

# Obtención de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de válvulas aórticas humanas sanas y estenóticas

Félix Gil-Dones<sup>a</sup>, Tatiana Martín-Rojas<sup>a</sup>, Luis F. López-Almodovar<sup>b</sup>, Rocío Juárez-Tosina<sup>c</sup>, Fernando de la Cuesta<sup>d</sup>, Gloria Álvarez-Llamas<sup>d</sup>, Sergio Alonso-Orgaz<sup>a</sup>, Fernando Vivanco<sup>d,e</sup>, Luis Rodríguez-Padial<sup>a,f</sup> y María G. Barderas<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratorio de Fisiopatología Vascul. Hospital Nacional de Parapléjicos. SESCAM. Toledo. España.

<sup>b</sup>Unidad de Cirugía. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. España.

<sup>c</sup>Departamento de Anatomía Patológica. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. España.

<sup>d</sup>Departamento de Inmunología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. España.

<sup>e</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I. Universidad Complutense. Madrid. España.

<sup>f</sup>Unidad de Cardiología. Hospital Virgen de la Salud. Toledo. España.

**Introducción y objetivos.** Durante años, la estenosis aórtica (EA) degenerativa ha sido considerada como un proceso pasivo secundario al depósito de calcio en la válvula aórtica. Aunque no se conoce su etiología, diversos autores han señalado que comparte los mismos factores de riesgo que la enfermedad arterial coronaria. Además, se han encontrado similitudes histológicas en la válvula aórtica estenótica y la placa de ateroma, lo que ha llevado a la hipótesis de que la EA degenerativa es un proceso inflamatorio similar a la aterosclerosis. No obstante, existen algunos datos discordantes con esta teoría, lo que hace necesario profundizar en el conocimiento de esta patología. El principal objetivo de este trabajo es la puesta a punto de un protocolo de extracción proteínica eficaz para válvulas estenóticas aórticas y válvulas aórticas sanas, compatible con la realización de estudios proteómicos.

**Métodos.** Para el desarrollo del objetivo planteado, se han utilizado diferentes abordajes proteómicos: electroforesis bidimensional, espectrometría de masas y técnicas complementarias.

**Resultados.** Hemos puesto a punto una metodología, sencilla, reproducible y desarrollada en el laboratorio, que permite el análisis proteómico de la válvula aórtica humana, así como la identificación de las proteínas que la componen.

**Conclusiones.** Obtención de un método de extracción de proteínas sencillo, reproducible y compatible con la espectrometría de masas, que permite el análisis a gran escala del proteoma de válvulas con estenosis aórtica.

Además, esta metodología aumentará de forma significativa nuestro conocimiento del proteoma valvular.

**Palabras clave:** Proteómica. Estenosis aórtica. Biomarcadores.

## Development of an Optimal Protocol for the Proteomic Analysis of Stenotic and Healthy Aortic Valves

**Introduction and objectives.** For many years, degenerative aortic stenosis was thought to be a passive process secondary to calcium deposition in aortic valves. Although its etiology remains unknown, several authors have pointed out that degenerative aortic stenosis is associated with the same risk factors as coronary artery disease. Furthermore, histological similarities have been found between aortic valve stenosis and atherosclerotic plaque, giving rise to the hypothesis that degenerative aortic stenosis is an inflammatory process similar to atherosclerosis. Nevertheless, some data do not fit with this hypothesis and, consequently, greater understanding of the condition is needed. The main aim of this study was to develop a practical protocol for extracting protein for use in proteomic analysis from both stenotic and healthy aortic valves.

**Methods.** The study was carried out using a number of different proteomic methods: two-dimensional electrophoresis, mass spectrometry and additional techniques.

**Results.** We developed a simple and reproducible methodology in the laboratory for carrying out the proteomic analysis of human aortic valves and for identifying their component proteins.

**Conclusions.** We developed a simple and reproducible method for extracting protein that can be used with mass spectrometry and that makes it possible to carry out large-scale proteomic analysis of stenotic aortic valves. Furthermore, the methodology will significantly increase our understanding of the valve proteome.

**Key words:** Proteomics. Aortic stenosis. Biomarkers.

Full English text available from: [www.revespcardiol.org](http://www.revespcardiol.org)

Este trabajo se ha podido realizar gracias a la financiación de la Beca Esteve de la Sociedad Española de Cardiología. Redes Técnicas de Investigación Cooperativa (RETICS), Instituto de Salud Carlos III, RD06/0014/1015. Fondo de Investigación Sanitaria PI070537 y P080970; CAM (Biomarkers S2006/GEN-0247). FISCAM 2008/08.

Correspondencia: Dra. M.G. Barderas. Laboratorio de Fisiopatología Vascul. Hospital Nacional de parapléjicos. SESCAM. Edificio de Terapia, 2.ª planta. 45071 Toledo. España. Correo electrónico: megonzalez@sescam.jccm.es

Recibido el 12 de noviembre de 2008.

Aceptado para su publicación el 7 de octubre de 2009.

## ABREVIATURAS

apo: apolipoproteína.  
 EA: estenosis aórtica.  
 IEF: isoelectroenfoque.  
 MALDI: desorción/ionización mediante láser inducida por matriz.  
 MS: espectrometría de masas.  
 TBP: tributilfosfina.  
 TOF: tiempo de vuelo.

