (12). Sin embargo, muchos de estos métodos causan pérdida de proteínas debido a la disminución en la solubilidad de las mismas (15,16). Con el fin de evaluar lo anterior, se comparó la resolución de muestras depletadas y precipitadas, solubilizadas en urea 8 M o en urea 7 M/tiourea 2 M (Figuras 2A y 2B, respectivamente).

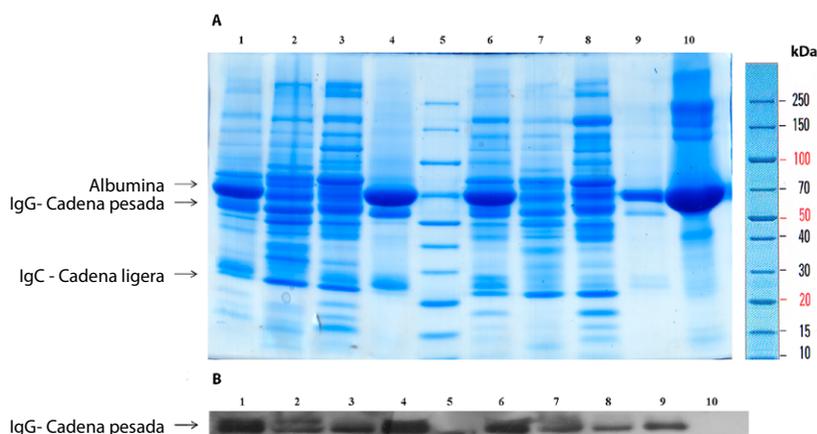


Figura 1. Perfil electroforético de muestras de plasma de adulto (carriles 1 a 4) e infante (carriles 6 a 9) tratadas y no tratadas. Gel SDS-PAGE 5-15% p/v, teñido con azul de Coomassie coloidal (A); Western blot contra la cadena pesada de IgG humana (B). Los carriles corresponden a: Plasma total (carriles 1 y 6); Plasma enriquecido con ProteoMiner™ (carriles 2 y 7); Plasma inmunodepletado con ProteoPrep® (carriles 3 y 8); Proteínas retenidas por el sistema ProteoPrep® (carriles 4 y 9); Fracción V de albúmina humana como control a ~67 kDa (carril 10) y marcador de peso molecular PageRuler Unstained Broad Range Protein Ladder (Thermo Scientific, California, USA) (carril 5). Una separación electroforética representativa del marcador de peso molecular proporcionado por el fabricante se observa a la derecha de la figura

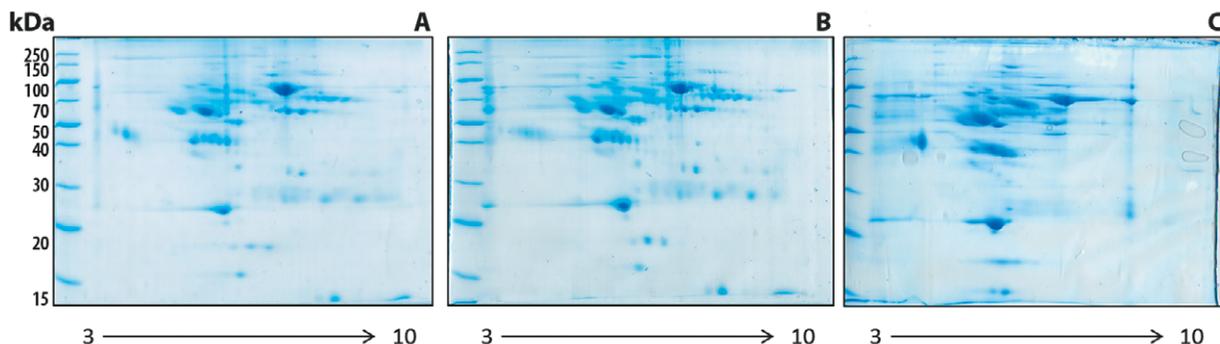


Figura 2. Efecto de la preparación de la muestra en el enfoque isoeléctrico de proteínas. Plasma inmunodepletado, precipitado con el método TCA y disuelto en: buffer de rehidratación urea 8 M (A) o buffer de rehidratación urea 7 M/tiourea 2 M (B). Plasma depletado disuelto en urea 7 M/tiourea 2 M en acople directo con la 2DE (C). La separación 2DE se realizó a partir de 100 µg de proteína con tiras IPG de 7 cm y pH 3-10 en la primera dimensión, y geles de poliacrilamida al 12% p/v en la segunda dimensión. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie coloidal G-250

