

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO DE TEJIDO Y
SECRETOMA DE LA ARTERIA CORONARIA
HUMANA EN LA ENFERMEDAD
ATEROSCLERÓTICA.**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Fernando de la Cuesta Marina

Bajo la dirección de los doctores

Fernando Vivanco Martínez
Eugenia M^a González Barderas
Gloria Álvarez Llamas

Madrid, 2010

Universidad Complutense de Madrid
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular



**ESTUDIO DEL PERFIL PROTEICO DE
TEJIDO Y SECRETOMA DE LA ARTERIA
CORONARIA HUMANA EN LA
ENFERMEDAD ATEROSCLERÓTICA**

Tesis Doctoral

Fernando de la Cuesta Marina
Madrid, 2010

Directores:

Dr. Fernando Vivanco Martínez
Dra. M^a Eugenia González Barderas
Dra. Gloria Álvarez Llamas

ÍNDICE

ABREVIATURAS

INTRODUCCIÓN

1. **ATEROSCLEROSIS**
 - 1.1. Estructura de la pared vascular
 - 1.2. Disfunción endotelial
 - 1.3. Aterogénesis
 - 1.4. Vulnerabilidad de la placa de ateroma. Ruptura y trombosis.
2. **MICRODISECCIÓN POR LÁSER**
 - 2.1. Microdissección por captura con láser (LCM)
 - 2.2. Microdissección por corte con láser
 - 2.3. Material específico para microdissección
 - 2.4. Microdissección por láser para Proteómica
3. **PROTEÓMICA**
 - 3.1. Preparación de muestras
 - 3.1.1. *Lisis celular*
 - 3.1.2. *Solubilización*
 - 3.2. Técnicas de separación de proteínas
 - 3.2.1. *Electroforesis bidimensional (2-DE)*
 - 3.2.2. *Electroforesis capilar (CE)*
 - 3.2.3. *Cromatografía líquida (LC)*
 - 3.3. Espectrometría de masas (MS)
 - 3.3.1. *Estructura de un espectrómetro de masas*
 - 3.3.2. *Identificación por MS*
 - 3.4. Análisis de expresión diferencial por LC-MS. Proteómica Cuantitativa.
4. **PROTEOMICA CARDIOVASCULAR. ANTECEDENTES**
 - 4.1. Estudio de arterias ateroscleróticas
 - 4.2. Estudio de regiones de arteria aisladas por microdissección
 - 4.3. Estudios de secretoma de tejido

OBJETIVOS

MATERIAL Y MÉTODOS

1. **OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ARTERIAS ATROSCLERÓTICAS Y CONTROLES**
2. **CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA**
3. **OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE TEJIDO COMPLETO**
4. **MICRODISECCIÓN POR LÁSER**
 - 4.1. Preparación de la muestra para LMD
 - 4.2. LMD
5. **OBTENCIÓN DEL SECRETOMA**
 - 5.1. Marcaje con isótopos estables
 - 5.2. Procesamiento de secretomas para análisis por Orbitrap
6. **2-DE**
 - 6.1. Isoelectroenfoque
 - 6.2. SDS-PAGE
7. **2-D DIGE**
 - 7.1. Reducción y marcaje de las muestras
 - 7.2. Isoelectroenfoque
 - 7.3. SDS-PAGE
 - 7.4. Análisis diferencial mediante 2-D DIGE
8. **IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS**
 - 8.1. Identificación por MALDI-TOF/TOF
 - 8.2. Identificación por LC-MS/MS
 - 8.2.1. *Identificación por trampa lineal, LTQ*
 - 8.2.2. *Detección de marcaje isotópico en espectros de MS/MS de trampa lineal, LTQ*
 - 8.2.3. *Identificación por LTQ-OrbiTrap*
 - 8.3. Análisis diferencial por cuantificación libre de marcaje
 - 8.3.1. *Análisis diferencial por cuantificación libre de marcaje con el programa Scaffold*
 - 8.3.2. *Análisis diferencial por cuantificación libre de marcaje con el programa SIEVE*
 - 8.4. Validación de las diferencias por inmunohistoquímica

RESULTADOS

1. **HISTOLOGÍA DE LA ARTERIA CORONARIA ATROSCLERÓTICA**
2. **AISLAMIENTO DE LAS CAPAS ÍNTIMA Y MEDIA DE ARTERIA CORONARIA ATROSCLERÓTICA Y ARTERIAS CONTROL MEDIANTE LMD**
3. **OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE 2-DE CON TEJIDO TRAS LMD**
 - 3.1. Optimización de la 2-DE de arteria coronaria con placa de ateroma
 - 3.2. Análisis de tejido aislado por LMD mediante 2-DE
 - 3.3. Combinación del DIGE de marcaje a saturación con la LMD para el análisis de tejido arterial
 - 3.3.1. *Optimización del DIGE de marcaje a saturación con tejido completo*
 - 3.3.2. *Influencia de los métodos de tinción en el perfil bidimensional de los geles 2-DE*
 - 3.3.3. *Influencia del tampón de lisis en la extracción y solubilización de las proteínas*
 - 3.3.4. *Chequeo del aislamiento correcto de las capas íntima y media mediante LC-MS/MS.*

4. CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE LAS CAPAS ÍNTIMA Y MEDIA DE ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA HUMANA

4.1. Capa íntima

- 4.1.1. *Análisis diferencial mediante DIGE de marcaje a saturación empleando DeCyder*
- 4.1.2. *Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF-TOF*
- 4.1.3. *Validación de las variaciones encontradas mediante IHQ*

4.2. Capa media

- 4.2.1. *Análisis diferencial mediante DIGE de marcaje a saturación empleando DeCyder*
- 4.2.2. *Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF-TOF*

5. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DEL SECRETOMA DE ARTERIA CORONARIA

5.1. Aplicación del protocolo de obtención de secretoma de arteria carótida a la obtención de secretoma de arteria coronaria

5.2. Evaluación del protocolo de intercambios de medio para la obtención del secretoma de arteria coronaria aterosclerótica

6. CARACTERIZACIÓN DEL SECRETOMA DE LA ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA HUMANA

6.1. Aplicación del marcaje isotópico al análisis proteómico del secretoma de arteria coronaria aterosclerótica

6.2. Análisis diferencial de secreción de coronaria aterosclerótica por 2-D DIGE

- 6.2.1. *Análisis diferencial mediante DIGE de marcaje a saturación empleando DeCyder*
- 6.2.2. *Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF-TOF*

6.3. Caracterización del secretoma de arteria coronaria aterosclerótica y análisis cuantitativo mediante contaje espectral

6.4. Análisis cuantitativo libre de marcaje del secretoma de arteria coronaria aterosclerótica mediante el programa SIEVE

DISCUSIÓN

1. CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE LAS CAPAS ÍNTIMA Y MEDIA DE LA ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA HUMANA

1.1. Optimización del protocolo de extracción de proteína de tejidos aislados mediante LMD y su combinación con 2-D DIGE

1.2. Análisis deferencial de abundancia de proteína de la capa íntima de arteria coronaria aterosclerótica mediante 2D-DIGE

1.3. Análisis deferencial de abundancia de proteína de la capa media de arteria coronaria aterosclerótica mediante 2D-DIGE

2. CARACTERIZACIÓN DEL SECRETOMA DE LA ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA HUMANA

2.1. Optimización del protocolo de obtención de secretoma para enriquecer la muestra en proteínas secretadas

2.2. Análisis diferencial de secreción de proteínas de arteria coronaria aterosclerótica humana

- 2.2.1. *Análisis diferencial de secreción de coronaria aterosclerótica por 2-D DIGE*
- 2.2.2. *Análisis diferencial de secreción de coronaria aterosclerótica mediante LC-MS/MS*

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

2D-DIGE	Electroforesis bidimensional diferencial en gel
2-DE	Electroforesis bidimensional
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ApoE	Apolipoproteína E
APS	Persulfato amónico
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BVA	Análisis de variaciones biológicas
CE	Electroforesis capilar
CHAPS	[3-[(3-Colaamidopropil)dimetilamonio]-1 propanosulfonato]
CID	Disociación inducida por colisión
CILAIR	Comparación de la velocidad de incorporación de aminoácidos marcados con isótopos
Cys	Cisteína
CZE	Electroforesis capilar en zona
DIA	Análisis de diferencias dentro del gel
DIGE	Electroforesis diferencial en gel
DTT	Ditiotreitol
ECD	Disociación por captura de electrones
ETD	Disociación por transferencia de electrones
ECL	Quimioluminiscencia acentuada
EDA	Análisis de datos extendido
EM	Espectrómetro de masas
ESI	Electronebulización o electroespray
h.	horas
FT-ICR	Resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier
HCl	Ácido clorhídrico
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSP27	Proteína de choque térmico de 27kDa
HSP70	Proteína de choque térmico de 70kDa
IAA	Yodoacetamida
ICAT	Marcaje de afinidad codificado por isótopos
ICPL	Marcaje proteico codificado por isótopos
iTRAQ	Marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta
IEF	Isoelectroenfoque
IgG	Inmunoglobulina G
IMAC	Cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
IT	Trampa iónica
iTRAQ	Etiqueta isotópica para cuantificación relativa y absoluta
LC	Cromatografía líquida
LCM	Microdissección por captura con láser
LMD	Microdissección por láser
LMPC	Microdissección por láser y catapultado por presión
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LTQ	Trampa lineal
m/z	Masa /Carga
MALDI	Desorción/ionización mediante láser inducida por matriz
min.	minutos
MMPs	Metaloproteasas
MRM	Monitorización por reacción múltiple
MS	Espectrometría de masas
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
MudPIT	Tecnología multidimensional de identificación de proteínas
MW	Masa molecular
NO	Óxido Nítrico
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida

PBS	Tampón fosfato salino
PCA	Análisis de Componentes Principales
PEDF	Factor derivado del Pigmento de Epitelio
PEN	Poliétilen-naftalato
PMF	Huella dactilar peptídica
POL	Poliéster
PVDF	Polivinildifluoruro
Q	Cuadropolo
RF	Radiofrecuencia
SaP	Componente P Amiloide del Suero
SCA	Síndrome Coronario Agudo
SDS	Dodecilsulfato sódico
SILAC	Marcaje con isótopos estables mediante aminoácidos en cultivos celulares
SRM	Monitorización por reacción múltiple
TEMED	N,N,N',N'-tetraetiletilendiamina
TOF	Tiempo de vuelo
UV	Ultravioleta
VCAM-1	Molécula de adhesión de célula vascular-1
VSMC	Células de músculo liso vascular

INTRODUCCIÓN

1. ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis es el tipo más frecuente de arteriosclerosis existente. Se conoce como arteriosclerosis a cualquier patología que afecte a las arterias produciendo su engrosamiento y/o endurecimiento. Una vez formada, la placa de ateroma consta de un núcleo lipídico altamente trombogénico rodeado de una capa fibrosa que evita el contacto de éste con el torrente sanguíneo. La ruptura de la placa es la causa más común de trombosis arterial, lo que produce una interrupción en el flujo de sangre que llega a los tejidos que irriga el vaso, denominada isquemia. Cuando la trombosis se produce en la arteria coronaria, la isquemia que afecta al corazón o cardiopatía isquémica da lugar a un síndrome coronario agudo (SCA). El SCA puede ser de dos tipos: angina inestable o infarto agudo de miocardio.

1.1 Estructura de la pared vascular

Cada arteria consta de tres capas o tunicas concéntricas¹ (Figura 1):

- 1 Íntima: está constituida por el endotelio, que es un epitelio simple plano, la lámina basal y una capa conjuntiva subendotelial. La íntima está presente en todos los vasos (arterias o venas) y con idéntica composición en todos ellos.
- 2 Media: está compuesta por fibras musculares lisas dispuestas de forma concéntrica, fibras elásticas y fibras de colágeno, en proporción variable según el tipo de arteria.
- 3 Adventicia: formada por tejido conjuntivo laxo, compuesto fundamentalmente por fibroblastos y colágeno. En arterias de diámetro superior a 1 mm, la nutrición de estas tunicas o capas corre a cargo de los *vasa vasorum*; su inervación, de los *nervi vasorum*.

Los límites entre las tres capas están generalmente bien definidos en las arterias. Las arterias presentan siempre una lámina elástica interna separando la íntima de la media, y presentan una lámina elástica externa que separa la media de la adventicia.

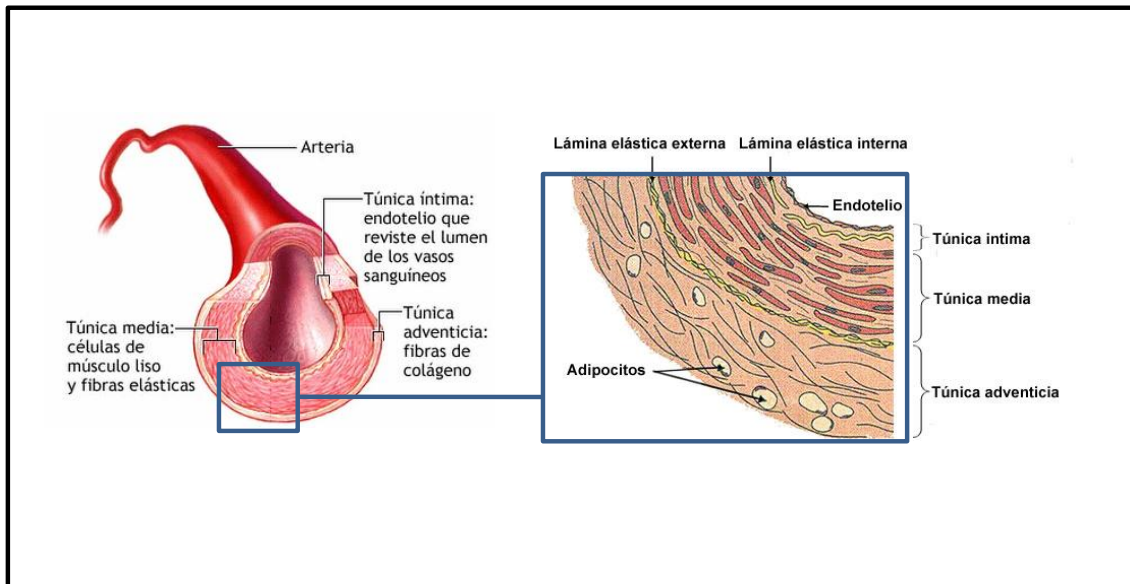


Figura 1 Estructura de la pared vascular. Corte transversal de una arteria en el que se observa su estructura en capas o túnicas concéntricas y la composición celular de éstas.

1.2 Disfunción endotelial

Existen una serie de factores que provocan una activación de las células endoteliales de las arterias denominada disfunción endotelial. Estos factores son principalmente: elevados niveles de LDL colesterol, diabetes, tabaquismo e hipertensión arterial². La activación de las células endoteliales provoca la expresión en su superficie de moléculas de adhesión, entre las que se encuentra la molécula de adhesión de célula vascular-1 (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) que permite la adhesión de monocitos y linfocitos T circulantes al endotelio², lo que inicia su reclutamiento. También provoca un descenso en la producción de óxido nítrico (NO) que tiene un papel vasodilatador y anti-inflamatorio³. Por lo tanto, la disfunción endotelial producida en una región concreta del árbol arterial en la que las células endoteliales sufren una mayor incidencia de flujo sanguíneo intermitente, en la cual los mecanismos endógenos se encuentran alterados³, se considera como el probable punto inicial del proceso que posteriormente podría dar lugar a una placa de ateroma.

1.3 Aterogénesis

La activación de las células endoteliales se suele producir conjuntamente con el depósito de LDLs circulantes en el espacio subendotelial de la arteria. Estos eventos provocan el reclutamiento de monocitos circulantes, de la manera antes comentada, que se extravasan al espacio subendotelial donde pasan a diferenciarse a macrófagos,

liberando citoquinas y factores de crecimiento y fagocitando a las LDL, convirtiéndose en células llenas de lípidos, denominadas células espumosas. En paralelo, los eventos producidos por la disfunción endotelial provocan la activación de las células musculares lisas (VSMCs) contiguas de la capa media. Estas células migran a la íntima y allí liberan una serie de citoquinas y factores de crecimiento, contribuyendo a la activación de los macrófagos, así como a la suya propia. Además, las VSMCs comienzan a sintetizar y secretar proteínas de matriz extracelular, principalmente colágeno, lo que contribuye al engrosamiento de la capa íntima. Las moléculas de matriz extracelular, principalmente los proteoglicanos, en estos primeros estadios de la lesión contribuyen a su desarrollo ya que retienen las LDLs en la capa íntima². Las células espumosas se acumulan en un núcleo central junto con depósitos lipídicos procedentes de la muerte celular de gran número de ellas. Las VSMCs, con el progreso de la lesión, se sitúan alrededor del núcleo lipídico y forman una cápsula fibrosa gracias a su activa síntesis de matriz extracelular rica en colágeno. El avance que se ha producido en la investigación básica de la aterosclerosis en los últimos años nos ha permitido cambiar el concepto de esta enfermedad, tradicionalmente considerada como de mero depósito de lípidos y que actualmente conocemos como una enfermedad de claro carácter inflamatorio³⁻⁵.

1.4 Vulnerabilidad de la placa de ateroma. Ruptura y trombosis.

La cápsula fibrosa que recubre al núcleo lipídico en la placa de ateroma constituye un mecanismo protector para el individuo, puesto que este núcleo contiene gran número de agentes protrombóticos, principalmente el denominado factor tisular⁶. La ruptura de la cápsula fibrosa es la causa principal de trombosis arterial, por lo que una cápsula fibrosa de mayor grosor confiere a las lesiones un mayor grado de estabilidad⁷. La cápsula fibrosa es generada por las VSMCs y una mayor presencia de estas células en esta localización se ha demostrado que está inversamente relacionado con el riesgo de un evento trombótico². Por otro lado, ciertas células de la placa, principalmente los macrófagos, sintetizan colagenasas de la familia de las metaloproteasas (MMPs), las cuales degradan la matriz extracelular de la cápsula fibrosa y contribuyen a la inestabilidad de la placa⁷. La actividad de estas MMPs conjuntamente con un incremento en la apoptosis en las VSMCs de la cápsula fibrosa provoca un estrechamiento de esta estructura protectora², lo que conlleva la desestabilización de la

placa. De hecho, se ha observado la presencia de un importante infiltrado inflamatorio en los lugares en los que se produce trombosis en la arteria coronaria⁶.

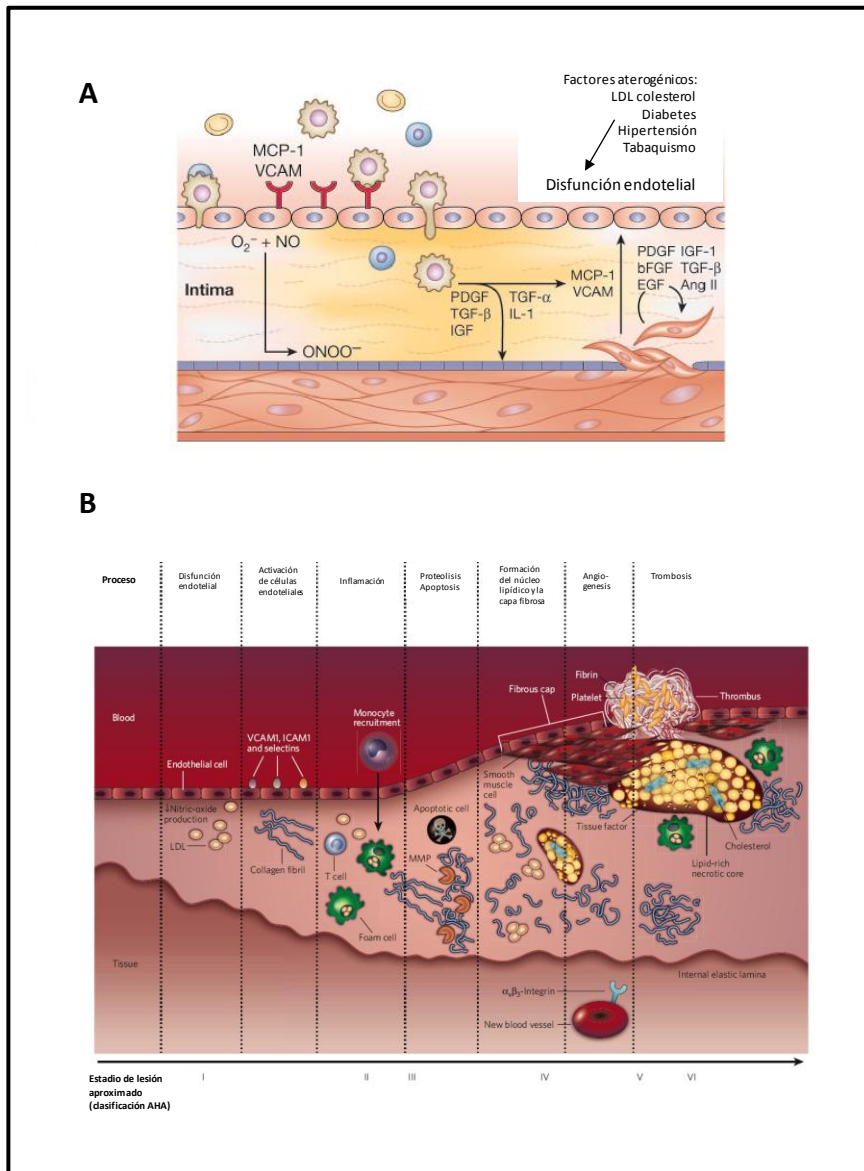


Figura 2. Inicio y desarrollo de la placa de ateroma. A, Inicio de la lesión aterosclerótica con disfunción endotelial, expresión de moléculas de adhesión y citoquinas pro-inflamatorias, reclutamiento de monocitos y linfocitos T circulantes, y su extravasación al espacio subendotelial; y migración de VSMCs de la capa media a la íntima. Adaptado de: Dzau, V. J., Braun-Dullaeus, R. C. & Sedding, D. G. *Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies*. *Nat. Med.* 8, 1249-1256 (2002). B, Desarrollo de la placa de ateroma representado espacialmente de izquierda a derecha, desde un vaso normal a una placa de ateroma con trombo. Adaptado de: Sanz J., & Fayad Z.A. *Imaging of atherosclerotic cardiovascular disease*. *Nature.* 451, 953-957 (2008)

Por lo tanto, se ha considerado una placa vulnerable o inestable a aquella lesión en la que se observe una cápsula fibrosa de poco grosor⁷, concretamente menor de 65µm⁸, con un importante núcleo lipídico, un importante infiltrado inflamatorio en la cápsula

fibrosa, no excesivamente calcificada y con un moderado grado de estenosis⁷. Aunque en el 70% de los casos de infarto de miocardio y/o muerte coronaria repentina la causa es la ruptura en una placa de ateroma en la coronaria, no es el único tipo de lesión aterosclerótica de esta arteria que puede derivar en un SCA⁹. Por lo tanto la definición de placa vulnerable se ha extendido incluyendo otro tipo de placas que con frecuencia dan lugar a eventos trombóticos⁷, como es el caso de los trombos murales producidos por erosión de la capa fibrosa sin fisura ni rotura de ésta⁸. En los últimos tiempos se ha empezado a considerar la implicación de otros factores externos a la placa de ateroma en el riesgo de SCA. Estos factores son la sangre y el miocardio, y su vulnerabilidad estaría contribuyendo a aumentar el riesgo de un evento cardíaco. La conjunción de vulnerabilidad de estos dos factores y de la placa de ateroma sería determinante en el riesgo cardiovascular, lo que nos ha llevado a generar el concepto de paciente vulnerable, en el que se agruparían estos tres factores⁹.

2. MICRODISECCIÓN POR LÁSER

La microdissección por láser es una técnica desarrollada muy recientemente que permite realizar el aislamiento de regiones o células de interés, a partir de una preparación histológica, con gran precisión. Esta técnica puede realizarse sobre tejidos de todo tipo fijados y teñidos de manera convencional, con la salvedad de evitar el empleo de medios de montaje y cubreobjetos que la imposibilitarían. La disección de dichas preparaciones se lleva a cabo mediante un láser ultravioleta y las regiones aisladas se recogen en un tubo para su posterior análisis.

Antes de aparecer la microdissección por láser ya se empleaba la microdissección manual, en la que el investigador se valía de un microscopio y una aguja microscópica para aislar grandes regiones de tejido. Aunque aún se utiliza puntualmente^{10,11}, impide el aislamiento a nivel de pequeñas regiones o células, y es común que se produzcan contaminaciones con regiones adyacentes.

2.1 Microdissección por captura con láser (LCM)

La primera técnica de microdissección por láser, desarrollada por Emmert-Buck y colaboradores en 1996¹², fue denominada microdissección por captura con láser (*laser capture microdissection*, LCM), debido a que se basaba en el empleo de una membrana termosensible que, al ser irradiada por el láser, adhería el tejido contiguo. Tras

seleccionar las zonas de interés del tejido, que son irradiadas por el láser, la membrana se retira y se posiciona en el tubo de análisis, donde se procede a lisar el tejido y se realiza la extracción de las biomoléculas de interés. El problema de esta técnica radica en el calentamiento que reciben las regiones aisladas al incidir el láser directamente sobre ellas, algo que puede ser crítico para la degradación de las biomoléculas de estudio. Esta limitación ha sido solventada en los métodos de microdissección por corte con láser, que además permiten obtener grandes regiones de tejido en menor tiempo.

2.2 Microdissección por corte con láser

Esta técnica emplea un láser de pequeño diámetro que rodea las regiones de tejido o células delimitadas, lo que las escinde del tejido. Estas regiones pueden ser recolectadas mediante dos métodos diferentes: a) en los equipos de la casa Leica las regiones caen por gravedad en el tubo de análisis, b) se lleva a cabo un catapultado por presión de las regiones empleando el propio láser. Este método patentado por PALM Microlaser se denomina microdissección por láser y catapultado por presión (*laser microdissection and pressure catapulting*, LMPC).

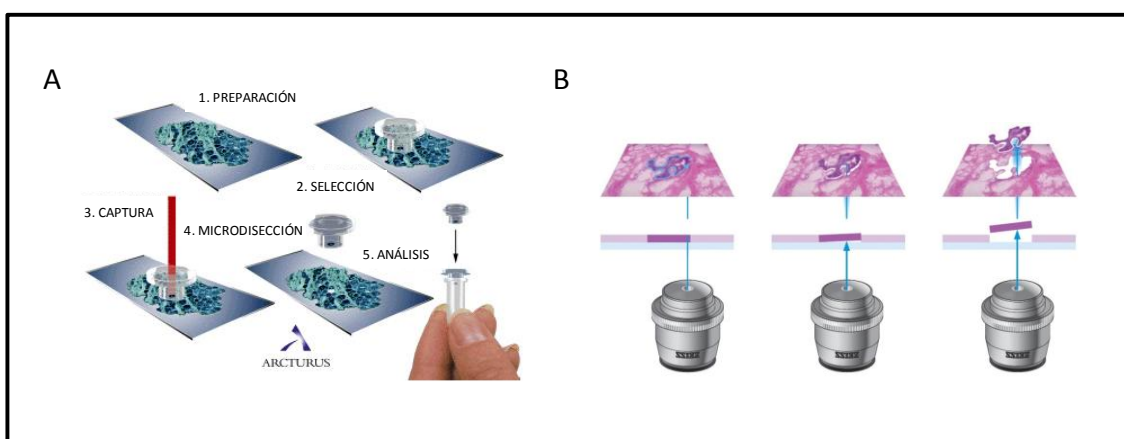


Figura 3. Tipos de microdissección por láser. **A**, Microdissección por captura con láser (Arcturus, Molecular Devices). En la muestra histológica teñida se sitúa la tapa del tubo de análisis con la membrana termoplástica, se selecciona la región a aislar y, tras incidir sobre ella el láser, se retira la tapa, en la que queda adherido el tejido aislado para proceder a su posterior análisis. **B**, Microdissección por corte con láser. Sobre la muestra histológica teñida se delinea la región de interés, el láser va rodeando el área seleccionada escindiéndola del resto del tejido. El procedimiento de recogida de las regiones aisladas depende del equipo empleado. En este caso se realiza mediante el catapultado de la región producido por un pulso de láser que termina de escindir el fragmento a la vez que lo proyecta al tubo de análisis, lo que se denomina microdissección por láser y catapultado por presión (LMPC. Palm Microlaser, Carl Zeiss).

2.3 Material específico para microdissección

La microdissección por láser puede llevarse a cabo con el material convencionalmente empleado para realizar estudios histológicos, pero existen materiales que ayudan a realizarla de una manera más eficiente. Para realizar la LCM es fundamental el empleo de unos dispositivos que contienen la membrana termoplástica y encajan en un tubo de análisis de 500 μ l. Para el caso del LMPC, existen tubos de análisis de 200 y 500 μ l con una membrana adhesiva en la tapa para ayudar a que las regiones aisladas se depositen en el tubo al catapultarlas desde la preparación, aunque se pueden utilizar tubos convencionales con un pequeño volumen de tampón. Por otro lado, en los equipos que operan con el método de corte con láser se pueden utilizar portaobjetos con membranas de polietilen-naftalato (PEN) o poliéster (POL) que ayudan a mantener la integridad del tejido durante la microdissección y a su correcto desplazamiento al tubo de análisis. La membrana de PEN absorbe la energía ultravioleta en gran medida, lo que facilita su corte con el láser, mientras que la de POL es menos sensible al láser, lo que la hace idónea para llevar a cabo la eliminación de regiones no deseadas del tejido previa al aislamiento de las regiones de interés, que requerirá una energía del láser mayor que en el caso de las membranas de PEN.

2.4 Microdissección por láser para Proteómica

La aplicación de la LMD en estudios proteómicos implica una serie de inconvenientes y limitaciones que hacen que no haya sido empleada con tanta frecuencia como en otros campos. En primer lugar, la cantidad de proteína que se necesita para realizar un análisis proteómico mediante técnicas convencionales implica el aislamiento de grandes regiones de tejido o un número de células muy elevado, en la mayoría de los casos inabordable. Las técnicas de espectrometría de masas (MS) han evolucionado a gran velocidad en los últimos años, lo que nos permite detectar proteínas de muy baja concentración en una muestra. Aún así, las mezclas muy complejas y con gran número de proteínas mayoritarias impiden realizar identificaciones de proteínas por MS sin realizar varias técnicas cromatográficas de separación acopladas, lo que implica el aumento de la cantidad de proteína de partida.

El análisis de tejido procedente de LMD mediante electroforesis bidimensional (2-DE) convencional requiere la obtención de enormes cantidades de tejido. Teniendo en

cuenta que el periodo de microdissección máximo recomendado por los fabricantes de los equipos de LMD es de aproximadamente 2 horas, para evitar la degradación proteica, resulta imprescindible la mezcla de muestras obtenidas en muchos días de trabajo para obtener las grandes cantidades de proteína necesarias para realizar un gel de 2-DE. Recientemente ha aparecido una novedosa técnica, basada en la electroforesis diferencial en gel (*Differential In Gel Electrophoresis*, DIGE) que implica el marcaje de las proteínas previo a la 2-DE mediante fluorocromos que se unen a los residuos de cisteína (Cys) a saturación, y que se denomina DIGE de marcaje a saturación. Este tipo de marcaje permite visualizar pequeñas cantidades de proteína (1-5 µg) en un gel 2-DE, lo que ha permitido obtener perfiles bidimensionales de regiones de tejido aisladas por LMD empleando mucha menor cantidad de células. A pesar de todo, el acoplamiento de las técnicas de preparación del tejido para la LMD (fijación y tinción) con la extracción de las proteínas del tejido y el marcaje del DIGE de saturación resulta a menudo complicado, y requiere la eliminación de contaminantes de la muestra que puedan interferir con dichos procesos.

3. PROTEÓMICA

La Proteómica es la ciencia que estudia de manera dinámica todas las proteínas expresadas por un organismo, en un momento dado y bajo determinadas condiciones concretas de tiempo y ambiente, lo que se denomina proteoma¹³. También se agrupan con el mismo nombre el conjunto de técnicas que permiten analizar un proteoma. Las proteínas son los efectores finales de los procesos que suceden en las células, por lo que el estudio proteómico es la manera más adecuada de analizar los procesos biológicos que tienen lugar en un organismo, así como de comprender los mecanismos moleculares subyacentes a dichos procesos.

