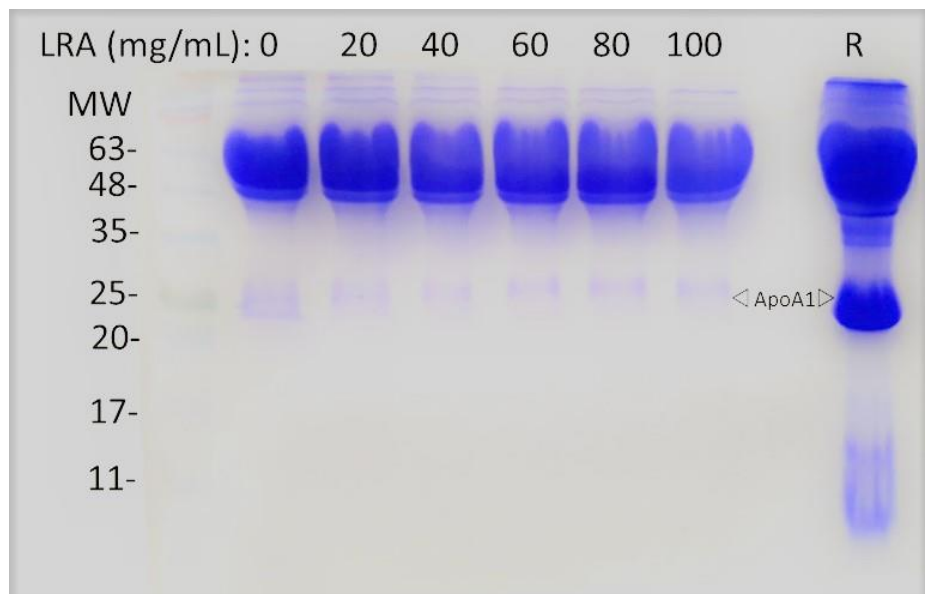


Estudio del proteoma sérico en asma.

Curso académico 2017/2018



Ángel Deprada Fernández

Trabajo fin de Grado presentado en la Facultad de Biología de la
Universidad de Santiago de Compostela para obtener el grado en
Biología

Índice:

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCIÓN	1
2.1- Definición de asma	1
2.2- Fisiopatología del asma	1
2.3- Fenotipos asmáticos	1
<i>2.3.1- Asma alérgica</i>	<i>2</i>
<i>2.3.2-Asma no alérgica</i>	<i>2</i>
2.4-Rinitis	2
2.5- Búsqueda de biomarcadores mediante el uso de herramientas proteómicas	3
3.- OBJETIVOS	4
4.- MATERIAL Y MÉTODOS	4
4.1- Donantes	4
4.2- Obtención de muestras de suero y delipidación	4
4.3- SDS-PAGE (1-DE)	5
4.4- Enriquecimiento en proteínas de baja abundancia: Proteominer	5
4.5- Cleanup	5
4.6.- Cuantificación de proteínas	6
4.7- Reducción, alquilación y tripsinización	6
4.8- iTRAQ	7
4.9- LC-MS/MS	7
4.10- Análisis bioestadístico de los datos	8
5.- RESULTADOS	8
5.1- Características clínicas de los pacientes de estudio	8
5.2- Desarrollo del método de análisis	9
<i>5.2.1- Delipidación</i>	<i>9</i>
<i>5.2.2.- Librerías de hexapéptidos aleatorios: Proteominer</i>	<i>10</i>
<i>5.2.3- Marcaje con reactivos iTRAQ y proceso de LC-MS/MS</i>	<i>11</i>
<i>5.2.4- Análisis cualitativo</i>	<i>12</i>
<i>5.2.5- Análisis cuantitativo</i>	<i>14</i>
6.- DISCUSIÓN	16
7.- CONCLUSIONES	18
8.- BIBLIOGRAFÍA	18

1.- RESUMEN:

En este trabajo se ha desarrollado un protocolo para el análisis del proteoma de media/baja abundancia del suero de pacientes con diferentes fenotipos de asma y rinitis alérgica, mediante la delipidación (LRA) y el uso de librerías peptídicas (ProteoMiner) y proteómica cuantitativa (iTRAQ/LC-MS/MS). A pesar de ser un estudio preliminar, los resultados muestran una reducción en la abundancia de proteínas séricas como la calreticulina o el MASP1 en pacientes con asma alérgica moderado grave, posiblemente relacionadas con la gravedad de la patología.

2.- INTRODUCCIÓN:

2.1- Definición de asma

Es un grupo de enfermedades heterogéneo que comparten un conjunto de síntomas y signos caracterizados por limitación del flujo aéreo respiratorio reversible, hiperrespuesta bronquial, hiperplasia de células mucosas, mayor permeabilidad vascular y remodelado de las vías aéreas. Su prevalencia en los países desarrollados oscila entre el 5-10% [1].

2.2- Fisiopatología del asma:

Las células T CD4⁺ (Th) tienen un papel central en la patogénesis del asma. Estos linfocitos pueden ser divididos en tres subgrupos principales: Th1, con un papel importante en la lucha frente a patógenos intracelulares; Th2, especializados en la coordinación de eosinófilos, basófilos y mastocitos, importantes en la lucha contra patógenos como helmintos y en enfermedades alérgicas); y Th17 (adaptados para la detección y eliminación de bacterias extracelulares) [2]. Clásicamente se consideró que la respuesta Th2 y sus citoquinas (p. ej., interleuquina-4/IL-4, IL-5, IL-13) era predominante en el desarrollo del asma. Sin embargo, recientemente han cobrado gran importancia tanto la respuesta Th1 como Th17 en algunos fenotipos asmáticos [3]. Asimismo, se ha observado un remodelado a largo plazo de las vías respiratorias acompañado de una hipertrofia del músculo liso en donde juegan un papel importante proteasas como MMP9 [3, 4].

2.3- Fenotipos asmáticos:

Se define fenotipo como el “conjunto de propiedades observables de un organismo que se generan por la interacción entre su genotipo y el ambiente” (5). Clásicamente se han descrito dos fenotipos de asma: **asma**

extrínseca, que se desarrolla típicamente desde la niñez, es inducida por alérgenos y está acompañada de una respuesta mediada por IgE; y **asma intrínseca**, que no está asociada con sensibilización alérgica y es típica de la edad adulta. No obstante, esta terminología ha quedado obsoleta y sido sustituida por los conceptos de **asma alérgica (AA)** y **no alérgica (ANA)** [6]. Más recientemente, esta clasificación se ha hecho más compleja y diversa. Así, por ejemplo, algunos autores hablan de otros fenotipos (7).

2.3.1- Asma alérgica

Es el fenotipo más común de asma y la media de edad a la que se manifiesta es menor que en el asma no alérgica (Figura 1). Aunque el espectro del asma alérgica puede variar desde leve a severo, en general es menos severa que la no alérgica [8]. Los niveles totales de IgE normalmente son mayores en asma alérgica que en asma no alérgica [8], y lo mismo ocurre con los eosinófilos circulantes, relacionándose con la obstrucción de las vías aéreas y las exacerbaciones [9]. Asimismo, se han observado aumentos de marcadores Th2 (IL-5, IL-13, FeNO, periostina) y descensos en marcadores Th1 (IFN γ , IL-12) [10].