También se evaluó si la solubilización de las proteínas en la muestra directamente en buffer urea 7 M/tiourea 2 M permite una buena resolución en la 2D-PAGE, sin tener que precipitar las proteínas (Figura 2C). Se observó que el plasma no precipitado muestra una pobre resolución en comparación con el plasma precipitado, especialmente, cuando es solubilizado en el buffer de rehidratación urea/tiourea. De acuerdo a lo anterior, se optó por usar un método de precipitación tipo TCA, según lo recomendado por otros estudios en plasma (17), seguido de la solubilización del precipitado con un buffer de rehidratación compuesto por urea/tiourea.

En conclusión, la preparación de la muestra tratada para los análisis 2DE, mostró una mejor resolución al incluir un paso de precipitación antes del IEF. Lo anterior puede explicarse por la eliminación de sales y lípidos, entre otros interferentes, debido a la precipitación con TCA, donde la pérdida de cantidad de proteína es menor con respecto a otros protocolos de precipitación (2). Si bien se estima que la mayoría de las proteínas circulantes en plasma son solubles, la mejor resolución 2DE se obtuvo con el buffer de rehidratación urea/tiourea, que es usualmente empleado para muestras poco solubles de carácter hidrofóbico, como extractos de membrana celular (18). Este resultado, similar a otros estudios (2), se debe a la presencia de complejos proteicos circulantes en plasma,

que al ser desnaturalizados exponen residuos hidrofóbicos difíciles de disolver en presencia de urea como agente caotrópico único (14).

Análisis 2DE de plasmas no tratados y tratados

Una vez establecidos los protocolos de preparación de la muestra, se compararon los perfiles 2DE de plasma humano sin tratar y tratado con las dos metodologías. En la Figura 3, se muestran los geles 2DE de plasmas no tratados (Figura 3A y Figura 3D), enriquecidos en proteínas de baja abundancia (Figuras 3B y 3E) o inmunodepletados (Figuras 3C y 3F) de adulto e infante, respectivamente. En comparación con los perfiles proteómicos de muestras sin tratar, en las muestras tratadas se observa una disminución en la intensidad de spots predominantes y una mejor discriminación de spots menos intensos. Lo anterior, está relacionado con la capacidad que tienen estos métodos de reducir el rango dinámico de proteínas en plasma.

Resultaron evidentes las diferencias en los perfiles proteómicos, tanto de las fracciones de interés (Figura 3) como de las fracciones eliminadas (Figura 4), obtenidos por enriquecimiento proteico en comparación