El análisis del proteoma de un organismo ha estado tradicionalmente basado en la separación de las proteínas mediante electroforesis bidimensional (2-DE) y la identificación de las mismas por espectrometría de masas (MS). Este tipo de estudios proteómicos se conocen en la actualidad como Proteómica Clásica. La aparición del método de ionización por electroespray (ESI)¹⁴, que permite realizar la identificación de proteínas por MS de forma inmediata tras su separación por cromatografía líquida (LC-MS), ha abierto recientemente un nuevo campo en la Proteómica que se conoce como

Proteómica de Segunda Generación o con el anglicismo “*shotgun proteomics*”. Esta nueva rama de la Proteómica permite realizar identificaciones a gran escala de las proteínas presentes en una mezcla y su creciente desarrollo ha dado lugar a la descripción de multitud de proteomas que no se conocían hasta el momento.

3.1 Preparación de muestras

La preparación de la muestra que se va a analizar mediante técnicas proteómicas es un paso crítico para que dicho análisis sea adecuado. Las muestras que se pueden estudiar son: células, tejidos o fluidos. Salvo para el caso de los fluidos, es necesario realizar un procesamiento de las muestras que permita disgregar el tejido y/o romper las células para obtener el proteoma.

3.1.1 Lisis celular

La rotura de las células se puede realizar por métodos físicos: choque osmótico, rotura mecánica, congelación/descongelación, sonicación, etc.; o químicos, que están basados en el empleo de detergentes. Los detergentes disocian las interacciones lípido-proteína e interacciones hidrofóbicas entre proteínas, rompiendo las membranas y ayudando además a solubilizar las proteínas. El dodecilsulfato sódico (SDS) es uno de los más utilizados por su alta eficiencia de solubilización. Generalmente se combinan ambos tipos de métodos por medio de una lisis física en tampón de lisis con detergente.

3.1.2 Solubilización

Para realizar una correcta solubilización de las proteínas de una muestra ésta debe llevarse a cabo en un medio tamponado suplementado con una serie de compuestos. En primer lugar, los tampones de solubilización deben contener alta concentración de un agente caotrópico, generalmente Urea o una combinación de esta con Thiourea, que desnatura las proteínas mediante la ruptura de enlaces hidrofóbicos de las proteínas, así como de las interacciones intramoleculares. En segundo lugar, se debe incluir un detergente (CHAPS, SDS, Tritón X-100...) que mantenga a las proteínas en disolución, al impedir que se formen de nuevo las interacciones hidrofóbicas. La presencia de un agente reductor (ditiotreitól, β -mercaptoetanol, fosfinas...) que produzca la ruptura de los puentes disulfuro entre residuos de cisteína es también fundamental para una solubilización eficiente. En aquellos casos en el que la muestra vaya a ser analizada

mediante 2-DE, la presencia de anfólitos, una mezcla de compuestos cargados, ayuda a solubilizar las proteínas y evita que precipiten al entrar en la primera dimensión de la 2-DE. Además, los anfólitos contienen grupos amino, de tal manera que, al competir con los grupos amino de las proteínas, contribuyen a minimizar el efecto negativo de los cianatos producidos por la Urea.

3.2 Técnicas de separación de proteínas

El análisis directo por espectrometría de masas de la mayoría de proteomas es algo inabordable dada la complejidad de los mismos. En consecuencia, resulta imprescindible realizar un fraccionamiento de las muestras previo al análisis por MS. Las dos técnicas empleadas con mayor frecuencia para realizar la separación de las proteínas de una mezcla compleja son la electroforesis bidimensional y la cromatografía líquida bidimensional (LC).

3.2.1 Electroforesis bidimensional (2-DE)

La 2-DE fue la primera técnica empleada en Proteómica para separar mezclas complejas de proteínas, que eran identificadas posteriormente en espectrómetros de masas tipo MALDI-TOF. Está basada en la electroforesis convencional en geles de poliacrilamida o PAGE-SDS, en la que se separan las proteínas por su masa molecular en presencia del detergente SDS. A este tipo de electroforesis, que constituye la segunda dimensión, se le añade una electroforesis adicional previa en base al punto isoeléctrico (pI) denominada isoelectroenfoque (IEF), que constituye la primera dimensión. La separación de las proteínas en la segunda dimensión se realiza de manera perpendicular a la primera, de tal manera que el resultado obtenido es un mapa de manchas proteicas en dos dimensiones: punto isoeléctrico y masa molecular.

a) Primera Dimensión: Isoelectroenfoque (IEF)

Al aplicar una diferencia de potencial en una región que presenta un gradiente de pH, las moléculas anfotéricas, como es el caso de las proteínas, se moverán por el gradiente hasta alcanzar el punto del gradiente de pH equivalente a su pI. Las proteínas que inicialmente se encuentran en regiones de pH inferior a su pI estarán cargadas positivamente y migrarán hacia el cátodo, mientras aquellas que se encuentran en medios con pH más altos que su punto isoeléctrico tendrán carga negativa y migrarán

hacia el ánodo. Cuando una proteína alcanza la región del gradiente de pH que coincide con su pI tendrá una carga neta neutra, lo que supone que detenga su movimiento en el campo eléctrico.

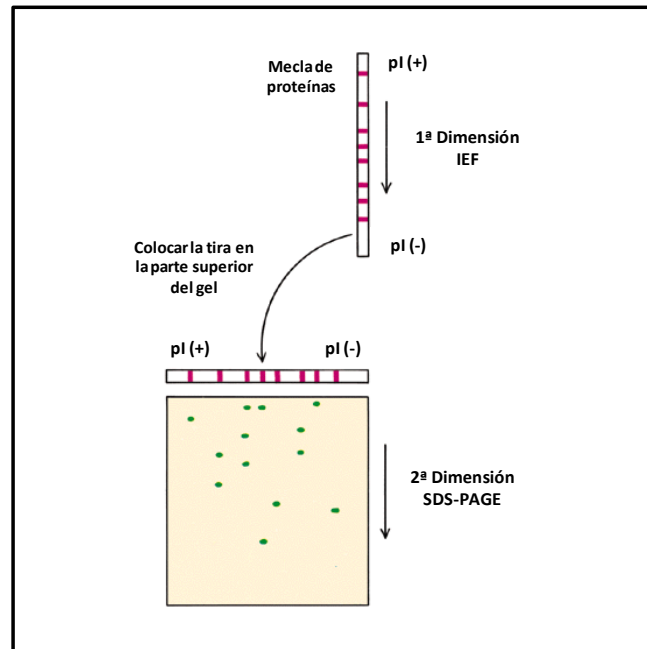


Figura 4 Representación esquemática de la técnica de electroforesis bidimensional. La técnica de 2-DE está basada en la separación de una mezcla de proteínas en dos dimensiones. En la primera dimensión las proteínas se separan según su punto isoeléctrico en una tira de poliacrilamida con un gradiente inmobilizado de pH. A continuación, la tira se coloca en la parte superior de un gel SDS-PAGE, y se separan las proteínas en base a su masa molecular (segunda dimensión).

El uso de esta técnica comenzó en los años 70¹⁵⁻¹⁷, mediante el uso de anfolitos al polimerizar la poliacrilamida en finos tubos, generando el gradiente de pH necesario en la primera dimensión. Pero fue en los años 80 cuando se produjo el mayor avance del isoelectroenfoco con el desarrollo de las tiras de poliacrilamida con gradiente inmobilizado de pH (IPG)¹⁸. Las tiras IPG se adquieren deshidratadas y para realizar la rehidratación se emplea un tampón que contiene los componentes básicos para solubilización de proteínas comentados en el apartado 3.1.2. La utilización de ciertos detergentes como el SDS o de agentes reductores como el β -mercaptoetanol pueden interferir en la separación de las proteínas por IEF, por lo que se emplean detergentes no iónicos como el CHAPS y agentes reductores como las fosfinas (TBP, TCEP...). La aplicación de la muestra en la tira puede realizarse de manera paralela a la rehidratación, empleando un campo eléctrico suave (rehidratación activa) o tras ésta, siendo realizada

en este caso la rehidratación sin aplicación de campo eléctrico (rehidratación pasiva), mediante la técnica de “*cup-loading*”.

b) Segunda Dimensión: PAGE-SDS

Tras el IEF y antes de la separación por masa molecular, las tiras IPG deben sufrir un pretratamiento para que el acople de ambas técnicas electroforéticas sea factible. Las tiras IPG se equilibran en un tampón que contiene urea, glicerol y SDS, los primeros para evitar efectos electroendosmóticos y el último debido a su papel fundamental en el SDS-PAGE. El equilibrado se realiza en dos pasos en los que al tampón de equilibrado se le añade ditioneitol (DTT) y yodoacetamida (IAA) que producen la disociación de los puentes disulfuro y su alquilación, respectivamente. La electroforesis se realiza en presencia de SDS, que dota a las proteínas de carga negativa, lo que les permite migrar hacia el ánodo en presencia de un campo eléctrico. En su trayecto, las proteínas se ven ralentizadas por el reticulado generado por la poliacrilamida, siendo este efecto directamente proporcional a la masa molecular de éstas.

c) Visualización de los geles bidimensionales

Para poder visualizar las proteínas en un gel bidimensional, se debe realizar una tinción de las proteínas del gel, posterior a la separación. Las primeras técnicas de tinción empleaban azul de Coomassie o nitrato de plata. Aunque la tinción de plata tiene alta sensibilidad, y aún se utiliza bastante, su rango de detección lineal es inferior al de métodos de tinción desarrollados posteriormente. Actualmente se utilizan tinciones como el Coomassie G-250 o coloidal, que tiene una mayor sensibilidad que el convencional (R-250), o tinciones fluorescentes como el SYPRO Ruby.

Una mención especial requiere la técnica desarrollada hace unos años denominada con el acrónimo DIGE (*Differential In Gel Electrophoresis*), basada en el marcaje de las proteínas previo a la 2-DE con fluorocromos, que permite visualizar los geles en un escáner de fluorescencia. Esta técnica, comercializada por GE Healthcare, permite además el uso de tres fluorocromos con espectros de excitación y emisión diferentes: Cy2, Cy3 y Cy5, lo que permite realizar la 2-DE de tres muestras en el mismo gel, minimizando así el error experimental. Dichos fluorocromos se unen covalentemente a los aminoácidos lisina de las proteínas y están diseñados para igualar su masa y carga entre sí, de tal manera que moléculas de la misma proteína marcadas con diferente

fluorocromo migran conjuntamente en el gel. El fluorocromo Cy2 se emplea siempre para marcar un estándar interno que se obtiene realizando una mezcla a partes iguales de todos los proteomas del experimento, lo que permite realizar comparaciones mucho más fiables de cantidad de proteína entre geles. Existe una nueva variante de esta técnica, denominada DIGE de marcaje a saturación, que realiza el marcaje mediante unión a saturación a aminoácidos cisteína, lo que permite realizar geles 2-DE con únicamente 5µg de proteína, algo muy útil para muestras muy escasas, como en el caso de la LMD. En esta variante del DIGE sólo existen dos fluorocromos disponibles: Cy3 y Cy5, debido a que no ha sido posible realizar una variante estable de Cy2. Al disponer sólo de dos fluorocromos, en cada gel se cargan las muestras marcadas con Cy5 y el estándar interno, que es similar al del DIGE tradicional, marcado con Cy3.

3.2.2 *Electroforesis capilar (CE)*

La electroforesis capilar (CE) está basada en el mismo principio que cualquier método electroforético, es decir, el desplazamiento de una molécula cargada producido por un campo eléctrico en un líquido o un gel. En la CE, el conducto por el que se mueve el analito es un capilar en el que la muestra se separa en sus diferentes compuestos iónicos, que pueden ser a la vez monitorizados dentro del propio capilar¹⁹. El método más habitualmente empleado en proteómica clínica es el exclusivamente basado en la movilidad electroforética de las moléculas según su relación carga/tamaño¹⁹, denominado electroforesis capilar en zona (*capillary zone electrophoresis, CZE*)²⁰. Este método proporciona ciertas ventajas frente a la separación mediante cromatografía líquida de alta resolución (*high performance liquid chromatography, HPLC*): alta eficiencia de separación, mínimo gasto de volumen de muestra, tiempo de análisis reducido, alta resolución, capilares de reducido coste, compatibilidad con la mayoría de tampones volátiles requeridos para ESI, y bajo riesgo de pérdida de analito¹⁹. En la CZE es bastante menor que en la HPLC, y la migración del analito depende de la intensidad del campo eléctrico. Por un lado, la CZE se realiza mediante un flujo estable y constante, sin necesidad de crear gradientes, ni un continuo ajuste de los voltajes. En cambio, tiene la desventaja de que la mayoría de los tampones empleados no suelen ser suficientemente volátiles, lo que conlleva una mayor dificultad de acoplamiento con el espectrometro de masas y una baja robustez y reproducibilidad con respecto a la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas¹⁹. A pesar

de esto, su excelente poder de resolución y la posibilidad de analizar gran número de muestras poco tiempo ha hecho que sea de gran utilidad para búsqueda de biomarcadores en fluidos, por ejemplo en orina²⁰.

3.2.3 Cromatografía líquida (LC)

Se denomina cromatografía a toda técnica de separación que distribuye a los componentes de una mezcla entre dos fases: una estacionaria y otra móvil. Las moléculas que se van a separar se distribuyen entre ambas fases, bien por solubilidad, bien por su interacción con alguna de las fases (habitualmente la estacionaria), llevándose a cabo, de esta manera, la separación en una columna. Las moléculas con menor solubilidad/interacción con la fase estacionaria se moverán más rápidamente porque tenderán a permanecer en la fase móvil, mientras que las que tengan mayor solubilidad/interacción se moverán más despacio, tratando de permanecer asociadas a la fase estacionaria el mayor tiempo posible.

La técnica cromatográfica más comúnmente utilizada en Proteómica es la cromatografía líquida (LC), ya que puede ser directamente acoplada a MS y puede realizarse tanto con proteínas como con péptidos. En los métodos cromatográficos que se emplean en Proteómica se utiliza como fase estacionaria una matriz porosa, generalmente en forma de columna. Existen diferentes tipos de LC según la propiedad física o química en base a la cual se lleve a cabo la separación de las proteínas.

a) Cromatografía de afinidad

Las proteínas se separan en base a su afinidad de unión específica a ligandos unidos a la matriz de la columna. Una columna de afinidad puede retener específicamente a una o varias proteínas o péptidos, lo que implica el uso de anticuerpos unidos a la matriz, o puede unir grupos específicos de proteínas y péptidos por su unión a determinadas moléculas como sucede, por ejemplo, en el caso de la cromatografía de afinidad mediante metales inmovilizados (*immobilized metal affinity chromatography*, IMAC) en el que fosfoproteínas o fosfopéptidos se unen a los iones cargados positivamente de la fase estacionaria. Esta técnica conlleva un método de elución en dos pasos. En la primera fracción eluyen las proteínas o péptidos que no interaccionan con los ligandos unidos a la matriz y en la segunda aquellos que han sido retenidos por éstos.

b) Cromatografía de intercambio iónico

En este tipo de LC las proteínas o péptidos se separan por su carga. La matriz empleada será un soporte cromatográfico de tipo catiónico o aniónico, que atraerá a las moléculas con carga opuesta, en mayor medida cuanto mayor sea su carga. Para conseguir la elución progresiva de las proteínas según su carga, se suele aumentar la fuerza iónica o el pH de la fase móvil.

c) Cromatografía de fase reversa

El empleo de una fase enlazada hidrofóbica en la matriz de las columnas de fase reversa permite su empleo para llevar a cabo la separación de una mezcla de proteínas o péptidos en base a su hidrofobicidad. La elución gradual de las moléculas se lleva a cabo mediante un aumento progresivo de un componente orgánico en la fase móvil que produce la disociación de las interacciones hidrofóbicas. La cromatografía de fase reversa es la modalidad cromatográfica de mayor resolución y la más empleada en Proteómica, fundamentalmente debido a la compatibilidad de las fases móviles con la ionización ESI en el espectrómetro de masas, lo que permite su acoplamiento en línea.

d) Cromatografía de penetrabilidad

También se conoce como cromatografía de exclusión por tamaño. El soporte cromatográfico que se emplea en este tipo de LC está constituido por unas microesferas porosas formadas por un entramado tridimensional de fibras de polímeros naturales como la agarosa o los dextranos. Los espacios presentes entre estas fibras formarán los poros. Las proteínas o péptidos de menor tamaño pueden entrar por los poros de las microesferas, lo que les hace tardar más tiempo en llegar al final de la columna, al contrario de lo que les sucede a los de mayor tamaño, que al no acceder a través de los poros de las esferas se desplazan más rápidamente a través de los huecos existentes entre éstas. Este principio de separación, denominado exclusión molecular, produce que las proteínas o péptidos eluyan en volúmenes de elución inversamente proporcionales a su masa molecular.

e) Cromatografía líquida multidimensional

Para estudiar un proteoma por LC-MS suele ser conveniente utilizar varios métodos cromatográficos concatenados, lo que permite obtener la resolución necesaria para

estudiar complejas mezclas de proteínas y péptidos. Es bastante frecuente el empleo de una técnica bidimensional de LC con una primera separación mediante intercambio iónico y una segunda en fase reversa. Esta metodología permite realizar una separación bidimensional, al igual que en el caso de una 2-DE, con la ventaja de que se puede acoplar directamente a MS, lo que permite realizar el estudio proteómico de una manera automatizada. La adición de pasos extra de LC en este método de cromatografía bidimensional permite realizar las dimensiones que sean requeridas para un adecuado fraccionamiento del proteoma de estudio, siempre teniendo en cuenta la necesidad de utilizar tampones de elución en las LC compatibles con el ciclo cromatográfico posterior. En una aproximación bastante reciente ¹⁸, se han desarrollado columnas con dos soportes cromatográficos en tándem en busca de una completa automatización del método de LC bidimensional comentado anteriormente. Estas columnas contienen un soporte de intercambio catiónico en la zona proximal seguida de una de fase reversa en la distal. Esto permite realizar la LC bidimensional en un HPLC y acoplarla de manera automatizada a un espectrómetro de masas con fuente ESI, y ha sido denominado como tecnología multidimensional de identificación de proteínas (*multidimensional protein identification technology*, MudPIT) ¹⁸.

3.3 Espectrometría de masas (MS)

La espectrometría de masas es una técnica analítica que se emplea para determinar la masa molecular de un compuesto mediante el uso de instrumentos que pueden medir la relación masa/carga (m/z) de iones, trabajando en condiciones de vacío¹³. Estos instrumentos se denominan espectrómetros de masas. En sus inicios, la MS no era aplicable a las proteínas, debido a la ausencia de técnicas suaves de ionización que permitieran realizar el paso de grandes biomoléculas a iones en fase gaseosa sin una fragmentación excesiva de las mismas, es decir, que no se volatilizaban²¹. En su lugar, desde mediados de los 80 se empleaba una técnica para identificar proteínas procedentes de geles 2-DE transferidos a membranas de polivinildifluoruro (PVDF), basada en el empleo de la degradación de Edman. A finales de los 90 se desarrollaron dos técnicas de ionización que permitieron realizar análisis de proteínas y péptidos, entre otras biomoléculas, por MS. La primera de ellas es la denominada ionización mediante desorción por láser asistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization*: MALDI) desarrollada por Karas y Hillenkamp en 1988²². La segunda de ellas es la

ionización por electroespray (*electrospray ionization*: ESI), desarrollada por Fenn y colaboradores²³. La identificación mediante degradación de Edman es una técnica laboriosa y requiere largos periodos de tiempo, por lo que a mediados de los 90, con el desarrollo de la MS de proteínas, fue desplazada por ésta como método de identificación²¹.

3.3.1 Estructura de un espectrómetro de masas

Los espectrómetros de masas se componen de tres elementos básicos, que en orden secuencial de actuación en un análisis por MS serían: fuente de ionización, analizador de masas y detector. La fuente de ionización convierte las moléculas en iones en fase gaseosa para que pasen al analizador de masas, donde son separadas según su relación masa/carga y hace que lleguen al detector secuencialmente. Las señales captadas por el detector son integradas por un sistema informático que genera un gráfico denominado espectro de masas, donde se representan la abundancia (intensidad) de los iones en el eje de coordenadas y la m/z en las abscisas, y que permitirá la identificación del compuesto.

a) Fuentes de ionización

- MALDI: El analito se mezcla con de un compuesto aromático o matriz en presencia de un disolvente orgánico y se deposita en una superficie metálica. Al evaporarse el compuesto orgánico la matriz co-cristaliza junto con el analito. La placa metálica se introduce en la cámara de ionización del espectrómetro de masas, que se encuentra en alto vacío, y a continuación se incide con un pulso de un láser ultravioleta (UV) sobre ella. Los cristales absorben la energía del láser, algo que no haría el analito por sí solo, y se produce un importante aumento de energía en una superficie pequeña, lo que conlleva una rápida sublimación de la mezcla, dejando al analito ionizado y en fase gaseosa. La acción de un campo eléctrico (20-25kV) produce el movimiento de los iones del analito hacia el analizador de masas.
- ESI: En este caso el analito disuelto en un disolvente volátil, a pH ácido, es llevado desde la salida de la columna HPLC a un capilar metálico que está sometido a un alto voltaje. Esto produce la salida de la disolución en forma de spray de gotas cargadas que contienen varios analitos. Las microgotas son sometidas a la acción de

un corriente de gas a alta temperatura, lo que elimina el disolvente restante y deja a los analitos ionizados y en fase gaseosa, lo que provoca que sean acelerados por el campo eléctrico hacia el analizador de masas.

La ionización por ESI permite acoplar métodos de electroforesis capilar y cromatografía líquida directamente al espectrómetro de masas, lo que es hoy en día muy utilizado para realizar la identificación a gran escala de complejas mezclas de proteínas. La técnica MALDI se emplea para la identificación de mezclas de muy bajo número de proteínas, lo que limita su uso a la identificación de manchas proteicas de geles 2-DE o fracciones de baja complejidad procedentes de métodos multidimensionales de LC. Aún así sigue siendo una técnica complementaria al ESI por su gran sensibilidad y tolerancia a los contaminantes de la muestra²¹.

b) Analizadores de masas

Existen diversos tipos de analizadores de masas (en la Figura 5 se representan los esquemas de las principales configuraciones existentes):

- Cuadrupolo (*quadrupole*, Q): este analizador de masas está compuesto por cuatro varillas metálicas, con campos eléctricos opuestos dos a dos. A cada par de varillas se les aplica un campo eléctrico de corriente continua y otro de radiofrecuencia (RF). Al aplicar un voltaje de RF variable, éste permite que un determinado ión de m/z concreta conserve su trayectoria y llegue al detector, mientras que todos los demás son desviados. De esta manera, se va permitiendo el paso consecutivo de los iones con distintas m/z hacia el detector, obteniéndose el correspondiente espectro de masas. Un cuadrupolo puede actuar en otro modo, en el que todos los iones pasan a través de él sin que ninguno de ellos sea seleccionado de manera específica. Actualmente se suelen emplear hexapolos u octapolos, aunque el analizador de masas sigue conservando su denominación de cuadrupolo. Además de emplearse para separar los iones, estos analizadores de masas también se emplean para producir la fragmentación en la MS en tándem, por un método denominado disociación inducida por colisión (*collision-induced dissociation*, CID), en cuyo caso se conocen como cámaras o celdas de colisión.
- Tiempo de vuelo (*time of flight*, TOF): en un analizador de masas tipo TOF no es necesario un campo eléctrico para separar los iones, sino que sólo se aplica el campo

inicialmente para enviar los iones al tubo de vuelo. Al llegar al tubo de vuelo, que se encuentra sometido a un alto vacío, los iones tendrán un tiempo de vuelo directamente proporcional a su masa.

- Trampa iónica (*ion trap*, IT): se trata de una cámara formada por un electrodo circular con dos electrodos, superior e inferior, que la cierran a modo de cubiertas. Este analizador de masas permite realizar la espectrometría de masas en tándem en un único analizador, ya que en él se lleva a cabo la obtención del espectro de masas de los péptidos presentes en la mezcla, la fragmentación de una serie de péptidos seleccionados, y el espectro de fragmentación de estos péptidos seleccionados. La variación del voltaje RF aplicado al electrodo circular hace salir a los iones de la trampa de manera gradual acorde a su m/z . También puede usarse para realizar CID, cuando se quiere emplear para MS/MS. Actualmente se han desarrollado trampas de mayor resolución, denominadas trampas lineales (LIT).
- Resonancia ciclotrónica de iones mediante transformada de Fourier (*Fourier transform ion cyclotron resonance*, FT-ICR): está basado en la denominada frecuencia ciclotrónica, por la que los iones en un campo magnético orbitan a una frecuencia que depende de su m/z y de la intensidad del campo magnético. La aplicación de una señal eléctrica de frecuencia igual a la frecuencia de giro de una partícula hace que ésta absorba energía de forma resonante y aumente su radio de giro. La frecuencia de giro se mide en estos equipos a partir de la señal imagen inducida capacitativamente por la carga durante su giro en unos electrodos, lo que permite determinar la masa del ión. La señal obtenida puede deconvolucionarse utilizando la transformada de Fourier para generar el espectro de masas.

Identificación por MS

a) Huella peptídica dactilar (*peptide mass fingerprint*, PMF)

Consiste en la identificación de una proteína mediante el empleo de las masas de los péptidos obtenidos tras digestión enzimática, que generalmente se realiza con tripsina. Cada proteína puede ser inequívocamente identificada por las masas de los péptidos que la forman, y eso constituye lo que denominamos huella peptídica. Este tipo de identificación se realiza para proteínas únicas o mezclas simples de proteínas, que pueden provenir de manchas proteicas de un gel 2-DE y bandas de geles

unidimensionales o fracciones de LC de baja complejidad. Una vez obtenido el espectro en un espectrómetro de masas tipo MALDI-TOF (Figura 5), se utiliza un programa informático denominado motor de búsqueda que compara el espectro obtenido con los espectros teóricos de una base de datos que contiene las digestiones teóricas de todas

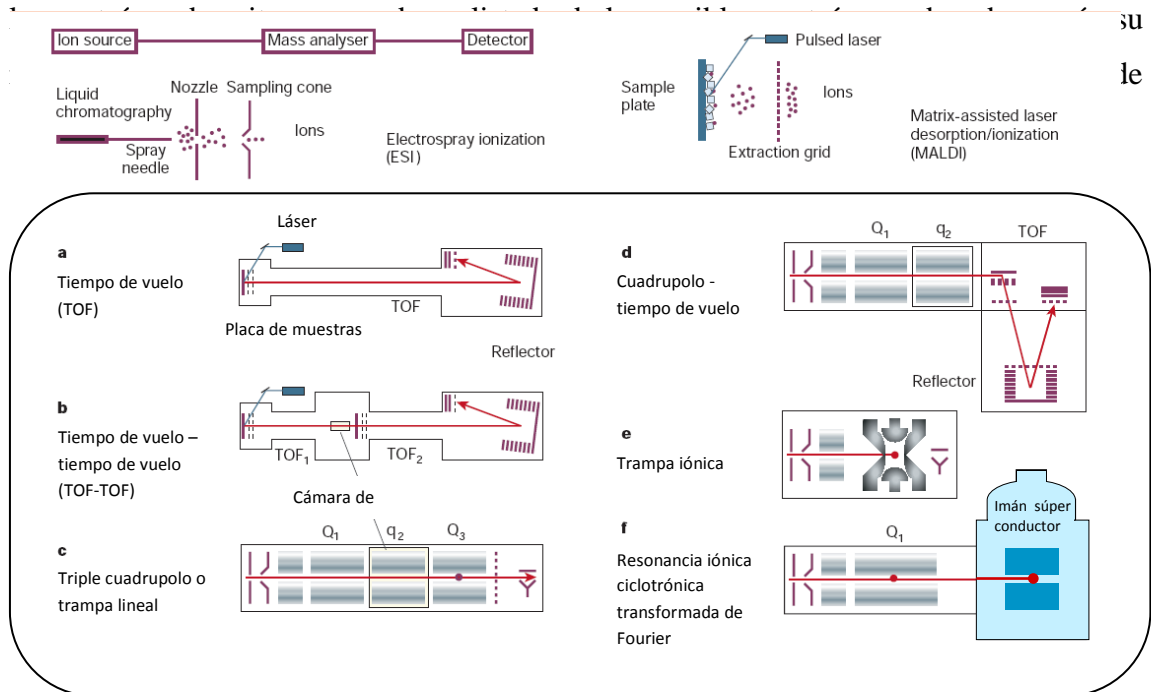


Figura 5. Tipos de espectrómetros de masas empleados en Proteómica. **a**, En los equipos MALDI-TOF los iones son acelerados y separados en un tubo de vuelo de acuerdo a sus diferentes velocidades. **b**, El MALDI-TOF-TOF incluye una celda de colisión entre dos tubos de vuelo. **c**, En el triple cuadrupolo los iones son seleccionados en el primer cuadrupolo (Q_1), fragmentados en la celda de colisión (Q_2) y sus fragmentos separados en el Q_3 . En una trampa lineal, los iones son capturados en una sección cuádruple, representada por un punto rojo en Q_3 . A continuación son sometidos a un campo de resonancia eléctrica y los fragmentos se escanean a su salida. **d**, El cuadrupolo-TOF combina la parte frontal de un triple cuadrupolo con un analizador de masas para los fragmentos peptídicos tipo TOF. **e**, La trampa iónica tridimensional funciona de manera similar a la lineal, reteniendo los iones peptídicos, fragmentando los de determinada m/z y escaneando los fragmentos a su salida para generar el espectro de masas. **f**, El FT-MS retiene también los iones, pero ayudándose de campos magnéticos de alta intensidad. En la figura aparece representada la configuración que combina una trampa lineal para separación y fragmentación de iones y el FT-MS para detectar los fragmentos con alta resolución. Adaptado de: *Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. Nature. 422(6928):198-207 (2003).*

b) Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Actualmente se emplean en la mayoría de los casos espectrómetros de masas con dos analizadores de masas en tándem para llevar a cabo identificación de proteínas. Estos equipos permiten realizar la medición de m/z de los péptidos intactos en el primer analizador de masas y, tras una fragmentación de algunos de los péptidos en una cámara de colisión por CID, la medición de las m/z de los fragmentos de los mismos en el segundo analizador de masas. Esto permite realizar la identificación de la proteína con

información adicional a la realizada por huella peptídica, ya que el espectro de fragmentación de un péptido es característico de cada péptido. Este espectro de fragmentación puede incluso permitir la secuenciación total o parcial del péptido. La obtención de la secuencia de aminoácidos de un péptido, utilizando exclusivamente los datos presentes en el espectro de fragmentación se conoce como secuenciación *de novo*.

Para realizar MS/MS de mezclas poco complejas se emplean los espectrómetros de masas tipo MALDI-TOF-TOF, que permiten realizar las identificaciones de proteínas con mayor fiabilidad que en un MALDI-TOF. El resto de espectrómetros de masas en tándem tienen fuentes de ionización ESI y diferentes tipos de analizadores de masas. Las configuraciones más habituales hasta la fecha son (Figura 5): Q3, Q-TOF, IT, Q-Q-LIT, FT y Orbitrap.

Recientemente se han desarrollado nuevas técnicas de fragmentación como alternativa a la CID en busca de una mejor secuenciación peptídica. Existen dos nuevos métodos basados en la transferencia de electrones de los iones presentes en la cámara de colisión denominados disociación por captura de electrones (*electron capture dissociation*, ECD) y disociación por transferencia de electrones (*electron transfer dissociation*, ETD)²¹.