2.3.2- Asma no alérgica

La definición de este fenotipo implica un resultado negativo del test cutáneo de alergia. Un 10-30% de los pacientes asmáticos presenta este fenotipo. Por lo general, es de aparición más tardía y severa que el asma alérgica, predominando además en mujeres y respondiendo mal a los tratamientos [11]. En cuanto a los biomarcadores, en la mucosa bronquial se observan también patrones de expresión de citoquinas Th2, a excepción de IL-4, más típica del asma alérgica. También existe similitud con el asma alérgica en cuanto a los niveles de IgE y eosinófilos en la mucosa. En sangre, se observa también una menor producción de IL-4, así como un descenso del número de células B CD23⁺ y un incremento de linfocitos CD4⁺ perforina⁺ [9].

2.4- Rinitis:

En términos clínicos la rinitis se refiere a un grupo heterogéneo de trastornos nasales caracterizados por estornudos, prurito nasal, rinorrea y congestión nasal. Se suele asociar a inflamación, aunque algunas formas no son inflamatorias. El tipo más común es la alérgica, que se desencadena por agentes ambientales (polen, ácaros, roedores). El diagnóstico se realiza en base a los síntomas y es confirmado mediante pruebas cutáneas. En caso de resultados negativos o difíciles de interpretar, se realizan pruebas séricas específicas para IgE [12].

La prevalencia estimada de la rinitis en la población es de aproximadamente el 20% y afecta a 60 millones de personas solamente en los Estados Unidos y a 400 millones de personas a lo largo del mundo [13, 14].

La rinitis alérgica implica en primer lugar la captura del antígeno por células dendríticas en la mucosa, lo cual lleva a la activación de células T antígeno específicas. Simultáneamente, la activación de células del epitelio conduce a la liberación de citoquinas epiteliales (IL-25, IL-13) y una respuesta Th2. A través de estas citoquinas se activan las células dendríticas y los basófilos, así como probablemente linfocitos innatos de tipo 2 (ILC-2). Estos dos últimos tipos celulares liberan factores como IL13 e IL-4, los cuales inducen la transformación de las células Th2 y la diferenciación de los linfocitos B en células productoras de IgE. Esta IgE se une a basófilos y mastocitos, activándolos e induciendo la liberación de histamina y leucotrienos. Paralelamente, la activación de las células dendríticas (DCs) da lugar a la liberación de citoquinas que inducen el flujo de más células de respuesta inflamatoria (eosinófilos, basófilos, células T y células B) hacia la mucosa [13]. Se piensa que todo este proceso inflamatorio podría progresar desde las vías aéreas superiores (rinitis) a las inferiores (asma alérgica), por lo que estas dos patologías podrían compartir un mismo mecanismo inmunopatogénico y biomarcadores [15].

2.5- Búsqueda de biomarcadores mediante el uso de herramientas proteómicas:

Se puede definir la Proteómica como el estudio del proteoma, es decir, el conjunto total de proteínas de un sistema biológico en un momento y condiciones determinadas. Diferentes mecanismos (transcripción, traducción, vida media del mRNA/proteína, cambios de compartimentos, etc) colaboran para que existan diferencias de abundancia de proteínas entre, por ejemplo, individuos sanos y pacientes de una determinada enfermedad. Por tanto, el estudio de dichas diferencias podría permitir, potencialmente, el descubrimiento de biomarcadores específicos de estas enfermedades: es decir, proteínas cuya abundancia está elevada o disminuida en pacientes con respecto al grupo de referencia, como por ejemplo individuos sanos [16].

El análisis proteómico basado en la combinación de la cromatografía líquida de altas prestaciones (HPLC) junto con la espectrometría de masas (MS) se ha convertido en una herramienta muy poderosa en investigación biomédica. Esta técnica permite no solo la separación de péptidos y la identificación de las

proteínas, sino también la realización de un análisis cuantitativo de las mismas. Así, una vez se ha identificado una proteína es posible determinar su abundancia en una muestra determinada y compararla con la de otra [17].

3.- OBJETIVOS:

- **Objetivo 1:** Desarrollar una metodología “*shotgun/bottom-up*” para el análisis cuantitativo del proteoma de media-baja abundancia en muestras de suero de pacientes con rinitis y diversos fenotipos asmáticos.
- **Objetivo 2:** Estudiar la abundancia diferencial de proteínas en el suero de pacientes con rinitis y diversos fenotipos asmáticos (alérgica y no alérgica) de diferente gravedad (moderada-grave e intermitente-leve)

4.- MATERIAL Y MÉTODOS:

4.1.- Donantes

Los donantes (81) fueron reclutados en la consulta del Servicio de Neumología del CHUS, y divididos en 6 grupos: 25 con asma alérgica moderada-grave (AAMG), 29 con asma alérgica intermitente-leve (AAIL), 25 con rinitis (R), 22 con asma no alérgica moderada-grave (ANAMG), 26 con asma no alérgica intermitente-leve (ANAIL) y 17 controles sanos (C). Los pacientes asmáticos tenían diagnóstico confirmado de asma durante al menos un año (GINA 2006) y estaban en fase estable durante al menos 4 semanas. El proyecto de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica de Galicia y todos los participantes firmaron un consentimiento informado. Los estudios de hematología, bioquímica, espirometría y de sensibilización cutánea fueron realizados por el personal clínico del hospital.

4.2-Obtención de las muestras de suero y delipidación:

Se usaron tubos BD Vacutainer SST II Advance. Tras 30 minutos a temperatura ambiente (RT), se centrifuga a 3,000 xg, 15 min a 4°C. El suero fue recogido en alícuotas de 1 mL y congelado a -80°C. Con el fin de eliminar las lipoproteínas del suero se procedió a realizar un proceso de delipidación. Así, se realizó una centrifugación a inicial a 3,000 xg durante 30 min a 4°C, añadiendo a los 2.5 mL de cada *pool* de muestras de suero 200 mg de una resina denominada LRA™ (Lipid Removal Agent) (13358-U; Sigma, España). La mezcla

se incubó toda la noche (4°C, en rotación), centrifugando posteriormente a 2,500 xg (10 min, 4°C). A continuación, el suero delipidado fue recogido para su cuantificación proteica.

4.3- SDS-PAGE (1-DE)

Para comprobar la eliminación de ciertas apolipoproteínas como la apoAI (~ 30 kDa; quilomicrones, HDL) tras la delipidación se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida discontinuos en condiciones desnaturalizantes y reductoras (SDS-PAGE) utilizando el sistema Mini-Protean III de Bio-Rad. Brevemente, se preparó un gel separador con un porcentaje de monómero elevado (15%T) y un gel concentrador, con un %T bajo (4%). Tras la polimerización, los geles fueron colocados en la cámara interna del sistema Mini-Protean III de Bio-Rad, que a su vez fue introducida en el tanque de la unidad. Tras rellenar con tampón de electroforesis 1X (25 mM Tris pH 8.3, 190 mM glicina, 0.1 % (p/v) SDS), se cargaron los marcadores de peso molecular (NZYColour Protein Marker II; Nzytech) y las muestras de proteínas (30 µg/canal). Durante la electroforesis se fijó el voltaje (Powerpac 300, Bio-Rad), que fue de 200 V. Finalmente, los geles fijaron, tiñeron, y destiñeron con Coomassie R-250. Los geles fueron posteriormente escaneados para su análisis.