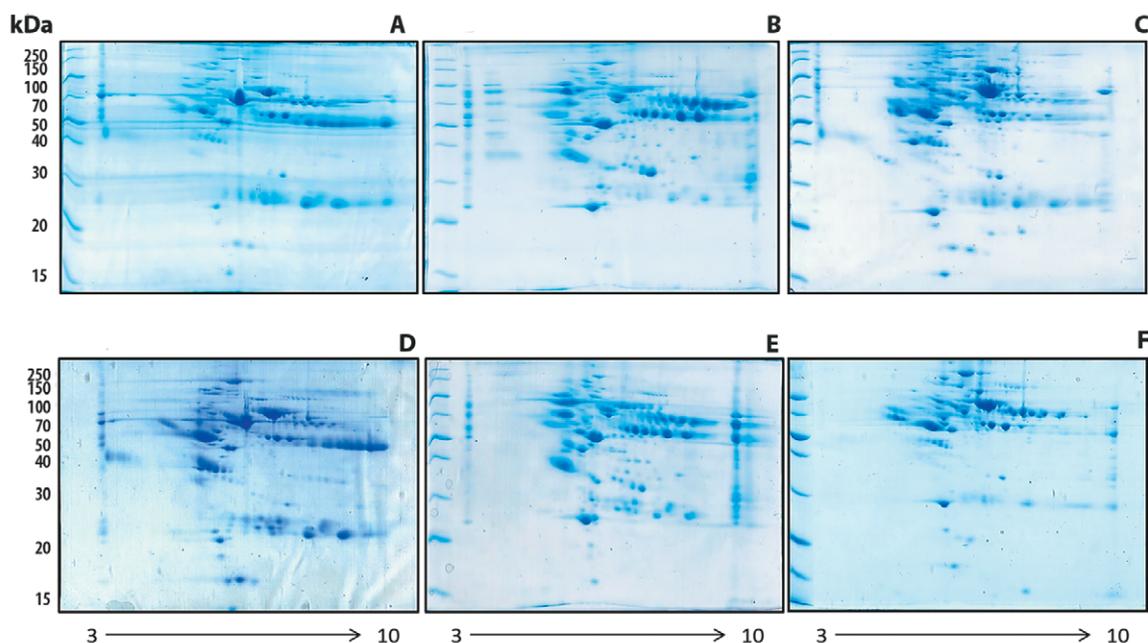


Figura 3. Efecto de los tratamientos para reducir la complejidad en plasma de adulto (A-C) e infante (D-F). Plasma sin tratar (A y D); plasma tratado con ProteoMiner™ (B y E); plasma tratado con ProteoPrep® (C y F). La separación 2DE se realizó a partir de 100 µg de proteína con tiras IPG de 7cm y pH 3-10 en la primera dimensión, y geles de poliacrilamida al 12% p/v en la segunda dimensión. Los geles se tiñeron con azul de coomassie coloidal G-250

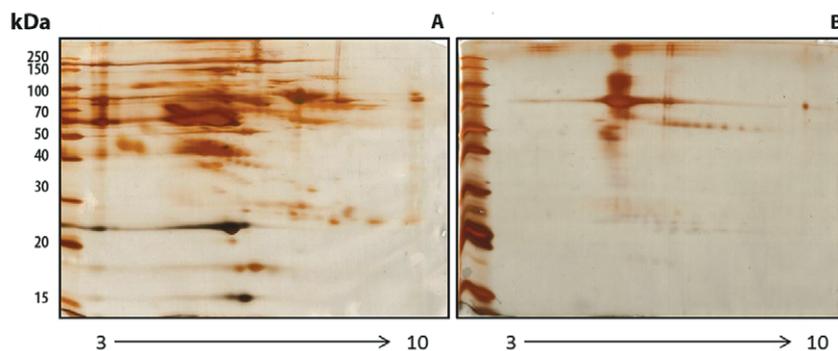


Figura 4. Fracción de proteínas eliminadas por los sistemas, ProteoMiner™ (A) y ProteoPrep® (B), durante el proceso de reducción de la complejidad del plasma. La separación 2DE se realizó a partir de 100 µg de proteína con tiras IPG de 7cm y pH 3-10 en la primera dimensión, y geles de poliacrilamida al 12% p/v en la segunda dimensión. Los geles se tiñeron usando el estuche Pierce Silver Stain

con inmunodepleción. Al respecto, es de resaltar que, con el sistema de enriquecimiento, se observa la eliminación de una gran cantidad de proteínas, a diferencia de lo observado con la inmunodepleción, a causa de los mecanismos que emplea cada sistema para la reducción del rango dinámico de concentración de proteínas. Mientras que el primero se basa en el uso de una librería de hexapéptidos únicos que serán saturados según la abundancia de las proteínas en la muestra, el segundo (la inmunodepleción), solo se descarta albúmina e IgG de manera específica. Estas particularidades de cada uno de los sistemas empleados, pueden también explicar las diferencias encontradas en cuanto a la tasa de recuperación de proteínas señaladas anteriormente.

Diferencias entre los perfiles proteómicos obtenidos con los sistemas ProteoMiner™ y ProteoPrep® para los dos estados fisiológicos

La evaluación de la reproducibilidad y capacidad de distinción entre dos estados de interés a partir de la aplicación de los sistemas empleados en

este estudio, se realizó por medio del análisis comparativo de los perfiles proteómicos obtenidos para cada tipo de muestra.

Los métodos de agrupamiento, basados en análisis multivariado (Heatmap y PCA), permitieron evidenciar la similitud de las réplicas técnicas dentro de cada grupo, así como las diferencias entre infante y adulto, con ProteoMiner™ (Figura 5A) y con ProteoPrep® (Figura 5B). En los diagramas de Venn (Figura 6) se observa que la totalidad de los spots compartidos detectados con los dos tratamientos empleados, fueron similares.