## INTRODUCCIÓN

La estenosis aórtica (EA) degenerativa es una enfermedad de elevada prevalencia en los países desarrollados y es la causa del mayor número de reemplazos valvulares aórticos; solamente en Estados Unidos se realizan cada año en más de 70.000 pacientes<sup>1</sup>. Un 2-3% de los adultos mayores de 65 años padecen esta enfermedad, mientras que hay engrosamiento irregular de la válvula aórtica sin obstrucción del flujo de salida (esclerosis aórtica) en alrededor del 25% de las personas mayores<sup>2</sup>. Por lo tanto, se espera un gran aumento de ésta, por las mejoras en sanidad que conllevan el progresivo envejecimiento de la población.

Durante años, la EA degenerativa ha sido considerada consecuencia inevitable del envejecimiento y se pensaba en ella como un proceso pasivo secundario al depósito de calcio en la válvula aórtica. En la actualidad, aunque no se conoce con certeza su etiología, diversos autores han señalado que comparte los mismos factores de riesgo que la aterosclerosis; así, es más frecuente en pacientes con hipercolesterolemia, hipertensión arterial, tabaquismo y diabetes mellitus<sup>3</sup>.

Además, recientemente se han encontrado similitudes histológicas entre la válvula aórtica estenótica y la placa de ateroma, lo que ha llevado a la hipótesis de que la EA degenerativa es un proceso inflamatorio similar al aterosclerótico. En diferentes trabajos, se ha demostrado que en la válvula aórtica se produce aterosclerosis, y después depósito de calcio y expresión de marcadores específicos de matriz ósea, como la osteopontina<sup>4-9</sup>. De igual forma, se ha documentado que la disfunción endotelial, con acumulación de lípidos y proteínas —apolipoproteína (apo) B, apo(a) y apo-E—<sup>10,11</sup>, es importante en el inicio de la estenosis aórtica, así como el estrés oxidativo con modificación de las enzimas del óxido nítrico también tiene participación relevante<sup>12,13</sup>. Sin embargo, algunos datos indican que su mecanismo patogénico no es exactamente igual que el de la aterosclerosis; así, en adultos con estenosis aórtica severa solamente el 50% tiene enfermedad arterial coronaria significativa. A su vez, la mayoría de los pacientes

con enfermedad arterial coronaria no sufren EA<sup>2</sup>. Además, algunos estudios dirigidos a evaluar el efecto de las estatinas en la EA degenerativa han objetivado disminución de la enfermedad coronaria sin cambio en la progresión de la EA degenerativa<sup>14,15</sup>.

Por ello, parece esencial profundizar en el conocimiento de la patogenia de la EA degenerativa como paso previo a establecer medidas de prevención de dicha enfermedad.

Uno de los problemas con que se han encontrado las investigaciones realizadas hasta la fecha en el estudio de la EA y otras afecciones radica en que se estudian las alteraciones de una proteína o un reducido número de éstas cada vez, lo cual genera una información sesgada e incompleta del verdadero estado fisiológico de una muestra biológica. En la actualidad el estudio de proteínas individuales, aun siendo esencial, ha sido desplazado por las estrategias proteómicas que permiten el análisis de todas las proteínas de una muestra<sup>16</sup>.

La proteómica clínica es una disciplina que aplica las herramientas proteómicas al diagnóstico, el pronóstico, el tratamiento y el seguimiento de las enfermedades humanas. La naturaleza de los datos que se generan mediante esta tecnología no es de tipo individual, referidos a una única molécula, sino de tipo generalizado, en el que se describen cientos o miles de datos simultáneamente. Ello se debe a que las nuevas tecnologías —desorción/ionización mediante láser inducida por matriz (Maldi)-*time of flight*/time of flight (TOF/TOF), cromatografía líquida-espectrometría de masas (MS), DIGE, MS-IMAGING, etc.— caracterizan miles de especies moleculares (proteínas, lípidos, metabolitos, fármacos) en cada análisis y generan perfiles conjuntos que reflejan la situación general de una muestra<sup>17</sup>.

Debido a que las proteínas que componen las válvulas aórticas son esenciales para el correcto funcionamiento de éstas, su identificación y su caracterización mediante herramientas proteómicas son vitales para conocer más sobre la fisiología de la válvula aórtica y sus posibles afecciones.

El objetivo de este trabajo es obtener un protocolo estándar, fácilmente reproducible, que nos permita estudiar e identificar las distintas proteínas que componen el proteoma de la válvula aórtica y el proteoma de la válvula estenótica. De esta forma pretendemos aportar nuevos datos que nos permitan profundizar en el conocimiento tanto de la fisiología como de la etiología de esta enfermedad.

## MÉTODOS

### Selección de pacientes

Tras solicitar el correspondiente consentimiento informado, se incluyó en este estudio a los pacientes

**TABLA 1. Características clínicas de los individuos cuyas válvulas aórticas se usaron como controles**

Paciente	Edad/sexo	Causa de la muerte	Válvulas
1	64/V	Bronconeumonía aguda bilateral	Normales
2	51/M	<i>Shock</i> séptico	Normales
3	47/V	Sepsis	Normales
4	47/M	Neumonía bacteriana	Normales
5	47/M	Carcinomatosis	Normales
6	34/V	Pancreatitis aguda	Normales
7	64/M	Sepsis bacteriana	Normales
8	78/M	Bronconeumonía aspirativa	Normales
9	76/V	<i>Shock</i> séptico y bronconeumonía	Normales
10	66/V	Bronconeumonía bilateral	Normales

M: mujer; V: varón.