4.4- Enriquecimiento en proteínas de baja abundancia: Proteominer.

Para enriquecer las muestras en proteínas de baja abundancia se utilizó el Proteominer (Bio-Rad, Large Capacity Kit, #cat163-3007). Tras preparar las columnas, las 6 muestras de suero (1 por cada grupo de donantes) fueron cargadas (1 mL), incubando en agitación (2 h, RT). Tras la incubación, se realizaron 3 lavados con el tampón de lavado del kit y uno adicional con agua milliQ. Entre cada paso las columnas fueron centrifugadas (1000 xg, 1 min). A continuación, se eluyó 3 veces consecutivas con un tampón proporcionado por el kit (15 min), seguido de centrifugación a 1000 xg, 1 min. Las 3 fracciones fueron recogidas en una única muestra.

4.5- CleanUp

Con el fin de eliminar contaminantes como las sales del tampón de elución del Proteominer se utilizó el 2-D Cleanup Kit (GE Healthcare, Cat N° 80-6484-51). El primer paso fue añadir 3 volúmenes de precipitante sobre la muestra, seguido de homogenización e incubación a 4°C, 15 min. Posteriormente, se añadió el mismo volumen de co-precipitante, se homogenizó y se incubó 15 min a 4°C. El pellet se obtuvo tras centrifugar (10 min, 12,000 xg), se añadieron 100 µL de co-precipitante y se mantuvo en hielo 5 min. Se centrifugó durante 5

min a 12,000 xg y se retiró el líquido. Se añadieron 100 µL de agua desionizada, 1 mL de tampón de lavado y 5 µL de aditivo de lavado. La incubación se realizó a -20°C durante 2 h. Tras centrifugar a 12,000 xg 10 min, el precipitado obtenido se secó al aire durante 5 min y se disolvió en 30 µL de 0.5 M TEAB 6M urea.

4.6- Cuantificación de las proteínas

Se emplearon dos metodologías. La primera es el kit Pierce™ BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher, # 23225), tras el proceso de delipidación. Se generó una recta de calibración empleando diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (BSA) en tampón fosfato (10 mM, pH 7.0): 0-2 mg/mL. Las muestras problema se diluyeron también en tampón fosfato (dilución 1:60). En una placa de 96 pocillos se añadieron 25 µL del blanco (PBS), muestras a analizar y recta patrón. Cada condición fue analizada al menos por duplicado. Posteriormente, se añadieron 200 µL de reactivo de trabajo (50 A:1 B) y se incubó a 37°C, 20 min. Finalmente se realizó la lectura a 550 nm en el lector de placas (modelo 680, Bio-Rad).

La cuantificación tras el Cleanup requirió usar el kit CB-X (786-12X; G-Biosciences). Este kit usa un primer paso de precipitación diseñado para minimizar las interferencias. Cada muestra (50 µL de proteína diluida 1:10 en tampón TEAB: 0.5 M bromuro de tetraetilamonio conteniendo 6 M urea) fue analizada al menos por duplicado. Para precipitar las proteínas se agregó 1 mL de reactivo CB-X™ previamente enfriado (-20°C) y se mezcló mediante vórtex. A continuación, las muestras se centrifugaron a 16,000 xg durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se añadió secuencialmente 50 µL de tampón de solubilización CB-X™ I y 50 µL CB-X™ II por muestra. Las proteínas se disolvieron mediante vórtex, y se agregó 1 mL/muestra de colorante de ensayo CB-X™. Tras vórtex e incubación 5 min a RT, las muestras se transfirieron a placas de 96 pocillos y la absorbancia fue leída a 595 nm en un lector de microplacas (Labsystems Multiskan MS). También se elaboró una recta patrón con BSA (0.2-1 mg/mL) diluida en tampón 0.5 M TEAB conteniendo 6M urea.

4.7- Reducción, alquilación y tripsinización

Las 6 muestras de proteínas, conteniendo 50 µg en 20 µL de 0.5 M TEAB 6M urea, fueron reducidas y alquiladas. Para ello se añadió a cada tubo 2 µL de agente reductor (TCEP), seguido de incubación 1h a RT. A continuación, las muestras fueron alquiladas añadiendo 1 µL por muestra de MMTS, seguido de incubación 10 min a RT. Posteriormente, se añadieron 123 µL de TEAB para reducir la concentración de urea por debajo de

1M, y 1 μ L de tripsina (1 μ g; 4326682, Sciex), incubando posteriormente a 37°C durante toda la noche. Para parar la reacción y lograr un pH < 6.0 se añadieron 4 μ L de ácido acético; se comprobó el pH final utilizando papel indicador de pH y se procedió a liofilizar las muestras.

4.8- iTRAQ

Los reactivos de iTRAQ presentan tres grupos: reactivo, compensador y reportero. El primero reacciona con ciertos grupos amino de los péptidos, mientras que el compensador iguala la masa total de los reactivos, de modo que cada péptido marcado se detecte como un único pico en MS1. La cuantificación se hace durante la fragmentación peptídica (MS/MS o MS2), durante la cual se liberan los reporteros y se detectan como picos con bajos valores (< 200) de m/z. La intensidad de estos picos permite conocer la concentración de los péptidos correspondientes, y a partir de ella estimar la de las proteínas. Para el marcaje de los péptidos con los reactivos iTRAQ® Reagent - 8PLEX Multiplex Kit (Sigma-Aldrich) se disolvieron las muestras en 30 μ L de 0.5M TEAB. A su vez, los 8 viales de los reactivos iTRAQ fueron descongelados a RT (15 min). A la mitad del contenido de cada vial (10 μ L) se le añadieron 25 μ L de isopropanol, y estos ~ 40 μ L totales de cada reactivo de iTRAQ fueron utilizados para marcar cada una de las muestras de péptidos trípticos: AAMG, 113; AAIL, 114; R, 115; ANAMG, 116; ANAIL 117; C, 119. El reactivo de iTRAQ 121 se reservó para una muestra formada por un *pool* de todas las muestras del análisis, utilizado para normalizar los datos entre las diferentes series analíticas en MS. Se comprobó el pH con tiras indicadores de pH, comprobando que fuese > 7.5, incubando a RT durante 2 h. Finalizado el proceso, las muestras de péptidos marcados fueron juntadas en un único tubo y liofilizadas.

4.9- LC/MS-MS:

Las muestras se analizaron en el Servicio de Determinación Estructural, Proteómica y Genómica, Unidad de Espectrometría de Masas del Cacti, Universidad de Vigo. Los péptidos fueron desalados mediante zip-tips (C18) y su análisis se realizó por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS). Esta tecnología es empleada normalmente para la identificación y cuantificación de proteínas en muestras de complejidad moderada/alta. En este caso el sistema de nano-cromatografía líquida fue un Proxeon EASY-nLC 1000 UHPLC, con nanocolumnas analíticas C-18 (fase-reversa) para separar los péptidos en base a su hidrofobicidad. Este equipo se encontraba acoplado “*on-line*” a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap

ELITE (Thermo Fisher), un sistema híbrido trampa iónica-Orbitrap con una elevada resolución y diferentes modos de fragmentación de los péptidos en MS/MS (CID, HCD e ETD). Al tratarse de péptidos marcados con reactivos iTRAQ, la fragmentación se realizó mediante HCD.