Sin embargo, con el sistema de enriquecimiento de proteínas de baja abundancia, se alcanzó un mayor número de spots únicos en el grupo adulto en comparación con el infante, a diferencia del método de inmunodepleción (Figura 6). Con cada tratamiento, se obtuvieron 26 spots con valores de densidad óptica significativamente diferentes ($p < 0,001$) entre adulto e infante, los cuales se muestran en los mapas 2DE de la Figura 6 (spots delineadas en verde). Las imágenes tridimensionales del área representativa de algunos de estos spots más significativos, junto con su respectivo diagrama de dispersión “caja o cuartiles” para

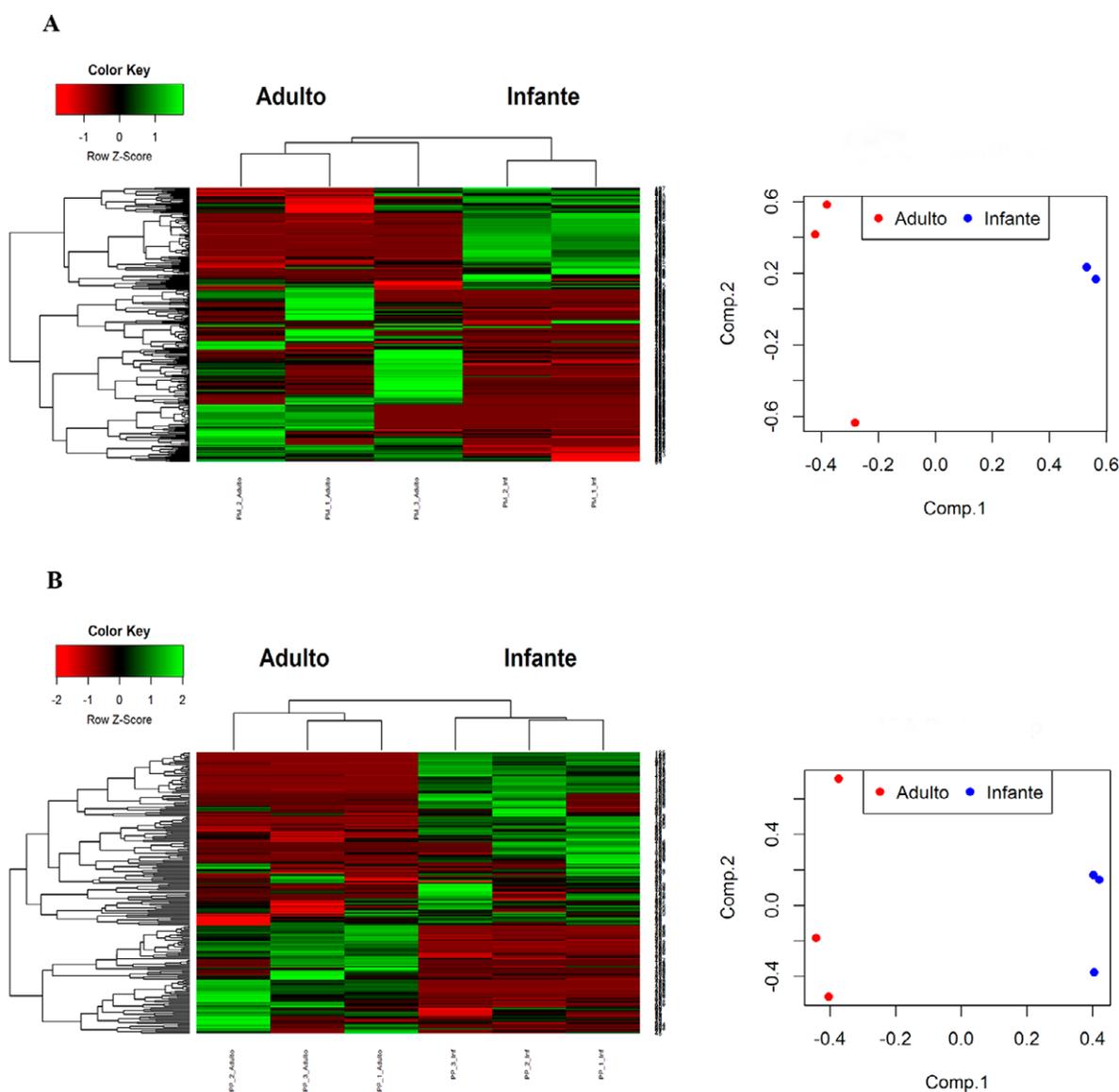


Figura 5. Agrupamiento basado en análisis multivariado de adulto e infante, con la totalidad de spots observados en plasma tratado con: ProteoMiner™ (A) y ProteoPrep® (B). Izquierda: Heatmap, sin diferencias (Z-score = 0), mayor a la media (Z-score > 1) y menor a la media (Z-score < 1). Derecha: PCA usando dos componentes principales