**TABLA 2. Características clínicas de los individuos con estenosis aórtica**

Edad	75 ± 3,93
Sexo (varones/mujeres), %	55/45
Hipertensión arterial, %	76,16
Diabetes mellitus, %	33
Dislipemia, %	52,51

ingresados en la Unidad de Cirugía del Hospital Virgen de la Salud (Toledo) que se sometieron a cirugía de reemplazo valvular aórtico. Además, como controles se utilizaron válvulas aparentemente sanas procedentes de necropsias realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud (Toledo) (tabla 1). Se registraron las características basales (edad, sexo, tabaquismo, diabetes mellitus, hipertensión, hiperlipemia, obesidad) (tabla 2). Formaron parte de la puesta a punto de la metodología 10 pacientes y se validó en 10 sujetos de control.

### Procesado de las válvulas aórticas. Lisado y extracción de proteínas

Las válvulas estenóticas procedentes de reemplazo valvular aórtico fueron procesadas de la siguiente manera. Hasta su llegada al Hospital Nacional de Paraplégicos de Toledo, en un tiempo < 2 h desde la extracción, las válvulas aórticas fueron mantenidas a 4 °C en medio RPMI. Una vez en el laboratorio, todas las manipulaciones fueron realizadas a 4 °C.

En primer lugar se realizaron dos lavados con tampón fosfato salino para eliminar los contaminantes de sangre. Para obtener el contenido proteínico de la válvula, el fragmento de la válvula seleccionado se congeló en nitrógeno líquido y se homogeneizó con mortero. Del tejido así obtenido, se resuspendieron 0,1-0,3 g en 400 µl de tampón de extracción de proteínas (tampón fosfato salino,

2,5 mmol de ditiotretol, 0,01% de triton, 0,01% de inhibidores de proteasas de amplio espectro)<sup>18</sup>. Tras la centrifugación del homogeneizado resultante, el sobrenadante que corresponde al extracto proteínico soluble se recogió<sup>19,20</sup> (350 µl) y se cuantificó según el método de Bradford-Lowry (Biorad protein assay)<sup>21</sup>, con lo que se obtuvo una concentración de 0,4-1 µg/µl de proteína total en cada extracto.

Las proteínas se desnaturalizaron en tampón de disociación (2-amino-2-hidroximetil-1,3 propanodiol 0,5 mol a pH 8,0, SDS 10%, glicerol, B-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0,02%), se calentaron 5 min a 100 °C y posteriormente se cargaron en el gel.

### Electroforesis bidimensional

Todos los reactivos y aparatos utilizados para el desarrollo de estas técnicas se describieron en detalle en publicaciones anteriores<sup>18-20</sup>. Se desalaron 250 µg del extracto proteínico obtenido mediante filtración de la muestra con las columnas comerciales Spin-X (Costar). Luego hubo un segundo paso de limpieza y precipitación de la muestra mediante el *kit* comercial 2D-Clean-up (GE Healthcare) siguiendo las recomendaciones de la casa comercial.

Tras la desalación, las muestras se resuspendieron en tampón de rehidratación<sup>19,20</sup> y se añadió el agente reductor tributilfosfina (TBP) (Bio-Rad) y anfolitos (Bio-Rad), para llevar a cabo la primera dimensión utilizando tiras de poliacrilamida con gradientes inmovilizados a pH 4-7 y 3-10 (Bio-Rad). El isoelectroenfoque (IEF) se desarrolló horizontalmente y a una temperatura constante de 20 °C siguiendo el programa descrito previamente por Lázaro et al<sup>22</sup>, con ligeras modificaciones.

Durante el desarrollo del programa de IEF, se colocaron dos pequeños trozos de papel entre los electrodos (Electrode Wicks, Bio-Rad) y las tiras de poliacrilamida con el fin de eliminar sales, exceso de agua y proteínas con valores de punto isoeléctrico fuera del rango de pH de la tira.

Una vez finalizado el IEF, las tiras fueron equilibradas con tampón de equilibrado<sup>19,20</sup> y se llevó a cabo la segunda dimensión. A continuación los geles se tiñeron con plata (Silver staining protein with Ampholine PAGplate de Pharmacia Biotech, GE Healthcare) o con azul Coomassie (pageBlue, Protein Staining, Fermentas), siguiendo en ambos casos las indicaciones descritas por las casas comerciales. Los geles teñidos fueron escaneados usando el escáner/densitómetro GS-800 (Bio-Rad) y posteriormente analizados con el programa de análisis de imagen PDQUEST 8.0 (Bio-Rad).

### MALDI-TOF/TOF y búsqueda en las bases de datos

Las manchas proteínicas fueron recortadas de los geles manualmente, digeridas automáticamente usando el Ettan Digester (GE Healthcare) e identificadas en la Unidad de Proteómica del Hospital Nacional de Paraplégicos (Toledo).

El protocolo de digestión utilizado fue el descrito por Schevchenko et al<sup>23</sup>, con ligeras modificaciones: los fragmentos del gel fueron reducidos utilizando 10 mmol de ditiotretol (Ditiotretol, Sigma Aldrich) en bicarbonato amónico —50 mmol (el 99% de pureza; Scharlau)— y alquilados con yodoacetamida 55 mmol (Sigma Aldrich) en bicarbonato amónico (50 mmol). Los fragmentos de gel se lavaron entonces con bicarbonato amónico 50 mmol, metanol al 50% (gradient HPLC grade, Scharlau) y acetonitrilo (gradient HPLC grade, Scharlau), tras lo cual fueron secados en *speedvac* (Thermo Fisher). Se añadió tripsina modificada de cerdo (Sequencing grade; Promega, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) a una concentración final de 20 ng/μl en bicarbonato amónico 20 mmol a los fragmentos de gel y la digestión tuvo lugar durante la noche a 37 °C. Finalmente se utilizó acetonitrilo al 60% en agua y el 0,1% de ácido fórmico (el 99,5% de pureza; Sigma Aldrich) para la extracción peptídica.