4.10- Análisis estadístico y bioinformático de los datos:

Los datos fueron proporcionados por la Unidad de Espectrometría de Masas del Cacti en un fichero Excel. Este fichero contenía datos como el número de acceso de las proteínas identificadas, la descripción de las proteínas encontradas, el nivel de confianza en la identificación (FDR), el número de espectros (PSM) y de péptidos identificados de cada proteína, la cobertura. También informaba sobre el número de aminoácidos, el punto isoeléctrico y el peso molecular de cada proteína identificada, así como su abundancia basada en la intensidad de la señal de los grupos reporteros. Los datos procedentes de MS se analizaron tanto cualitativa como cuantitativamente. La abundancia de cada proteína se calculó como una abundancia promedio de todos sus péptidos detectados. Los datos procedentes de abundancia fueron normalizados con respecto al *pool* (121). Posteriormente, se utilizó como instrumento comparativo la tasa de cambio (“Fold Change”), representado como el logaritmo en base 2 del cociente de la abundancia de una proteína en cada grupo y la del grupo control (119). También se realizó un análisis de términos GO y de enriquecimiento utilizando la herramienta on-line *PANTHER Classification System*. Para comparaciones entre los distintos grupos muestrales se ha utilizado el test no paramétrico Kruskal Wallis de una vía, seguido de Dunn’s para comparaciones múltiples.

5. RESULTADOS:

5.1- Características clínicas de los pacientes del estudio:

Este trabajo incluye pacientes adultos con distintos fenotipos de asma (AA y ANA) clasificados en distintas gravedades (IL y MG). Además, se incluye un grupo con rinitis alérgica (R) y otro de controles sanos (C). Las características de demográficas y clínicas de los distintos grupos de estudio se muestran en la Tabla 1. Los pacientes con asma MG presentaban un descenso del volumen espiratorio forzado en un segundo (FEV1 %) en comparación con pacientes con asma IL, aunque solo significativo en el caso del ANA ($p = .0001$). Este mismo descenso se manifestó en los pacientes asmáticos MG con respecto a R (AAMG vs R, $p = .0160$; ANMG vs. R, $p = .0007$) (Tabla 1). El fenotipo alérgico (AAMG, AAIL) se caracterizó además por unos niveles elevados de

IgE comparado con los demás grupos (AAMG vs. C, $p = .0055$; AAMG vs. R, $p = .0215$; AAMG vs. ANMG, $p = .0037$; AAMG vs. ANIL, $p = <.0001$; AAIL vs. C, $p = .0348$; AAIL vs. ANIL, $p = .0003$). En el caso de asma alérgica (MG, $p = .0016$; IL, $p = .0106$) y en ANAMG ($p = .0440$), los niveles de eosinófilos también se encontraban elevados en comparación con C (Tabla 1). Por otro lado, los pacientes con ANA presentaron un aumento de neutrófilos en sangre periférica comparado con C (ANMG, $p = .0494$; ANIL, $p = .0383$) (Tabla 1).

Tabla 1. Características demográficas y clínicas de los pacientes.

	AAMG (n=25)	AAIL (n=29)	Rinitis (n=25)	ANAMG (n=22)	ANAIL (n=26)	Controles (n=17)
Sexo (H / M)	11 / 14	10 / 19	13 / 12	8 / 14	6 / 20	10 / 7
Edad (años)	37.4 ± 13.8	37.3 ± 12.3	38.8 ± 9.3	54.4 ± 10.5	51.0 ± 12.0	42.0 ± 9.8
FUNCIÓN PULMONAR						
FEV1	87.0 ± 22.4	104.1 ± 20.2	105.2 ± 12.7	81 ± 18.4	106.5 ± 16.3	-
FEV1/FVC (%)	69.2 ± 12.8	77.7 ± 7.6	82.5 ± 6.2	68.3 ± 8.8	76.1 ± 7.0	-
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS Y HEMATOLÓGICOS						
IgE (UI/mL)	481.0 ± 901.7	204.6 ± 206.9	95.1 ± 132.7	73.5 ± 82.5	47.8 ± 75.8	49.0 ± 65.7
Linfocitos (x10³ / mm³)	2.14 ± 0.61	2.15 ± 0.68	2.22 ± 0.75	2.14 ± 0.79	2.11 ± 0.59	2.00 ± 0.51
Neutrófilos (x10³ / mm³)	4.03 ± 1.71	3.68 ± 0.79	3.60 ± 1.03	4.47 ± 2.68	4.07 ± 1.41	3.00 ± 0.69
Eosinófilos (x10³ / mm³)	0.40 ± 0.26	0.33 ± 0.14	0.25 ± 0.16	0.25 ± 0.09	0.28 ± 0.15	0.18 ± 0.12

AAIL, asma alérgica intermitente leve; AAMG, asma alérgica moderado grave; ANAIL, asma no alérgica intermitente leve; ANAMG, asma no alérgica moderado grave; FEV1, volumen espiratorio forzado en 1 segundo; FEV1/FVC, relación entre el volumen espiratorio forzado en un segundo y la capacidad vital forzada; IgE, inmunoglobulina E.
 Todos los valores se presentan como media ± desviación típica.

5.2.- Desarrollo del método de análisis.

5.2.1.- Delipidación

El objetivo de la delipidación fue la eliminación de las lipoproteínas séricas. Dado que el protocolo tradicional de delipidación por ultracentrifugación requería un uso prolongado de la ultracentrífuga a elevadas velocidades y el número de muestras a procesar excedían las 6 (capacidad máxima del rotor), utilizamos como alternativa una resina con afinidad denominada LRA. Se realizó una titulación de la cantidad de resina necesaria, con concentraciones de 20 a 100 mg/mL. Tras aplicar dicha resina a las muestras de suero y analizar dichas muestras mediante 1-DE, se observó que las bandas con la apoA1 (~25-30 kDa; quilomicrosomas, HDL) estaban

reducidas (Figura 1), confirmando lo previamente publicado. Se seleccionó una concentración de 80 mg/mL de resina LRA para los experimentos posteriores. Como refleja la Tabla 2, aproximadamente un 13% de las proteínas son eliminadas, si bien a costa de una variabilidad técnica elevada.