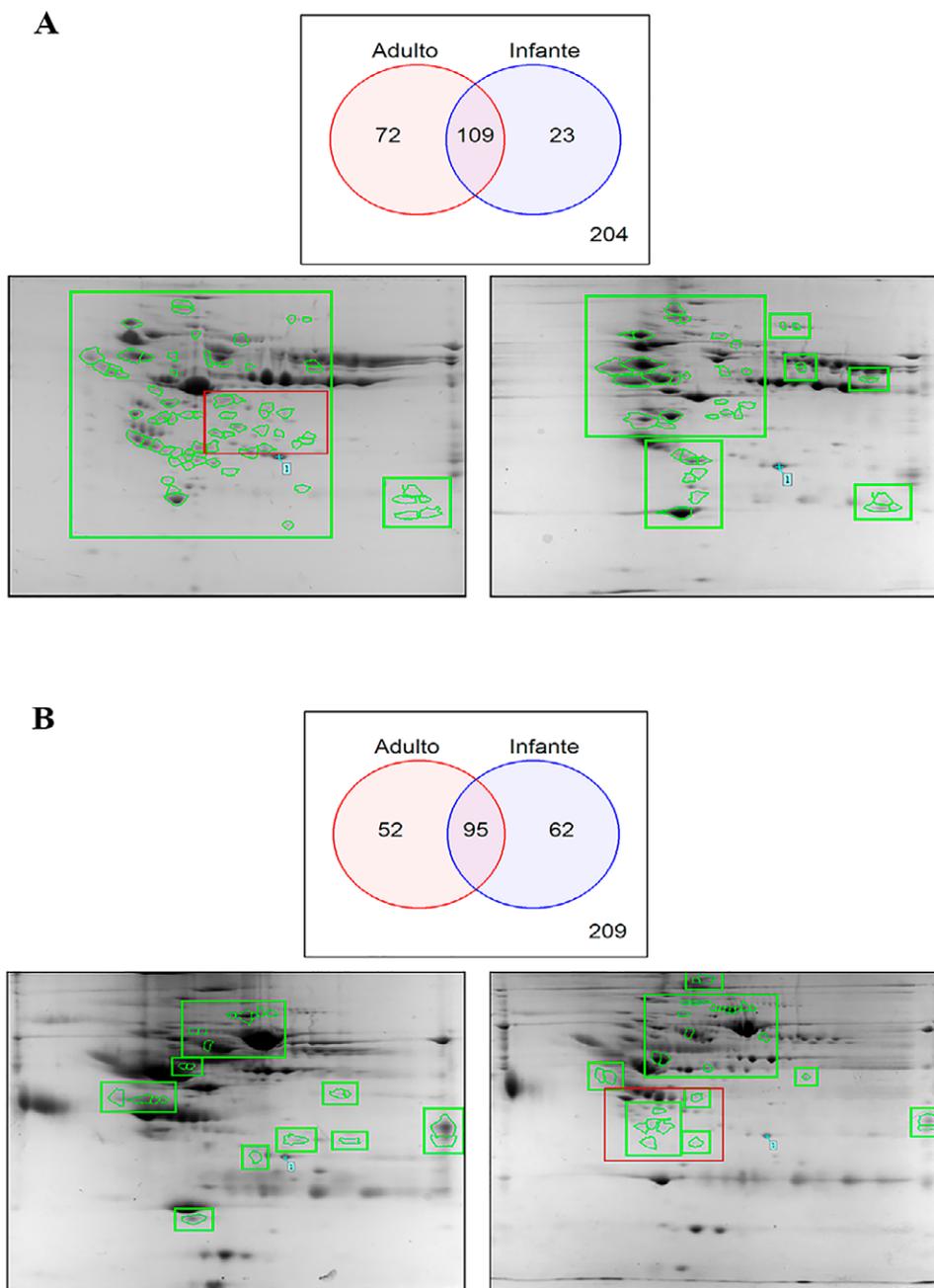


Figura 6. Totalidad de spots observados, compartidos y únicos, en plasma de adulto e infante tratados con ProteoMiner™ (A) y ProteoPrep® (B), con sus respectivos mapas 2DE de spots de proteínas con diferencias de densidad óptica significativas entre los grupos ($p < 0,001$)