3.4 Análisis de expresión diferencial por LC-MS. Proteómica Cuantitativa.

La metodología tradicionalmente utilizada para realizar un análisis comparativo de dos grupos de muestras mediante análisis proteómico está basada en la 2-DE, y sigue siendo la más utilizada hoy en día, sobre todo por medio de DIGE, debido a su menor coste con respecto a la LC-MS y a una mayor facilidad de implementación en el laboratorio. Aún así, los avances en LC-MS experimentados en los últimos años nos han dotado de un gran número de nuevas estrategias para realizar análisis cuantitativos empleando la abundancia o intensidad de los péptidos (MS) y/o de los fragmentos de éstos (MS/MS), y su uso está en constante crecimiento. La mayoría de los métodos empleados están basados en el uso de isótopos estables con los que se marcan las proteínas de uno o varios (para los casos en que se tienen varias marcas) de los grupos de estudio. Las propiedades físico-químicas de los compuestos marcados con los isótopos estables son idénticas a las de sus homólogos no marcados, excepto en masa, lo que permite emplearlos como estándares internos o referencias relativas en un análisis

por espectrometría de masas²⁴. Dentro de los métodos de marcaje isotópico podemos encontrar, entre otros: marcaje de afinidad codificado por isótopos (*Isotope-Coded Affinity Tag*, ICAT), marcaje metabólico con ¹⁵N, marcaje enzimático con ¹⁸O, marcaje proteico codificado por isótopos (*Isotope-Coded Protein Labeling*, ICPL), marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta (*Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification*, iTRAQ), marcaje con isótopos estables mediante aminoácidos en cultivos celulares (*Stable Isotope Labeling by Amino Acids in Cell Culture*, SILAC)²⁴ y una reciente variante aplicada a tejidos denominada comparación de la velocidad de incorporación de aminoácidos marcados con isótopos (*Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates*, CILAIR)²⁵. Aunque estos métodos permiten cuantificaciones fiables, tienen la desventaja de no permitir la comparación de más de 2 ó 3 muestras en paralelo (salvo el método iTRAQ, en el que se pueden comparar hasta 8), de un alto coste de los reactivos, marcaje incompleto, y una importante complejidad de la preparación de la muestra, así como la necesidad de mayores concentraciones de ésta²⁴. Por estos motivos, una metodología bastante reciente denominada cuantificación libre de marcaje se emplea con bastante asiduidad actualmente debido a que no requiere ningún marcaje, lo que minimiza el número de pasos en la preparación de la muestra. De esta manera evita la posible pérdida de péptidos cuantificables, el alto coste de los reactivos de marcaje y/o la síntesis de péptidos estándar marcados isotópicamente²⁶. Uno de los primeros métodos empleados para realizar cuantificación libre de marcaje es el de contaje de espectros (*spectral counting*). Este método está basado en la existencia de una correlación entre la frecuencia con la que un espectrómetro de masas en tándem fragmenta un ión de un m/z dado y la abundancia de la proteína de la que procede ese ion²⁷. Es decir, al aumentar la abundancia de una proteína en una muestra aumenta el número de péptidos resultado de la digestión proteica, por lo que cabe esperar: a) un aumento en el porcentaje de secuencia cubierto, b) un aumento en el número de péptidos únicos identificados, y c) un aumento de espectros de MS/MS adquiridos²⁴. De estos 3 factores, sólo se encontró una relación lineal proporcional a la abundancia proteica para el número de espectros MS/MS y es por tanto en esta medida en la que se basa la metodología de contaje de espectros. Este método es un método semicuantitativo, que tiende a ser sustituido por métodos más fiables basados en el área de los picos del espectro de masas. En este tipo de métodos los picos de los iones en el espectro de masas son integrados, siendo el área resultante equivalente a su abundancia

en la muestra. Para poder realizar una cuantificación adecuada, un paso previo de normalización de cada elución cromatográfica es crucial. Existen dos niveles en los que se puede llevar a cabo la normalización: se puede realizar una normalización técnica dirigida a compensar los cambios producidos entre carreras debido al sistema de LC-MS o una normalización a nivel de la muestra biológica. La primera se puede realizar añadiendo una proteína o, tras la digestión, una mezcla de péptidos marcados de concentración conocida con tiempos de retención cromatográfica también conocidos, y que cubran la mayor parte del gradiente. En la segunda, una proteína cuya expresión permanezca constante en los diferentes grupos y condiciones experimentales del estudio se utiliza como estándar interno. También se puede emplear para realizar la normalización la suma de todas las intensidades de los iones, que se corresponde con la proteína total inyectada²⁷. Existen varios programas informáticos que permiten realizar todo este proceso de normalización, alineamiento de espectros y cuantificación: Decyder MS (GE Healthcare), SIEVE (Thermo Electron) Elucidator (Rosetta) y ProteinLynx (Waters)²⁴.

Una de las técnicas más utilizadas en los últimos años para realizar cuantificaciones absolutas por espectrometría de masas de diversos tipos de moléculas, incluidas las proteínas, es la denominada monitorización por reacción simple (*simple reaction monitoring*, SRM) o monitorización por reacción múltiple (*multiple reaction monitoring*, MRM), cuando se cuantifican varias moléculas a la vez. Esta técnica requiere habitualmente del empleo de un espectrómetro de masas triple cuadrupolo. El primer cuadrupolo del equipo, Q₁, se emplea para seleccionar un ión precursor de masa conocida. Este ión pasa al Q₂, dónde es fragmentado mediante CID. Los fragmentos resultantes son analizados en el Q₃, y las transiciones precursor-fragmento se emplean para cuantificar el péptido²⁸. También se puede realizar esta metodología en espectrómetros de masas tipo trampa iónica, ya que en estos la trampa puede funcionar como un tercer cuadrupolo en el que monitorizar las transiciones. Para realizar una cuantificación por MRM debemos conocer la/s proteína/s de interés, lo que no permite su empleo para análisis diferencial en la fase de descubrimiento de biomarcadores. Aún así, esta técnica, que lleva empleándose desde hace décadas para cuantificar compuestos de bajo peso molecular (principalmente en la industria farmacéutica), se está imponiendo como técnica de validación de biomarcadores debido a su gran selectividad y sensibilidad²¹, así como por el manejo de alto número de muestras que permite.

4. PROTEOMICA CARDIOVASCULAR. ANTECEDENTES

El estudio de las enfermedades cardiovasculares ha sido frecuentemente abordado mediante análisis proteómico, en busca de biomarcadores con carácter diagnóstico y pronóstico, así como de dianas terapéuticas. A pesar de los importantes avances en los últimos tiempos en nuestro entendimiento de la patogénesis de la enfermedad aterosclerótica y sus complicaciones derivadas, esta enfermedad se mantiene como primera causa de muerte en los países desarrollados. Tradicionalmente, los estudios proteómicos en aterosclerosis se han centrado en la búsqueda de biomarcadores en el plasma de los pacientes. El análisis de tejidos, en cambio, ha sido abordado en menor medida, a pesar de que se trata de una estrategia complementaria al análisis del plasma, puesto que las proteínas expresadas por el tejido pueden ser liberadas a la sangre, tratándose en este caso de un tejido con contacto directo y constante con ésta. Además, estos estudios incrementan nuestro conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de la enfermedad aterosclerótica. Los biomarcadores circulantes tienen la gran ventaja de permitir una cuantificación mediante procedimientos no invasivos, pero los estudios llevados a cabo con plasma son complicados debido a la complejidad proteica de la muestra, su alto rango dinámico de concentraciones y la dificultad para detectar proteínas de baja abundancia²⁹. También hay que tener en cuenta que algunos de los biomarcadores circulantes podrían no ser específicos de la enfermedad aterosclerótica, por ejemplo en el caso de los marcadores de inflamación. Los estudios llevados a cabo con secretoma representan una metodología intermedia, con las ventajas del estudio de una muestra de menor complejidad que el plasma y permitiendo la identificación directa de potenciales proteínas liberadas a la sangre, que podrían ser biomarcadores de la enfermedad³⁰. Por otro lado, el estudio de células circulantes, constituye también una interesante aproximación tanto en la búsqueda de biomarcadores como para entender la iniciación y desarrollo de la aterosclerosis. Estudios previos de nuestro grupo han permitido definir un perfil proteico específico de los monocitos circulantes en el SCA^{31,32}.

4.1 Estudio de arterias ateroscleróticas

El modelo animal más empleado en el estudio de la enfermedad aterosclerótica es en el que se emplean ratones deficientes en apoE, una proteína implicada en el

transporte inverso de colesterol cuya deficiencia promueve el desarrollo de aterosclerosis. La aorta de estos animales con lesiones ateroscleróticas de diferentes grados ha sido comparada mediante 2-DE con la de ratones control ³³. Los cambios observados indicaron una alteración temprana de la activación inmune, el estrés oxidativo y el balance energético ³³. En un estudio reciente, este modelo ha sido combinado con una deficiencia en el receptor TLR2, de tal manera que se ha comprobado que este receptor es crucial para el desarrollo de la lesión ³⁴. Asimismo, se estudió por 2-DE la implicación de las infecciones bacterianas en el desarrollo de la aterosclerosis, observando alteraciones en proteínas de respuesta a estrés oxidativo y el depósito de hemoglobina en estas placas, una proteína que potencia la función de las endotoxinas bacterianas ³⁴. Una alternativa a este modelo animal son los modelos de inducción quirúrgica de estenosis en la arteria. En estos modelos, se induce mecánicamente una lesión en la arteria, lo que al cabo de unos días provoca una hiperplasia de la capa íntima y, por lo tanto, la estenosis. Mediante este modelo, Forte *et al.* estudiaron el proteoma (mediante 2-DE) y transcriptoma de la arteria carótida estenosada, hallando bastante heterogeneidad en cuanto a regulación de la cantidad de proteína a nivel de transcripción o traducción, lo que resalta de nuevo la idoneidad de realizar este tipo de estudios mediante análisis proteómico.

En cuanto al estudio proteómico de la placa de ateroma humana, la arteria carótida es la arteria que se ha empleado con mayor frecuencia por su accesibilidad y debido a que se obtienen cantidades importantes de material proveniente de endarterectomía, una intervención por la que se retira la placa cuando la estenosis de esta arteria es importante (>70%). La placa de ateroma de carótida ha sido estudiada por 2-DE³⁵⁻³⁷, micromatrices (*microarrays*) de anticuerpos³⁸ y matrices “*western*” (*western arrays*)³⁹. También se ha estudiado por 2-DE el proteoma de la aorta aterosclerótica, y se ha comparado con el de regiones sanas de la misma arteria, observando un alto número de proteínas variadas⁴⁰.

Aunque las complicaciones derivadas de una trombosis provocada por la ruptura o erosión de la placa tienen en la arteria coronaria su lugar de consecuencias más dramáticas, este tejido ha sido muy poco estudiado mediante análisis proteómico. Esto se debe a la dificultad de obtención de este tejido y al pequeño calibre de la arteria, lo que dificulta la recogida de cantidades de material aptas para este tipo de análisis. En un

estudio bastante preliminar publicado con el carácter de comunicación breve, se compararon arterias coronarias humanas afectadas y sanas mediante 2-DE, y se encontró una mancha proteica que a simple vista aparecía aumentada en la placa, la cual se correspondía con la cadena ligera de la ferritina⁴¹. Por otro lado, un estudio detallado del proteoma de la arteria coronaria humana con placa de ateroma fue llevado a cabo por LC-MS/MS, describiendo por vez primera, y de manera exhaustiva, la composición proteica de esta arteria⁴².

4.2 Estudio de regiones de arteria aisladas por microdissección

La placa de ateroma es un tejido de gran complejidad con gran número de regiones diferenciadas: tejido fibroso, núcleo lipídico, cápsula fibrosa, nódulos calcificados; así como de tipos celulares. Del mismo modo, cada capa arterial juega un papel diferente en el desarrollo de la placa, que se inicia en la íntima, dónde se producen los mayores cambios histológicos, pero que acaba afectando al resto de capas, que además están implicadas en el avance o estabilización de la lesión. El estudio de regiones concretas de la placa nos da una información más específica que el estudio de la arteria en su conjunto. A pesar de la creciente importancia de la LMD como metodología de aislamiento de áreas de tejido para su análisis por diversas técnicas moleculares, las diferentes regiones y capas de las arterias ateroscleróticas han sido escasamente estudiadas por esta metodología. La LMD exige el empleo de un sofisticado sistemas de microscopía acoplada a un láser, por lo que en ocasiones se ha empleado la microdissección manual para estudiar de las placas humanas: células espumosas por inmunoensayo (*western blot*, WB)¹⁰ o los proteoglicanos de la capa íntima¹¹. Empleando la LMD para el estudio de la placa de ateroma, se han realizado principalmente análisis de expresión génica de: íntima de arterias coronarias humanas preateroscleróticas⁴³, regiones con infiltrado inflamatorio de diversas placas humanas⁴⁴, y macrófagos/células espumosas de placas de ratones deficientes en apoE^{45,46}.

La LMD es una técnica que ha sido muy poco aprovechada en proteómica cardiovascular. Se empleó para el estudio del tejido cardiaco, del que se aislaron miocitos y vasos sanguíneos, para su posterior análisis por 2-DE convencional⁴⁷. La cantidad de proteína que se puede obtener mediante LMD es baja, por lo que para este tipo de análisis se necesitaron gran número de horas de LMD, así como extender los

tiempos de tinción, algo que aumenta la tinción inespecífica del fondo. Esta limitación de la LMD ha sido compensada, hoy en día, con la aparición de una variante del DIGE denominado DIGE de marcaje a saturación, que permite analizar 5µg de proteína en un gel 2-DE⁴⁸. Esta herramienta facilita el estudio comparativo de subproteomas de tejido y su uso ha sido numerosas veces comprobado para el estudio de tejido tumoral. A pesar de esto, su empleo para el estudio de la aterosclerosis, e incluso de las enfermedades cardiovasculares, ha sido nulo.

En cuanto al estudio de la arteria coronaria mediante LMD y proteómica, el estudio de Bagnato *et al.*⁴² es, hasta la fecha, el único exponente. En este trabajo, se analizaron las tres capas que componen la arteria coronaria aterosclerótica humana, tras su aislamiento por LMD, mediante LC-MS/MS. De esta manera se describieron 444 proteínas en la íntima, 137 en la media y 194 en la adventicia; que corresponden en total a 495 proteínas únicas en las tres capas⁴².

4.3 Estudios de secretoma de tejido

El término secretoma fue introducido, por vez primera, en el año 2000 en un estudio genómico en el que se describían las proteínas secretadas por *Bacillus Subtilis*⁴⁹. Se considera como secretoma al conjunto de proteínas liberadas por una célula o tejido en unas determinadas condiciones y en un periodo de tiempo concreto. Una de sus principales ventajas es que se puede considerar que se trata de un subproteoma del plasma, siendo por lo tanto de menor complejidad que este, además de permitir el análisis directo de las proteínas implicadas en la patología de estudio, que podrán ser detectadas en la sangre de manera no invasiva. La mayoría de los estudios del secretoma han sido llevados a cabo en líneas celulares, frecuentemente en líneas tumorales, dada su facilidad de manejo y la facilidad para obtener material de cultivo⁵⁰. Una manera de minimizar la variabilidad experimental introducida en estudios con líneas celulares es el empleo de explantes de tejido, que además permite mimetizar mejor las condiciones *in vivo* al tener en consideración los diferentes tipos celulares del tejido y las posibles interacciones entre ellos.

A la hora de diseñar la estrategia de análisis del secretoma hay que tener en cuenta que existen dos tipos de contaminantes que pueden aparecer en la muestra y que debemos minimizar en la medida de lo posible, independientemente del material de

partida (células o tejido): a) proteínas intracelulares, liberadas por daño celular y b) suero (de la sangre en tejido o suero bovino fetal en los cultivos).

El estudio proteómico del secretoma fue realizado inicialmente de manera meramente descriptiva, presentando listados de proteínas secretadas por un tejido, célula u organismo. Generalmente se ha empleado la 2-DE combinada con espectrometría de masas MALDI-TOF-TOF, o LC-MS/MS con un posible prefraccionamiento previo a una LC multidimensional llevado a cabo mediante SDS-PAGE^{51,52}. De esta manera, en el campo de la aterosclerosis, se identificó por primera vez el proteoma y secretoma de VSMCs y macrófagos humanos en cultivo mediante 2-DE y MALDI-MS^{53,54}. La clasificación de las proteínas como verdaderamente secretadas se ha llevado a cabo habitualmente mediante métodos computacionales. Las proteínas secretadas por la vía clásica, en la que intervienen el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, contienen un péptido señal, lo que nos permite clasificarlas de manera sencilla. Existen programas que asignan un grado de probabilidad de secreción a las proteínas, ya sea por la presencia de péptido señal o por su posible secreción por vías no clásicas. El programa que más se ha utilizado hasta la actualidad es el SecretomeP, aunque recientemente ha aparecido otro denominado SecretP⁵⁵. Aún así, es difícil diferenciar entre las proteínas liberadas por procesos fisiológicos de apoptosis o necrosis de las provenientes de daño celular debido a la manipulación.

Más adelante, se procedió a utilizar el secretoma para estudios comparativos. En este tipo de estudios, la tecnología SILAC ha sido fundamental para los análisis no basados en geles. En particular, una metodología de reciente formulación denominada CILAIR ha permitido la aplicación del marcaje con isótopos estables al estudio del secretoma de tejido en cultivo. En el estudio de la enfermedad aterosclerótica se han llevado escasos estudios comparativos de secretoma. En un trabajo pionero en este campo llevado a cabo anteriormente en nuestro grupo, se compararon mediante 2-DE secretomas de arteria mamaria, carótida con placa de ateroma no complicada y complicada con trombo⁵⁶. Se observó una disminución en la secreción de hsp27 que se correlacionaba con la complicación de la placa y que fue corroborada en el plasma de los pacientes⁵⁷. También se estudió la influencia de los fármacos atorvastatina y amlodipino en el secretoma de los grupos de estudio citados anteriormente⁵⁸.

OBJETIVOS

Objetivo principal:

El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el estudio del perfil proteico de las capas íntima y media de la arteria coronaria aterosclerótica humana, la evaluación de las proteínas alteradas en estas capas en la coronaria, con el desarrollo de la aterosclerosis, así como la caracterización del secretoma de la coronaria aterosclerótica y la evaluación de las proteínas específicamente secretadas por esta arteria, con respecto a otras arterias humanas no afectadas.

De este objetivo principal se derivan los siguientes objetivos:

1. Optimización de las condiciones de preparación histológica, microdissección por laser, solubilización y marcaje del proteoma de la arteria coronaria aterosclerótica humana y de arterias humanas no afectadas, para el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional.
2. Análisis del proteoma de las capas íntima y media de la arteria coronaria aterosclerótica humana mediante electroforesis bidimensional.
3. Estudio mediante inmunohistoquímica de algunas de las proteínas alteradas de mayor relevancia.
4. Optimización del método de obtención del secretoma de la arteria coronaria aterosclerótica humana para enriquecer la muestra en proteínas secretadas, minimizando la contaminación por proteínas del plasma.
5. Análisis del secretoma de la arteria coronaria aterosclerótica humana mediante metodologías proteómicas basadas en geles bidimensionales.
6. Caracterización del secretoma de la arteria coronaria aterosclerótica humana mediante metodologías proteómicas basadas en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.
7. Comparación de dos procedimientos de análisis cuantitativo del secretoma de la arteria coronaria aterosclerótica humana mediante técnicas de cuantificación libre de marcaje basadas en contaje espectral e integración de picos cromatográficos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE ARTERIAS ATEROSCLERÓTICAS Y CONTROLES

Para realizar este estudio proteómico de la arteria coronaria con placa de ateroma, se obtuvieron muestras humanas provenientes de biopsias y necropsias. Las biopsias se obtuvieron durante operaciones de revascularización coronaria, realizadas en los centros Hospital Universitario Gregorio Marañón y Hospital Clínico San Carlos, ambos de Madrid; y durante operaciones de trasplante de corazón llevadas a cabo en el Hospital Universitario La Fe, de Valencia. Las necropsias fueron obtenidas durante autopsias (menos de 12 horas después de la muerte del individuo) realizadas en los servicios de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud de Toledo, y en el de nuestro centro, la Fundación Jiménez Díaz. En todos los casos se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes o familiares de los fallecidos, así como los correspondientes informes positivos de los comités éticos de cada hospital.

Las biopsias obtenidas durante las operaciones de revascularización coronaria fueron: atelectomías de coronaria aterosclerótica, y según el tipo de revascularización realizada, mamaria, radial, o ambas. De los explantes de corazón provenientes de trasplantes se aislaron las arterias coronarias izquierda y derecha en su tramo de mayor calibre. En cuanto a las necropsias, las arterias coronarias fueron aisladas de manera similar al caso de los trasplantes, y se obtuvieron además arterias aorta y mamaria. Todas estas muestras fueron inmediatamente lavadas con suero salino, incluidas en medio óptimo para corte a baja temperatura, (*Optimal cutting temperature*, OCT, Sakura Finetek), congeladas con nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta su uso. Para realizar un estudio en profundidad del tejido de estudio, se incluyeron en parafina

una arteria coronaria aterosclerótica, una arteria mamaria y una radial. El protocolo de inclusión en parafina fue el siguiente:

- Parafinado:

- Fijación con formol 10%
- 2 x Etanol 70%, 2h
- 2 x Etanol 95%, 1h 30min
- 2 x Etanol 100%, 1h 30min
- 2 x Xilol, 1h 30min
- 2 x Parafina, 2h

2. CARACTERIZACIÓN HISTOLÓGICA

Se realizaron cortes histológicos de 5µm para estudiar el grado de lesión de las muestras obtenidas mediante tinción con Hematoxilina-Eosina (H&E) y Oil Red e IHQ para localizar macrófagos y células espumosas y VSMCs, empleando anticuerpos frente a los marcadores CD68 y α -actina, respectivamente. Los anticuerpos empleados en estas IHQs fueron de Dako y se correspondieron con: anticuerpo monoclonal de ratón anti-CD68 humana, clon EBM11; y anticuerpo monoclonal de ratón anti-actina de músculo liso humana, clon 1A4. Con las muestras incluidas en parafina se realizaron cortes histológicos de similar grosor y se estudiaron por H&E e IHQ. Estas muestras se desparafinaron previamente a los procesos de tinción e IHQ de la siguiente manera: calentar a 60°C 1h, 3 lavados con xilol de 5min, etanol 100%, etanol 70% y etanol 70%. No se realizaron tinciones de Oil Red en cortes de muestras parafinadas, puesto que el procesamiento de estas muestras elimina los lípidos, haciendo inútil el empleo de este colorante. Los protocolos de tinción H&E y Oil Red, y de IHQ para CD68 y α -actina fueron los que siguen:

- Tinción H&E:

- Fijación con etanol 70%
- Secado al aire
- Lavado con H₂O (para retirar el OCT)
- Tinción con hematoxilina de Mayer (Sigma), 10 min
- Lavado con H₂O
- Tinción con eosina en solución alcohólica (Sigma)
- Etanol 70%
- Etanol 95%
- Etanol 100%
- Xilol

- Tinción Oil Red:

- Fijación con formol
- Tinción con Oil Red O (Sigma), 120 mg en isopropanol 60%, filtrado en el momento
- Lavado con H₂O
- Tinción de fondo con hematoxilina, 1 min
- Montaje con gelatina glicerinada

- IHQ CD68/ α -actina:

- Fijación con acetona fría
- Secado al aire
- Lavado con H₂O (para retirar el OCT)
- Delimitar secciones con bolígrafo de IHQ (Invitrogen)
- Bloqueo con BSA 10%, 1 hora
- Anticuerpo primario, dilución 1:500 en diluyente de anticuerpos primarios (Biomed) con BSA 1%, 30 min
- 3 lavados de 5 min con tampón de lavado (Dako)
- H₂O₂ 3% 5 min para bloquear peroxidasas endógenas.
- Lavado con tampón de lavado
- Anticuerpo secundario EnVision + Dual Link-HRP (Dako), 30 min
- 3 lavados de 5 min con tampón de lavado (Dako)
- Revelado con 3,3'-diaminobencidina (DAB, Dako)
- Lavado con H₂O
- Tinción de fondo con hematoxilina, 1 min
- Lavado con H₂O
- Etanol 70%
- Etanol 95%
- Etanol 100%
- Xilol

Para realizar la caracterización de las muestras, se empleó la modificación de la clasificación de la Asociación Americana del Corazón (*American Heart association*,

AHA) descrita por Virmani y colaboradores⁸. Para este estudio, se seleccionaron biopsias y necropsias de coronarias ateroscleróticas que presentasen una lesión denominada ateroma con cápsula fibrosa, en el que se observa un núcleo lipídico bien formado rodeado por una importante cápsula fibrosa, infiltrado inflamatorio y una presencia esporádica de calcificación. Como controles de los diversos análisis proteómicos realizados se emplearon: coronarias no afectadas obtenidas en autopsias de individuos que no fallecieron por causas coronarias; además de radiales y mamarias, que son arterias en las que comúnmente la aterosclerosis no llega a alcanzar estadios avanzados.

3. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE TEJIDO COMPLETO

Para extraer el proteoma del tejido completo de las arterias se congelaron en nitrógeno líquido, después de lo cual fueron trituradas con un mortero. El polvo obtenido se disolvió en un tampón de lisis compuesto de urea 7M, tiourea 2M, Tris 30mM y 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-2-hidroxi-1-propanosulfonato (CHAPS) 4%. Posteriormente, se sonicaron durante 15 minutos y se llevó a cabo una centrifugación a 12000 x g. El sobrenadante se guardó a -80°C hasta su uso.

4. MICRODISECCIÓN POR LÁSER

4.1. Preparación de la muestra para LMD

Empleando un criostato CM1900 (Leica) se cortaron secciones de 10 µm de los bloques incluidos en OCT y se depositaron en portaobjetos con membrana de PEN (PALM Microlaser, Carl Zeiss), para facilitar la escisión y catapultado de grandes áreas de tejido por LMPC manteniendo su integridad, lo que nos permite obtener mayor cantidad de proteína. Se fijaron las muestras con etanol 70% con 0,01% de cóctel de inhibidor de proteasas (Sigma) y enfriado previamente a -20°C para minimizar la

actividad de las proteasas. Se realizaron dos métodos diferentes de tinción, hematoxilina (Sigma) y violeta de cresilo (Certistain, Merck) para evaluar el más adecuado, en cuanto a visualización del tejido y compatibilidad con la LMD. Ambos protocolos se llevaron a cabo en hielo, con los reactivos previamente enfriados a 4°C y las disoluciones total o parcialmente acuosas suplementadas con 0,01% de cóctel de inhibidor de proteasas. Ambos protocolos se describen a continuación:

- Tinción con hematoxilina de Mayer:

- Lavado con H₂O mQ + 0,01% inhibidores de proteasas
- Secado al aire en hielo
- Tinción con hematoxilina + 0,01% inhibidores de proteasas, 5 minutos
- Lavado con H₂O mQ + 0,01% inhibidores de proteasas
- Etanol 70% + 0,01% inhibidores de proteasa.
- Etanol 95% + 0,01% inhibidores de proteasas
- Etanol 100%

- Tinción con violeta de cresilo:

- Lavado con H₂O mQ + 0,01% inhibidores de proteasas
- Secado al aire en hielo
- Etanol 70% + 0,01% inhibidores de proteasas
- Etanol 100%
- Tinción con violeta de cresilo 0,05% en etanol, 1 minuto
- Etanol 70% + 0,01% inhibidores de proteasas
- Etanol 100%

Tras ambos protocolos de tinción los portaobjetos se mantuvieron en hielo hasta proceder a la LMD. No se cubrieron con cubreobjetos porque impediría el proceso de LMD.

4.2. LMD

La microdissección de las regiones analizadas por proteómica fue llevada a cabo en un equipo *Microbeam System* de PALM Microlaser (Carl Zeiss), que lleva a cabo el aislamiento y recogida del tejido por la técnica de microdissección por láser y

catapultado por presión (LMPC). Empleando el objetivo 5x del microscopio de este equipo, se chequeó la estructura general de los cortes de arteria, procediendo a la identificación de las diferentes capas que los componían. Con el objetivo de 10x se procedió a delinear las regiones de las capas de interés que se pretendían aislar. El empleo del difusor de luz del equipo durante la visualización general del tejido y la selección de las regiones de interés mejoró sustancialmente la imagen obtenida mediante una reducción de la absorción de luz de los tejidos sin cubreobjetos. El aislamiento de las regiones delineadas se realizó empleando el objetivo 10x, lo que, con respecto al de 5x, permite una mayor precisión en el corte con el láser, así como visualizar que el corte se produce a la energía y enfoque del láser adecuados. La energía del láser empleada para escindir las áreas seleccionadas fue de un 75% para el corte y de un 100% para el catapultado, y el enfoque de un 78% para ambos procesos. Al llevar a cabo la LMPC con cada portaobjetos, se emplearon las regiones aisladas en primer término para comprobar si las condiciones generales de energía y enfoque del láser eran adecuadas, siendo ligeramente modificadas en los casos necesarios hasta conseguir un correcto funcionamiento de la técnica. El aislamiento de los elementos seleccionados para LMPC se llevó a cabo empleando una función del programa del equipo de microdissección (PALM Robo Software 3.2, Carl Zeiss) denominada RoboLPC, que permite realizar el corte y el catapultado en un único paso. Tras llevar a cabo el aislamiento de todas las regiones programadas, ciertas regiones que no resultaron catapultadas de manera correcta al tubo de análisis, fueron recogidas mediante un paso adicional de catapultado por presión, para lo cual se empleó la función denominada LPC. Se utilizaron tubos de análisis con tapa adhesiva opaca de 500µl (PALM Microlaser, Carl Zeiss), puesto que permiten una mejor visualización del tejido a través de la tapa, que difunde la luz, y por su mejora en la recogida del tejido durante el

catapultado. La degradación proteica podría ser crítica si el tiempo empleado en la LMD se extiende demasiado, por lo que se realizaron periodos de microdissección de un máximo de 2 horas, según recomendaciones de la casa comercial.

El material obtenido tras la LMPC se lisó con 100µl de tampón de lisis. La composición del tampón de lisis varió según los experimentos realizados para optimizar la solubilización y extracción de las proteínas (ver sección Resultados). A continuación, se llevó a cabo una sonicación en agua con hielo durante 5 minutos, se centrifugó a 12000 x g, y se guardó el sobrenadante a -80°C hasta su uso.

5. OBTENCIÓN DEL SECRETOMA

Antes de utilizarlas para estudios de secretoma, las arterias se lavaron repetidas veces, para eliminar restos de sangre superficiales. Tanto para estos lavados como para el cultivo de los tejidos, se empleó el medio de cultivo RPMI 1640 sin L-Glutamina (Gibco, Invitrogen), al que se le añadieron los antibióticos penicilina y estreptomina (Pen/Strep, Lonza) y el fungicida anfotericina B (Fungizona 50 mg, Bristol-Myers Squibb) a unas concentraciones de 100 Unidades/ml y 2,5 µg/ml, respectivamente. Una vez lavadas, se procedió a su escisión en fragmentos de pequeño tamaño, para favorecer el intercambio con el medio, y se procedió a realizar una serie de lavados adicionales. Dependiendo del tamaño del tejido, se realizaron una o más réplicas del secretoma en placas de cultivo de 24 pocillos (Iwaki), mediante la adición de 1ml de medio a los fragmentos de la arteria. Se realizaron dos métodos de cultivo diferentes durante la optimización del método. El protocolo A se obtuvo de los trabajos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio con arteria carótida aterosclerótica y mamaria⁵⁶, y consistió en mantener los fragmentos en cultivo 24 horas, para posteriormente recoger el sobrenadante. En el protocolo B se aplicó un método de intercambio de medio

empleado por Álvarez-Llamas y colaboradores para reducir contaminantes de la muestra⁵⁹. Este protocolo conllevó la realización de intercambios de medio 1 hora después de iniciado el cultivo, a la mañana siguiente y, tras éste, dos lavados consecutivos de 4 horas. Tras realizar los lavados, se recogió el sobrenadante tras 48 horas de cultivo.

Una vez recogido el secretoma se procedió a su concentración mediante filtración por centrifugación, 1 hora a 2800 x g en un equipo GS-6R (Beckman Coulter), para lo cual se emplearon filtros Amicon Ultra – 4, que retienen todas las moléculas mayores de 5 kDa de peso molecular. Los secretomas concentrados se valoraron mediante el método de Bradford-Lowry, empleando el reactivo Coomassie Plus (Thermo Fisher). Una vez valorados se almacenaron a -80°C hasta su uso.