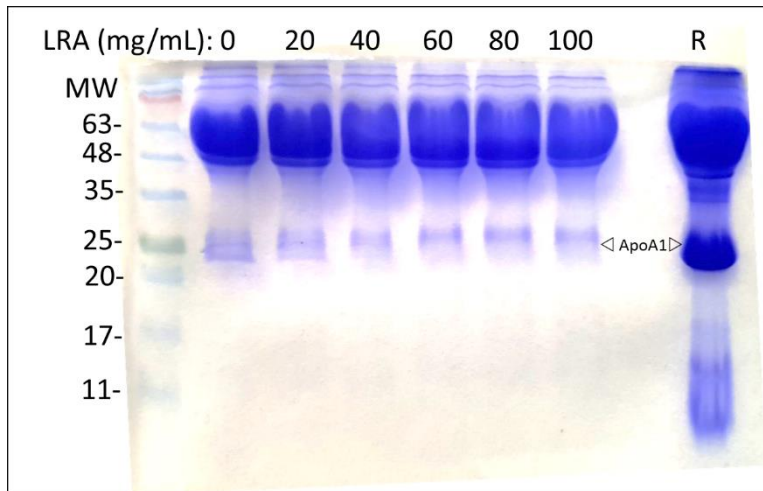


Figura 1. El tratamiento con resina LRA reduce los niveles de lipoproteínas en suero. Un volumen de 300 mL de suero fue tratado con distintas concentraciones de resina LRA (0-100 mg/mL) toda la noche a 4°C en rotación. Se muestra una SDS-PAGE (gel separador del 15%T) en los que se han cargado 30 µg de proteína perteneciente a la fracción no retenida por la resina (canales 2-7). El canal 1 se corresponde con marcadores de peso molecular, y el canal 9 con la fracción retenida (R).

5.2.2- Librerías de hexapéptidos aleatorios: Proteominer

Los biofluidos (plasma, suero, etc) presentan cientos de proteínas en concentraciones muy variadas. Sin embargo, desde un punto de vista biomédico, resultan más interesantes las especies de media y baja abundancia, ya que en ellas se concentran los posibles biomarcadores. Para acceder a este subproteoma se necesita reducir el rango dinámico de abundancias, y una de las maneras de hacerlo es el uso de librerías peptídicas como la tecnología ProteoMiner™. Una vez tratadas las muestras delipidadas de suero de todos los grupos, se procedió a eliminar mediante CleanUp aquellos interferentes que pudiesen tener un impacto negativo en análisis posteriores. El pellet resultante se disolvió en 0.5 M TEAB 6M urea. La urea fue necesaria para facilitar la disolución de las proteínas precipitadas, mientras que el TEAB es un tampón que no contiene grupos amino reactivos y no interfiere con el protocolo de marcaje isóbarico (iTRAQ) posterior. Una vez disueltas las muestras, se cuantificaron mediante el kit CB-X. Este kit realiza una precipitación antes de la cuantificación, lo que permite la eliminación de la urea y otros interferentes. Como muestra la Tabla 2, la aplicación de las librerías peptídicas a nuestras muestras de suero previamente delipidadas logró eliminar >99% de las proteínas iniciales del suero, con una variabilidad técnica extremadamente reducida (Tabla 2).

Tabla 2. Cambios en la concentración y cantidad total de proteínas del suero tras los tratamientos con LRA y con el kit Proteominer.

	Cantidad de proteína (mg) (media \pm SD)	% de depleción con respecto al suero total (media \pm SD; CV%)
Suero total	76.51 \pm 2.95	-
LRA	66.73 \pm 1.98	12.67 \pm 4,48 %; 35.36%
Proteominer	0.12 \pm 0,03	99,85 \pm 0,03 %; 0.03%

CV, coeficiente de variación; LRA, “Lipid Removal Agent”; SD, desviación estándar.

5.2.3- Marcaje con reactivos iTRAQ y proceso de LC-MS/MS

A diferencia de la Proteómica cualitativa, la cuantitativa trata de analizar la abundancia diferencial de las proteínas entre distintas muestras. Para conocer dicha abundancia diferencial se pueden utilizar metodologías no basadas en geles, como las técnicas de “*shotgun proteomics*” (técnicas “*bottom-up*”), basadas en el corte proteolítico de las proteínas (normalmente tripsinizaciones) y la separación de los péptidos resultantes mediante cromatografía líquida de altas prestaciones en configuraciones mono o bidimensionales (nanoHPLC) acopladas a espectrómetros de masas. Antes de tripsinizar las proteínas, resulta necesario reducir y alquilar sus residuos de cisteína. En nuestro caso se emplearon TCEP (no DTT) y MMTS (no iodoacetato), ya que no interfieren con el marcaje isobárico posterior. La tripsina fue utilizada posteriormente para hidrolizar en el carboxilo de residuos de arginina o lisina, siempre y cuando no exista una prolina a continuación. Para el marcaje de los péptidos se utilizó el kit iTRAQ® Reagent 8 Plex One Assay. Con el fin de realizar una separación bidimensional (MudPIT), estaba previsto que los péptidos resultantes de la digestión trípica fuesen separados mediante cromatografía de intercambio catiónico fuerte (SCX) antes de la cromatografía de fase reversa (C18), pero se demostró que el proceso de SCX era incompatible con las etapas posteriores de nanoHPLC y MS. Por tanto, los péptidos tríplicos fueron enviados al servicio de MS de la UVigo, resuspendidos y limpiados de sales (ZipTips) antes de ser cargados en la precolumna del nano-HPLC. Posteriormente una columna de cromatografía líquida de fase reversa (C18) acoplada en línea con un espectrómetro de masas (Orbitrap) permitió realizar los análisis de MS1 y MS2 y así identificar los péptidos/proteínas de las muestras y cuantificarlas. Un resumen de lo realizado se muestra en la Figura 2.

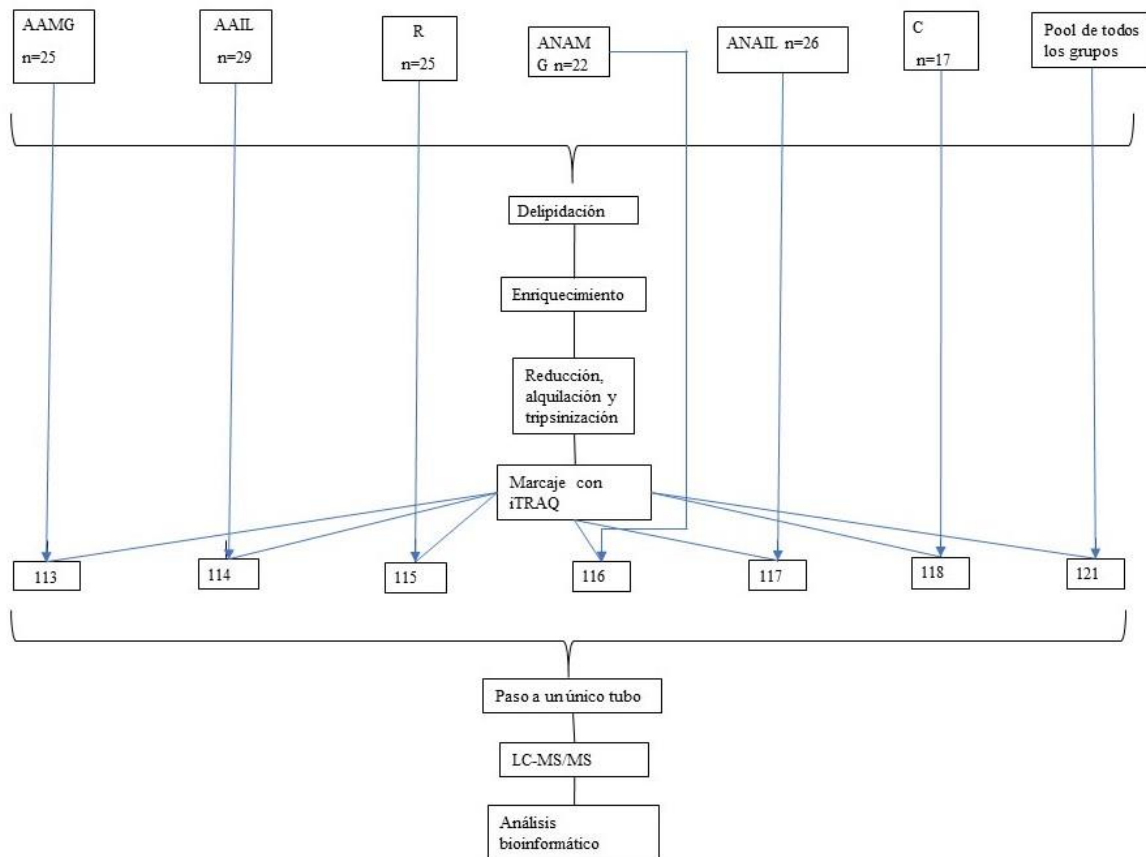


Figura 2. Esquemización del método de análisis llevado a cabo.