cada uno de los tratamientos, se aprecian en la Figura 7. Al respecto, se observa una mayor dispersión de los datos en las réplicas técnicas de adulto obtenidas por enriquecimiento en comparación con la inmunodepleción.

A pesar de las diferencias en los mecanismos para la reducción de la complejidad plasmática entre los dos sistemas, ambos métodos son reproducibles, como se observó al hacer los análisis de agrupamiento multivariado, pues permitieron evidenciar la similitud entre las réplicas técnicas dentro de cada grupo, así como las diferencias entre infante y adulto. Si bien la cantidad de spots totales y significativos detectados con los dos métodos fue similar, se observa que con cada sistema estos se ubican en zonas diferentes de los mapas 2DE (ver zonas demarcadas en rojo en la Figura 6), por lo cual, ambos métodos logran discriminar entre dos estados biológicos particulares.

Las imágenes tridimensionales de los spots seleccionados como significativos con los dos sistemas, muestran que estos corresponden a spots reales y no a artefactos, lo cual confirma que la metodología implementada permite hacer análisis diferenciales en la expresión de proteínas en muestras complejas, como el plasma sanguíneo. Sin embargo, en los datos observados como resultado del enriquecimiento se evidenció una mayor dispersión, relacionada con las limitaciones propias de la técnica 2DE, aunque estos no afectaron la clasificación por grupos obtenida en este estudio.

A pesar del vertiginoso avance en las técnicas proteómicas basadas en cromatografía, la electroforesis bidimensional, por su alta resolución y posibilidad de observar cientos de proteínas en un solo gel, sigue siendo útil para identificar proteínas con uso potencial como biomarcadores de enfermedad en estudios exploratorios de casos y controles en mues-