Una vez finalizada la digestión, se mezcló una alícuota de cada digestión con una alícuota de matriz de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma Aldrich) en acetonitrilo al 50% y el 0,1% de ácido trifluoroacético. La mezcla se depositó en capa fina en una placa del espectrómetro 384 Opti-TOF 123 × 81 mm MALDI (applied Biosystem) y se secó a temperatura ambiente. Los datos de MALDI-MS/MS se obtuvieron automáticamente utilizando un espectrómetro de masas 4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems).

Se captaron los espectros en modo ión positivo con un láser Nd:YAG de 355 nm de longitud de onda, a una frecuencia de 200 Hz, y se obtuvieron de 100 a 2.000 espectros individuales. Para el

análisis de fragmentos de iones en modo de tiempo de vuelo en tándem (TOF/TOF), se aceleraron los precursores a 8 kV y se los seleccionó en la puerta de entrada de iones. Además, los fragmentos generados por colisión de los precursores con aire en la cámara de colisión se aceleraron a 15 kV en la fuente 2 y se analizaron sus masas después de pasar por el reflector de iones. El análisis automático de los datos de masas se realizó usando el programa informático 4000 Series Explorer versión 3.5.3 (Applied Biosystem). Para la calibración interna de los espectros de masas del MALDI-TOF se usaron dos iones de la autólisis de tripsina ( $m/z = 842.510$  y  $m/z = 2211.105$  respectivamente). Para las calibraciones del MALDI-MS/MS, se utilizaron espectros de iones fragmento obtenidos del Glub-fibrinopeptide (4800MALDI/TOF-TOF, Applied Biosystem). Los datos de MALDI-MS y MS/MS fueron combinados mediante el programa GPS Explorer versión 3.6, que permite la realización de búsquedas no redundantes en la base de datos de proteínas NCBIInr (versión 20080225) usando el programa Mascot versión 2.1 (Matrix science)<sup>24</sup>, con una tolerancia de masas de 50 ppm y permitiendo la pérdida de un lugar de corte. Los espectros MALDI-MS/MS y las búsquedas fueron revisadas en detalle manualmente usando este programa.

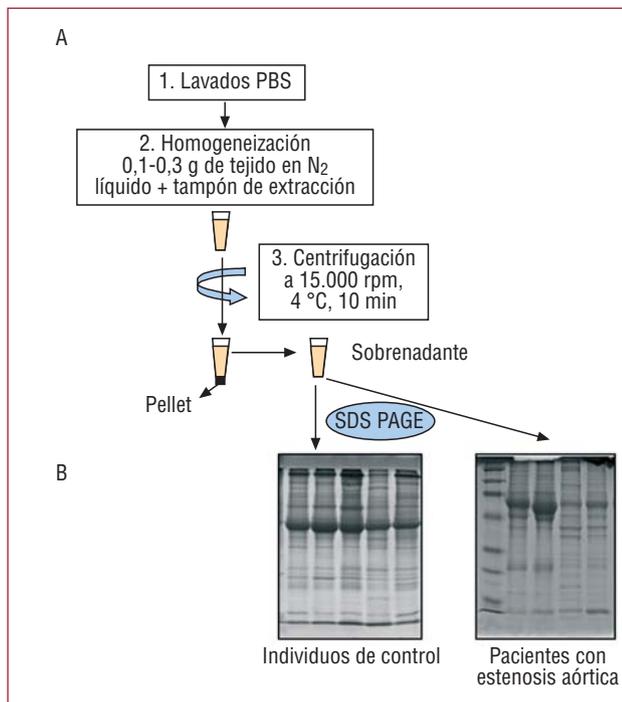
## RESULTADOS

### Procesamiento de válvulas aórticas: homogeneización y extracción de proteínas

Con el objetivo de maximizar el número de proteínas extraídas, las válvulas fueron sometidas a un protocolo de extracción «fuerte» que había sido puesto a punto previamente por Barderas et al<sup>18</sup> para otro tipo de muestras diferentes, y que consideramos que podía ser compatible con nuestras muestras de válvulas aórticas estenóticas. La figura 1A muestra esquemáticamente el procedimiento.

Es importante señalar que las muestras de válvulas estenóticas aórticas obtenidas siguiendo este protocolo presentaban un alto contenido en sales de calcio y otros contaminantes, lo cual dificultó el correcto isoelectroenfoco de dichas muestras (datos no mostrados), por lo que fue necesario un nuevo paso de filtración para intentar eliminarlos. Además, incorporamos inhibidores de proteasas al tampón de extracción de proteínas para evitar la degradación de las proteínas por causas externas a procesos fisiopatológicos durante el procesado.