5.1. Marcaje con isótopos estables

En algunas de las muestras se llevó a cabo un marcaje basado en la metodología SILAC aplicada al cultivo de tejidos, empleando los aminoácidos L-lisina (Lys) y L-arginina (Arg) marcados reemplazando 6 carbonos ^{12}C por ^{13}C (Cambridge Isotope Laboratories). El medio empleado en estos casos fue RPMI 1640 sin L-Glutamina y sin los aminoácidos Lys y Arg (Palisa GmbH), para poder sustituirlos por los marcados. El medio se suplementó con antibióticos y fungicida, de manera similar a como se realizó con los experimentos de cultivo sin aminoácidos marcados. Se ensayaron varias opciones de marcaje, añadiendo los aminoácidos al medio tras realizar los intercambios de medio o a partir de alguno de ellos (ver sección de Resultados).

5.2. Procesamiento de secretomas para análisis por Orbitrap

Para analizar las muestras de secretoma por LC-MS/MS en el espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher), se empleó la electroforesis en gel de

poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes producidas por la presencia de SDS (SDS-*Poliacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE). El SDS-PAGE está basado en el método descrito por Laemmli⁶⁰. Los geles de electroforesis empleados fueron geles polimerizados a partir de una disolución de acrilamida 30% y bisacrilamida 0.8%, y se corrieron en el sistema de electroforesis MINIPROTEAN II (BioRad). Los geles se polimerizan formando dos fases con diferentes condiciones de concentración de acrilamida y pH, y contienen a lo largo de todo el gel un 10% de SDS, lo que mantiene las condiciones desnaturalizantes a lo largo de todo el proceso. El “gel concentrante” es el primero por el que pasa la muestra que se deposita en el pocillo del gel, y tiene una concentración de 4% de acrilamida, obtenida diluyendo la disolución madre de acrilamida/bisacrilamida en Tris-HCl 1.5 M pH 6.8, SDS 10%. El “gel separador” puede tener una concentración de acrilamida variable, dependiendo de la masa molecular de las proteínas a analizar, y se diluye en Tris-HCl 1.5 M pH 8.8, SDS 10%. En ambas fases del gel se lleva a cabo la reacción de polimerización gracias a la adición de los catalizadores persulfato amónico (APS, BioRad) como iniciador y N,N,N',N'-tetra-metil-etilenodiamina (TEMED, BioRad) como propagador. Las muestras que se cargaron en estos geles, se diluyeron en un tampón de carga compuesto por Tris-HCl 0.2M pH 8.0, SDS 3.5%, glicerol 16.5%, β -mercaptoetanol (Sigma) 8%, y una punta de espátula de azul de bromofenol (BioRad). Previamente a la electroforesis se calentaron 5 minutos a 95°C para favorecer la desnaturalización de las proteínas.

Basándonos en un método recientemente descrito⁶¹, se dejaron correr 30 μ g de las muestras hasta el momento exacto en que se produjo el paso del gel concentrante al gel de resolución. Se tiñeron los geles con Coomassie G-250 (Fermentas) y se cortó la banda en la que se encontraban las proteínas cargadas.

6. 2-DE

6.1. Isoelectroenfoque

Para realizar la 2-DE, al volumen de extracto que contenía la cantidad de proteína que se deseaba analizar se le añadió el volumen de tampón de rehidratación (urea 7M, tiourea 2M y CHAPS 4%) correspondiente hasta completar el volumen recomendado de carga en las tiras IPG: 125µl para tiras de 7cm, 300µl para tiras de 17cm y 410µl para tiras de 24cm. En el momento de cargar las tiras, se les añadió 0.6% de anfolitos (BioRad), 0.6% tributil fosfato (TBP, BioRad), 1.2% del reactivo DeStreak (GE Healthcare) y una punta de espátula de azul de bromofenol. Las tiras IPG empleadas fueron de rango lineal de pH 4-7 y de longitudes de 7, 17 y 24cm (GE Healthcare). La rehidratación se realizó de manera activa a 50V durante 12 horas, en una fuente PROTEAN IEF Cell (BioRad), empleando la muestra en tampón de rehidratación preparada como se acaba de detallar, y se cubrieron las tiras con aceite mineral para evitar la evaporación de la muestra durante el proceso. Los programas de IEF fueron diferentes según el tipo de muestra analizada. Para las procedentes de LMD se empleó el siguiente: 200V 1h 30min, 500V 1h 30min, 1000V 1h 30min, de 1000V a 8000V en 3horas y 8000V hasta acumular 20000V finales, para tiras de 7cm, y 60000V finales en el caso de las de 17 y 24cm. Para las de secretoma fue: 500V 1h, 1000V 1h, de 1000V a 8000V en 30 minutos y 8000V hasta acumular 10000V finales, para tiras de 7cm, y 50000V finales en el caso de las de 17 y 24cm.

6.2. SDS-PAGE

Previo a la segunda dimensión, se equilibraron las muestras durante 20 minutos con DTT y yodoacetamida (IAA), sucesivamente, en tampón de equilibrado (Tris-Cl 1,5M pH 8.8, urea 6M, glicerol 30%). La segunda dimensión se realizó en geles SDS-PAGE 12.5%, en los que sólo se polimeriza el “gel separador” y la tira se coloca directamente

en contacto con la región superior de éstos. Los geles de 7cm se corrieron en una cubeta de electroforesis MINIPROTEAN II, y los de 17 y 24cm en el sistema EttanDalt Seis (GE Healthcare). Tras la PAGE-SDS, se tiñeron los geles con plata empleando el kit de tinción PlusOne Silver Staining (GE Healthcare) y se escanearon en un densitómetro GS-800 (BioRad).

7. 2-D DIGE

7.1. Reducción y marcaje de las muestras

Para realizar los experimentos de análisis diferencial por 2-DE del material microdisecionado y de los secretomas de arteria coronaria con placa frente a arterias no afectadas, se empleó la técnica de DIGE de marcaje a saturación. Se precipitaron en acetona fría 5µg de los secretomas y toda la muestra en el caso del lisado tras LMD, y se resuspendieron en 9µl del tampón de lisis recomendado para DIGE (7M, tiourea 2M Tris 30mM y CHAPS 4%, pH 8.0). En las primeras muestras analizadas, se midió el pH de las proteínas en tampón de lisis utilizando tiras de medición de pH de rango 5.0 a 10.0 (Merck), y se comprobó que ninguna de las muestras variaba en exceso el pH 8.0 requerido para el correcto marcaje de las muestras. Para los experimentos de análisis diferencial, se elaboró un estándar interno que contenía la mitad de proteína de cada una de las muestras del experimento. A continuación, se redujeron las muestras con tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) durante 1 hora a 37°C en oscuridad, y se marcaron durante 30 minutos a 37°C, con Cy5 las muestras y con Cy3 el estándar interno. Las cantidades de TCEP y fluorocromo añadidas se determinaron en experimentos de optimización del marcaje, y fueron: 1nmol de TCEP y 2nmol de Cy3/Cy5 para las muestras de LMD, y 2nmol de TCEP y 4nmol de Cy3/Cy5 para los secretomas. Tras realizar el marcaje, se paró la reacción añadiendo un volumen de tampón equivalente al de la mezcla de

marcaje, compuesto por 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, Anfólitos pH 3-10 (Pharmalyte, GE Healthcare) 2%, ditioneitol DTT 130mM.

7.2. Isoelectroenfoque

Una vez marcadas, las muestras se cargaron en tiras previamente rehidratadas pasivamente durante 10-24 horas. En los experimentos de análisis diferencial, se mezcló previamente cada muestra con un volumen equivalente del estándar interno. La carga de la muestra se llevó cabo mediante el método de carga en copa (*cup-loading*). El programa de IEF de las muestras de LMD y secretoma fue similar al empleado en la 2-DE para tiras de 17cm pH 4-7, salvo por la rehidratación, que en este caso fue pasiva.

7.3. SDS-PAGE

Previamente a la segunda dimensión se llevó a cabo el equilibrado de las tiras durante 20 minutos, empleando únicamente DTT en tampón de equilibrado. La segunda dimensión se realizó mediante SDS-PAGE similar al de la 2-DE, utilizando el sistema EttanDalt Seis, y geles de poliacrilamida al 12,5%. Las imágenes de fluorescencia de cada uno de los fluorocromos se tomaron empleando un escáner Typhoon 9400 a una resolución de 100ppm.

7.4. Análisis diferencial mediante 2-D DIGE

Los geles pertenecientes a los experimentos de análisis diferencial de capas de arteria coronaria y secretomas se analizaron empleando el programa DeCyder versión 6.5 (GE Healthcare). En primer lugar, empleando el módulo de análisis diferencial en gel (*Differential in-gel analysis*, DIA) se realizó una co-detección de las 2 imágenes de los geles (estándar interno y muestra), se midió la abundancia de las manchas proteicas y se expresaron como un ratio de muestra/estándar interno (Cy5/Cy3). A continuación, los datos obtenidos en el módulo DIA, para cada gel, se analizaron en el módulo de

análisis de variación biológica (Biological variation analysis, BVA), en el que se realizó la superposición de los diferentes geles, asociando las manchas proteicas correspondientes entre sí, y la comparación de los ratios entre los diferentes geles del experimento. Se realizaron análisis estadísticos mediante t de Student, y se consideraron significativas las diferencias con un *p*valor ≥ 0.05 y una variación > 2.0 ó < -2.0 . Empleando el módulo de análisis extendido de datos (*Extended data analysis*, EDA), se llevaron a cabo análisis de componentes principales (*Principal component analysis*, PCA) y análisis de agrupamiento jerárquico empleando las manchas proteicas con diferencias significativas en los grupos de estudio.

8. IDENTIFICACIÓN POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Todas las identificaciones por espectrometría de masas fueron realizadas en los siguientes Servicios: Unidad de Proteómica, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo; Servicio de Proteómica, CNIC, Madrid; y Unidad de Proteómica, Facultad de Farmacia-UCM, Parque Científico, Madrid.

8.1. Identificación por MALDI-TOF/TOF

Las manchas proteicas de los geles 2-DE empleados para identificación por MS/MS fueron digeridos automáticamente empleando un Ettan Digester (GE Helathcare). El protocolo de digestión empleado fue el de Shevchenko *et al.*⁶² con mínimas variaciones: los trozos de gel se lavaron con bicarbonato amónico 50 mM en metanol 50% y acetonitrilo 70% y se secaron en un Speedvac (Thermo Fisher). A continuación, se añadió tripsina porcina modificada (Promega) para llevar a cabo la digestión a 37°C durante una noche. La extracción de los péptidos se llevó a cabo empleando acetonitrilo 60% y ácido fórmico 0.1%. Se mezcló una alícuota de la solución de digestión con otra de ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (Sigma) en acetonitrilo acuoso 30%, 2-propanol

15% y ácido trifluoroacético 0,1%. Esta mezcla se depositó en una placa 384 Opti-TOF 123x81 mm MALDI (Applied Biosystems) empleando el método de la capa gruesa y dejando que se seque a temperatura ambiente. Los espectros de MS Y MS/MS se obtuvieron en un equipo 4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems). Para el análisis automático de los datos de masa obtenidos se empleó el paquete informático 4000 Series Explorer versión 3.5.3 (Applied Biosystems). Los datos de MS y MS/MS fueron combinados gracias al paquete informático GPS Explorer Software versión 3.6 (Applied Biosystems), y de esta manera se realizó una búsqueda frente a una base de datos de proteína no redundante (NCBIInr o SwissProt 56.5) empleando Mascot versión 2.2 (Matrix Science) ⁶³, con una tolerancia de masa para los fragmentos de 50ppm y permitiendo la presencia máxima de 1 único punto de corte fallido. Los espectros de MS y MS/MS y los resultados de las búsquedas fueron inspeccionados en detalle manualmente empleando los paquetes informáticos antes comentados.

8.2. Identificación por LC-MS/MS

8.2.1. Identificación por trampa lineal, LTQ

Para chequear la composición proteica de los extractos de las capas íntima y media aisladas por LMD, se emplearon extractos de coronaria preaterosclerótica de necropsia en tampón de lisis urea 7M, tiourea 2M, Tris 30mM, CHAPS 4% y DTT 1%, previamente desalados empleando las microcolumnas Protein Desalting Spin Columns (Pierce), y precipitados con acetona fría. Se resuspendió el precipitado en urea 8M, tras lo cual se redujo con DTT 10mM durante 1 hora a 56°C. Posteriormente, se alquiló con IAA durante 30 minutos en oscuridad. A continuación se redujo la concentración de urea hasta 2M mediante adición de bicarbonato amónico 100mM pH 8.5, y se llevó a cabo la digestión con tripsina con grado de secuenciación (Roche) a una dilución 1:50 durante una noche a 37°C. Tras llevar a cabo una concentración de las muestras en un

SpeedVac (Thermo Fisher) y un desalado de éstas en una columna de fase reversa, los péptidos se analizaron en un espectrómetro de masas tipo trampa lineal LTQ (Thermo Fisher). Se llevaron a cabo dos carreras de LC-MS/MS con cada muestra y los resultados de ambas se combinaron. El desalado de los péptidos así como su separación se llevó a cabo en una columna BioBasic C-18 PicoFrit (75µm de diámetro interno y 10cm de longitud, New Objective) a un flujo de 200 nL/min, empleando agua miliQ y acetonitrilo con 0.1% de ácido fórmico como disolventes A y B, respectivamente. El gradiente se inició y se mantuvo 5 min a 5%, tras lo cual se elevó gradualmente hasta 70% durante 120 min, y finalmente se mantuvo a 90% durante 5min. Los péptidos eluidos en el ESI se analizaron en experimentos independientes de MS. Se emplearon los siguientes parámetros para realizar el barrido de iones: Modo Full-scan MS (m/z 400-1800) junto con modo Siete Péptidos Mayoritarios Zoom/MS/MS (anchura de aislamiento del ratio m/z de 2), colisión normalizada de energía 35%. El barrido se llevó a cabo mediante el empleo de una lista de exclusión dinámica (de 30 seg, tamaño 500 y ancho de exclusión de m/z de 3). Se utilizaron dos motores de búsqueda para realizar la identificación de las proteínas: Sequest y MACOT. Las búsquedas en Sequest se hicieron mediante el programa BioWorks 3.2 (Thermo Fisher), empleando los siguientes parámetros: base de datos, IPI versión 3.45; tolerancia de masa de péptido, 200ppm; tolerancia de masa de fragmento, 0.5 Da y un máximo de 2 puntos de corte fallidos. Los filtros empleados para dar por validas las identificaciones fueron una probabilidad de péptido de 10^{-3} y una puntuación de correlación cruzada (Xcorr) de 2.0 para iones carga 2+ y de 2.5 para los de carga 3+. En cuanto a las búsquedas de MASCOT, se realizaron con parámetros similares a las de Sequest, salvo por el empleo de la base de datos SwissProt versión 56.6, además de la de IPI; permitiendo un máximo de 1 puntos de corte fallido, y empleando como punto de corte para dar por validas las

identificaciones un *p*valor de 0.05. Tanto en Sequest como en MASCOT se consideraron las siguientes modificaciones: carbamidometilación de las Cys (fija) y oxidación de las metioninas (variable). En cada búsqueda se llevó a cabo una búsqueda inversa simultánea, de manera que se eliminaron todas las identificaciones que tuvieran una puntuación inferior a la de la primera identificación inversa aparecida.

8.2.2. *Detección de marcaje isotópico en espectros de MS/MS de trampa lineal, LTQ*

Para analizar el marcaje isotópico de las muestras de secretoma en las que se incluyeron los aminoácidos Lys y Arg marcados, se analizaron los espectros de MS/MS empleando el programa MSQuant. Este programa busca de manera automática los pares de masas de las moléculas de un péptido que incorporan el marcaje (forma pesada) y de las que no lo incorporan (ligera). Según la cinética de incorporación del marcaje de cada proteína observaremos diferente abundancia de una y otra forma, lo cual será representativo de la velocidad de síntesis y secreción al medio de las proteínas identificadas. Cuanto mayor sea la proporción de forma pesada respecto a la ligera, mayor será la velocidad de secreción de la proteína.

8.2.3. *Identificación por LTQ-Orbitrap*

Una vez digeridas las muestras de secretoma, de manera similar a las muestras analizadas por el LTQ, los péptidos tripticos resultantes se inyectaron en una nanocolumna de fase reversa C-18 (diámetro interno de 100 μ m y 12cm de longitud, Mediterranean sea, Teknokroma) en la que se analizaron en un gradiente continuo de acetonitrilo de 0 a 50% de disolución B durante 45 min, 50-90% B en 1 min (B=95% acetonitrilo, 0.5% ácido acético), en un HPLC Ultimate 3000 (LC-Packings). Se empleó un flujo de 300nL/min para eluir los péptidos de la columna al ESI de un LTQ-Orbitrap XL. Se analizó, a lo largo de la carrera cromatográfica, el espectro de resolución

mejorada mediante *transformada de Fourier* (resolución=30000) y los espectros de MS/MS de los cinco iones parentales de mayor intensidad. La exclusión dinámica se fijó en 1 minuto. Para la identificación de las proteínas, se lanzaron búsquedas con los espectros de fragmentación en Sequest y MASCOT, empleando el paquete informático Proteome Discoverer 1.0 (Thermo Fisher). Las bases de datos empleadas fueron SwissProt en el caso de MASCOT, y NCBI nr para el de Sequest. Los parámetros de búsqueda fueron los siguientes: máximo de 2 puntos de corte fallidos, y errores de 10ppm y 0.8 Da para espectros de MS y MS/MS, respectivamente. Se estableció un valor de 0.05 como punto de corte del valor de la tasa de falsos-positivos (*false discovery rate*, FDR) para las identificaciones.

8.3. Análisis diferencial por cuantificación libre de marcaje

Con la idea de encontrar proteínas cuya secreción se encuentre alterada en la enfermedad aterosclerótica, se analizaron 3 muestras por grupo, procedentes de necropsia, de coronarias ateroscleróticas (CP), regiones no afectadas de coronaria contiguas a la placa en estadio preaterosclerótico (CS) y mamarias (M). Para realizar este análisis se emplearon dos software comerciales, Scaffold (Thermo Fisher) y SIEVE (Thermo Fisher), que toman diferentes datos de origen: número de espectros de masas adquiridos (contaje espectral) e intensidad de pico.

8.3.1. Análisis diferencial por cuantificación libre de marcaje con el programa Scaffold

El análisis semi-cuantitativo llevado a cabo con el programa Scaffold fue realizado en base al número de espectros MS/MS adquiridos para cada proteína (cuentas espectrales). Los datos pueden ser comparados tras aplicar una normalización en todo el experimento, teniendo en cuenta el número promedio de espectros adquiridos para todos los grupos y el número total de espectros adquiridos para cada uno de los grupos. La

normalización de los datos no se recomienda cuando la cantidad inyectada en el MS es la misma para todas las muestras (sin esperar variaciones en el procesamiento de las muestras) o cuando se consideran como muestras bandas individuales obtenidas de una electroforesis en gel, como es el caso. Por lo tanto, no se realizó esta normalización, y en ese caso la comparación se hace en base a cuentas espectrales sin peso (*unweighted spectral counts*, en el programa Scaffold). En el estudio del secretoma, se consideró una probabilidad mínima de identificación del 80% tanto para la proteína en conjunto como para cada uno de los péptidos. El análisis cuantitativo se realizó por comparación de los grupos dos a dos (M vs CP, M vs CS y CP vs CS) en base al número de espectros adquiridos, sin aplicar la normalización antes comentada. Para calcular las variaciones significativas, se realizó un análisis estadístico de t de Student, tomando como valor de corte un pvalor de 0.05. En aquellos casos en los que no se observó ninguna cuenta espectral en todas las muestras de un grupo, se tomo el valor 1, en lugar de 0, para poder calcular el ratio de variación.

8.3.2. *Análisis diferencial por cuantificación libre de marcaje con el programa SIEVE*

Este programa, realizó un alineamiento de las diferentes carreras cromatográficas analizadas, una vez normalizadas en base a la suma total de intensidades de los iones. Posteriormente, establece regiones únicas a comparar de los cromatogramas obtenidos para todas las muestras, de modo que cada una de estas regiones correspondan a un grupo de picos de m/z y tiempo de retención determinados. En cada una de estas regiones y por encima de un valor umbral, se analizan todas las señales cromatográficas buscando diferencias significativas en la intensidad de los picos (con un p valor definido) correspondientes a variaciones en la abundancia entre los grupos. En un último paso, se procede a la identificación de las proteínas que dieron lugar a los péptidos diferenciales y que por lo tanto presentan una expresión variada en los grupos

comparados. El análisis semi-cuantitativo se realizó también en este caso por comparación de los grupos dos a dos (M vs CP, M vs CS y CP vs CS). Para ello, se realizó un análisis estadístico por t de Student y se consideraron significativos los valores con $pvalor \geq 0.05$ y un ratio > 1.5 ó < 1.5 . El espectro de MS/MS y el análisis realizado por el SIEVE de aquellos péptidos que resultaron significativamente variados, fueron chequeados uno por uno para estar seguros de que la identificación y el alineamiento eran correctos, y aquellos que correspondían a la misma proteína fueron agrupados.

8.4. Validación de las diferencias mediante IHQ

Algunas de las diferencias significativas encontradas en los análisis diferenciales de capas íntima y media se validaron mediante IHQ en un grupo independiente de muestras, compuesto por seis coronarias ateroscleróticas procedentes de corazones de operaciones de trasplante, y seis arterias radiales no afectadas procedentes de cirugía de revascularización coronaria. Estas muestras fueron incluidas en OCT de la misma manera que lo fueron las empleadas para los experimentos de LMD. Se cortaron secciones de $5\mu\text{m}$ de las arterias, se fijaron en acetona fría y se secaron posteriormente al aire. A continuación se lavaron en agua para eliminar el OCT y se delimitaron las regiones del portaobjetos en las que se encontraba el tejido con un bolígrafo de inmunohistoquímica. Las muestras fueron posteriormente incubadas con una solución de bloqueo de concentración de BSA y suero normal de cabra dependiente del anticuerpo empleado, y entre el rango de 1-10%. Los anticuerpos primarios se diluyeron en tampón de dilución de anticuerpos primarios y fueron los siguientes: anticuerpo policlonal de conejo frente a anexina A4 (ANXA4) de Abcam, anticuerpo policlonal de conejo frente a la cadena ligera de la ferritina (CL ferritina) de Abcam, anticuerpo policlonal de conejo frente a la cadena reguladora 2 de la miosina, variante del músculo

liso (CRM2) de Abcam; y anticuerpo monoclonal de ratón frente a vimentina de Serotec. Se utilizaron en las siguientes condiciones: a) ANXA4, dilución 1:100, 1 hora; b) CL ferritina, dilución 1:100, 10 min; c) CRM2, 1:400, 1 hora; y d) vimentina 1:40 30 min. Tras este periodo de incubación, se realizaron tres lavados de 5 minutos con un tampón de lavado (Dako), y se incubaron con agua oxigenada al 3% durante 5 minutos, tras lo cual se lavaron de nuevo con tampón de lavado. El anticuerpo secundario se incubó durante 30 minutos y fue en todos los casos EnVision + Dual Link System-HRP, que contiene anticuerpos elaborados en cabra frente a inmunoglobulinas de ratón y conejo, de manera que reconoce a los anticuerpos primarios realizados en ambas especies; y están conjugados con un polímero que lleva gran número de peroxidasas de rábano (*horseradish peroxidase*, HRP), amplificando así la señal en el revelado. El anticuerpo secundario sobrante se eliminó mediante tres lavados de 5 minutos con tampón de lavado. Posteriormente se reveló el ensayo con el cromógeno DAB. Tras lavar con agua, se llevó a cabo una tinción de fondo con hematoxilina durante 1 minuto. Se procedió a lavar la tinción con agua, para luego deshidratar en una batería creciente de alcoholes: 70%, 95% y 100%. Se trataron con xilol y finalmente se montaron con cubreobjetos, empleando el medio de montaje DPX (Fluka).

Se tomaron 5 microfotografías con una magnificación de 100x de cada IHQ para cuantificar el área positiva, y proceder a comparar la variación de ésta entre los dos grupos de muestras. Para llevar a cabo la cuantificación del área positiva, se empleó un paquete informático denominado Axio Vision 4.5 (Carl Zeiss). Este programa de tratamiento de imagen nos permitió programar una aplicación mediante la cual las microfotografías eran, en primer lugar, procesadas para mejorar la imagen empleando varios tipos de filtros. En la misma secuencia de acciones de la aplicación, éstas se

analizaban para calcular automáticamente las regiones teñidas de marrón por el DAB, y el área total de todas. Antes de realizar la cuantificación del área positiva, se procedió a eliminar mediante el uso del programa Photoshop (Adobe) las regiones no correspondientes a la capa de interés. El área total de la capa analizada en cada microfotografía fue calculada con el programa AxioVision, y se empleó para calcular el porcentaje de área teñida en las capas estudiadas por IHQ, empleando la siguiente ecuación:

$$\% \text{ inmunotinción (\%IT)} = (\text{área positiva de la capa} / \text{área total de la capa}) \times 100$$

El %IT considerado fue el de la media de las 5 microfotografías tomadas por cada muestra. Los valores obtenidos fueron comparados entre grupos mediante un análisis estadístico de t de Student, y se consideraron significativos siempre que tuvieran un $p\text{valor} \leq 0.05$.

RESULTADOS

1. HISTOLOGÍA DE LA ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA

Con el fin de estudiar histológicamente la arteria coronaria aterosclerótica y las arterias control que se emplearían después en los diferentes análisis proteómicos, se incluyeron una arteria coronaria aterosclerótica, una mamaria y una radial en parafina y se analizaron mediante tinción con H&E e IHQ frente a CD68, para detectar macrófagos/células espumosas. De esta manera se pudo reconocer las 3 capas de las arterias y la composición celular de ellas (Figura 6).

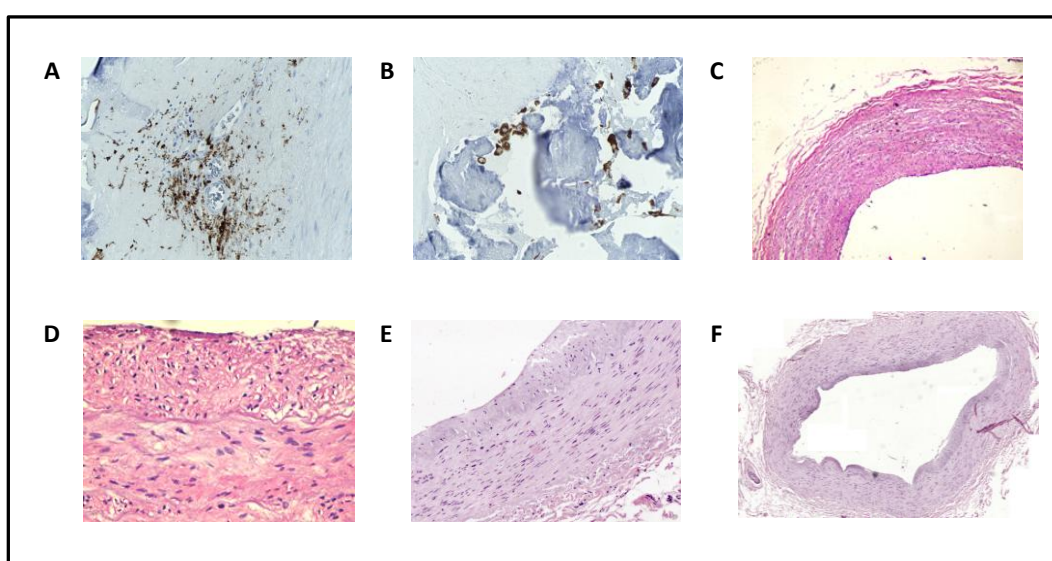


Figura 6 Estudio histológico de las arterias coronaria aterosclerótica, mamaria y radial incluidas en parafina. Las diferentes arterias empleadas posteriormente para realizar el estudio proteómico, fueron analizadas histológicamente en primer lugar incluyendo en parafina un espécimen de cada una de ellas. Ese procedimiento nos permite analizar el tejido en más detalle, ya que se observa mejor la morfología que en los tejidos incluidos en OCT y congelados. De esta manera se realizaron IHQ para CD68 de arteria coronaria (**A**, magnificación 200x, **B**, detalle de una región calcificada con algunos macrófagos/células espumosas, magnificación 400x) y H&E de mamaria (**C**, magnificación 100x; **D**, magnificación 400x) y radial (**E**, magnificación 200x; **F**, reconstrucción de la sección completa mediante microfotografías de magnificación 100x)

El análisis histológico de las arterias obtenidas de biopsia y necropsia fue realizado, por un lado, mediante tinción con H&E y Oil Red; y adicionalmente, mediante IHQ frente a CD68 y α -actina. De esta manera se observaron lesiones ateroscleróticas en gran número de arterias coronarias recogidas, cuyo grado fue desde la denominada ateroma con cápsula fibrosa, hasta casos de placas fibrocalcificadas. En las lesiones de ateroma con cápsula fibrosa, se observó un núcleo lipídico bien formado, con presencia de células espumosas, gotas lipídicas y cristales de colesterol (Figura 7A); rodeado por

una cápsula fibrosa, compuesta por un número moderado de VSMCs y abundante colágeno (Figura 7D). Alguna de estas VSMCs aparecían rellenas de lípidos, y en la cápsula se podía observar infiltrado inflamatorio (Figura 7E), generalmente en la zona

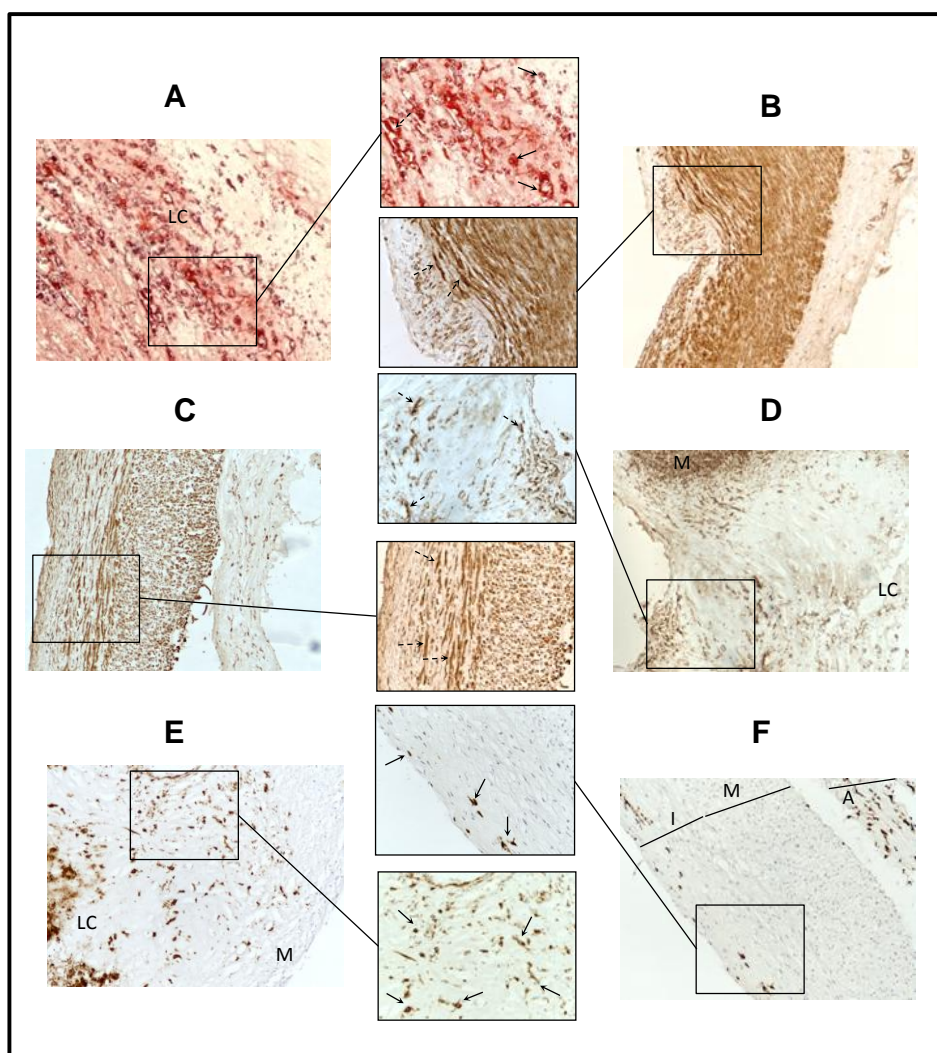


Figura 7 Histología de las muestras incluidas en OCT y congeladas que se emplearon para los estudios proteómicos de tejido aislado por LMD. Las muestras de arteria coronaria y radial empleadas para los experimentos realizados con tejido aislado mediante LMD se caracterizaron previamente mediante tinción específica de lípidos con Oil Red (A, coronaria aterosclerótica, magnificación 200x; detalle, magnificación 400x), e IHQ para VSMCs frente a α -actina (B, radial, C, coronaria preaterosclerótica, D, coronaria aterosclerótica, magnificación 100x; detalle, magnificación 200x) y para macrófagos/células espumosas (E, coronaria aterosclerótica; F, coronaria preaterosclerótica, magnificación 100x; detalle magnificación 200x). Flecha continua: macrófagos/células espumosas, flecha discontinua: células musculares, LC: core lipídico, I: capa íntima, M: capa media, A: capa adventicia.

de los hombros de la lesión. En bastantes ocasiones se encontraron depósitos de calcio, que únicamente de forma esporádica formaban nódulos (Figura 6B). En las placas fibrocalcificadas, se observó una mayoría de matriz extracelular (MEC) rica en colágeno y grandes nódulos de calcio, abarcando la mayor parte de la placa. La presencia de infiltrado inflamatorio, en estos casos, era poco frecuente. Algunas de las

coronarias procedentes de autopsia o de trasplante no presentaron lesión aterosclerótica, sino que se caracterizaron como preateroscleróticas, debido a que presentaban un engrosamiento de la capa íntima, producido por la migración de VSMCs de la media, que al llegar al subendotelio sintetizan MEC; y una moderada presencia de infiltrado inflamatorio, principalmente formado por macrófagos (Figura 7F). En el caso de las arterias mamaria y radial, no se observó en ningún caso presencia de placa de ateroma, aunque con frecuencia se observó un estadio preaterosclerótico. Este estadio se caracterizaba por un engrosamiento de la íntima, bastante leve en las mamarias y algo más elevado en las radiales (Figura 7C), con aparición muy escasa de macrófagos. No se observó engrosamiento alguno en un número importante de estas arterias, siendo la capa íntima una monocapa endotelial con un mínimo espacio subendotelial.