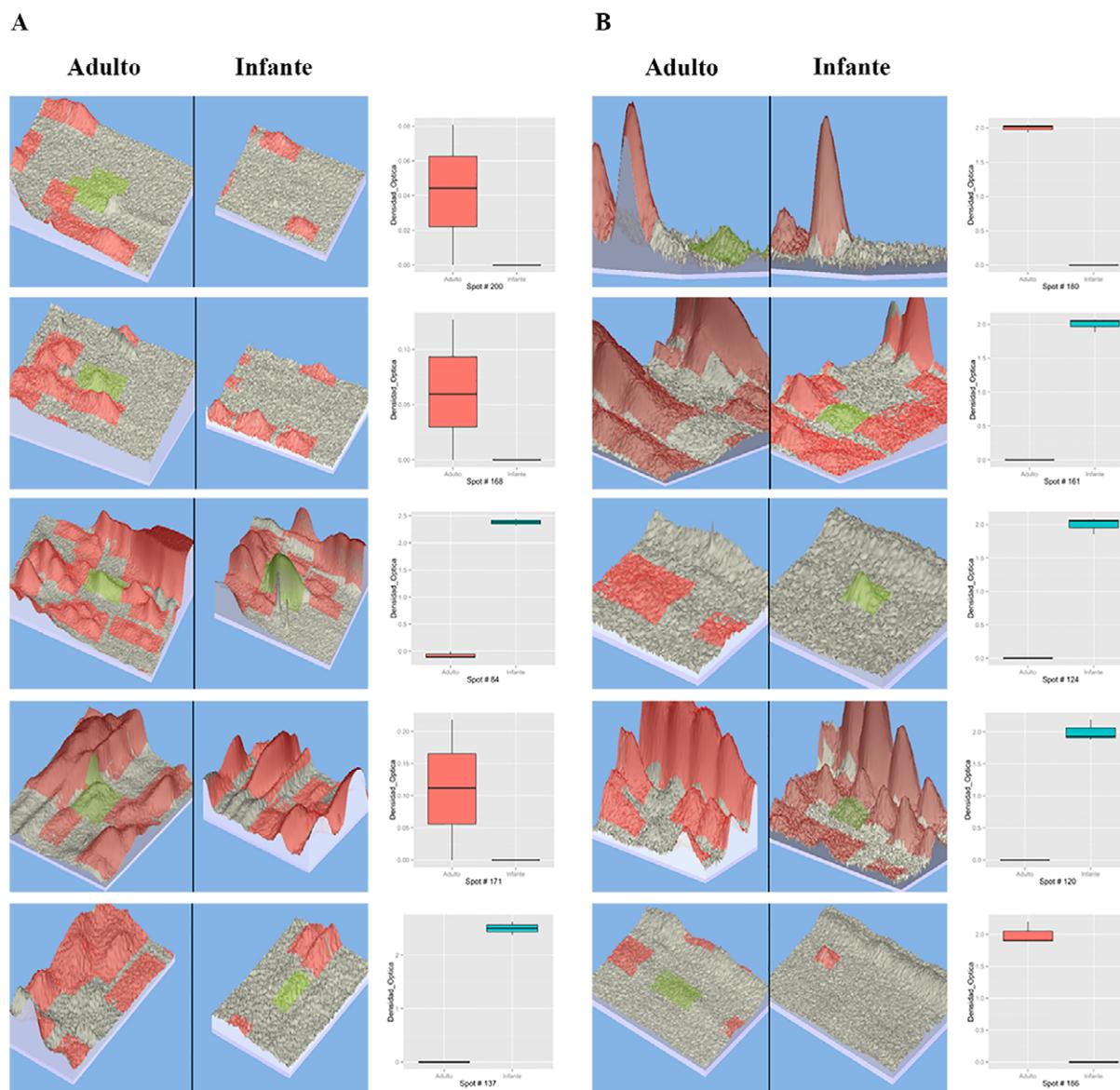


Figura 7. Imagen tridimensional del área representativa de algunos spots con mayores diferencias significativas en los valores de densidad óptica ($p < 0,001$) y su dispersión “diagrama de caja o cuartiles”. ProteoMiner™ (A) y ProteoPrep® (B)

tras complejas como el plasma sanguíneo. Finalmente, su implementación no requiere material o equipo especializado y es relativamente de bajo costo.

Conclusiones

En este trabajo se logró obtener una alta reproducibilidad en las réplicas técnicas con las estrategias usadas. Sin embargo, la fracción descartada del método de enriquecimiento mostró una mayor pérdida de proteínas distribuidas en un amplio rango de pH y peso molecular, a la vez que un menor porcentaje de recuperación de proteínas (~2,0 %) en comparación con la inmunodepleción específica de proteínas abundantes (~22 %). Si bien se encontró que ambos métodos empleados logran separar los proteomas plasmáticos y diferenciar entre dos estados biológicos de interés, se considera que los sistemas de reducción de la complejidad del plasma basados en mecanismos de inmutofinidad ofrecen un mejor control sobre las proteínas que se están descartando y por lo tanto

una menor pérdida de información, lo que es importante en estudios de tipo exploratorio.

Agradecimientos

Los autores agradecen la financiación de la Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá (Proyectos DIB 13269,14718, 15116 y 20708), la Convocatoria Colombia Corre por la investigación en cáncer y el Instituto Nacional de Cancerología (No. 41030310-24). RAR y WAU el apoyo del Programa Jóvenes Investigadores e Innovadores Colciencias 2011.

Adicionalmente agradecen a los investigadores de los proyectos “Análisis Exploratorio de Potenciales Biomarcadores en Cáncer de Colon, C41030610-191” y “Estudio exploratorio de potenciales biomarcadores en Leucemia Linfocítica Aguda en Colombia”, del Instituto Nacional de Cancerología y de la Universidad Nacional de Colombia, por su gestión en la realización de estos proyectos y permitir avanzar en esta parte de estandarización.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses respecto a la investigación, autoría y publicación de este manuscrito.