5.2.4 Análisis cualitativo

En total fueron detectadas 233 proteínas, existiendo algo de redundancia e importantes diferencias en cuanto al número de péptidos detectados para cada una. Así, se identificaron 48 péptidos correspondientes al factor C3 del complemento, 35 para el C4A o 19 para la albúmina. En el lado contrario se encontraron proteínas como la afamina, la cadena α de la hemoglobina o la apo C-I, identificadas en base a un único péptido. Además del número de péptidos, es importante el PSM (*Peptide-Spectrum Match*), que hace referencia al número de espectros detectados para cada péptido. Así, para las mismas proteínas antes comentadas, obtuvimos un valor de PSM de 220 para C3, de 119 para C4A, y de 94 para la albúmina; este valor se quedó en 1 para la afamina, la cadena α de la hemoglobina y la apo C-I. Otro aspecto importante en la fiabilidad de la detección fue la cobertura de las diferentes proteínas. La cobertura máxima fue del ~ 89% para la cadena A de la transtirretina,

mientras que en algunas proteínas, las menos abundantes y más interesantes, este valor de cobertura fue menor, como en la afamina o la proteína de adhesión vascular 1 (VCAM), con una cobertura inferior al 2%.

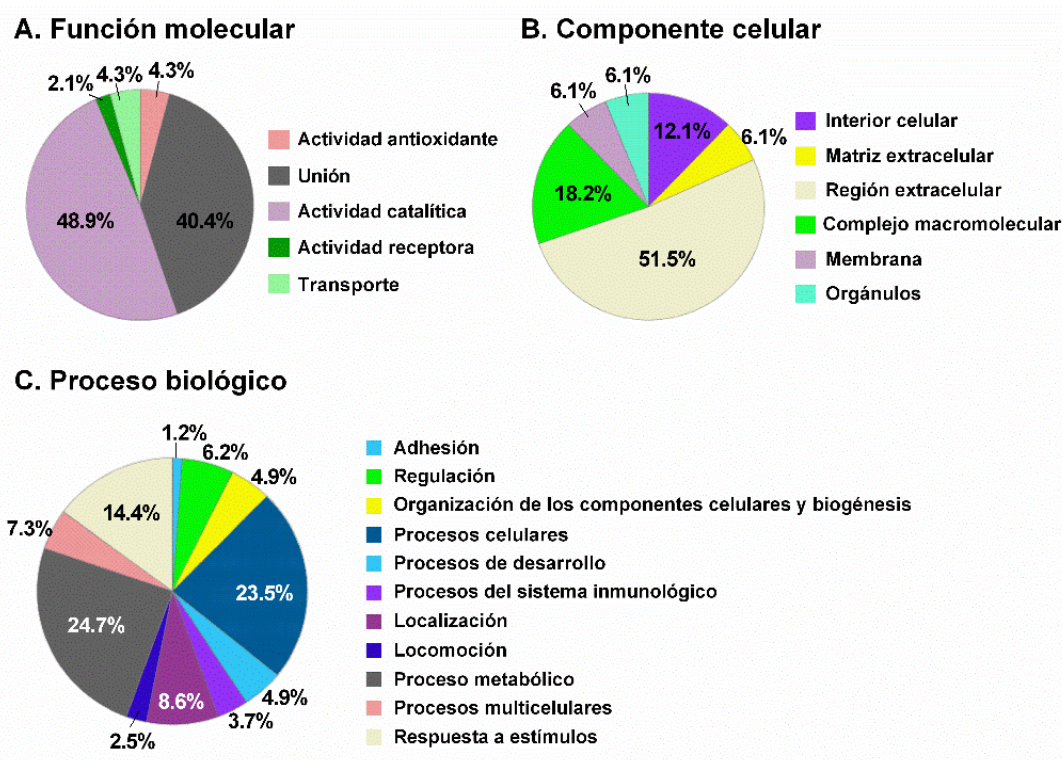


Figura 3. Análisis GO para la función molecular (A), componente celular (B) y proceso biológico (C) de las proteínas identificadas utilizando (LC-MS/MS).

Con el objetivo de caracterizar las proteínas identificadas se realizó un análisis descriptivo de términos GO utilizando *PANTHER*. Este análisis cualitativo estuvo centrado en tres aspectos: a) procesos biológicos; b) función molecular; c) y el componente celular. Para su realización se descartaron las inmunoglobulinas, al ser consideradas poco informativas, así como las proteínas pertenecientes a otras especies (a pesar de que el estudio se filtró para *Homo sapiens*); el número total de proteínas comparadas fue de 67. Si nos fijamos en la función molecular vemos que la mayor parte son proteínas con actividad catalítica (48.9%) y de unión (40.4%); en menor medida transporte (4.3%), actividad antioxidante (4.3%) y función receptora (2.1%) (Figura 3 A). Centrándonos en el componente celular, la mayor parte se encuentran en la región extracelular (51.5%), formando parte de complejos macromoleculares (18.2%) o en el interior celular (12.1%), mientras un menor porcentaje se encuentran en orgánulos (6.1%), membrana (6.1%) o matriz extracelular (6.1%) (Figura 3 B). Por último, atendiendo al proceso biológico, las proteínas identificadas están implicadas en procesos metabólicos

(24.7%), procesos celulares (23.5%) y respuestas a estímulos como el estrés o sustancias tóxicas (14.4%), siendo menos abundantes las relacionadas con el desarrollo o la organización de los componentes celulares y biogénesis (4.9% en ambos casos) (Figura 3 C).

Por otro lado, un análisis de enriquecimiento con términos GO en PANTHER utilizando como referencia el proteoma humano apreció una mayor cantidad de proteínas de las esperadas relacionadas con el metabolismo del colesterol y esteroides, la proteólisis y el metabolismo de proteínas (Procesos biológicos). También, un enriquecimiento en peptidasas, proteínas relacionadas con la actividad de citoquinas, hidrolasas, ligandos de receptores y enzimas (Función molecular), así como de proteínas del espacio extracelular (componente celular). En cambio, hubo un empobrecimiento de proteínas del interior celular y de orgánulos en relación al proteoma de referencia, como era de esperar al tratarse de suero.