Tras optimizar el protocolo de extracción proteínica de válvulas estenóticas aórticas, se obtuvieron extractos proteínicos de aproximadamente 350 μl,



**Fig. 1.** Obtención y análisis del contenido proteínico valvular. A: representación esquemática del protocolo para la obtención del extracto proteínico a partir de válvulas aórticas con y sin estenosis. B: imágenes representativas de geles unidimensionales (SDS-PAGE 12% acrilamida/bisacrilamida) de proteínas obtenidas a partir de válvulas con estenosis aórtica (pacientes) y válvulas sanas (individuos de control).

con una concentración de proteína de 0,4-1 µg/µl por cada 0,1-0,3 g de tejido.

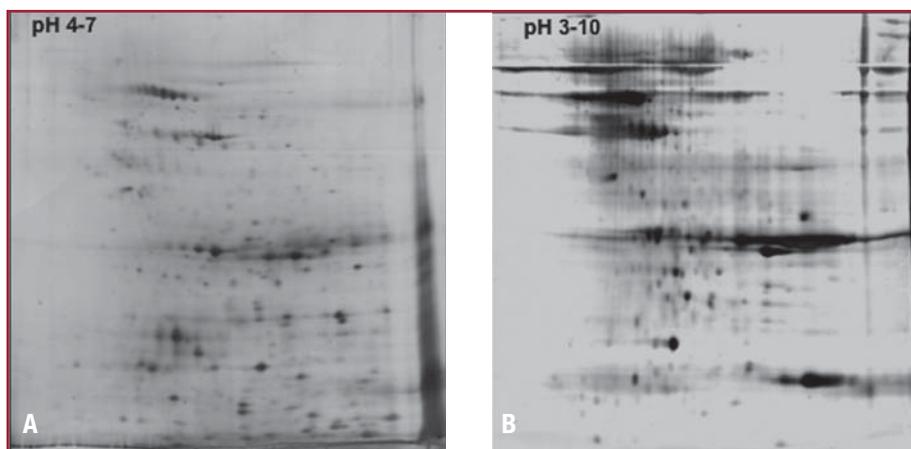
Después se realizó el mismo protocolo con las válvulas procedentes de necropsias (muestras sanas), y no se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos con uno y otro tipo de muestras.

## Electroforesis bidimensional e identificación de proteínas

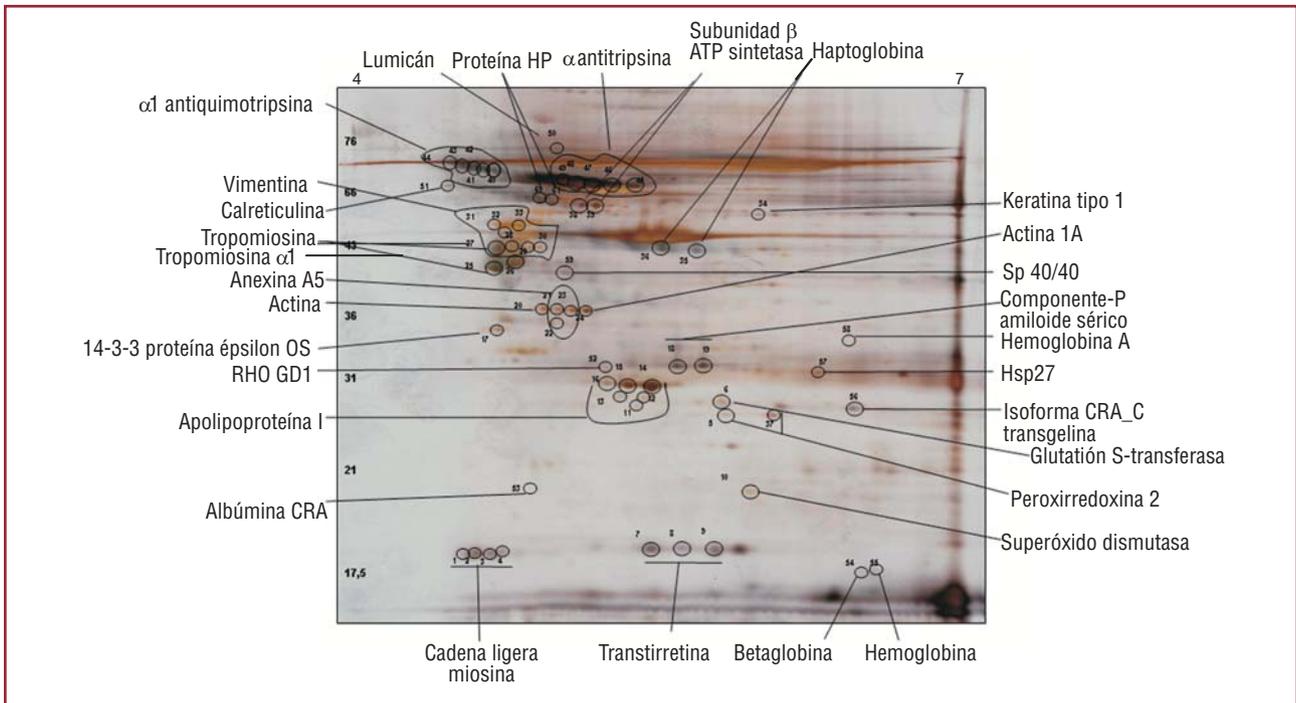
Tras la extracción proteínica y la eliminación de sales de las muestras, se produjeron los geles bidimensionales (2-DE) de los extractos utilizando diferentes gamas de pH (fig. 2), con el fin de hallar las condiciones adecuadas para obtener el mayor número de manchas proteínicas con la mejor resolución posible.