2. AISLAMIENTO DE LAS CAPAS ÍNTIMA Y MEDIA DE ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA Y ARTERIAS CONTROL MEDIANTE LMD

La aplicación de la técnica de LMD al aislamiento de regiones de tejido de la arteria coronaria aterosclerótica, y de arterias control, exigió el empleo de una serie de consideraciones en la preparación y tinción de la muestra, así como en el procedimiento de la LMD, que aseguraran un correcto desarrollo de la misma. Además, el empleo de las regiones aisladas para realizar análisis proteómico obligó a tener en cuenta un número adicional de precauciones. En primer lugar, en el procedimiento de fijación se evitó el empleo de formol, puesto que se conjuga con las proteínas, y se llevó a cabo empleando etanol 70% suplementado con inhibidores de proteasas, y previamente refrigerado a -20°C, para minimizar la acción de las proteasas. También se refrigeraron a 4°C antes de su uso todas las soluciones utilizadas en la tinción, y se emplearon inhibidores de proteasas en las total o parcialmente acuosas. Se compararon dos protocolos de tinción: uno basado en la tinción más comúnmente empleada en histología, H&E, pero sólo empleando hematoxilina (Figura 8A), puesto que la eosina altera las proteínas; y el segundo realizado mediante el empleo de violeta de cresilo (Figura 8B), un colorante que se puede disolver en etanol puro, lo que impide que las proteasas estén activas. Aunque los dos protocolos de tinción permitían realizar una correcta visualización del tejido, siempre que utilizásemos el difusor de luz del equipo

(Figura 8), la tinción con violeta de cresilo hizo más evidente el reconocimiento de la

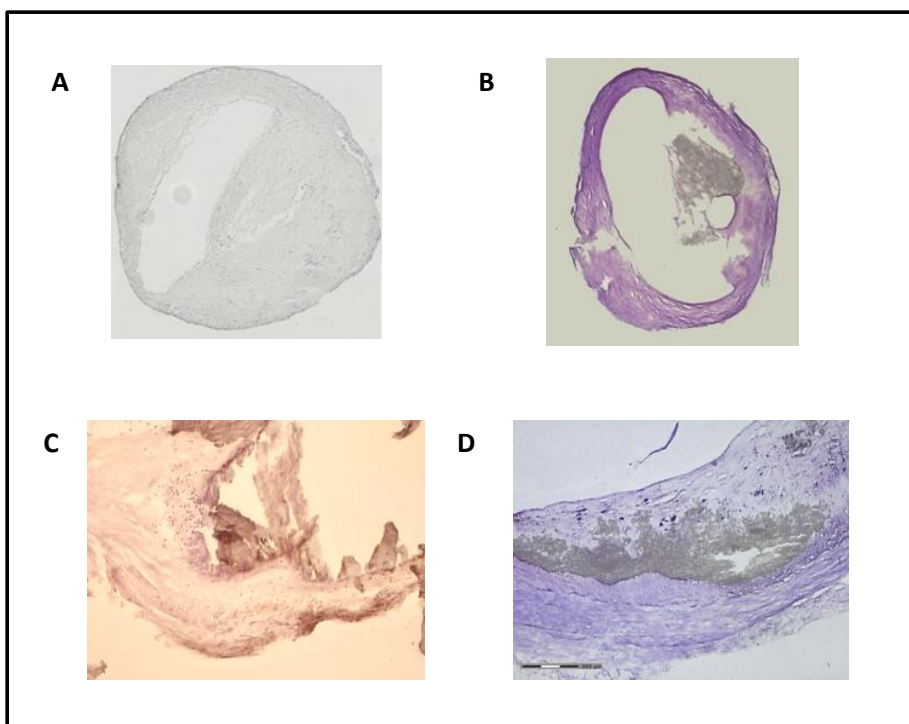


Figura 8 Protocolos de tinción para LMD ensayados. Se compararon dos protocolos de tinción para LMD diferentes, para lo cual se tiñeron arterias coronarias con placa de ateroma. La tinción con hematoxilina (A) resultó adecuada para este tipo de análisis, pero la de violeta de cresilo (B) permitió una mejor visualización de la arquitectura del tejido arterial. Además, la hematoxilina teñía las regiones calcificadas (C) mientras que el violeta de cresilo no penetraba en ellas (D), facilitando su reconocimiento en las lesiones ateroscleróticas. (A y B, construidas a partir de microfotografías de magnificación 50x; C y D, magnificación 100x)

arquitectura de las arterias estudiadas (Figura 8D), y por lo tanto facilitó el posterior aislamiento de las capas que las componían. Además, este colorante no penetraba en las regiones calcificadas (Figura 8D), al contrario de la hematoxilina (Figura 8C), lo que facilitaba el reconocimiento de dichas regiones en la coronaria con placa de ateroma. Una correcta deshidratación del tejido fue fundamental para poder realizar una adecuada escisión de las regiones aisladas por LMD del resto del tejido, algo que no fue posible en algunas preparaciones en las que este proceso se vio afectado o la eliminación del OCT resultó defectuosa, manteniendo el tejido con mayor hidratación. Las condiciones de enfoque y energía del láser fueron ajustadas según el tejido empleado y su grosor (10 μ m), y fue necesario emplear bastante energía, tanto para realizar el corte alrededor de las regiones delimitadas como para realizar el catapultado de éstas. Los parámetros del láser que dieron los mejores resultados para aislar fragmentos de arteria fueron: a) para el corte, energía 75% y enfoque 78%; b) para el catapultado, energía 100% y enfoque 78%. El máximo área que conseguimos catapultar de manera adecuada fue de

0,2 mm², por lo que se aislaron las capas íntima y media delimitando regiones de valor inferior a éste.

Con estas condiciones, se pudo llevar a cabo el aislamiento de las capas íntima y media de arterias humanas, tanto coronarias ateroscleróticas, como arterias control. El correcto aislamiento y recogida de los fragmentos escindidos (Figura 9A) se comprobó al visualizarlos al microscopio, una vez catapultados al tubo de análisis, en la tapa de éste (Figura 9B). Para los estudios comparativos realizados con 2-D DIGE, se aislaron gran número de regiones de capa íntima, en la que se evitaron las zonas de calcificación importante (Figura 9, C y D); y de capa media (Figura 9, E y F) hasta reunir un área total de tejido de 8mm².

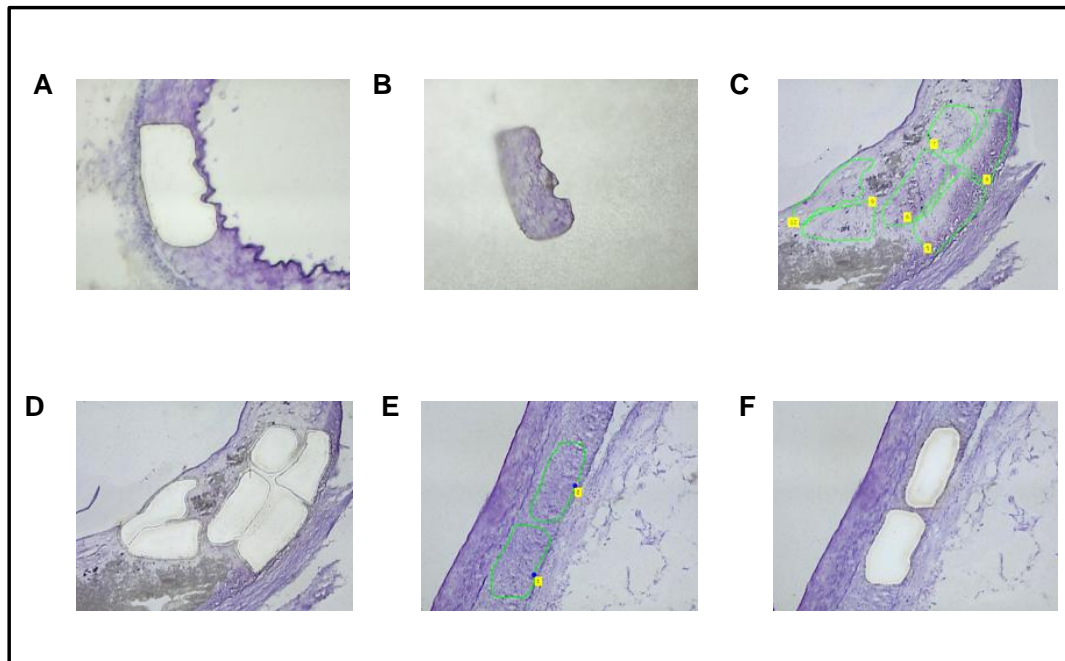


Figura 9 Aislamiento de las capas íntima y media mediante LMPC. Una vez optimizadas las condiciones de energía y enfoque del láser del sistema de LMPC, se consiguió aislar regiones de tejido de hasta 0.2 mm² de diferentes regiones de arteria (A), comprobando que se habían recogido adecuadamente en la tapa del tubo de análisis tras el catapultado (B). De esta manera se procedió a aislar regiones de la capa íntima (C y D, coronaria aterosclerótica) y de la media (E y F, coronaria preaterosclerótica). (A y B, magnificación 100x; C, D, E y F, magnificación 50x)

3. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE 2-DE CON TEJIDO TRAS LMD

3.1. Optimización de la 2-DE de arteria coronaria con placa de ateroma

Antes de realizar LMD de la arteria coronaria aterosclerótica y analizarlo por 2-DE, se procedió a optimizar un protocolo de IEF del tejido completo de la arteria que pudiéramos posteriormente aplicar al tejido obtenido tras la LMD. Con este fin, se

cargaron 20µg de proteína procedente del extracto de arteria coronaria aterosclerótica en tiras de 7cm pH 4-7. Se ensayaron dos tampones de rehidratación diferentes: a) tampón 1, urea 8M, CHAPS 4%, 0.6% de anfolitos, 0.6% TBP (Figura 10A); y b) tampón 2, 7M, tiourea 2M y CHAPS 4%, 0.6% de anfolitos, 0.6% TBP (Figura 10B). Tras realizar la segunda dimensión y teñirlos con plata, se observó en ambos casos un IEF defectuoso de las muestras, manifestado por un fenómeno de difusión horizontal de las manchas proteicas, denominado con el anglicismo *streaking*. Este *streaking* horizontal puede venir de la presencia en el extracto de ADN o sales, lo que interfiere en el enfoque de la primera dimensión. Para eliminar este fenómeno probamos en paralelo dos metodologías: benzonasa (Merck), una enzima que degrada el ADN; y un kit de limpieza de la muestra, denominado ReadyPrep Cleanup 2-D (BioRad), que realiza una precipitación con acetona para eliminar ADN y sales. Además se ensayó la adición del reactivo DeStreak (GE Healthcare), que minimiza el *streaking* horizontal durante el IEF. El empleo de benzonasa en solitario, produjo únicamente una ligera mejoría (Figura 10C), con respecto al mismo protocolo sin ésta (Figura 10A). Cuando se combinó el uso de ésta con el de DeStreak (Figura 8D), se observó una imponente disminución del *streaking* horizontal, por lo que se decidió incluirlo en los siguientes geles realizados. En este gel (Figura 10D) se empleó el tampón 1, y se probó a realizar el mismo protocolo con el tampón 2 (Figura 10E), lo que produjo una mejor resolución en la zona superior del gel, en la que se encuentran las proteínas de alta masa molecular. El empleo del kit ReadyPrep, con ambos tampones (tampón 1, Figura 10F; tampón 2, Figura 10G), dio resultados similares a los observados con la benzonasa. Al tratarse de un protocolo que incluye varios pasos entre precipitación y lavados, algo que puede suponer pérdida de proteína, se decidió utilizar únicamente un paso de precipitación en acetona fría y añadir después benzonasa para eliminar el ADN que no se hubiese eliminado de la anterior manera. De esta manera se llevó a cabo un último gel (Figura 8H), empleando el tampón 2, que resultó el más adecuado al favorecer el enfoque en la parte superior del gel, y se obtuvo un mapa bidimensional bien definido con abundantes manchas proteicas y una adecuada resolución.

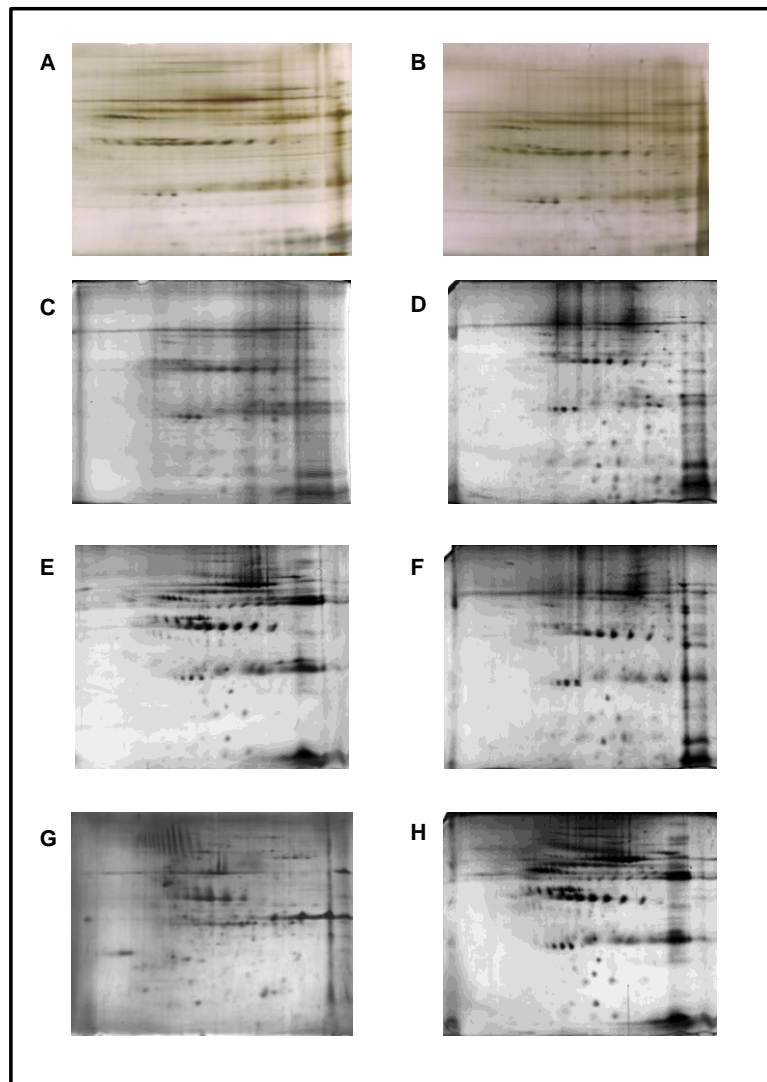


Figura 10 Optimización de la 2-DE de tejido de arteria coronaria con placa. Las primeras pruebas se realizaron cargando 20µg en tiras de 7cm pH 4-7, empleando tampón de rehidratación con urea 8M, CHAPS 4%, 0.6% de anfolitos, 0.6% TBP (tampón 1) (A) o con urea 7M, tiourea 2M y CHAPS 4%, 0.6% de anfolitos, 0.6% TBP (tampón 2) (B). Ante la alta presencia de *streaking* horizontal, y empleando el tampón 1, se probó a eliminar ADN con la enzima benzonasa (Merck), lo que ofreció una ligera mejoría (C) y a combinar esto con el uso del reactivo DeStreak (GE Healthcare), con el que se observó una importante disminución del *streaking* (D), con respecto al mismo protocolo sin él (C). Al emplear el tampón 2 con benzonasa y DeStreak, se observó que las manchas proteicas de alto peso molecular se resolvían mejor en el gel (E). En paralelo a la benzonasa, y empleando DeStreak, se probó a realizar una limpieza de la muestra empleando el kit Ready Prep Clean-up (BioRad) con los tampones 1 (F) y 2 (G). Al comprobar que los efectos de la benzonasa y el kit de limpieza de muestra eran similares, se decidió emplear la enzima y un paso sencillo de precipitación con acetona fría, para minimizar las pérdidas de proteína, obteniendo un gel 2-DE con bastantes manchas proteicas, y de buena resolución (H).

3.2. Análisis de tejido aislado por LMD mediante 2-DE

Aplicando las condiciones optimizadas en los pasos anteriores, se trató de obtener geles bidimensionales de tejido arterial aislado por LMD. Para ello, se procedió a aislar regiones de tejido de alguna de las capas de la arteria durante un máximo de 2 horas, obteniendo un área total de 6mm², de la que se extrajeron las proteínas en tampón de

lisis. Con estos lisados, se realizaron minigeles 2-DE y se tiñeron con plata. Un gel representativo de estos experimentos se puede observar en la Figura 11A, y podemos observar que, a pesar de extremar los tiempos de revelado de la plata, con un consiguiente aumento de la tinción de fondo, sólo se observa un escaso número de puntos. En un intento de aumentar la cantidad de proteína cargada en los minigeles para realizar la 2-DE, se realizaron cuatro aislamientos independientes de tejido mediante LMD hasta el máximo de 2 horas recomendado, para posteriormente mezclarlos una vez lisados, obteniendo las proteínas contenidas en 22,7 mm² de tejido. El gel obtenido tras realizar la 2-DE mostró varias decenas de manchas proteicas, la mayoría de moderada intensidad. Se enviaron a identificar las 34 manchas proteicas de mayor intensidad, pero sólo fue posible identificar 2 de ellas, las cuales aparecen delineadas en amarillo en la Figura 11B, que correspondieron a la isoforma sm2 de la nucleasa de *Serratia marcescens*. La identificación de esta proteína se debió a la adición de la enzima que hidroliza el ADN, comercializada como benzonasa por Merck, que no es otra que la nucleasa de *Serratia marcescens*.

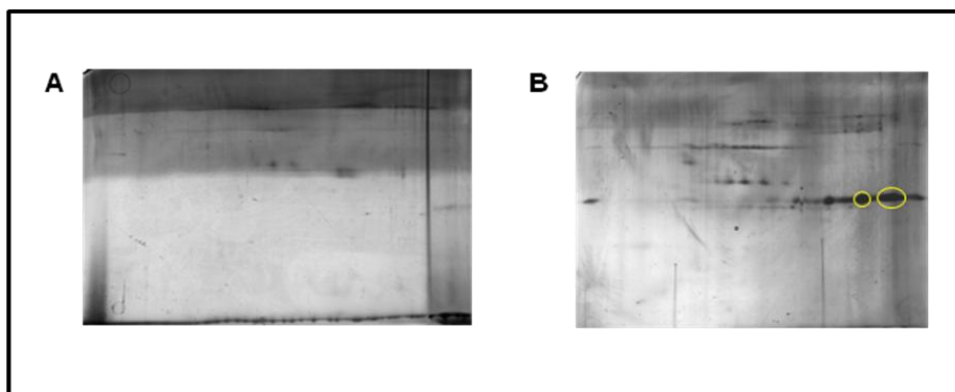


Figura 11 Análisis de tejido aislado por LMD mediante 2-DE. En un minigel se llevó a cabo la 2-DE del extracto proteico obtenido tras lisar 6mm² de tejido de arteria coronaria con placa aislados por LMD. Tras teñir con plata extendiendo el tiempo de revelado, se observaron muy pocas manchas proteicas de baja intensidad sobre una tinción de fondo abundante (A). Para aumentar la cantidad de proteína cargada en el gel, se realizaron cuatro experimentos de aislamiento por LMD independientes, sin superar en cada uno el periodo máximo recomendado de LMD de 2 horas, y se obtuvo un gel 2-DE con decenas de manchas proteicas (B), la mayoría de las cuales se escindieron del gel y se mandaron a identificar mediante MALDI-TOF-TOF. Sólo se pudieron identificar las manchas proteicas destacadas en amarillo, que correspondieron a una nucleasa de *Serratia marcescens*.

3.3. Combinación del DIGE de marcaje a saturación con la LMD para el análisis de tejido arterial

Ante la gran dificultad para obtener cantidad de proteína suficiente para realizar la 2-DE convencional, y en un intento de evitar el empleo de mezclas de gran número de

experimentos independientes de LMD, se recurrió a una técnica de DIGE de reciente aparición, denominada DIGE de marcaje a saturación, especialmente recomendada para muestras escasas y, en concreto, para estudios mediante LMD.

3.3.1. Optimización del DIGE de marcaje a saturación con tejido completo

Como primera aproximación al empleo de esta técnica, decidimos realizar experimentos de DIGE con extractos de tejido completo de arteria mamaria para comprobar la compatibilidad del protocolo de extracción, IEF y SDS-PAGE, así como para ajustar las condiciones de marcaje más adecuadas. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se ensayaron 5 cantidades diferentes de TCEP:fluorocromo, teniendo en cuenta que el ratio molar debe ser siempre 1:2. Las cantidades ensayadas fueron las que aparecen en la Tabla 1.

Gel	TCEP 2mM (µl)	TCEP (nmol)	Fluorocromo 2mM (µl)	Fluorocromo (nmol)	Figura
1	0.5	1	1	2	A
2	0.75	1.5	1.5	3	B
3	1	2	2	4	C
4	1.25	2.5	2.5	5	D
5	1.5	3	3	6	E

Tabla 1 Cantidades de TCEP:fluorocromo empleadas en la optimización del marcaje

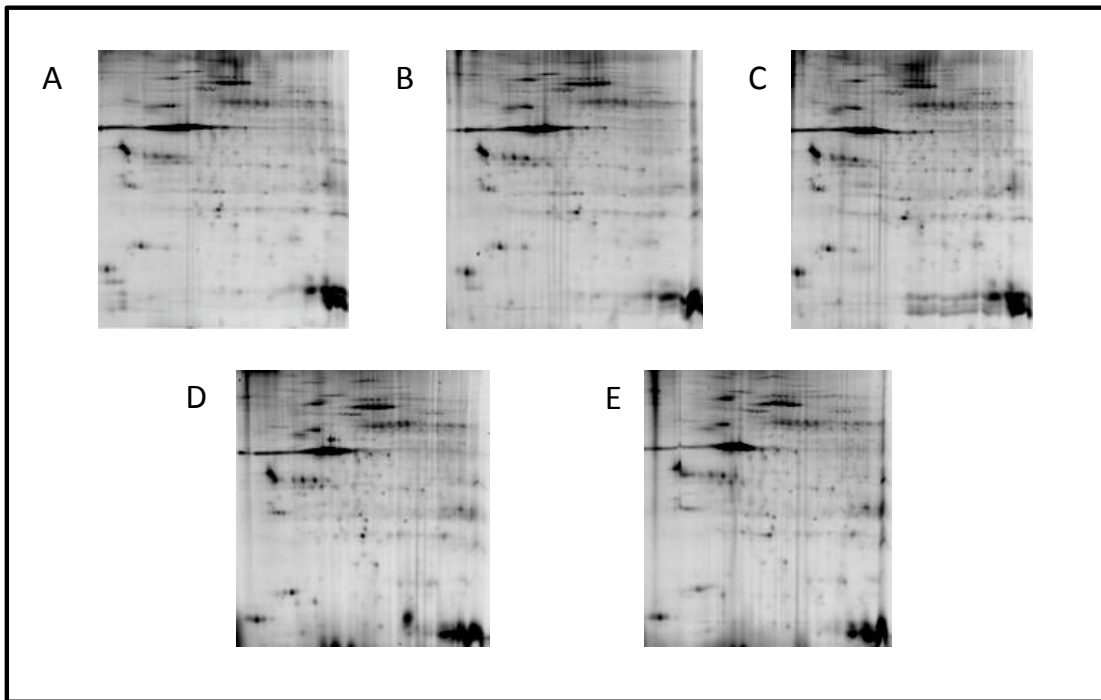


Figura 12 Optimización del marcaje a saturación del DIGE con tejido completo de arteria mamaria. Siguiendo las recomendaciones del fabricante, se ensayaron 5 cantidades crecientes de TCEP y fluorocromo, teniendo en cuenta que el ratio molar debe ser siempre 1:2. Los 2 gels de menor cantidad de reactivos (**A**, 1 y 2 nmol; **B**, 1.5 y 3 nmol) presentaron menor número de manchas proteicas que el gel consecutivo (**C**, 2 y 4 nmol). En el caso del marcaje con 2.5 y 5 nmol (**D**), los resultados fueron bastante similares a los de C. Un aumento de la cantidad de TCEP:fluorocromo resultó negativo al conllevar el aumento del *streaking* vertical (**E**, 3 y 6 nmol).

En los dos gels de menor cantidad (1 y 2) de TCEP y fluorocromo (Figura 12A y B) se observó una menor cantidad de manchas proteicas que en el gel 3, es decir, el inmediatamente superior en cantidad de ambos reactivos (Figura 12C). Este gel ofreció resultados bastante similares al gel 4 (Figura 12D). En cambio, en el gel 5 se empezó a observar un aumento en el *streaking* vertical (Figura 12E), lo que parece deberse al exceso de fluorocromo sobrante. Dado que los gels 3 y 4 ofrecieron los mejores resultados en cuanto a número de manchas proteicas y resolución, se decidió tomar las cantidades del gel 3 (2nmol de TCEP y 4nmol de Cy3/Cy5) como las idóneas para el marcaje a saturación de tejido arterial, pues suponían un menor gasto de fluorocromos y, por otro lado, se correspondían con las denominadas por la casa comercial como habitualmente óptimas en la mayoría de las muestras.

3.3.2. Influencia de los métodos de tinción en el perfil bidimensional de los gels 2-DE

En las primeras pruebas realizadas aplicando el DIGE de marcaje a saturación a los tejidos aislados por LMD, tanto para el caso del protocolo de tinción con hematoxilina como para el de violeta de cresilo, se observó un escaso número de

manchas proteicas en los geles, lo que indicaba una defectuosa extracción y solubilización de las proteínas (Figura 13, A: tinción con hematoxilina, B: violeta de cresilo). Además, la separación en ambas dimensiones de la electroforesis de las proteínas marcadas se vio afectada, lo que produjo un manifiesto efecto de *streaking* vertical y horizontal (Figura 13 A y B), que afectó sobre todo a las proteínas más ácidas (zona del ánodo del IEF). Para solucionar el posible efecto negativo sobre la extracción y separación de las proteínas debido a contaminantes introducidos durante el proceso de tinción, se introdujo un paso de cromatografía en columna de microfuga, previo a la precipitación con acetona. El efecto de esta etapa cromatográfica tras ambos protocolos de tinción supuso la disminución del *streaking* vertical y horizontal, así como un aumento en el número de manchas proteicas y en la resolución (Figura 13, C y D). La inclusión de este paso en el protocolo permitió la obtención de mapas bidimensionales de gran resolución de las capas íntima y media de arteria (Figura 13, C: capa media, hematoxilina, D: capa íntima, violeta de cresilo).

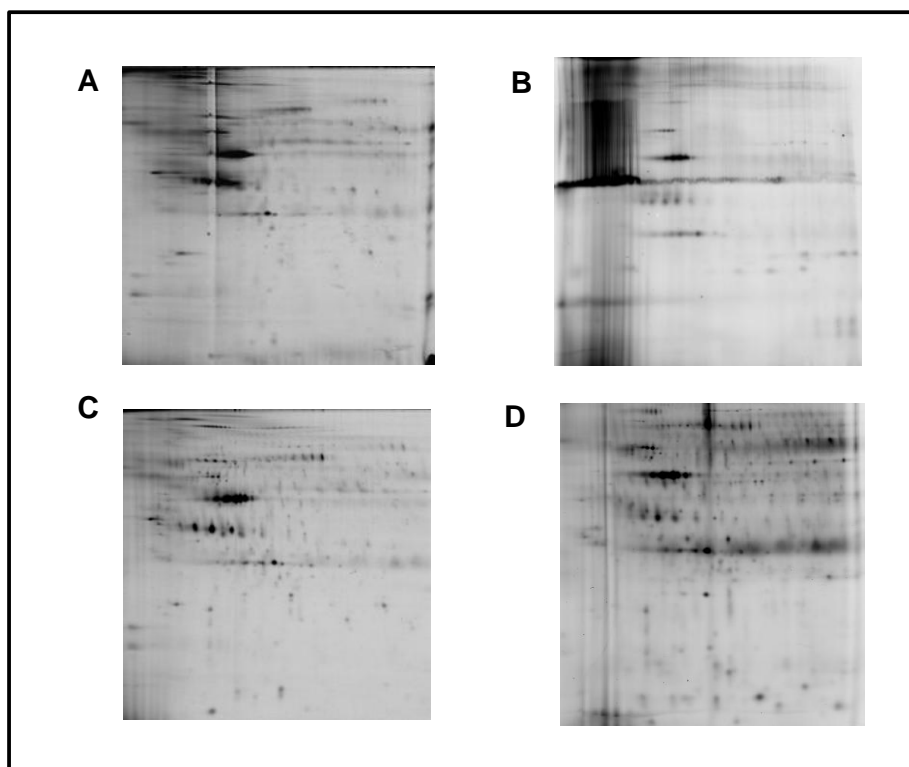


Figura 13 Mejoría experimentada al incluir un paso de cromatografía en columna de microfuga. Los geles 2-D DIGE obtenidos con las capas íntima y media, empleando los protocolos de tinción con hematoxilina y violeta de cresilo, dieron lugar a geles con escasas manchas proteicas. Además se advirtió la presencia de contaminantes, que alteraron el IEF, produciendo *streaking* horizontal (A, capa media de arteria aorta teñida con hematoxilina; B, capa íntima de arteria coronaria teñida con violeta de cresilo). La introducción de una etapa de cromatografía en columna de microfuga fue efectiva para eliminar los contaminantes de ambos protocolos de tinción, y permitió obtener perfiles 2-DE de gran resolución (C,

capa media de arteria aorta teñida con hematoxilina; **D**, capa íntima de arteria coronaria teñida con violeta de cresilo).

Una vez eliminado el efecto deletéreo introducido durante el protocolo de tinción, se probó a emplear menor cantidad de TCEP:fluorocromo para marcar 4mm² de tejido obtenido por LMD, ya que se observaba un efecto de *streaking* vertical en algunos geles debido al exceso de fluorocromo sobrante (Figura 14A). Empleando 1nmol de TCEP y 2nmol de fluorocromo se obtuvo una disminución del efecto negativo del fluorocromo sobrante (Figura 14B), de modo que se emplearon estas cantidades en los experimentos comparativos de capa íntima y media.