5.2.5- Análisis cuantitativo

El análisis cuantitativo de la abundancia de las proteínas en los diferentes grupos con respecto al grupo control reveló variaciones importantes en diferentes proteínas, de las cuales fueron seleccionadas 11 proteínas para AAMG, 6 para AAIL, 6 para R, 1 para ANAMG y 3 para ANAIL (Tabla 3).

Tabla 3. Cambios de proteínas en asmáticos y rinitis con respecto a controles.

Proteína	Número de acceso	AAMG	AAIL	R	ANMG	ANIL
Hemoglobina beta	229149	-7.487	-1.740	-1.580	-0.869	-0.809
Subunidad alfa del proteasoma	119588883	-7.430	0.660	-7.429	-0.195	-7.430
Cadena G de la calreticulina	1285033948	-7.111	-0.315	1.118	-0.280	-0.553
MASP1	767927172	-6.669	0.848	-0.018	0.154	0.231
Proteína amiloide sérica A1	119588815	-6.236	0.266	-6.236	0.278	0.542
Precursor C3 del complemento	532328993	-2.136	-0.592	-0.412	-0.545	-0.109
Colectina11	194383602	-1.579	-0.026	-1.279	0.253	0.136
Subcomponente C1r del complemento	194391088	1.526	0.485	0.963	0,823	0.823
Apolipoproteína C-I	189065250	1.689	0.059	1.291	0.941	0.911
Transtirretina I	223674045	6.612	6.217	6.528	5.760	6.040

Continuación de la Tabla 3.

Albúmina sérica	1567087	13.287	13.288	13.288	0.000	0.000
Cadena A, Transtirretina 1	1048348829	-0.468	-1.506	-0.328	-0.802	-0.431
Factor de coagulación XIII B	767908640	-0.582	-5.912	0.796	0.925	0.599
Lecitina colesterol acetil transferasa	37790794	0.000	5.855	0.000	0.000	6.501
Apolipoproteína CII	186972736	1.161	1.032	1.810	1.167	1.066

AAIL, asma alérgica intermitente leve; AAMG, asma alérgica moderado grave; ANAIL, asma no alérgica intermitente leve; ANAMG, asma no alérgica moderado grave; R, rinitis.

Como se observa en la Tabla 3 y en la Figura 4A, hemos apreciado una práctica ausencia de calreticulina en AAMG (Figura 4 A). Si nos centramos en la lectina de unión a manosa serín proteasa 1 (MASP1), también se observa un descenso muy importante en AAMG (Figura 4 B). Por su parte, la proteína amiloide A1 sérica está reducida tanto en AAMG como en R (Figura 4 C). Por último, en cuanto al proteasoma, se aprecia un descenso de esta proteína en AAMG, en R y en ANIL (Figura 4D).

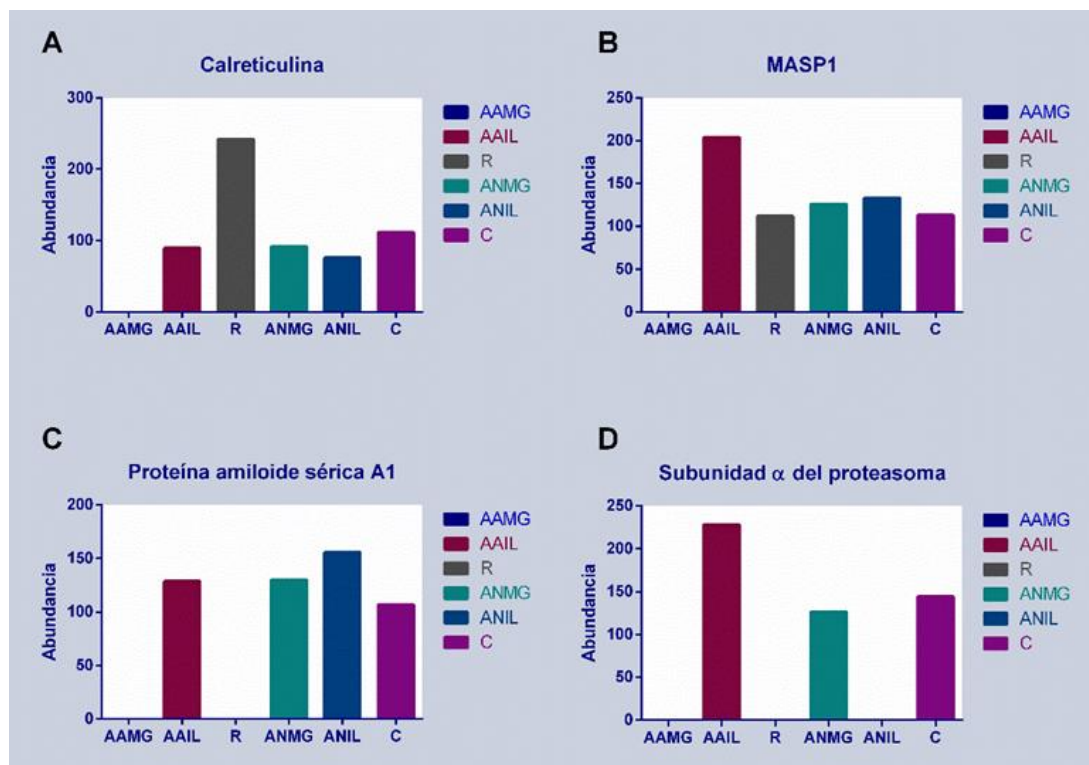


Figura 4. Modificación de los niveles de proteínas séricas en los diferentes grupos estudiados. A Calreticulina, B. MASP1, C. Proteína amiloide sérica A1, D. Subunidad α del proteasoma.

6.- DISCUSIÓN:

Se ha optimizado un protocolo para el estudio proteómico del suero en pacientes asmáticos o con rinitis en el que se han eliminado lipoproteínas, se ha reducido el rango dinámico de abundancias y se ha abordado un análisis cuantitativo (iTRAQ + LC-MS/MS). Un análisis preliminar de muestras de suero de diferentes grupos de donantes (AAMG, AAIL, R, ANAMG, ANAIL, C) demuestra la presencia de proteínas que forman parte de macrocomplejos (probablemente extracelulares) o que presentan actividad catalítica y que se relacionan con metabolismo o estrés. Además, este estudio preliminar ha detectado la abundancia diferencial de varias proteínas, como calreticulina, MASP1, proteína amiloide sérica A1 y la subunidad α del proteosoma.

La eliminación de los lípidos de las muestras de suero mediante la resina LRA (Lipid Removal Agent) fue necesaria dado el enriquecimiento en apolipoproteínas en los subproteomas obtenidos tras aplicar librerías peptídicas (Proteominer). Esta elevada capacidad del LRA para unirse a estructuras lipídicas y separarlas del resto de componentes de la fase acuosa ha sido puesta de manifiesto previamente en diversos trabajos [19, 20]. Además, el uso de la resina LRA supuso una alternativa óptima al proceso clásico de delipidación mediante ultracentrifugación, ya que este último no permite procesar un número de muestras elevado al mismo tiempo y las condiciones operativas sometían a un elevado estrés a la ultracentrífuga.