Como se puede observar en la figura 2A, aparecen aproximadamente 400 manchas proteínicas bien definidas y distribuidas por el gel realizado con un espectro de pH 4-7 y unas 300 manchas con pH 3-10 (fig. 2B). En ambos casos, para la cuantificación del número de manchas proteínicas se utilizó el programa de análisis de imágenes PD-Quest (Bio-Rad). En todos los casos analizados encontramos una mejor resolución de los geles 2-DE en la gama de pH 4-7, con la que se detectó un mayor número de manchas.

Una vez comprobada la compatibilidad de la metodología con la 2-DE, se procedió a la identificación de diferentes manchas proteínicas con el fin de corroborar que los protocolos empleados en la extracción proteínica eran compatibles con la espectrometría de masas (MALDI-TOF/TOF) (fig. 3); se obtuvo una eficacia del 100% a la hora de identificar las manchas proteínicas seleccionadas. Las identificaciones se llevaron a cabo tanto en válvulas aórticas sanas como en válvulas aórticas estenóticas. En este trabajo utilizamos el espectrómetro de masas 4800 MALDI-TOF/TOF (Applied Biosystem), que se caracteriza por sus limitaciones de detección e identificación mínimas por su alta sensibilidad (umbral mínimo de detección, 25 fmol). Además, presenta la gran fiabilidad



**Fig. 2.** Imágenes representativas de geles bidimensionales realizados con el extracto de proteína obtenido de válvulas aórticas estenóticas. Primera dimensión llevada a cabo con diferentes gradientes de pH (4-7 y 3-10). Segunda dimensión realizada en geles de acrilamida/bisacrilamida al 12%.



**Fig. 3.** Gel bidimensional representativo pH 4-7 de extracto de proteína obtenida a partir de válvulas aórticas sanas, sobre el cual se señalan algunas de las manchas proteínicas identificadas por espectrometría de masas.

y la sensibilidad de los TOF y son casi totalmente automáticos, por lo que se puede identificar cientos de proteínas en un día. Producen roturas de alta energía en los péptidos, y se generan los fragmentos antes citados y otros procedentes de las cadenas laterales de los aminoácidos, lo que permite incluso diferenciar residuos de masa idéntica como Leu/Ile. De esta forma la secuenciación de los péptidos se facilita notablemente.

### Grupos funcionales identificados

Las huellas peptídicas obtenidas se utilizaron para identificar las proteínas correspondientes empleando el motor de búsqueda MASCOT ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). En este trabajo hemos identificado manchas proteínicas de interés utilizando las tiras de pH 4-7 y pH 3-10. En la tabla 3 se muestran las proteínas identificadas hasta el momento, las cuales se han clasificado en diferentes grupos funcionales: metabolismo (apo-AI, SP40/40, etc.), transporte (albúmina, haptoglobina, transtirretina), energéticas (ATPasa), estrés (Hsp27), citoesqueleto (actina), inflamación y respuesta inmunitaria (vitronectina, antitripsina).

### DISCUSIÓN

En este trabajo se describe una metodología sencilla y reproducible desarrollada en el laboratorio y

que permite el análisis proteómico mediante 2-DE de la válvula aórtica humana, tanto patológica como sana, así como la identificación por espectrometría de masas de las proteínas que las componen. Es importante señalar que los grupos analizados presentan diferentes edades ( $75 \pm 4$  y  $57 \pm 14$ ), y el grupo de cuadros sistémicos graves que podrían alterar la naturaleza de las válvulas estudiadas. Asimismo hay que indicar que las muestras de control provienen de necropsias (los pacientes fallecieron por causas que no tienen ninguna relación con procesos de estenosis valvular aórtica).

La preparación de la muestra, como ya se ha indicado, es un paso clave para la obtención de buenos resultados. Por ello realizamos un paso de limpieza consistente en una filtración y una precipitación para reducir las grandes cantidades de sales de las muestras, procedentes de los depósitos de calcio que presentan las válvulas estenosadas. Estos depósitos de calcio impedían la obtención de geles 2-DE óptimos. Durante todo el proceso de limpieza de la muestra puede haber una pequeña pérdida de proteínas asociada a estos procesos, pero que se compensa por conseguirse una correcta resolución de los geles 2-DE.

Por otro lado, aunque la 2-DE es una técnica laboriosa, el desarrollo de las tiras comerciales de isoelectroenfoque, así como las nuevas cubetas de electroforesis (permiten hacer y correr hasta 12 geles en paralelo), ha permitido que esta técnica

**TABLA 3. Proteínas identificadas por espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF). Función de la proteína, eficacia de identificación y coeficiente de identificación (CI)**