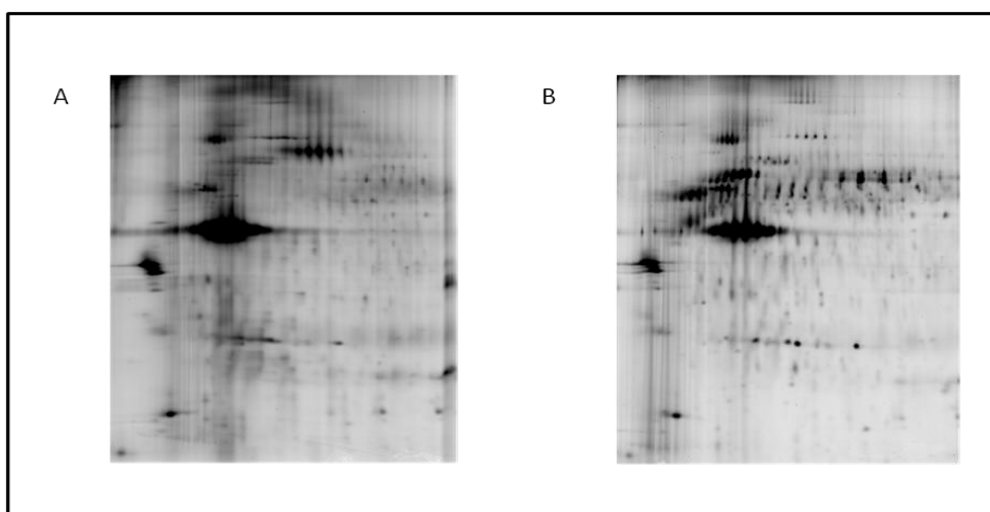


Figura 14 Mejoría del perfil 2-DE de los lisados tras LMD con la reducción de la cantidad de TCEP:fluorocromo. Ante la presencia de *streaking* vertical y una resolución baja de las manchas proteicas en los geles de tejido aislado por LMD con las cantidades de TCEP:fluorocromo optimizadas para el tejido completo (A), se ensayó una cantidad menor de TCEP:fluorocromo de 1nmol:2nmol, observando una importante mejoría, con la disminución de ambos efectos deletéreos (B).

3.3.3. Influencia del tampón de lisis en la extracción y solubilización de las proteínas

Para asegurarnos de realizar la solubilización más adecuada de las proteínas procedentes de las capas obtenidas mediante LMD, se investigó la posible influencia de la composición del tampón de lisis. Al realizar un paso de precipitación con acetona previo al marcaje DIGE (para pasar del volumen de 100µl necesario para realizar una lisis adecuada a los 9 µl requeridos para realizar el marcaje), y resuspender posteriormente el precipitado en el tampón recomendado por la casa comercial, no existieron limitaciones en cuanto a la composición del tampón de lisis empleado. Se ensayaron los siguientes tampones de lisis: a) tampón de lisis recomendado para el

DIGE (urea 7M, tiourea 2M, Tris 30mM, CHAPS 4%); b) urea 7M, tiourea 2M, Tris 40mM, CHAPS 4%, DTT 0.8%, N-Decanoil-N-metil-glucamina (Mega 10) 1%, 1-O-octil-b-D-glucopiranosido 2,3,4,6-tetra-acetato (OBG) 1%, Triton X-100 0.5%, β -mercaptoetanol 1% y TBP 0.02%, según Lawrie y Curran⁶⁴; c) a + 1% inhibidores de proteasas; d) a + 1% SDS; e) a + 1% DTT. El tampón de lisis recomendado para el DIGE fue el utilizado en los geles de la Figura 13, que ofrecieron buenos resultados tras incluir el paso de cromatografía en columnas de microfuga. Aún así, se procedió a analizar posibles mejoras en la solubilización de las proteínas mediante la adición de un detergente (SDS), un agente reductor (DTT) o inhibidores de proteasas, para prevenir una posible degradación proteica. Además se probó un tampón de lisis empleado por Lawrie y Curran⁶⁴ para experimentos de LMD y proteómica. A pesar de la compleja composición de este tampón, que contiene una gran variedad de agentes reductores, no se observó mejora en la extracción de proteínas, como se observa en el gel 2-D DIGE obtenido (Figura 15A). La presencia de inhibidores de proteasas en el tampón de lisis no supuso un aumento en número de manchas proteicas ni en su resolución (Figura 15B), en cambio, la adición de SDS (Figura 15C) y DTT (Figura 15D) sí produjo un incremento en ambos parámetros, lo que indicó una mejora de la extracción y solubilización de las proteínas. En concreto el DTT produjo una solubilización mayor de las proteínas de alto peso molecular, lo que aumentó su representación en el gel 2-DE, y por este motivo se decidió añadirlo al tampón de lisis en los experimentos diferenciales.

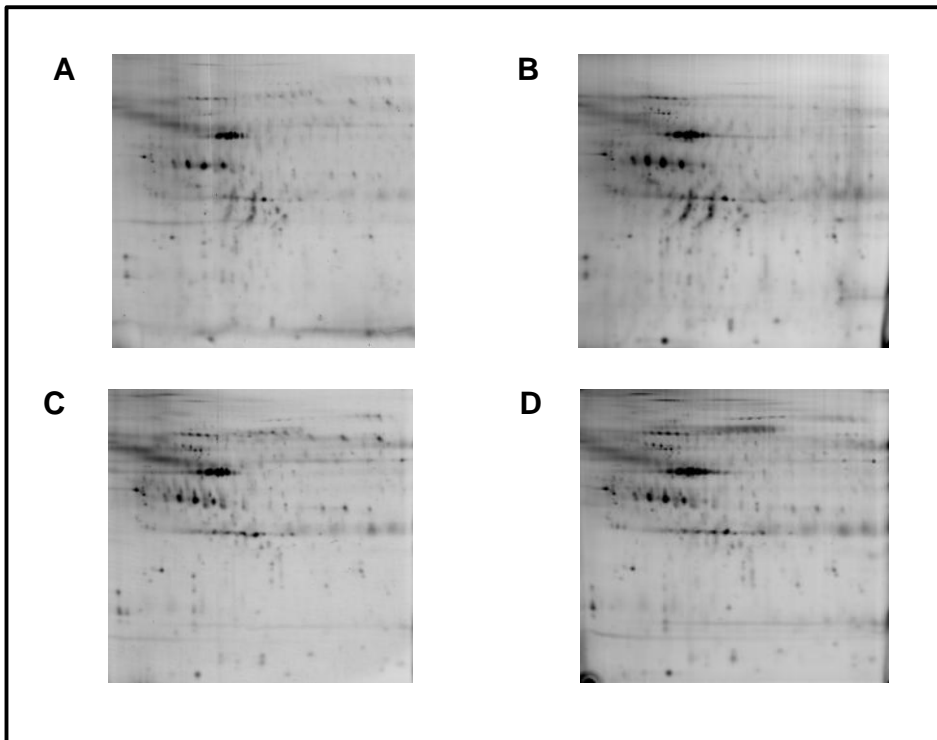


Figura 15 Evaluación de diferentes tipos de tampones de lisis. Se evaluaron varios tampones de lisis para solubilizar 4mm² de capa media de arteria aorta teñida con violeta de cresilo. Los tampones utilizados fueron: urea 7M, tiourea 2M, Tris 40mM, CHAPS 4%, DTT 0.8%, Mega 10 1%, OBG 1%, Triton X-100 0.5%, β -mercaptoetanol 1%, TBP 0.02% (A); urea 7M, tiourea 2M, Tris 30mM, CHAPS 4% (tampón recomendado para el DIGE) con 1% inhibidores de proteasas (B); con 1% SDS (C); y con 1% DTT (D).

3.3.4. Chequeo del aislamiento correcto de las capas íntima y media mediante LC-MS/MS.

La cantidad de proteína cargada en los geles 2-D DIGE, extraída de 4mm² de tejido, resultó insuficiente para realizar identificaciones mediante análisis por MALDI-TOF-TOF. Los geles, teñidos con plata tras el análisis por DIGE, presentaron escasas manchas proteicas, y sólo fue posible identificar las proteínas mayoritarias por este método, concretamente diferentes variantes de actina. Para asegurar un aislamiento adecuado de las capas, sin evidencias de contaminación entre capas ni por presencia de plasma, se analizaron extractos de proteína procedente de capa íntima y media de una arteria coronaria preaterosclerótica, aisladas por LMD, en un espectrómetro de masas LTQ. De esta manera, se identificaron 22 y 38 proteínas en los extractos de capa íntima y media, respectivamente (Tabla 2 y Tabla 3).

Código de acceso (Uni-Prot, IPI)	Proteína	Nombre del gen	Péptidos mapeados		Función (Uniprot)
			MASCOT	SEQUEST	
P62736, IPI00008603	Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	10	13	Componente citoesqueleto
P60709, IPI00021439	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	11	5	Componente citoesqueleto
P08670, IPI00418471	Vimentin	VIM	4	4	Componente citoesqueleto
A5A3E0, IPI00479743	Isoform 1 of ANKRD26-like family C member 1A	A26C1A	4	0	Proteína similar a actina
Q562R1, IPI00003269	Beta-actin-like protein 2	ACTBL2	2	3	Componente citoesqueleto
Q8TDR2, IPI00291457	Serine/threonine-protein kinase 35	STK35	0	3	Quinasa relacionada con fibras de actina en células no musculares
A6NBZ8, IPI00022434	Uncharacterized protein ALB	ALB	2	3	Proteína similar a albúmina
Q01995, IPI00216138	Transgelin	TAGLN	2	2	Entrecruzamiento de actina
P98160, IPI00024284	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein precursor	HSPG2	2	2	Componente de la membrana basal
P04792, IPI00025512	Heat shock protein beta-1	HSPB1	2	2	Chaperona
P21810, IPI00010790	Biglycan precursor	BGN	2	1	Ensamblaje de fibras de colágeno
P21333, IPI00302592	Filamin A	FLNA	2	1	Unión a actina
P12814, IPI00013508	Alpha-actinin-1	ACTN1	2	1	Entrecruzamiento de actina
P02768, IPI00745872	Serum Albumin	ALB	2	0	Proteína transportadora de del plasma
Q9C0F3, IPI00028391	Zinc finger protein 436	ZNF436	0	2	Represor transcripcional
P35749, IPI00020501	Myosin-11	MYH11	1	1	Contracción músculo liso
P02730, IPI00791534	Band 3 anion transport protein	SLC4A1	1	1	Glicoproteína más abundante de la membrana de eritrocito
O43707, IPI00013808	Alpha-actinin-4	ACTN4	1	1	Entrecruzamiento de actina
P02743, IPI00022391	Serum amyloid P-component	APCS	1	1	Lectina dependiente de calcio
P51888, IPI00020987	Prolargin precursor	PRELP	0	1	Anclaje de membrana basal l tejido conectivo
P45844-1, IPI00024089	Isoform 1 of ATP-binding cassette sub-family G member 1	ABCG1	0	1	Transportador de lípidos de macrófagos
O60784, IPI00432039	TOM1	TOM1	0	1	Tráfico intracelular

Tabla 2 Proteínas identificadas en la capa íntima de arteria coronaria preaterosclerótica

Código de acceso (Uni-Prot, IPI)	Proteína	Nombre del gen	Péptidos macheados		Función (Uniprot)
			MASCOT	SEQUEST	
P62736, IPI00008603	Actin, aortic smooth muscle	ACTA2	13	9	Componente citoesqueleto
P60709, IPI00021439	Actin, cytoplasmic 1	ACTB	9	2	Componente citoesqueleto
Q9Y427, IPI00000230	Tropomyosin 1 alpha chain isoform 2	TPM1	5	6	Componente citoesqueleto
P08670, IPI00418471	Vimentin	VIM	6	2	Componente citoesqueleto
A5A3E0, IPI00739539	ANKRD26-like family C member 1B	A26CB	5	0	Proteína similar a actina
P07951-1, IPI00013991	Isoform 1 of Tropomyosin beta chain	TPM2	3	4	Componente citoesqueleto
P21333, IPI00302592	Filamin A	FLNA	3	4	Unión a actina
Q01995, IPI00216138	Transgelin	TAGLN	4	3	Entrecruzamiento de actina
P60660-1, IPI00335168	Isoform Non-muscle of Myosin light polypeptide 6	MYL6	4	2	Cadena reguladora de la miosina
P35749, IPI00020501	Myosin-11	MYH11	3	2	Contracción de músculo liso
P35580-1, IPI00397526	Myosin-10	MYH10	3	1	Componente citoesqueleto
Q562R1, IPI00003269	Beta-actin-like protein 2	ACTBL2	3	1	Componente citoesqueleto
P07951, IPI00218820	Isoform 3 of Tropomyosin beta chain	TPM2	3	0	Componente citoesqueleto
P04908, IPI00026272	Histone H2A type 1-B/E	HIST1H2AB	2	2	Componente del nucleosoma
P02545-1, IPI00021405	Lamin-A/C	LMNA	2	1	Componente de la lámina nuclear
P17661, IPI00465084	Desmin	DES	2	0	Componente citoesqueleto
Not annotated, IPI00740545	Similar to protein expressed in prostate, ovary, testis, and placenta 2 isoform 2	LOC653269	2	0	Proteína similar a actina
P02462, IPI00844360	Collagen alpha-1(IV) chain precursor	COL4A1	2	0	Componente matriz extracelular
Q9BYX7, IPI00555900	Kappa-actin	ACTBL3	2	0	Componente citoesqueleto
P06396, IPI00377087	Gelsolin precursor	GSN	2	0	Componente citoesqueleto
P21291, IPI00442073	Cysteine and glycine-rich protein 1	CSRP1	1	1	Transducción de señales
P05976, IPI00216070	Myosin light chain 1, skeletal muscle isoform	MYL1	1	1	Cadena reguladora de la miosina
P52943, IPI00006034	Cysteine-rich protein 2	CRIP2	1	1	Metabolismo de ácidos nucleicos
P04792, IPI00025512	Heat shock protein beta-1	HSPB1	1	1	Chaperona
P37802, IPI00550363	Transgelin-2	TAGLN2	1	1	Entrecruzamiento de actina
O14950, IPI00033494	Myosin regulatory light chain MRLC2	MRLC2	1	1	Cadena reguladora de la miosina
P67936-1, IPI00010779	Isoform 1 of Tropomyosin alpha-4 chain	TPM4	0	1	Unión a actina
P68871, IPI00654755	Hemoglobin subunit beta	HBB	1	0	Transportador de oxígeno
P61978-1, IPI00216049	Isoform 1 of Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	1	0	Proteína de unión a pre-mRNA
P51911, IPI00021264	Calponin-1	CNN1	1	0	Unión a citoesqueleto
Q9BYE2, IPI00872703	Transmembrane protease, serine 13	TMPRSS13	1	0	Serín-proteasa de membrana
P18206, IPI00291175	Vinculin	VINC	1	0	Unión de filamentos de actina a membrana
P00325, IPI00473031	Alcohol dehydrogenase 1B	ADH1B	1	0	Oxidoreductasa
P06748, IPI00549248	Nucleophosmin	NPM1	1	0	Chaperonina nuclear
P24844, IPI00220278	Myosin regulatory light polypeptide 9	MYL9	1	0	Regulación de la actividad contractile del músculo liso
O15357, IPI00016932	Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 5-phosphatase 2	INPPL1	1	0	Inhibidor de la vía PI3K, regula remodelado del citoesqueleto de actina
Q9P1Z9, IPI00477055	Uncharacterized protein KIAA1529	KIAA1529	1	0	Desconocida
Q99733, IPI00017763	Nucleosome assembly protein 1-like 4	NAPIL4	1	0	Remodelado del nucleosoma

Tabla 3 Proteínas identificadas en la capa media de arteria coronaria preaterosclerótica

Con los dos listados de proteínas obtenidos por LC-MS/MS se construyeron sendos árboles de términos de la base de datos *Gene Ontology* (GO) empleando una herramienta disponible en Internet denominada *GO Tree Machine* de *Webgestalt* (<http://genereg.ornl.gov/webgestalt/>). Esta aplicación realiza un test hipergeométrico para cada una de las categorías principales de GO (función molecular, proceso biológico y componente celular), y para todas las subcategorías incluidas en estas tres. Una vez realizado el test, se destacan aquellos términos que hayan resultado significativamente representados en el listado de proteínas analizado (pvalor < 0.01), con respecto al total de genes humanos descritos. Los términos significativos serán aquellos cuya representación en el listado de proteínas sea significativamente mayor a la representación de estos en el genoma humano. Estos árboles GO se realizaron para comprobar que las proteínas identificadas en las capas íntima y media eran proteínas características de estas capas, y por lo tanto para asegurar un correcto aislamiento por LMD. Para este fin, nos centramos en la categoría GO de función molecular. Con respecto a la capa íntima, los términos GO significativos fueron: “constituyente estructural de la matriz extracelular” (pvalor = 0.002) y “constituyente estructural del citoesqueleto” (pvalor = 0.0002). En el caso de las proteínas de la capa media, los términos GO significativos fueron: “actividad motora” (pvalor = 3.86×10^{-7}), “constituyente estructural del citoesqueleto” (pvalor = 1.22×10^{-6}) y “constituyente estructural del músculo” (pvalor = 6.73×10^{-11}).

4. CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE LAS CAPAS ÍNTIMA Y MEDIA DE ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA HUMANA

4.1. Capa íntima

4.1.1. Análisis diferencial mediante DIGE de marcaje a saturación empleando DeCyder

Para realizar el análisis proteómico diferencial de la capa íntima de arteria coronaria aterosclerótica humana frente a arterias control se seleccionaron muestras procedentes de cirugías de revascularización coronaria (biopsias), así como de autopsias (necropsias). Las coronarias ateroscleróticas seleccionadas fueron aquellas que presentaban una lesión tipo “ateroma con cápsula fibrosa”, según la clasificación de Virmani y colaboradores⁸, es decir, que presentaron un núcleo lipídico bien formado, rodeado de una cápsula fibrosa, y con presencia de infiltrado inflamatorio. Se realizaron

dos grupos de muestras patológicas, uno compuesto por coronarias ateroscleróticas procedentes de biopsia (CAB), y otro por las procedentes de necropsia (CAN). En cuanto a los grupos de arterias control, se realizaron dos grupos, compuestos por arterias preateroscleróticas. En el caso de las necropsias se emplearon arterias coronarias de individuos que fallecieron por causas no cardiovasculares, y que no presentaron lesiones avanzadas en ninguna arteria, sino un estadio preaterosclerótico (coronaria preaterosclerótica de necropsia, CPN). Como controles de las muestras procedentes de biopsia se emplearon arterias radiales preateroscleróticas (RPB), obtenidas durante las operaciones de revascularización coronaria.



Figura 16 Árboles GO de las proteínas identificadas en las capas íntima y media de arteria coronaria preaterosclerótica. Con los listados obtenidos mediante análisis por LC-MS/MS de los extractos proteicos obtenidos de las capas íntima y media aisladas por LMD, se construyeron dos árboles GO con la aplicación *GO Tree Machine* de *Webgestalt*. Los términos significativamente representados (pvalor < 0.01) en cada listado, con respecto al total de genes humanos descritos, aparecen destacados en rojo. (O = “observados”, E = “esperados”, R = “ratio de enriquecimiento”, P = “pvalor”).

Utilizando el programa informático DeCyder, se realizaron los 4 posibles análisis diferenciales de abundancia de proteína entre los grupos de arterias ateroscleróticas y los grupos control. Además, se realizó también un análisis diferencial entre los dos grupos control, para evaluar posibles variaciones introducidas por el uso de diferentes tipos de arteria como control. El análisis estadístico mediante t de Student no dio lugar en este caso a diferencias significativas (pvalor \leq 0.05, ratio > 2.0 ó ratio < -2.0). En

cuanto a los análisis diferenciales entre coronarias ateroscleróticas y controles, éstos revelaron cambios significativos (empleando los mismos parámetros al anterior análisis) en 30 manchas proteicas: 6 aumentadas y 4 disminuidas en CAB vs. RPB, 2 aumentadas y 9 disminuidas en CAN vs. CPN, 2 disminuidas en CAB vs. CPN, y 3 aumentadas y 10 disminuidas en CAN vs. RPB. Seis manchas proteicas aparecen significativamente variadas en dos comparaciones, siendo la variación observada en el mismo sentido en ambas comparaciones, para todos los casos. Los resultados detallados pueden observarse en la Tabla 4.

El PCA elaborado con las manchas proteicas significativas en un Test Anova entre los 4 grupos del experimento (pvalor < 0.05), confirmó un adecuado agrupamiento de las muestras, según el diseño experimental realizado. De hecho, las muestras control quedaron manifiestamente separadas de las patológicas mediante la primera componente principal.

4.1.2. Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF-TOF

Al contener los geles del análisis una cantidad de proteína inferior a 5µg de proteína total, para poder realizar la identificación de las manchas proteicas significativas en el análisis mediante DeCyder, se debieron emplear geles de mayor contenido proteico (100-400µg), para lo cual se emplearon lisados del tejido completo de arteria coronaria aterosclerótica y arteria radial. Para facilitar el correcto reconocimiento de las manchas proteicas del subproteoma de capa íntima en el proteoma completo de las arterias, se realizaron dos geles de DIGE de marcaje a saturación en los que se marcaron con Cy5 5µg del extracto de arterias coronaria con placa y radial, y se cargaron en cada gel junto con el lisado de 4mm² de capa íntima de una mezcla de todas las muestras del estudio (similar al estándar interno del experimento), marcado a su vez con Cy3. Con ayuda del programa DeCyder, se realizó la superposición de los geles con el gel *Master* del análisis diferencial, en base a la presencia del estándar interno marcado con Cy3, y de esta manera se pudieron extrapolar las manchas proteicas significativas a los geles de tejido completo.

Las 30 manchas proteicas diferencialmente expresadas en la coronaria aterosclerótica fueron identificadas en un espectrómetro de masas MALDI-TOF-TOF, dando lugar a 13 proteínas únicas. Las proteínas que fueron encontradas en mayor

abundancia en las coronarias ateroscleróticas fueron las siguientes: cadena α -1 (VI) de colágeno (3 manchas proteicas), cada ligera de la ferritina, hemoglobina, hsp27, GRP78, proteína amiloide del suero (SaP) y SM22 α (2 manchas proteicas); las que se encontraron disminuidas fueron: anexina A4 (ANXA4), glicoproteína asociada a microfibras 4 (MFAP4) (4 manchas proteicas), cadena ligera reguladora de la miosina 2, isoforma de músculo liso (MRLC), osteoglicina (OGN) (5 manchas proteicas), transglutaminasa 2 (TG2) (3 manchas proteicas) y vimentina (5 manchas proteicas). Las manchas proteicas diferencialmente variadas y a qué proteína corresponden, se pueden observar en la Tabla 4.

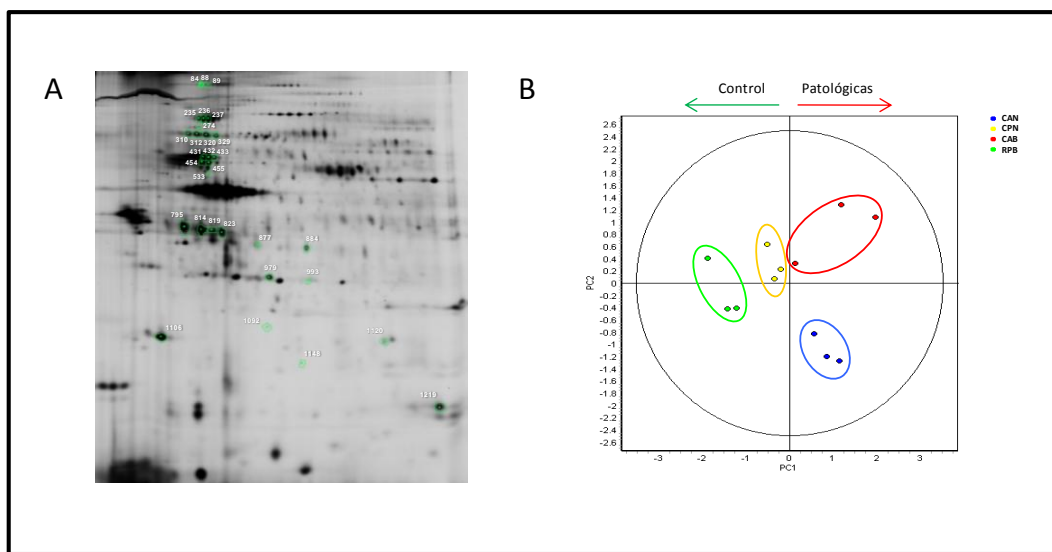


Figura 17 Resultados del análisis diferencial de abundancia de proteína de la capa íntima de arteria coronaria aterosclerótica humana. Tras realizar los 4 análisis diferenciales posibles entre los grupos de arterias ateroscleróticas frente a los grupos controles, se obtuvieron 30 manchas proteicas variadas significativamente, las cuales aparecen reflejadas en un gel 2-D DIGE del experimento (A). El PCA realizado con las manchas proteicas significativamente variadas entre todos los grupos estudiados, según el Test de Anova (p valor < 0.05), agrupó correctamente a los grupos del estudio y reflejó la variación entre los grupos patológicos y los controles, al separarlos en base a la primera componente principal (B).

4.1.3. Validación de las variaciones encontradas mediante IHQ

Para realizar la validación de 4 de las proteínas identificadas en el análisis diferencial de capa íntima de coronaria aterosclerótica, se utilizaron 6 muestras independientes de arterias coronarias con placa de ateroma, procedentes de explantes de corazón de operaciones de trasplante, y como controles se emplearon 6 arterias radiales procedentes de cirugía de revascularización coronaria. Las proteínas analizadas por IHQ fueron: cadena ligera de la ferritina, ANXA4, MRLC y vimentina. El porcentaje de inmunotinción (%IT) se calculó empleando el programa Axio Vision 4.5, según lo

descrito en la sección Material y Métodos, y se consideró una abundancia de proteína diferencialmente significativa cuando un análisis de t de Student ofreció un pvalor ≤ 0.05 . De esta manera, las diferencias observadas mediante DIGE para estas 4 proteínas fueron comprobadas por IHQ, y pueden ser observadas en las figuras. A continuación se detallan los resultados obtenidos para cada proteína, así como una descripción de los grupos celulares y regiones de la íntima que se observaron teñidos en la IHQ.

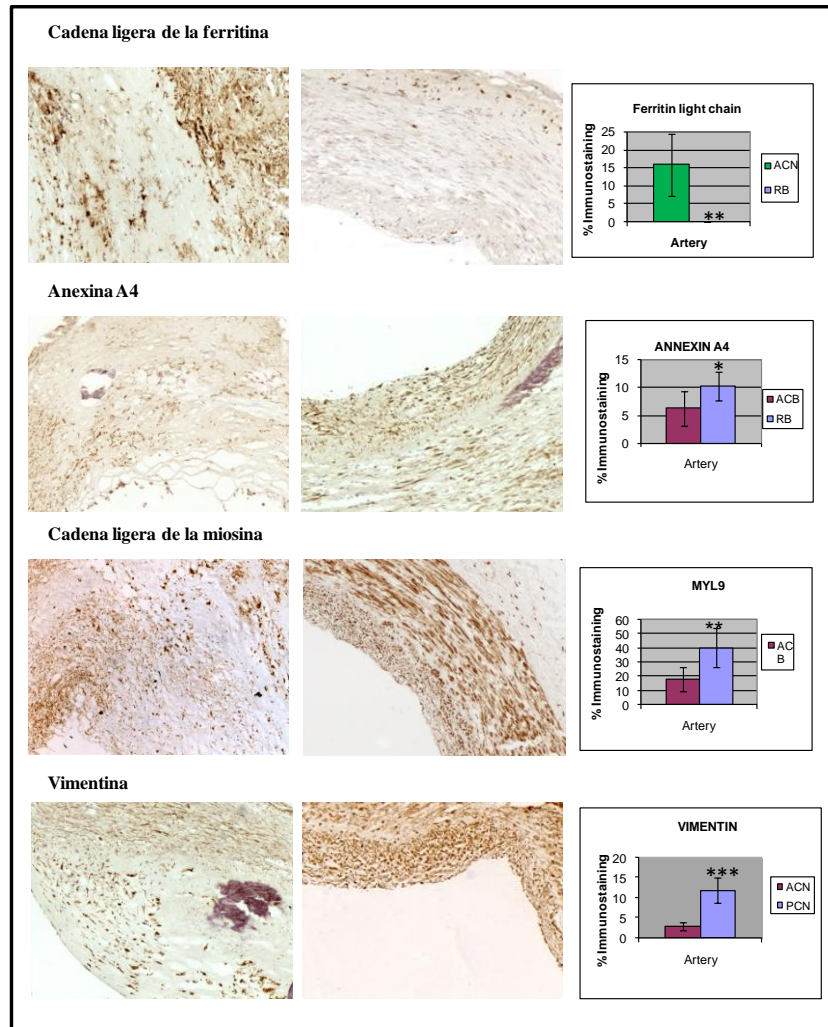


Figura 18 Inmunohistoquímica de 4 proteínas diferenciales en la capa íntima de arteria coronaria aterosclerótica humana. Se llevó a cabo la IHQ de 4 de las proteínas identificadas en el análisis diferencial de capa íntima de coronaria aterosclerótica, para lo que se utilizaron 6 muestras independientes de arterias coronarias con placa de ateroma y 6 radiales. Las valoraciones del área teñida se realizaron mediante una aplicación diseñada en el programa AxioVision 4.5.

a) Cadena ligera de la ferritina

El análisis estadístico mediante t de Student (pvalor = 0.042) llevado a cabo con los porcentajes de inmunotinción corroboró el aumento de la proteína en la capa íntima de

la coronaria aterosclerótica observado mediante DIGE de marcaje a saturación. En las preparaciones de coronaria con placa de ateroma, se observaron abundantes depósitos de la proteína, un importante número de macrófagos/células espumosas, y en menor medida VSMCs, que habrían internalizado estos depósitos. En cambio, la íntima de arteria radial presentó algunos macrófagos positivos, de manera muy esporádica.

b) Anexina A4

Se pudo comprobar mediante IHQ el descenso observado mediante DIGE en la expresión de ANXA4 en la íntima aterosclerótica de las arterias coronarias (pvalor = 0.02). Las células positivas detectadas por IHQ tanto en las coronarias con placa como en las arterias radiales fueron mayoritariamente VSMCs. También se observaron algunas ECs y menos frecuentemente macrófagos.

c) Cadena ligera reguladora de la miosina 2, isoforma de músculo liso

El análisis mediante IHQ de las variaciones observadas para la MRLC, permitió validar el descenso de esta proteína en la capa íntima de la arteria coronaria aterosclerótica (pvalor= 0.01). La expresión de esta proteína se limitó a las VSMCs, siendo acusado el descenso de estas células positivas en la placa de ateroma, fundamentalmente en el núcleo lipídico de la lesión.