La utilidad de los estudios de LC-MS/MS combinados con el uso de etiquetas isobáricas iTRAQ queda patente en numerosas publicaciones [21-23]. En cambio, esta aproximación proteómica es novedosa en el caso de la rinitis y los diferentes fenotipos asmáticos. Sin embargo, nuestros resultados son solamente preliminares, especialmente aquellos referidos a las proteínas detectadas con abundancia diferencial, debido a que sólo se ha realizado una “réplica biológica” y una única “réplica técnica”. Además, surgieron otras complicaciones a la hora de interpretar los resultados cuantitativamente. En primer lugar, no todas las proteínas fueron detectadas en todos los grupos, ya que en los ensayos de LC-MS/MS hacen falta alcanzar un número de 10 réplicas técnicas para poder detectar ~ 100% de proteínas de una muestra (problema de exhaustividad del análisis) [24]. Un segundo problema está relacionado con el “pool de pooles” analizado con la etiqueta isobárica 121. Esta muestra será introducida en todas las series analíticas futuras para permitir la normalización de las señales en el resto de

muestras y corregir así la variabilidad interserial. Sin embargo, el uso de este tipo de muestras de referencia dificulta la detección de proteínas de muy baja abundancia, lo que dificulta el proceso de normalización. Finalmente, un tercer problema ha sido la imposibilidad de fraccionar más los péptidos antes del análisis de MS empleando un sistema de cromatografía bidimensional combinando intercambio catiónico fuerte (SCX) con fase reversa (C18) (2D-LC o MudPIT). Ello fue debido a la incompatibilidad de SCX con MS, lo que ha redundado en un menor número de proteínas detectadas, especialmente las de baja abundancia. A pesar de todas estas limitaciones, podemos afirmar que la “prueba de concepto” que se ha realizado al implementar esta nueva metodología ha sido positiva.

Se ha observado la práctica ausencia de calreticulina en el suero de los pacientes con AAMG. La calreticulina es una proteína de unión a Ca^{2+} que se sitúa en el lumen del retículo endoplásmico y tiene especial relevancia en la homeostasis de dicho ion, señalización, adhesión celular o plegamiento de proteínas [25]. Se ha demostrado también su presencia en otras localizaciones, como el citoplasma, la membrana plasmática o la matriz extracelular. Asimismo, se ha visto *in vitro* la capacidad de la calreticulina para interactuar con diversos mRNAs, impidiendo la traducción de proteínas como C/EBPB y C/EBPA [26]. Este último actúa como factor de transcripción, jugando un papel fundamental en la inhibición de la proliferación de las células del músculo liso bronquial [27]. Dado que la proliferación de las células musculares lisas en asma está aumentada [28], es posible que la disminución de la calreticulina en suero en pacientes con AAMG esté relacionada con un aumento de esta proteína a nivel celular. Esta acumulación intracelular de calreticulina podría reducir la traducción del mRNA de C/EBP α y aumentar de este modo la proliferación celular en el músculo liso bronquial. Sin embargo, estudios proteómicos en modelos murinos muestran un descenso de calreticulina en el parénquima pulmonar de ratones expuestos a alérgenos durante 10 semanas [29], lo que apoya nuestros datos en suero humano e indica la necesidad de seguir estudiando el papel de esta proteína. Otra proteína apenas detectada en el grupo AAMG pero sí en el resto de grupos es MASP1. A diferencia de calreticulina, MASP1 no ha sido relacionada con asma por ningún trabajo, y se trata de una serín proteasa relacionada, entre otras funciones, con la vía de la lectina y la alternativa en la cascada del complemento [30]. Una hipótesis plausible podría ser que una insuficiencia en la vía de la lectina podría aumentar la recurrencia de infecciones respiratorias en pulmones por microorganismos, lo que tendería a exacerbar la recurrencia y gravedad de la inflamación alérgica.

7. CONCLUSIONES:

- Se ha desarrollado una metodología “*shotgun/bottom-up*” para el análisis cuantitativo del proteoma de media-baja abundancia en muestras de suero de pacientes con rinitis y diversos fenotipos asmáticos. Este protocolo está basado en la eliminación de lipoproteínas mediante la resina LRA, el enriquecimiento en proteínas de media y baja abundancia por Proteominer, el marcaje mediante reactivos iTRAQ 8plex y el análisis mediante LC-MS/MS.
- A falta de realizar más réplicas técnicas y biológicas, hemos detectado que los pacientes con asma alérgica moderada-grave presentan una disminución en la abundancia de ciertas proteínas séricas como la calreticulina o MASP1, que podrían estar relacionadas con la gravedad del asma.

8.- BIBLIOGRAFÍA:

1. Wenzel SE. *Nat Med* 2012; 18:716-25.
2. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Inmunología celular y molecular* 6º Ed. Madrid: Sanunders-Elsevier (2008).
3. Martinez FD, Vercelli D. *Lancet* 2013; 382:1360-72.
4. Hong, Z. *Mol Med Rep* 2012; 5:462-4.
5. Nature Education [Internet]; c2014 [consultada 10 de junio de 2018] *Definition: phenotype/phenotypes*. Disponible en: <https://www.nature.com/scitable/definition/phenotype-phenotypes-35>
6. Romanet-Manent S, et al. *Allergy* 2002; 57:607-13.
7. Pieter-Paul W, Hekking MD, Elisabeth H. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014; 2:671-80.
8. Schatz M, Rosenwasser L. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014; 2:645-8.
9. Zeiger RS, et al. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014; 2:741-50.
10. Zoratti E, et al. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2014; 113:25-30.
11. Peters SP. *J Allergy Clin Immunol Pract* 2014; 2:650-2.
12. Wallace DV, et al. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122:S1-S84.
13. Greiner AN, et al. *Lancet* 2011; 378:2112-22.
14. Bernstein JA. *Allergy Asthma Proc* 2010; 31:365-9.

15. Kariyawasam HH, Rotiroti G. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 2013; 21:79-86.
16. Altelaar AFM, Munoz J, Heck AJR. *Nat Rev Genet* 2013; 14:35-48.
17. Chahrour O, Cobice D, Malone J. *J Pharm Biomed Anal* 2015; 113:2-20.
18. Latosinska A, et al. *PLoS ONE* 2015; 10:e0137048.
19. Gordon SM, et al. *J Proteome Res* 2010; 9:5239-49.
20. Sakurai T, et al. *J of Pharmacol Exp Ther* 2016; 356:341-53
21. Cai X, et al. *J Cell Biochem* 2015; 116:1431-41.
22. Tonack S, et al. *Br J Cancer* 2013;108:1846-53.
23. Tremlett H, et al. *J Proteomics* 2015; 118:2-11
24. Wilkins MR, Sybille MNH. En: Visith Thongboonkerd, MD, FRCPT, editor. *Proteomics of human biofluids*. Humana Press: 2007 p. 147-74 (159).
25. Wang WA, Groenendyk J, Michalak M. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44:842-6.
26. Timchenko LT, et al. *Mol cell Biol* 2002; 22:7242-57.
27. Miglino N, et al. *J Allergy (Cairo)* 2012; 2012:783290.
28. Wright DB, et al. *Pulm Pharmacol Ther* 2013; 26:42-9.
29. Quesada Calvo F, et al. *J Proteome Res* 2011; 10:4291-301.
30. Takahashi M, et al. *J Exp Med* 2010; 207:29-37.
31. Cedzynski M, et al. *Mol Immunol* 2009; 47:415-19.