Nombre de la proteína	Número de acceso	Función	Score	CI (%)
Cadena ligera miosina	MYL6_HUMAN	Estructural (citoesqueleto)	240	100
2-peroxirredoxina	PRDX2_HUMAN	Regulación redox	157	100
Glutatión S transferasa	GSTP1_HUMAN	Metabolismo celular	280	100
Transtirretina	TTHY_HUMAN	Transporte	177	100
Superóxido dismutasa	SODC_HUMAN	Regulación redox	215	100
Apolipoproteína A1	APO A1_HUMAN	Transporte/metabolismo de lípidos	270	100
14-3-3 proteína épsilon	1433E_CHICK	Señalización celular	150	100
Componente P <i>serum</i> amiloide	SAMP_HUMAN	Respuesta a estrés	70	99
Actina	ACTC_HUMAN	Estructural (citoesqueleto)	91	99,57
Actina A1	ACTC1_HALRO	Estructural (citoesqueleto)	87	99,926
Anexina A5	ANXA5_HUMAN	Coagulación sanguínea	123	100
Cadena B tropomiosina	TPM2_HUMAN	Estructural (contracción muscular)	118	100
Cadena alfa 1 tropomiosina	TPM1_HUMAN	Estructural (contracción muscular)	92	99,97
Vimentina	VIME_HUMAN	Estructural (citoesqueleto)	123	100
Keratina tipo 1	K1C10_HUMAN	Estructural (citoesqueleto)	65	86,194
Haptoglobina	HPT_PONAB	Transporte y daño oxidativo	79	90,928
Subunidad beta de la ATP sintasa	ATPB_HUMAN	Metabolismo energético	88	98,958
Alfa 1 antiqumotripsina	AACT_HUMAN	Inflamación	131	100
Alfa 1 antitripsina	A1AT_HUMAN	Inhibidor serinproteasas	104	99,99
Lumicán	LUM_HUMAN	Estructural (matriz celular)	103	99,997
Calreticulina	CALR_HUMAN	Regulación proteínica (chaperona)	103	99,97
RHO GDP	B6BKU1_9PROT	Regulación proteínica	76	82,31
Albúmina	ALBU_HUMAN	Transporte	177	100
Betaglobina	HBB_HUMAN	Transporte de oxígeno	163	100
Hemoglobina 1	GLB1_LUCPE	Transporte de oxígeno	116	99,99
Isoforma CR_c transgelina	TAGL2_HUMAN	Estructural (citoesqueleto)	112	100
Hsp27	SAFB1_HUMAN	Chaperona, respuesta a estrés	70	38,663
Albúmina CRA_I	AFAM_HUMAN	Transporte	91	99,56
Hemoglobina A	HBA_HUMAN	Transporte de oxígeno	175	100
SP 40/40	CLUS_HUMAN	Apoptosis	104	100

sea muy reproducible. Sin embargo presenta algunas limitaciones, ya que estos geles (2-DE) no permiten resolver proteínas de menos de 10 kDa ni las de más de 150 kDa, así como las proteínas más básicas o más ácidas tampoco se suelen enfocar adecuadamente. Esto es un inconveniente para la 2-DE porque muchas proteínas reguladoras están a muy baja concentración y no son detectables. La utilización de geles expandidos, el fraccionamiento previo y la obtención de subproteomas o de complejos proteínicos para enriquecer el contenido proteínico evitan parcialmente estos inconvenientes e incrementan la sensibilidad en los umbrales de detección. En nuestro caso, para solventar en parte estas limitaciones se fraccionó la muestra, ya que una eficiente extracción de proteínas puede convertirse en un paso crítico dentro de la investigación del proteoma valvular o de cualquier otro órgano o tejido<sup>25,26</sup>, y se desarrollaron distintos mapas 2-DE con diferentes intervalos de pH (tiras de IEF pH 4-7 y pH 3-10). La utilización de estos pasos supuso una mejora considerable en la resolución de los geles 2-DE.

La limitación real a la hora de identificar una mancha proteínica en concreto, en general, está determinada por la amplitud dinámica que presente la muestra a analizar y la cantidad y la calidad (poca concentración de sales, ácidos nucleicos, lípidos, etc.) del extracto proteínico obtenido, lo cual depende directamente de la eficacia del método de extracción. De hecho, la preparación de la muestra es esencial y muchos trabajos recientes de proteómica se han centrado en la optimización de los protocolos de extracción y limpieza de las muestras en función del tejido u órgano en estudio. En el caso de la válvula estenótica aórtica, nuestro protocolo de extracción de proteínas nos ha permitido realizar la primera o una de las primeras aproximaciones proteómicas en esta patología.

Por otro lado, en cuanto a la metodología aquí presentada, hemos comprobado (datos preliminares) su compatibilidad con otras técnicas proteómicas como el 2-D DIGE y cromatografía líquida-MS (datos no mostrados).

Pese a los buenos resultados obtenidos hasta el momento, es necesario continuar este estudio e

identificar el mayor número de proteínas presentes en el proteoma valvular. Esperamos que, en el futuro, la finalización de estos estudios y otros complementarios, como la cromatografía líquida-MS/MS, nos permita obtener el proteoma valvular completo, así como la realización de análisis de expresión diferencial entre válvulas aórticas sanas y estenóticas. La expresión de alguna proteína específica en las válvulas estenóticas que también estuviera expresada en las placas de ateroma permitiría establecer un paralelismo molecular (proteínico) entre ambas patologías.

## CONCLUSIONES

Se ha desarrollado un método de extracción de proteínas para el análisis a gran escala del proteoma de la válvula estenótica aórtica y, por ende, la válvula aórtica sana, intentando minimizar las pérdidas de información por degradación de las proteínas durante el proceso.

La utilización de este método de extracción proteínica, junto con el análisis integral del proteoma mediante 2-DE, aumentará de forma significativa la cantidad de proteínas valvulares identificadas y permitirá su posterior estudio patofisiológico.