Spot Num	Comparación	T-test	Ratio	Proteína identificada
84	ACB/PRB	0,022	3,49	Cadena α -1 (VI) de colágeno
88	ACB/PRB	0,017	3,31	Cadena α -1 (VI) de colágeno
	ACN/PRB	0,0025	2,07	
89	ACB/PRB	0,049	2,47	Cadena α -1 (VI) de colágeno
235	ACN/PCN	0,0048	-3,68	Transglutaminasa 2
	ACN/PRB	0,044	-4,28	
236	ACN/PCN	0,048	-2,42	Transglutaminasa 2
237	ACN/PCN	0,0083	-2,79	Transglutaminasa 2
274	ACB/PRB	0,024	2,63	GRP78
310	ACN/PRB	0,024	-2,59	Glicoproteína asociada a microfibras 4
312	ACN/PRB	0,029	-2,72	Glicoproteína asociada a microfibras 4
320	ACB/PRB	0,05	-2,81	Glicoproteína asociada a microfibras 4
	ACN/PRB	0,034	-3,15	
329	ACN/PRB	0,012	-3,73	Glicoproteína asociada a microfibras 4
431	ACN/PCN	0,02	-6,08	Vimentina
432	ACN/PCN	0,038	-5,87	Vimentina
433	ACN/PCN	0,024	-4,21	Vimentina
454	ACN/PCN	0,015	-2,93	Vimentina
	ACN/PRB	0,041	-4,03	
455	ACN/PCN	0,013	-2,11	Vimentin
533	ACB/PCN	0,012	-2,46	Vimentin
795	ACN/PRB	0,026	-2,24	Osteoglicina
814	ACB/PRB	0,043	-3,35	Osteoglicina
	ACN/PRB	0,027	-3,02	
819	ACN/PRB	0,037	-2,27	Osteoglicina
823	ACB/PRB	0,023	-3,69	Osteoglicina
	ACN/PRB	0,02	-3,45	
877	ACN/PCN	0,021	-3,99	Osteoglicina
884	ACB/PRB	0,024	-4,2	Anexina A4
979	ACB/PRB	0,035	5,62	Proteína amiloide del suero (SaP)
993	ACB/PRB	0,024	4,37	Hsp27
1092	ACN/PRB	0,025	16,04	Cadena ligera de la ferritina
1106	ACB/PCN	0,049	-4,9	Cadena ligera reguladora de la miosina 2, isoforma de músculo liso
1120	ACN/PCN	0,0059	6,99	SM22 α
1148	ACN/PRB	0,035	4,46	SM22 α
1219	ACN/PCN	0,028	4,69	Hemoglobina

Tabla 4 Diferencias significativas del análisis diferencial de capa íntima de coronaria aterosclerótica y proteínas identificadas

d) Vimentina

Seis manchas proteicas diferentes, con una menor abundancia en la capa íntima de las arterias coronarias con placa de ateroma, fueron identificadas como vimentina. (pvalor = $1.5 \cdot 10^{-7}$). La capa íntima de las arterias radiales presentó abundantes VSMCs positivas, mientras que en el caso de las íntimas ateroscleróticas de coronaria, se observó un acusado descenso en el número de estas células positivas en la cápsula fibrosa, y de manera más evidente en el núcleo lipídico.

4.2. Capa media

4.2.1. Análisis diferencial mediante DIGE de marcaje a saturación empleando DeCyder

Para el análisis mediante DIGE de marcaje a saturación de la capa media de coronarias ateroscleróticas, se emplearon las muestras procedentes de necropsia empleadas en el estudio de capa íntima comentado anteriormente. Las biopsias de arteria coronaria empleadas en el estudio de capa íntima, procedentes de operaciones de revascularización coronaria, fueron obtenidas mediante endarterectomía, lo que suponía la recogida de una cantidad variable de capa media, según la muestra, generalmente bastante limitada como para poder obtener tejido suficiente para un análisis mediante DIGE de marcaje a saturación. Por este motivo no se emplearon estas muestras en el análisis mediante DIGE de capa media, ni tampoco el grupo de biopsias control correspondiente, compuesto por arterias radiales.

El análisis diferencial de capa media llevado a cabo con el programa DeCyder entre los grupos CAN y CPN mostró 25 manchas proteicas significativamente variadas (pvalor ≤ 0.05 y ratio ≥ 2.0 ó ≤ -2.0) tras un análisis estadístico mediante t de Student. De estas 25 manchas proteicas, 7 se encontraron aumentadas y 18 disminuidas en las coronarias con placa, respecto a las coronarias preateroscleróticas. Para comprobar el correcto agrupamiento de las muestras de este experimento, se realizó un análisis estadístico mediante PCA empleando las 25 manchas proteicas diferenciales, en el que los dos grupos de estudio fueron correctamente separados por la primera componente principal.

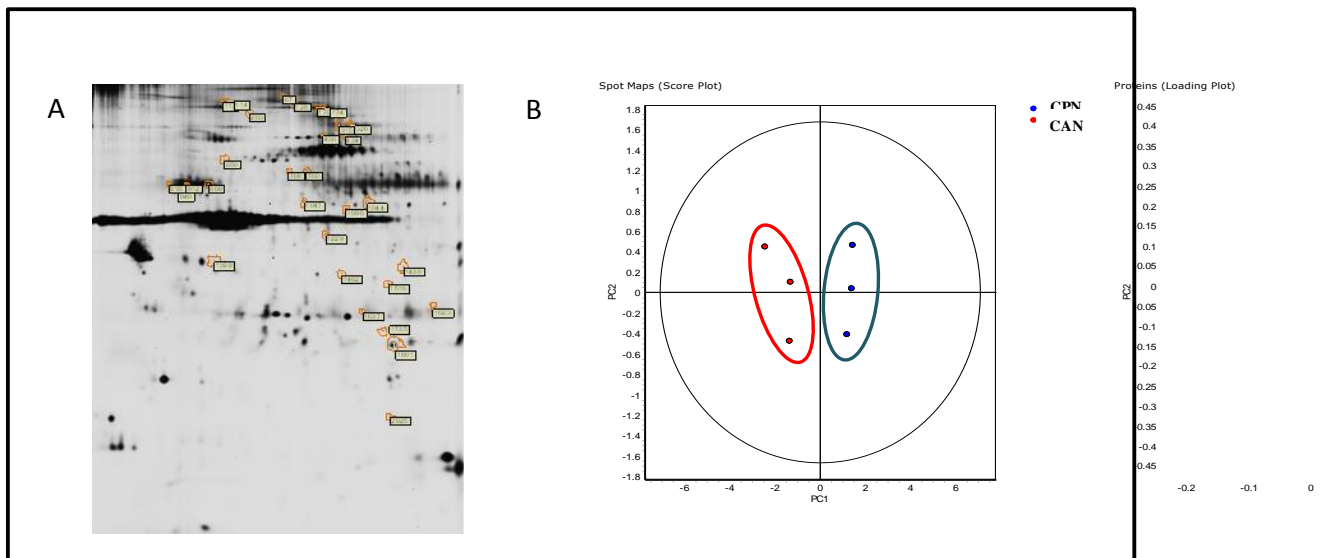


Figura 19 Resultados del análisis diferencial de abundancia de proteína de la capa media de arteria coronaria aterosclerótica humana. El análisis diferencial de capa media llevado a cabo con el programa DeCyder entre los grupos CAN y CPN mostró 25 manchas proteicas significativamente variadas. Para comprobar el correcto agrupamiento de las muestras de este experimento, se realizó un análisis estadístico mediante PCA empleando las manchas proteicas diferenciales, en el que los dos grupos de estudio fueron correctamente separados por la primera componente principal.

4.2.2. Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF-TOF

Los geles 2-D DIGE de capa íntima y media ofrecieron perfiles bastante similares, en lo que se refiere a la distribución de manchas proteicas en el gel. Esto nos permitió utilizar los geles 2-D DIGE elaborados con tejido completo y estándar interno de la capa íntima para realizar la extrapolación de las diferencias encontradas con DeCyder a los geles de tejido completo de coronaria aterosclerótica y radial, para realizar la escisión de las manchas proteicas y proceder a su identificación. De las 25 manchas proteicas halladas diferencialmente expresadas en la capa media de las arterias coronarias ateroscleróticas, 18 fueron identificados por espectrometría de masas, dando lugar a 12 proteínas únicas. Las proteínas aumentadas identificadas en la capa media de las arterias con placa son las que se citan a continuación: fosfoglicerato mutasa 1 (PGAM1), MFAP4, superóxido dismutasa extracelular [Cu-Zn] (SOD3) y triosafosfato isomerasa (TPI). Las que aparecieron disminuidas fueron: carbonil reductasa 3 (CBR3), hsp27, factor pigmentario derivado del epitelio (PEDF), filamina A (3 manchas proteicas), gelsolina (2 manchas proteicas), tubulina (3 manchas proteicas), vimentina y vinculina (2 manchas proteicas).

Master No.	T-test	Av. Ratio	Proteína
67	0,014	-4,08	Mezcla Talina 1 y Filamina A
128	0,029	-9,9	Filamina A
170	0,051	-7,9	Vinculina
174	0,029	-13,16	Vinculina
203	0,0063	-4,21	-
315	0,049	-4,2	Filamina A
320	2,80E-05	-3,28	Filamina A
430	0,023	-2,07	Gelsolina
434	0,012	-3,34	Gelsolina
650	0,037	2,12	Glicoproteína asociada a microfibras 4
888	0,04	-3,23	Vimentin
895	0,025	-3,83	Tubulin
912	0,01	-2,89	Tubulin
940	0,0029	-2,74	Tubulin
1044	0,049	-3,33	Varias proteínas
1047	0,011	-3,43	PEDF
1096	0,03	-2,82	Varias proteínas
1430	0,02	2,31	-
1462	0,037	-3,14	Carbonil reductasa 3
1516	0,018	2,54	SOD3
1623	0,0081	3,3	Phosphoglycerate mutase 1
1637	0,04	3,22	TPI
1735	0,0016	3,08	-
1801	0,033	-3,2	Hsp27
2025	0,029	3,46	-

Tabla 5 Diferencias significativas del análisis diferencial de capa media de coronaria aterosclerótica y proteínas identificadas

4.3. OPTIMIZACIÓN DEL PROTOCOLO DE OBTENCIÓN DEL SECRETOMA DE ARTERIA CORONARIA

4.4. Aplicación del protocolo de obtención de secretoma de arteria carótida a la obtención de secretoma de arteria coronaria

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio, se estableció un protocolo para la obtención del secretoma de arteria carótida aterosclerótica para análisis proteómico⁵⁶. Por lo tanto, se empleó dicho protocolo (protocolo A) como punto de partida y se ensayó su posible aplicación a la obtención del secretoma de arteria coronaria con placa de ateroma. La cantidad de proteína obtenida tras 24 horas de cultivo, al tratarse de una arteria de pequeño calibre como es la coronaria, resultó algo escasa, especialmente para el caso de las biopsias, cuyo tamaño es bastante inferior al de

las necropsias. Se obtuvo un gel 2-DE de buena resolución a partir del secretoma de una coronaria aterosclerótica de gran tamaño, y se escindieron 69 manchas proteicas de las más abundantes, tratando de cubrir la mayoría de la superficie del gel, y se llevó a cabo su identificación mediante MALDI-TOF-TOF.

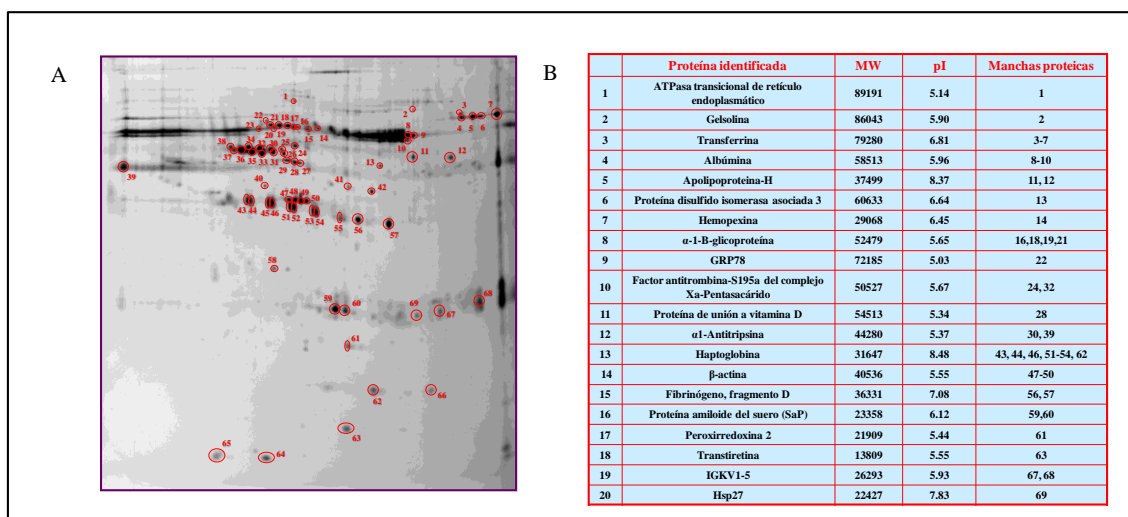


Figura 20 Mapa 2-DE de secretoma de coronaria aterosclerótica obtenido con el protocolo de carótida, y proteínas identificadas en el gel. Empleando el protocolo de obtención de secretoma previamente utilizado en estudios de carótida aterosclerótica, se obtuvo el secretoma de una arteria coronaria con placa de ateroma, y se analizó mediante 2-DE y tinción con plata. Se seleccionaron 69 manchas proteicas de las más intensas (A), a lo largo de todo el gel, y se identificaron por MALDI-TOF-TOF. Se identificaron 45 de estas manchas proteicas, correspondiendo a 20 proteínas únicas (B).

Tras realizar la identificación empleando el motor de búsqueda MASCOT, en aquellos casos en que la proteína asignada con mayor puntuación correspondía con una queratina se consideró errónea ante el alto riesgo de que se tratara de una contaminación. De las 69 manchas proteicas enviadas a identificar, 45 fueron correctamente identificadas dando lugar a 20 proteínas únicas. Las proteínas identificadas fueron las que se detallan a continuación: ATPasa transicional de retículo endoplasmático, gelsolina, transferrina (5 manchas proteicas), albumina (3 manchas proteicas), apolipoproteína-H (2 manchas proteicas), proteína disulfido isomerasa asociada 3, hemopexina, α -1-B-glicoproteína (4 manchas proteicas), GRP78, factor antitrombina-S195a del complejo Xa-Pentasacárido (2 manchas proteicas), proteína de unión a vitamina D, α 1-antitripsina (2 manchas proteicas), haptoglobina (8 manchas proteicas), β -actina (4 manchas proteicas), fibrinógeno fragmento D (2 manchas proteicas), proteína amiloide del suero (SaP) (2 manchas proteicas), peroxirredoxina 2, transtiretina, IGKV1-5 (2 manchas proteicas) y hsp27.

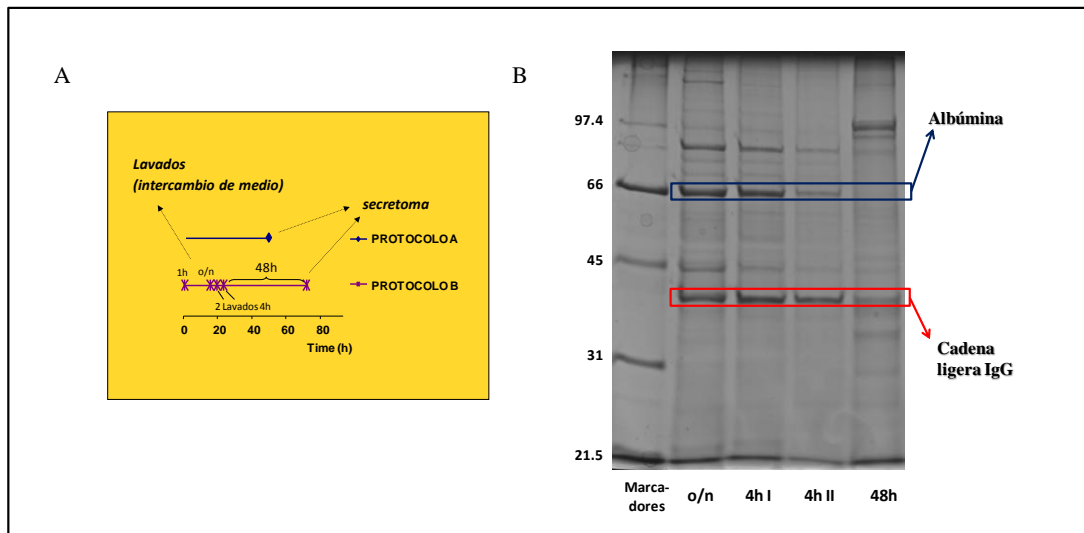


Figura 21 Protocolos de obtención de secretoma ensayados y disminución de la albúmina con los lavados en el Protocolo B. Se ensayaron dos protocolos de obtención del secretoma (A), el protocolo A, basado en los estudios previos realizados con arteria carótida⁵⁶, en el que se recoge el secretoma directamente tras 24h de cultivo; y el protocolo B, basado en el protocolo de Alvarez-Llamas y cols.⁵⁹ para el secretoma de tejido adiposo, en el que se realizaron 4 intercambios de medio a los siguientes tiempos: 1h, al día siguiente, y 2 lavados de 4h tras el anterior; tras lo cual se recogió el sobrenadante tras 48h de cultivo. El análisis por SDS-PAGE de los sobrenadantes del cultivo en los diferentes intercambios de medio realizados en el protocolo B, mostró un descenso de las 2 proteínas mayoritarias del plasma en la muestra, albúmina e IgG (B).

4.5. Evaluación del protocolo de intercambios de medio para la obtención del secretoma de arteria coronaria aterosclerótica

Ante la alta frecuencia de proteínas mayoritarias del plasma entre las identificaciones llevadas a cabo en el secretoma empleando el protocolo A, se ensayó un segundo método de obtención del secretoma (protocolo B), basado en el protocolo de Alvarez-Llamas y colaboradores⁵⁹ para el secretoma de tejido adiposo, en el que se realizaron 4 intercambios de medio a los siguientes tiempos: 1h, al día siguiente, y 2 lavados de 4h tras el anterior; tras lo cual se recogió el sobrenadante tras 48h de cultivo (Figura 21A). La eliminación de posibles contaminantes procedentes del plasma se evaluó mediante geles SDS-PAGE y 2-DE. En los geles unidimensionales (Figura 21B) se observó una disminución importante de las dos proteínas mayoritarias de plasma, albúmina e IgG, a lo largo del protocolo, hasta valores mucho menores en el caso de la IgG, llegando en el caso de la albúmina a resultar la banda inapreciable en el carril correspondiente al secretoma. Además, el número de bandas apreciado en los carriles del gel se incrementa con cada intercambio de medio, llegando a alcanzar su máximo en el del secretoma, lo que indica un enriquecimiento de la muestra en proteínas secretadas a consecuencia de la disminución de las proteínas contaminantes del plasma. En los

geles 2-DE se aprecia un efecto similar (Figura 22), con un aumento progresivo en el número de manchas proteicas de los geles, alcanzando en el gel del secretoma el valor máximo. Las cadenas de manchas proteicas procedentes de la albúmina y las cadenas pesada y ligera de la albúmina disminuyen en abundancia en los geles apareciendo en el gel de secretoma con intensidades menores a gran número de manchas proteicas del gel.

Ante la posibilidad de que el aumento de los tiempos de cultivo de la arteria supusiese la degradación del tejido, lo que enmascararía los resultados de secreción de proteína, se valoró la necrosis del tejido a lo largo del cultivo, mediante la medición de LDH en el sobrenadante. Esta medición se hizo de forma paralela en una muestra aterosclerótica de aorta y en una no afectada, de mamaria. Los resultados obtenidos (Figura 23) mostraron un descenso de la LDH a lo largo del cultivo, lo que confirma la buena conservación del tejido. El primer intercambio de medio (el de 1h) es el que presentó mayor cantidad de LDH en ambos casos y, según se realizaron sucesivos intercambios de medio, la LDH se fue eliminando de manera similar para ambas muestras.

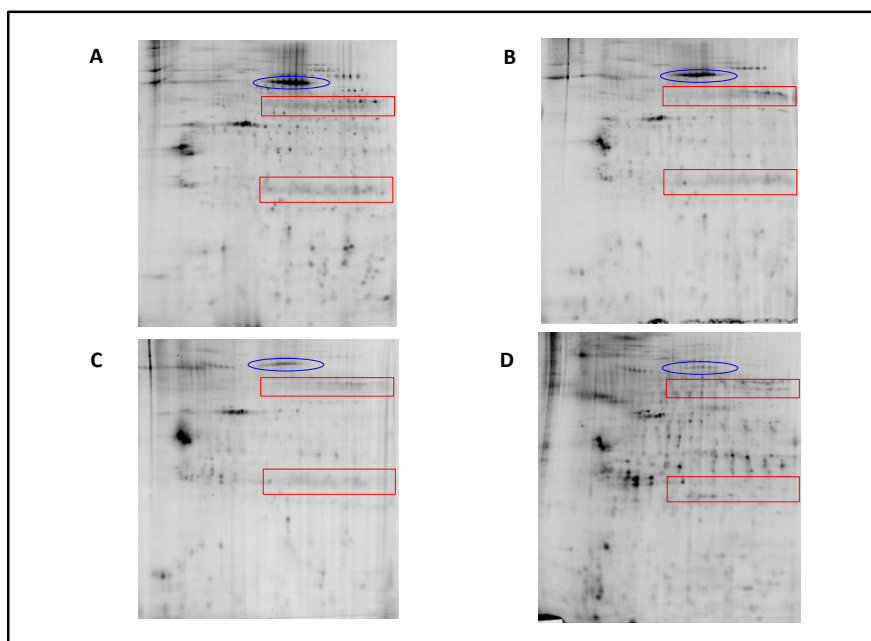


Figura 22 Evolución del perfil bidimensional del sobrenadante del cultivo de arteria coronaria en los diferentes intercambios de medio y recogida final del secretoma en el protocolo B. Para evaluar el efecto de los intercambios de medio incluidos en el protocolo B, se realizaron geles 2-DE con el sobrenadante del cultivo en cada punto del protocolo (A, intercambio 1h; B, intercambio al día siguiente; C, primer intercambio 4h; D, segundo intercambio 4h). Se observó una clara evolución en el patrón de manchas proteicas según se introducía mayor número de intercambios de medio, algo que se puede constatar claramente si nos fijamos en la disminución de la abundancia de la cadena de manchas proteicas de la albúmina (elipse azul) y en las de las cadenas pesada (rectángulo rojo superior) y ligera (rectángulo rojo inferior) de la inmunoglobulina G.

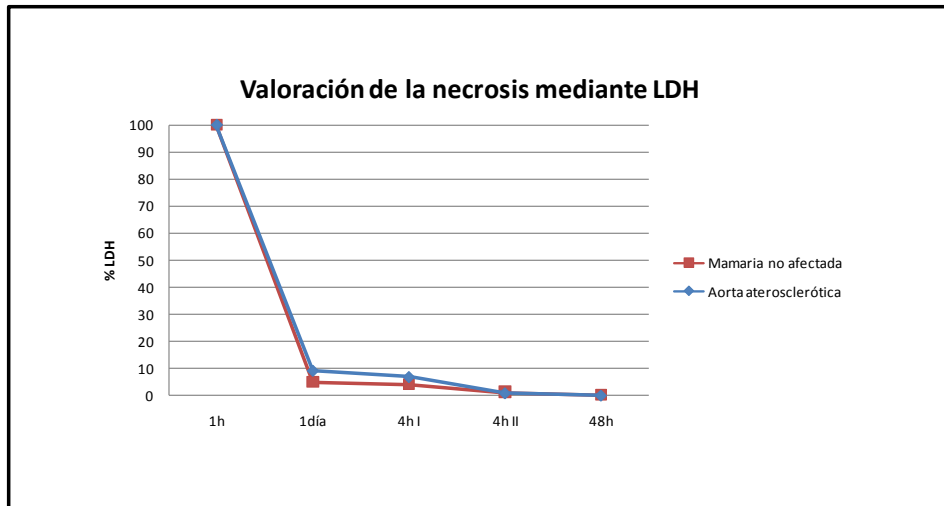


Figura 23 Valoración de la necrosis durante el cultivo de obtención del secretoma mediante la medición del nivel de LDH. Para comprobar que el empleo de tiempos de cultivo mayores a los ensayados en un principio no provocaban la degradación del tejido, se midió la cantidad de LDH en los sobrenadantes del cultivo en los diferentes tiempos de intercambio de medio para una muestra de aorta aterosclerótica y una de mamaria no afectada. Los valores obtenidos se expresaron en cantidad de LDH/hora, y se refirieron al valor máximo de absorbancia/hora de todas las medidas, que se consideró el 100%, y que en ambos casos fue el lavado 1h.

5. CARACTERIZACIÓN DEL SECRETOMA DE LA ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA HUMANA

5.1. Aplicación del marcaje isotópico al análisis proteómico del secretoma de arteria coronaria aterosclerótica

Con el fin de poder diferenciar las proteínas secretadas de las provenientes de contaminación por plasma en los secretomas de arteria coronaria, se empleó un método de marcaje isotópico con aminoácidos Lys y Arg pesados, basado en la técnica SILAC.

Al realizar el análisis con el programa MSQuant, se observó una tendencia general de no incorporación del marcaje en las proteínas del secretoma de arteria coronaria con placa, y arterias control (radial). A pesar de ello, una serie de péptidos de determinadas proteínas mostraron la presencia de la forma pesada (marcada) en el espectro de MS/MS, lo que permitió considerar a estas proteínas como secretadas por el tejido, y descartar que fueran contaminantes del plasma. Estas proteínas aparecen listadas en la Tabla 6, y los espectros de MS/MS de mayor interés, tanto de coronaria aterosclerótica como los de una arteria sin placa de ateroma (radial), pueden verse en las Figura 24 y Figura 25, respectivamente.

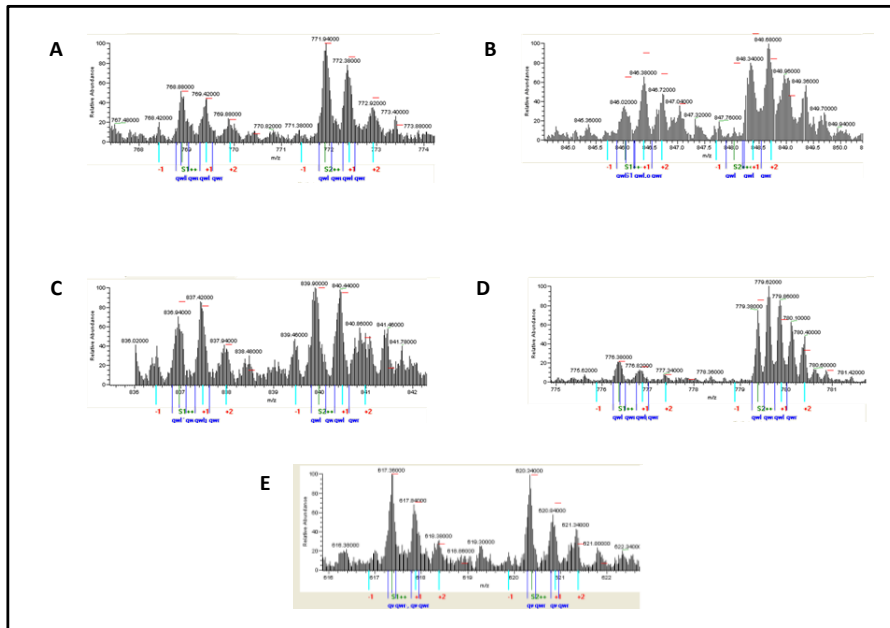


Figura 24 Marcaje isotópico en el secretoma de una arteria coronaria aterosclerótica. Se suplementó con Lys y Arg marcadas el medio de cultivo en el que se mantuvieron las muestras de arteria coronaria aterosclerótica. Tras analizar el secretoma por LC-MS/MS en un LTQ, se observó una baja eficiencia de marcaje en la mayoría de proteínas identificadas. A pesar de ello, algunas proteínas presentaron marcaje en los péptidos detectados, que puede ser visualizado en los espectros de MS/MS: apo E (A), filamina A (B), miosina 9 (C), miosina 11 (D), malato deshidrogenasa (E).

Muestra	Proteína
Coronaria aterosclerótica	Actina citoplasmática 1
Coronaria aterosclerótica	Apolipoproteína E
Coronaria aterosclerótica	Cadena β de fibrinógeno
Coronaria aterosclerótica	Filamina A
Coronaria aterosclerótica	Malato deshidrogenasa mitocondrial
Coronaria aterosclerótica	Miosina 9
Coronaria aterosclerótica	Miosina 11
Coronaria aterosclerótica	Proteína del core de versican
Coronaria aterosclerótica	Tenascina
Radial	Cadena β de la tropomiosina
Radial	Cadena ligera reguladora de la miosina 2, isoforma de músculo liso
Radial	Fibronectina
Radial	Lamin A/C
Radial	Malato deshidrogenasa mitocondrial
Radial	Miosina 11
Radial	Proteoglicano heparan sulfato específico de la membrana basal
Radial	SM22 α

Tabla 6 Proteínas con péptidos que incorporaron el marcaje según resultado de MS/MS

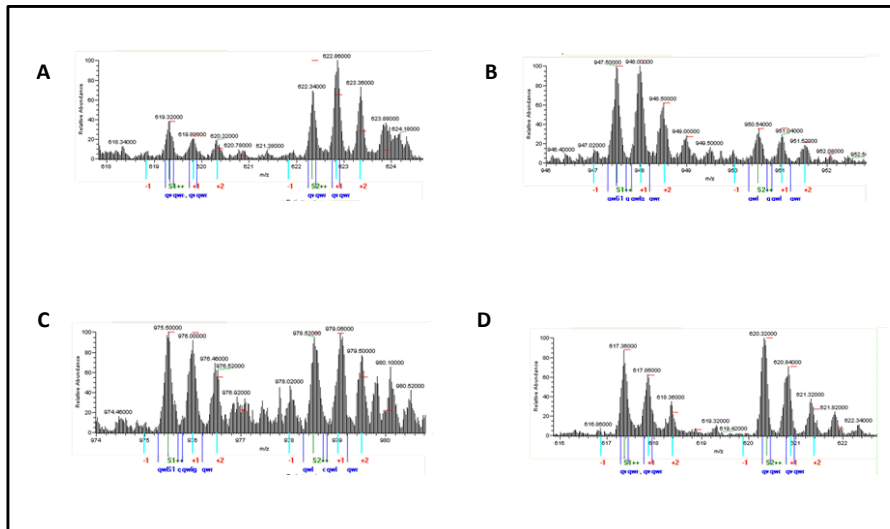


Figura 25 Marcaje isotópico en el secretoma de una arteria sin placa de ateroma. Se añadió Lys y Arg marcadas al medio de cultivo en el que se mantuvieron las muestras de arteria radial. Al igual que se observó en el caso de la coronaria aterosclerótica, tras analizar el secretoma en un LTQ, se observó una baja eficiencia de marcaje en la mayoría de proteínas identificadas. Los espectros de MS/MS de algunas proteínas que presentaron marcaje en los péptidos detectados, se muestran en la figura: MRLC (A), Lamin A/C (B), miosina 11 (C), malato deshidrogenasa (D).

5.2. Análisis diferencial de secreción de coronaria aterosclerótica por 2-D DIGE

5.2.1. Análisis diferencial mediante DIGE de marcaje a saturación empleando DeCyder

Como primera aproximación al estudio de secretoma de arteria coronaria aterosclerótica, se realizó un análisis diferencial de abundancia de proteína mediante geles 2-DE. Para este análisis se emplearon secretomas procedentes de biopsias de arteria coronaria con placa de ateroma y como controles, arterias mamarias, ambas procedentes de operaciones de revascularización coronaria. Tras realizar la cuantificación mediante Bradford de los secretomas obtenidos, se observó que la cantidad de proteína era bastante baja (20-50µg) como para realizar un experimento de 2-DE convencional, incluso un experimento de DIGE de marcaje mínimo. Por esta razón, decidimos emplear la técnica de DIGE de marcaje a saturación para este experimento, debido a que requiere únicamente 5µg de proteína para el análisis. Al tratarse de dos grupos de análisis, se realizó un análisis estadístico mediante *t de Student* en el que se consideraron significativas las variaciones que cumpliesen el siguiente criterio: $p\text{valor} \leq 0.05$ y ratio de variación ≥ 2.0 ó ≤ -2.0 . De esta manera se detectaron 42 manchas proteicas con variación significativa.