Referencias

- Honore, B.; Ostergaard, M.; Vorum, H. Functional genomics studied by proteomics. *BioEssays*. **2004**, *26* (8), 901-915. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20075>
- Ahmad, Y.; Sharma, N. An effective method for the analysis of human plasma proteome using two-dimensional gel electrophoresis. *J. Proteomics. Bioinform.* **2009**, *2*, 495-499. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/jpb.1000111>
- Mitulovic, G.; Mechtler, K. HPLC techniques for proteomics analysis—a short overview of latest developments. *Brief. Funct. Genomic. Proteomic.* **2006**, *5* (4), 249-260. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/bfgp/ell034>
- Mann, M.; Hendrickson, R. C.; Pandey, A. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, *70*, 437-473. DOI: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.70.1.437>
- Kennedy, S. Proteomic profiling from human samples: the body fluid alternative. *Toxicol. Lett.* **2001**, *120* (1-3), 379-384. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4274\(01\)00269-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0378-4274(01)00269-7)
- Millioni, R.; Tolin, S.; Puricelli, L.; Sbrignadello, S.; Fadini, G. P.; Tesari, P., *et al.* High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. *PLoS One*. **2011**, *6* (5), e19603. DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019603>
- Bueno, Y.; Muñoz, G.; Torres Sáez, R. Implementación de técnicas sencillas de remoción de proteínas mayoritarias de plasma sanguíneo para análisis por electroforesis bidimensional (2d). *Rev. Colomb. Quím.* **2011**, *40* (2), 131-148.
- Mostovenko, E.; Scott, H.; Klychnikov, O.; Dalebout, H.; Deelder, A. Protein Fractionation for Quantitative Plasma Proteomics by Semi-Selective Precipitation. *J. Proteomics. Bioinform.* **2012**, *5* (9), 217-221. DOI: <http://dx.doi.org/10.4172/jpb.1000239>
- Polaskova, V.; Kapur, A.; Khan, A.; Molloy, M. P.; Baker, M. S. High-abundance protein depletion: comparison of methods for human plasma biomarker discovery. *Electrophoresis*. **2010**, *31* (3), 471-482. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/elps.200900286>
- Omenn, G. S.; States, D. J.; Adamski, M.; Blackwell, T. W.; Menon, R.; Hermjakob, H., *et al.* Overview of the HUPO Plasma Proteome Project: Results from the pilot phase with 35 collaborating laboratories and multiple analytical groups, generating a core dataset of 3020 proteins and a publicly-available database. *Proteomics*. **2005**, *5* (13), 3226-3245. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200500358>
- Rai, A. J.; Gelfand, C. A.; Haywood, B. C.; Warunek, D. J.; Yi, J.; Schuchard, M. D., *et al.* HUPO Plasma Proteome Project specimen collection and handling: towards the standardization of parameters for plasma proteome samples. *Proteomics*. **2005**, *5* (13), 3262-77. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401245>
- Shaw, M. M.; Riederer, B. M. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. **2003**, *3* (8), 1408-17. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200300471>
- Dyballa, N.; Metzger, S. Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J. Vis. Exp.* **2009**, *30*, e1431 DOI: <http://dx.doi.org/10.3791/1431>
- Gorg, A.; Weiss, W.; Dunn, M. J. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. **2004**, *4* (12), 3665-3685. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200401031>
- Bak-Jensen, K. S.; Laugesen, S.; Roepstorff, P.; Svansson, B. Two-dimensional gel electrophoresis pattern (pH 6–11) and identification of water-soluble barley seed and malt proteins by mass spectrometry. *Proteomics*. **2004**, *4* (3), 728-742. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200300615>
- Jiang, L.; He, L.; Fountoulakis, M. Comparison of protein precipitation methods for sample preparation prior to proteomic analysis. *J. Chromatogr. A*. **2004**, *1023* (2), 317-320. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2003.10.029>
- Canas, B.; Pineiro, C.; Calvo, E.; Lopez-Ferrer, D.; Gallardo, J. M. Trends in sample preparation for classical and second generation proteomics. *J. Chromatogr. A*. **2007**, *1153* (1-2), 235-58. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2007.01.045>
- Molloy, M. P. Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal. Biochem.* **2000**, *280* (1), 1-10. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/abio.2000.4514>

Article citation:

Rodríguez, R. A.; Urrego, W. A.; Sanabria M. C.; Sánchez-Gómez, M. C.; Umaña-Pérez, A. Implementación de una metodología para la separación de proteomas de plasma humano mediante electroforesis bidimensional. *Rev. Colomb. Quím.* **2015**, *44* (3), 30-38. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n3.55810>