## AGRADECIMIENTOS

Queremos dar las gracias a la Dra. V.M. Dardé, Gemma Barroso y Ana Isabel Carrasco, de la Unidad de Proteómica del Hospital Nacional de Paraplégicos, por su ayuda en la identificación de proteínas. Asimismo queremos dar las gracias a Carmen Bermúdez por su contribución a este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

- Passik CS, Ackermann DM, Pluth JR, Edwards WD. Temporal changes in the causes of aortic stenosis: a surgical pathologic study of 646 cases. *Mayo Clin Proc.* 1987;62:119-23
- Otto CM, O'Brien KD. Why is there discordance between calcific aortic stenosis and coronary artery disease? *Heart.* 2001;85:601-2.
- Rajamannan NM, Subramaniam M, Rickard D, Stock SR, Donovan J, Springett M, et al. Human aortic valve calcification is associated with an osteoblast phenotype. *Circulation.* 2003;107:2181-4.
- Stewart BF, Siscovick D, Lind BK, Gardin JM, Gottdiener JS, Smith VE, et al. Clinical factors associated with calcific aortic valve disease. *J Am Coll Cardiol.* 1997;29:630-4.
- Mohler ER, Adam LP, McClelland P, Graham L, Hathaway DR. Detection of osteopontin in calcified human aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997;17:547-52.
- O'Brien KD, Kuusisto J, Reichenbach DD, Ferguson M, Giachelli C, Alpers CE, et al. Osteopontin is expressed in human aortic valvular lesions. *Circulation.* 1995;92:2163-8.
- Srivatsa S, Harrity PJ, Maercklein PB, Kleppe L, Veinot J, Edwards WD, et al. Increased cellular expression of matrix proteins that regulate mineralization is associated with calcification of native human and porcine xenograft bioprosthetic heart valves. *J Clin Invest.* 1997;99:996-1009.
- Feldman T, Glagov S, Carroll JD. Restenosis following successful balloon valvuloplasty: bone formation in aortic valve leaflets. *Cathet Cardiovasc Diagn.* 1993;29:1-7.
- Fernández González AL, Montero JA, Martínez Monzonis A, Gil O, Alemany P. Osseous metaplasia and hematopoietic bone marrow in a calcified aortic valve. *Tex Heart Inst J.* 1997;24:232.
- O'Brien KD, Reichenbach DD, Marcovina SM, Kuusisto J, Alpers CE, Otta CM. Apolipoproteins B, and E accumulate in the morphologically early lesion of "degenerative" valvular aortic stenosis. *Arterioscler Thromb.* 1996;16:523-32.
- Mohler R, Gannon F, Reynolds C, Zimmerman R, Keane MG, Kaplan FS. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation.* 2001;103:1522-8.
- Arumugam SB, Sankar NM, Cherian KM. Osseous metaplasia with functioning marrow in a calcified aortic valve. *J Cardiovasc Surg.* 1995;10:610-1.
- Rajamannan NM, Subramaniam M, Springett M, Neikrasz M, Stock RS, Ignatiev KI, et al. Atorvastatin inhibits aortic valve calcification in an experimental model of chronic hypercholesterolemia via nonlipid lowering effects. *J Am Coll Cardiol.* 2003;41 Suppl A:842.
- Rossebo AB, Pedersen TR, Boman K, Brudi P, Chambers JB, Egstrup K, et al. Intensive lipid lowering with simvastatin and ezetimibe in aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2008;359:1343-56.
- Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, Bloomfield P, Reid J, Northridge DB, et al; Scottish Aortic Stenosis and Lipid Lowering Trial, Impact on Regression (SALTIRE) Investigators. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis. *N Engl J Med.* 2005;352:2389-97.
- Carrette O, Burkhard PR, Sanchez JC, Hochstrasser DF. State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nature Protocols.* 2006;1:812-3.
- Vivanco F, Rodríguez-Padial L, Darde VM, De la Cuesta F, Álvarez-Llamas G, Díaz-Prieto N, et al. Proteomic biomarkers of atherosclerosis. *Biomarkers Insights.* 2008;3:101-13.
- Barderas MG, Wigdorovitz A, Merelo F, Beitia F, Borca M, Escibano JM. Expression of recombinant African Swine Fever virus protein p30 in insect larvae and its use in serodiagnosis. *J Virol Methods.* 2000;89:129-36.
- González-Barderas M, Gallego-Delgado J, Mas S, Durán MC, Lázaro A, Hernández-Mérida S, et al. Isolation of circulating human monocytes with high purity for proteomic analysis. *Proteomics.* 2004;4:432-7.
- Durán MC, Mas S, Martín-Ventura JL, Meilhac O, Michel JB, Gallego-Delgado J, et al. Proteomic analysis of human vessels: application to atherosclerotic plaques. *Proteomics.* 2003;3:973-8.
- Asubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman J, Smith JA, et al. Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons; 2001.
- Lázaro A, Gallego-Delgado J, Osende JI, Barderas MG, Durán MC, Vivanco F, et al. Expresión diferencial de proteínas en el corazón de ratas espontáneamente hipertensas con hipertrofia cardiaca. *Clin Invest Arterioscl.* 2005;17:1-9.
- Schevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 1996;68:850-8.
- Perkins DN, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis.* 1999;20:3551-67.
- Dardé VM, Barderas MG, De la Cuesta F, Durán MC, Egidio J, Vivanco F. Depletion of high-abundant proteins improves Proteomic Analysis of plasma from patients with acute coronary syndrome. *Investigación Cardiovascular.* 2006;9:37-54.
- Jiang X, Ye M, Jiang X, Liu G, Feng S, Cui L, et al. Method development of efficient protein extraction in bone tissue for proteome analysis. *J Proteome Res.* 2007;6:2287-94.