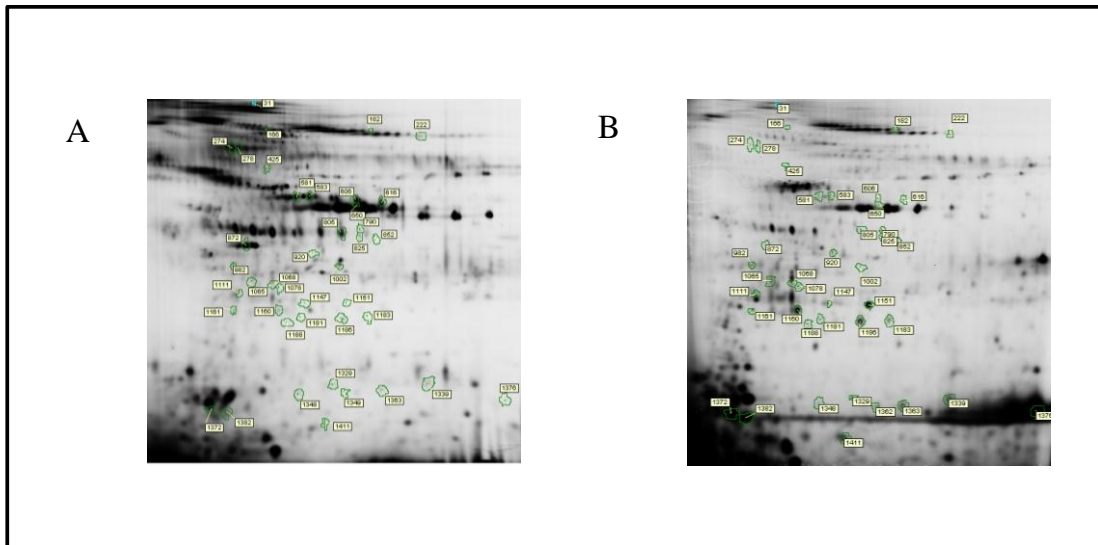


Figura 26 Geles 2-D DIGE de secretoma de arterias coronaria aterosclerótica y mamaria con las manchas proteicas significativamente variadas. Se realizó un análisis diferencial de abundancia de proteína mediante DIGE de marcaje a saturación para estudiar el secretoma de la arteria coronaria aterosclerótica. Las manchas proteicas diferencialmente secretadas por la coronaria con placa de ateroma aparecen marcadas en dos geles tipo de dicha arteria (A) y de la arteria control, mamaria (B).

En el análisis PCA elaborado con las manchas proteicas significativamente variadas en el análisis estadístico de t de Student, se observó la separación de los dos grupos de estudio mediante la primera componente principal (Figura 27A). También se realizó un análisis de agrupamiento jerárquico que separó a ambos grupos en base a un similar perfil de secreción de dichas manchas proteicas (Figura 27B). Ambos análisis estadísticos permitieron asegurar el correcto diseño experimental de los grupos del estudio.

5.2.2. Identificación de las manchas proteicas diferenciales mediante MALDI-TOF-TOF

La identificación de las manchas proteicas diferencialmente secretadas por la arteria coronaria fue realizada empleando un gel compuesto por una mezcla de secretomas de coronaria aterosclerótica, compuesto por un total de 380 μg de proteína, para así tratar de identificar el mayor número de manchas proteicas posibles. De las 42 manchas proteicas sólo fue posible identificar 19, debido a que la mayoría de las manchas proteicas eran de muy baja intensidad. Una de estas manchas proteicas contenía una mezcla de dos proteínas, filamina A y miosina 11, lo que hizo imposible detectar a cuál de ellas se debía la variación. Las otras 18 se correspondieron con 8 proteínas únicas. Cinco de esas proteínas se encontraron aumentadas: actina citoplasmática 1 (2 manchas

proteicas), actina de músculo liso aórtico (5 manchas proteicas), anexina A5, cadena β de fibrinógeno (2 manchas proteicas), lumican (3 manchas proteicas); y 3 disminuidas: filamina A (3 manchas proteicas), cadena ligera de la miosina 6B (2 manchas proteicas) y hsp27.

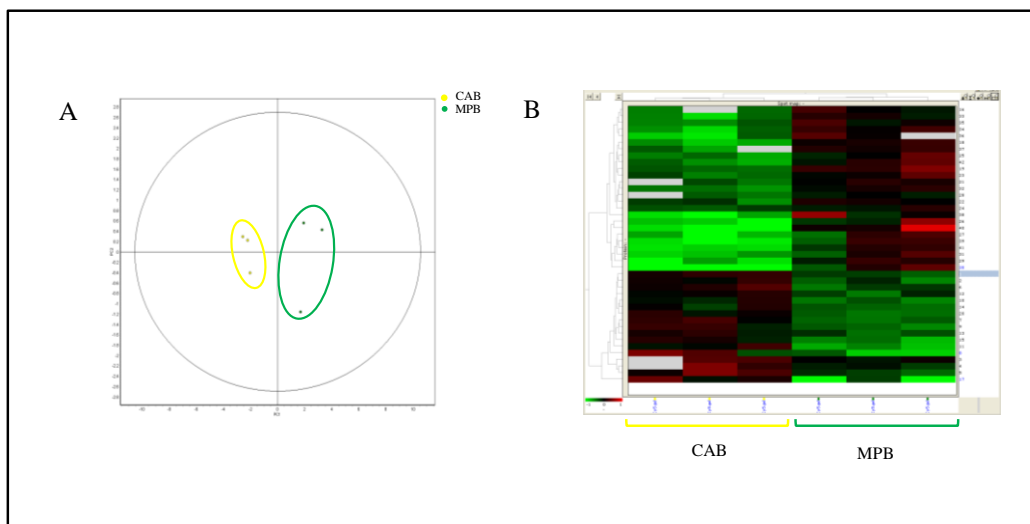


Figura 27 Análisis estadístico de los resultados del estudio diferencial con DeCyder mediante PCA y agrupamiento jerárquico. Se realizaron análisis estadísticos mediante PCA y agrupamiento jerárquico empleando las proteínas significativas en el análisis diferencial de abundancia de proteína. Ambos análisis permitieron asegurar la correcta asignación de los grupos, según experimental propuesto.

5.3. Caracterización del secretoma de arteria coronaria aterosclerótica y análisis cuantitativo mediante conteo espectral

Los datos obtenidos tras analizar los secretomas en el espectrómetro de masas *OrbiTrap*, fueron tratados con el programa informático Scaffold. Con este programa realizamos el filtrado de las identificaciones con el fin de obtener un listado de todas aquellas que aparecieron de manera representativa en el secretoma de al menos uno de los grupos analizados. Se consideró una probabilidad mínima de identificación del 80% tanto para la proteína en conjunto como para cada uno de los péptidos. Siempre que una proteína hubiera sido identificada dentro de ese umbral de probabilidad, en al menos una réplica de las tres que componen cada grupo, dicha proteína fue considerada como presente en el secretoma. Así se identificaron un total de 792 proteínas. Si aplicamos un filtro tal que sólo se consideren aquellas proteínas que hayan sido identificadas en un mínimo de dos de las tres réplicas, en al menos uno de los grupos, el listado se reduce a 201 proteínas. Se consideraron, por lo tanto, como proteínas presentes en el secretoma de los grupos analizados a aquellas proteínas que no fueron eliminadas con alguno de

estos dos filtros. El listado de las proteínas presentes en los secretomas de arteria coronaria aterosclerótica, preaterosclerótica y mamaria se puede observar en la Tabla 8.

Master No.	T-test	Ratio	Proteína
31	0,0017	2,73	
166	0,031	2,58	Mezcla filamina A y miosina 11
182	0,0079	2,09	
222	0,037	3,17	
274	0,02	3,82	Lumican
278	0,016	2,97	Lumican
425	0,0037	3,7	
581	0,047	7,51	Actina citoplasmática 1
583	0,014	3,55	Actina citoplasmática 1
606	0,017	2,68	Cadena β de fibrinogeno
616	0,0046	5,21	Cadena β de fibrinogeno
650	0,046	2,09	Cadena β de fibrinogeno
790	0,036	2,28	Actina de músculo liso aórtico
805	0,043	2,35	Actina de músculo liso aórtico
825	0,0092	3,88	Actina de músculo liso aórtico
852	0,037	-3,48	
872	0,048	6,97	Anexina A5
920	0,00086	-6,23	
982	0,0036	-5,15	
1002	0,0042	2,97	Actina de músculo liso aórtico
1065	0,017	-2,84	Filamina A
1068	0,036	-2,34	
1078	0,022	-3,54	
1111	0,034	-2,03	
1147	0,027	-4,55	Filamina A
1151	0,025	-12,84	
1160	0,036	-7,82	
1161	0,015	-2,17	
1181	0,0053	-8,7	Filamina A
1183	0,0052	-22,06	
1186	0,028	-6,74	
1188	0,0018	-3,69	
1329	0,018	-4,04	Hsp27
1339	0,009	-5,39	
1348	0,013	-3,73	
1349	0,039	-6,89	
1362	0,014	-4,16	
1363	0,019	-13,84	
1372	0,0092	-11,29	Cadena ligera de la miosina 6
1376	0,0085	-39,41	
1382	0,0023	-8,68	Cadena ligera de la miosina 6
1411	0,013	-5,22	

Tabla 7 Manchas proteicas significativamente secretadas por la arteria coronaria aterosclerótica y proteínas a las que corresponden, cuando la identificación fue posible

Proteínas	Péptidos en grupo M	Péptidos en grupo M	Péptidos en grupo M	Péptido totales
smooth muscle myosin heavy chain 11 isoform SM1	110	120	123	583
fibronectin 1 isoform 1 preproprotein	86	76	131	455
filamin A	104	83	102	476
beta-myosin heavy chain	0	78	10	166
actinin, alpha 1	51	42	41	227
myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	31	35	23	155
vinculin	45	20	17	147
gelsolin	31	17	21	117
titin isoform novex-1	3	84	4	178
annexin 5	17	6	29	75
actin, alpha, cardiac muscle precursor	23	13	17	89
chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	13	11	14	62
vimentin	32	17	16	114
tropomyosin 1 alpha chain isoform 2	30	11	13	95
annexin A2	17	4	26	68
myosin, heavy polypeptide 10, non-muscle	17	31	16	112
alpha 3 type VI collagen isoform 1 precursor	5	19	31	79
actinin, alpha 4	21	15	18	90
collagen, type XIV, alpha 1	25	19	19	107
tropomyosin 2 (beta) isoform 2	17	7	9	57
osteoglycin preproprotein	9	7	9	41
lumican	11	6	12	46
actinin, alpha 2	0	15	4	34
desmin	2	10	8	32
keratin 1	14	14	17	73
phosphoglucomutase 5	17	3	3	43
fibrinogen, beta chain preproprotein	7	10	22	56
beta actin	11	5	8	40
fibrinogen, gamma chain isoform gamma-A precursor	3	13	21	53
mitochondrial malate dehydrogenase precursor	12	6	6	42
prolyl 4-hydroxylase, beta subunit	13	5	3	39
gamma filamin	2	21	3	49
EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1 precursor	5	3	4	20
calreticulin precursor	15	1	3	35
transforming growth factor, beta-induced, 68kDa; corneal dystrophy	12	3	12	42
protein disulfide isomerase-related protein	13	4	3	37
lamin A/C isoform 1 precursor	20	7	3	57
hexokinase 1 isoform HKI-ta/tb	3	4	3	17
osteoblast specific factor 2	7	3	11	31
keratin 9	11	5	5	37
ras suppressor protein 1	10	3	3	29
superoxide dismutase 3	14	0	5	33
complement component 1	3	3	4	16
albumin precursor	9	2	8	30
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	11	4	6	36
tropomyosin 1 (alpha)	10	1	3	25
myosin heavy chain 6	0	4	1	9
keratin 10	4	10	6	34
spectrin, alpha, non-erythrocytic 1 (alpha-fodrin)	8	8	3	35
tenascin C (hexabrachion)	0	0	20	20
annexin I	4	1	8	18
carbamoyl-phosphate synthetase 1, mitochondrial	11	3	1	29
serum amyloid P component precursor;	6	1	9	23
IQ motif containing GTPase activating protein 1	5	3	5	21

Proteínas	Péptidos en grupo M	Péptidos en grupo M	Péptidos en grupo M	Péptido totales
heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa), BiP	4	4	1	17
vitronectin precursor	1	3	4	12
Lutheran blood group (Auberger b antigen included)	5	1	5	17
manganese superoxide dismutase isoform A precursor	3	3	1	13
heat shock 27kDa protein 1	4	4	4	20
anti-RhD monoclonal T125 gamma1 heavy chain	3	2	5	15
P3ECSL; glucocorticoid-inducible protein; oxidized-LDL responsive gene 2	4	1	3	13
caldesmon 1 isoform 1	3	1	5	13
hemoglobin, alpha 2	1	2	1	7
heat shock 60kDa protein 1 (chaperonin)	6	2	0	16
fibrinogen, alpha chain isoform alpha preproprotein	1	4	8	18
SM22 α	4	2	1	13
keratin 12 (Meesmann corneal dystrophy)	2	2	2	10
alpha 1 type XVIII collagen isoform 1 precursor	5	0	7	17
thrombospondin 1 precursor	1	1	8	12
keratin 2a	3	3	5	17
heparan sulfate proteoglycan 2	4	4	3	19
peroxiredoxin 2 isoform a	3	0	3	9
complement component 9	0	0	7	7
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3	1	1	9
Glutamate dehydrogenase 2	8	0	1	17
ABI gene family, member 3 (NESH) binding protein	5	1	2	14
keratin 6B	1	4	0	10
glycine N-methyltransferase	2	1	1	7
fibulin 1 isoform D	3	2	2	12
biglycan	0	2	3	7
fibulin 1 isoform C precursor	5	1	1	13
transglutaminase 2 isoform a	1	3	2	10
spectrin, beta, non-erythrocytic 1 isoform 2	1	8	0	18
galectin 3 binding protein	4	0	4	12
tropomyosin 4	2	1	1	7
Arg/Abl-interacting protein 2 isoform 2	3	1	2	10
Microfibril-associated glycoprotein 4 precursor	4	0	3	11
fibulin 5 precursor	5	1	1	13
aldolase B	1	2	2	8
carboxylesterase 1 isoform c precursor	6	0	0	12
cytochrome c	4	3	0	14
hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 2 (mitochondrial)	1	2	1	7
protocadherin Flamingo 2	1	2	1	7
hypothetical protein LOC651928	1	0	4	6
collagen, type XII, alpha 1 long isoform precursor	0	0	6	6
myomesin family, member 3	0	5	0	10
annexin VI isoform 1	0	0	3	3
collagen, type XXIV, alpha	3	0	1	7
fibulin 2 precursor, isoform a	1	1	3	7
alpha 2 type IV collagen preproprotein; canstatin	0	2	1	5
alcohol dehydrogenase 1	3	0	0	6
complement component 1, q subcomponent, B chain precursor	0	0	3	3
peroxiredoxin 3 isoform b	3	1	1	9
phosphodiesterase 4D interacting protein isoform 5	1	1	2	6
vitamin D-binding protein precursor	2	0	2	6
lactate dehydrogenase C	2	1	1	7
complement component 3 precursor	1	0	5	7

Proteínas	Péptidos en grupo M	Péptidos en grupo M	Péptidos en grupo M	Péptido totales
dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 1B isoform a	2	1	2	8
titin isoform N2-A	3	1	1	9
keratin 16	1	3	2	10
hepatoma up-regulated protein	1	2	1	7
dihydrolipoamide dehydrogenase precursor	2	2	0	8
alpha-tubulin 8	2	0	1	5
aldehyde dehydrogenase 2, mitochondrial	2	1	1	7
Ig alpha-1 chain C region isoform 1	0	0	5	5
tenascin XB isoform 1	1	3	2	10
aspartate aminotransferase 2 precursor	2	2	2	10
Temporarily Assigned Gene name family member (tag-58)	2	1	1	7
hypothetical protein LOC26074	2	1	1	7
peroxiredoxin 1	4	2	0	12
histone H1	2	0	0	4
vacuolar protein sorting 54 isoform 1	2	0	1	5
CDC23 (cell division cycle 23, yeast, homolog)	1	1	1	5
cytochrome P450, subfamily IIS, polypeptide 1	2	1	0	6
smooth muscle and non-muscle myosin alkali light chain isoform 1	1	0	2	4
oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoamide) isoform 1 precursor	2	0	1	5
decorin variant C	2	0	0	4
ponsin; SH3-domain protein 5	2	0	0	4
KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 2	1	1	1	5
scinderin; adseverin	1	1	1	5
Rho guanine nucleotide exchange factor 3; RhoGEF protein; 59.8 kDa protein; exchange factor found in platelets and leukemic and neuronal tissues, XPLN	1	1	0	4
thioredoxin domain containing 5 isoform 1	3	0	0	6
moesin	2	0	1	5
glucose regulated protein, 58kDa; glucose regulated protein, 58kD	3	0	0	6
transmembrane protease, serine 9	0	2	0	4
H1 histone family, member 1	1	0	0	2
mirror-image polydactyly gene 1	0	1	0	2
intracellular membrane-associated calcium-independent phospholipase A2 gamma	2	1	0	6
elastin microfibril interfase located protein	2	0	2	6
hect domain and RLD 2	1	0	2	4
pericentrin (kendrin)	1	1	1	5
catalase	0	1	2	4
glutamate receptor KA2 precursor	1	0	2	4
serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 1	0	0	3	3
ETAA16 protein	1	1	1	5
AHNAK nucleoprotein isoform 1	2	1	0	6
dynein, cytoplasmic, heavy polypeptide 1	2	1	0	6
lysozyme precursor	1	0	1	3
peptidylprolyl isomerase B (cyclophilin B)	3	0	0	6
dynein, axonemal, heavy polypeptide 8	2	0	0	4
hypothetical protein FLJ40629	0	1	1	3
acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	1	1	0	4
cell division cycle protein 27	1	0	1	3
ARP3 actin-related protein 3 homolog	1	0	1	3
ubiquitin and ribosomal protein S27a precursor	0	1	1	3
thioredoxin peroxidase	2	0	0	4
elastin microfibril interfacer 2	2	0	0	4
PTPRF interacting protein alpha 1 isoform a	0	2	0	4
cartilage linking protein 1	0	1	1	3

Proteínas	Péptidos en grupo M	Péptidos en grupo M	Péptidos en grupo M	Péptido totales
fibronectin 1 isoform 2 preproprotein	0	1	1	3
neurofilament 3 (150kDa medium)	0	2	0	4
SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin a5	1	0	1	3
3-oxoacid CoA transferase	1	1	1	5
SMC1 structural maintenance of chromosomes 1-like 1	1	1	1	5
translocated promoter region (to activated MET oncogene)	1	2	0	6
asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated	2	0	1	5
chromosome 15 open reading frame 16; cezanne 2	1	1	1	5
leucine rich repeat containing 1	1	2	0	6
desmoplakin isoform I	1	1	0	4
ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit precursor	0	2	0	4
neuropathy target esterase	0	2	1	5
beta-2-glycoprotein I precursor	1	1	0	4
heat shock cognate protein, 71-kDa	2	0	1	5
dystonin isoform 1	0	1	2	4
senataxin	0	1	1	3
cardiomyopathy associated 5	0	3	0	6
G protein-coupled receptor 123	2	0	0	4
adenylyl cyclase-associated protein	2	0	0	4
hypothetical protein XP_946718	2	0	0	4
tumor protein p53 inducible protein 5	2	0	0	4
MYST histone acetyltransferase (monocytic leukemia) 4	0	2	0	4
phosphatidylinositol transfer protein, beta	0	0	2	2
hypothetical protein FLJ37306	0	0	2	2
centrosomal protein 110kDa	1	1	0	4
hypothetical protein FLJ14345	1	1	0	4
breast cancer antiestrogen resistance 3	2	0	0	4
REV3-like, catalytic subunit of DNA polymerase zeta	2	0	0	4
membrane associated guanylate kinase, WW and PDZ domain containing 1 isoform b	2	0	0	4
solute carrier family 25 member 24 isoform 1	0	2	0	4
talin 1	2	0	0	4
olfactory receptor, family 5, subfamily H, member 15	2	0	0	4
DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13	2	0	0	4
PPAR-alpha interacting complex protein 285 isoform 1	2	0	0	4
axonemal dynein heavy chain 7	0	0	2	2
serine/threonine-protein kinase PRP4K	0	2	0	4
clusterin isoform 1	0	0	2	2
ring finger protein 40; 95 kDa retinoblastoma protein binding protein; likely ortholog of rat staring	0	0	2	2
hypothetical protein LOC23331	0	0	2	2
I beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase isoform A	2	0	0	4
scribble isoform b	0	0	2	2
WD repeat domain 66	2	0	0	4

Tabla 8 Proteínas identificadas en el secretoma de los grupos de estudio (CP, CS, M)

A continuación, se realizó un análisis semi-cuantitativo por comparación de los grupos dos a dos (M vs CP, M vs CS y CP vs CS) en base al número de espectros adquiridos, sin aplicar normalización (ver resultados en Tabla 9). De este modo se obtuvieron diez proteínas diferenciales: vinculina, gelsolina, vimentina, fosfoglucomutasa 5, lamina A/C, superóxido dismutasa 3, albúmina, proteína relacionada con el antígeno de nefritis tubulointersticial, SM22 α y peroxirredoxina 3 isoforma b.

Proteína	Media cuentas M	Media cuentas CS	Media cuentas CP	Comparación y ratio de cambio
vinculina	40,00	20,00	15,33	CP vs. M (-2.6)
gelsolina	35,00	16,33	23,67	CS vs. M (-2.1),
vimentina	32,67	10,67	13,67	CP vs. M (-2.4), CS vs. M (-3.1)
fosfoglucomutasa 5	21,67	6,67	4,67	CP vs. M (-4.6)
lamin A/C	12,00	2,33	1,00	CP vs. M (-12)
superóxido dismutasa 3	10,00	0,00	4,00	CP vs. M (-2.5), CS vs. M (-10)
albúmina	6,33	1,00	6,67	CP vs. CS (6.7), CS vs. M (-6.3)
proteína relacionada con el antígeno de nefritis tubulointersticial	2,67	0,67	3,67	CS vs. M (-4)
SM22 α	4,33	0,67	1,00	CS vs. M (-6.5)
peroxirredoxina 3	1,33	0,33	0,67	CS vs. M (-4)

Tabla 9 Proteínas variadas significativamente en el análisis cuantitativo mediante Scaffold, media de cuentas espectrales y ratio de cambio

5.4. Análisis cuantitativo libre de marcaje del secretoma de arteria coronaria aterosclerótica mediante el programa SIEVE

El análisis diferencial llevado a cabo mediante contaje de espectros fue combinado con un análisis, en paralelo, de cuantificación libre de marcaje, realizado mediante el programa SIEVE. Mediante esta aproximación, se hallaron 26 proteínas del secretoma con una abundancia significativamente variada en alguna de las comparaciones posibles entre los tres grupos de estudio (CP, CS y M). De esas proteínas, 7 son significativas en más de una comparación, pero ninguna en las 3 comparaciones realizadas. En la comparación CP vs. CS se encontraron 4 proteínas disminuidas en la coronaria aterosclerótica; en CP vs. M, 3 aumentadas y 13 disminuidas en las arterias con placa; y en la CS vs. M, 3 aumentadas y 10 disminuidas. Las proteínas identificadas los péptidos diferenciales por proteína y los ratios de variación de éstos pueden observarse en la Tabla 10.

Proteína	Comparación	Número pépts y ratio
Glicoproteína asociada a microfibras 4	CP vs. M	2 (-2.67, -3.91)
	CS vs. M	1 (-5.87)
Ligasa de ácidos grasos de cadena larga-CoA 6	CP vs. M.	1 (-2.54)
Vinculina	CP vs. M	6 pépts (-2.15, -2.18, -2.29, -2.41, -3.01, -3.34)
Gelsolina	CP vs. M	(-1.98)
	CS vs. M	2 (-3.12, -4.71)
Lamina A/C	CP vs. M	5 (-1.70, -1.75, -1.84, -2.40, -3.16)
Cadena C de Inmunoglobulina α-1	CP vs. M	1 (1.55)
Lisozima C-1	CP vs. M	2 (-3.36, -4.08)
	CS vs. M	1 (-5.27)
Peroxirredoxina 1	CP vs. M	2 (-2.31, -2.74)
Proteína relacionada con Ras (Rab 16)	CP vs. M	1 (-6.03)
Superóxido dismutasa 3	CP vs. M	2 (-2.42, -3.80)
	CS vs. M	1 (-3.07)
Miosina 9	CP vs. M	1 (-1.96)
Miosina 11	CP vs. M	1 (2.29)
	CP vs. CS	1 (-3.68)
Metalopeptidasa ADAM 19 con motivo trombospondina tipo 1	CP vs. M	1 (-2.32)
ATPasa transportadora de cobre 1	CP vs. M	1 (-2.27)
	CS vs. M	1 (-2.52)
Colágeno α-3 tipo VI isoforma 5	CP vs. M	1 (5.99)
CCDC93	CP vs. M	1 (-4.88)
Proteína disulfido-isomerasa A6	CP vs. CS	1 (-2.51)
	CS vs. M	1 (-2.79)
Canal rectificador interno de potasio13	CP vs. CS	1 (-3.12)
Filamina A	CP vs. CS	2 (-1.75, -1.81)
Tropomiosina beta	CS vs. M	1 (-3.58)
Proteína similar a fosfoglucomutasa 5	CS vs. M	2 (2.70, 2.93)
Dominio tipo 3 de fibronectina	CS vs. M	1 (4.20)
Factor TFIIA	CS vs. M	1 (-3.84)
Factor GTF2I	CS vs. M	1 (-4.16)
Dominio BTB relacionado con Rho 1	CS vs. M	1 (1.71)
Filamina C	CS vs. M	1 (5.85)

Tabla 10 Proteínas encontradas con una variación significativa en el análisis de cuantificación libre de marcaje con el programa SIEVE, número de péptidos diferenciales y ratio de variación de éstos.

DISCUSIÓN

La aterosclerosis coronaria es una patología con alta incidencia en los países del primer mundo, que puede dar lugar a fenómenos de isquemia cardíaca cuyas últimas consecuencias pueden derivar en el fallecimiento del individuo. Esta patología ha sido estudiada desde diferentes puntos de vista y, en cuanto a posibles aplicaciones clínicas, la proteómica supone una de las aproximaciones más interesantes. Los estudios proteómicos en aterosclerosis que se han llevado a cabo hasta la fecha han estudiado el plasma⁶⁵, las células circulantes de la sangre^{31,32}, y el tejido de la placa de ateroma⁶⁶. El estudio de la enfermedad coronaria ha sido abordado, en mayor medida, por medio de un análisis del plasma sanguíneo en busca de biomarcadores de posible aplicación clínica. El plasma constituye la muestra más compleja del organismo en cuanto a contenido proteico y rango dinámico de concentración de las proteínas. Por este motivo, en este trabajo se plantean dos estrategias de análisis molecular de la aterosclerosis coronaria y búsqueda de potenciales biomarcadores, como alternativa al estudio del plasma. En primer lugar, el estudio del tejido de la arteria coronaria aterosclerótica, permite localizar las alteraciones proteicas en su lugar de origen. Estas proteínas pueden terminar liberándose al plasma, debido al permanente contacto de este fluido biológico con los vasos sanguíneos. El estudio de las capas que lo forman, y en concreto aquellas que se encuentran más en contacto con la sangre (íntima y media), debiera aportar datos relevantes para el entendimiento de esta patología, así como de posible aplicación clínica. Por otro lado, el estudio de las proteínas secretadas por la arteria coronaria aterosclerótica, representa una aproximación orientada a la búsqueda de biomarcadores que puedan detectarse en el plasma, permitiendo realizar el estudio proteómico con una muestra enormemente menos compleja que éste.

3. CARACTERIZACIÓN DEL PROTEOMA DE LAS CAPAS ÍNTIMA Y MEDIA DE LA ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA HUMANA

3.1. Optimización del protocolo de extracción de proteína de tejidos aislados mediante LMD y su combinación con 2-D DIGE

El análisis proteómico del tejido de arteria coronaria aterosclerótica, mediante 2-DE, requiere de una cuidadosa preparación de la muestra que permita la adecuada solubilización de un proteoma con un importante contenido en proteínas

miofilamentosas, que pueden agregar durante la solubilización⁶⁷, y una alta presencia de lípidos y calcio. Este hecho fue comprobado durante el proceso de optimización de la 2-DE de tejido coronario aterosclerótico (Figura 10). La presencia del reactivo DeStreak minimizó el *streaking* horizontal durante el IEF, el cual fue manifiesto en los geles elaborados sin incorporar el reactivo. Este *streaking* horizontal es producido por la oxidación inespecífica de los grupos tiol de las proteínas que no hayan sido alquilados por la IAA. La oxidación de los grupos tiol genera grupos sulfuro, con carga negativa, alterando la carga de la proteína, lo que produce alteraciones en el patrón de IEF, sobre todo en la región de mayor pH del gradiente de la tira IPG. Este reactivo contiene grupos tiol que se unen a los de las proteínas, transformándolos en grupos disulfuro. La presencia del DeStreak, conjuntamente con una adecuada eliminación de la presencia de contaminantes de la muestra, permitió obtener unos perfiles bidimensionales de gran resolución.

El análisis del tejido aterotrombótico se ha llevado a cabo, hasta la fecha, estudiando mayoritariamente el tejido completo de las arterias, lo que podría resultar un estudio sesgado debido a la gran complejidad de la muestra, compuesta por 3 capas diferentes y varios tipos celulares con un comportamiento diferente en cada una de las capas. Además, las alteraciones proteicas que tengan lugar en una capa pueden verse ocultadas por los proteomas de las capas restantes, si analizamos el tejido completo. La LMD constituye una valiosa herramienta para realizar el aislamiento de las distintas capas arteriales para su estudio independiente. Mediante esta aproximación las tres capas que componen la arteria coronaria han sido estudiadas empleando la tecnología de LC-MS/MS junto con el proteoma completo de la arteria en lo que constituye la más exhaustiva caracterización del proteoma de la arteria coronaria publicado hasta la fecha⁴². Aún así, sólo tenemos constancia de un análisis comparativo del proteoma de alguna de las capas arteriales en el proceso aterogénico. En dicho estudio, los proteoglicanos de la capa íntima de arteria carótida se compararon con los de la capa íntima de arteria mamaria mediante un análisis cuantitativo basado en la medida de las intensidades de los péptidos de dichos proteoglicanos mediante MS¹¹. Las capas íntima y media están muy implicadas en la formación de la placa de ateroma en la arteria coronaria. De hecho, la aterogénesis se inicia en la íntima con la disfunción del endotelio y el depósito de LDL colesterol, que es fagocitado por macrófagos que se infiltran en el subendotelio en respuesta a citoquinas. La capa media también sufre alteración de las VSMCs

contiguas a la lámina basal, que migran a la íntima, en la que secretan MEC, contribuyendo finalmente al desarrollo de la cápsula fibrosa que rodea a las lesiones avanzadas. El estrés mecánico que produce la lesión desarrollada en la íntima sobre la capa media provoca la desorganización y estrechamiento de la capa media en los estadios avanzados de la aterosclerosis. En este contexto, el estudio de las capas íntima y media, aisladas de arterias ateroscleróticas y arterias sanas, ha de permitir la identificación de nuevos biomarcadores o mediadores de la enfermedad aterosclerótica.

En este trabajo, se ha constatado una gran dificultad para obtener suficiente cantidad de proteína, procedente de tejido arterial aislado por LMD, como para poder realizar un análisis proteómico mediante 2-DE convencional. La necesidad de realizar una mezcla del material obtenido en días sucesivos de LMD, con un resultado aún insuficiente, ha dejado bien claro que realizar el análisis de las distintas capas arteriales mediante un método clásico de 2-DE resulta inadecuado. En cambio, la combinación de la técnica de aislamiento de tejido denominada LMPC y el análisis diferencial mediante DIGE de marcaje a saturación, ha demostrado ser adecuada para llevar a cabo el análisis proteómico de las capas íntima y media de la arteria coronaria aterosclerótica. Para realizar un adecuado acoplamiento de ambas técnicas, un exhaustivo proceso de optimización de las condiciones de preparación de los cortes histológicos, condiciones de LMD y solubilización y limpieza de las muestras fue necesaria. Estudios previos han descrito el efecto negativo de los colorantes de tinción de los tejidos en la solubilización de las proteínas del tejido y, como consecuencia, del perfil bidimensional obtenido mediante DIGE de marcaje a saturación de estos extractos⁶⁸. Este fenómeno fue observado en el caso de la hematoxilina⁶⁸, pero no se había estudiado previamente la compatibilidad del violeta de cresilo con el DIGE de marcaje a saturación. Este colorante, que permite minimizar la acción de las proteasas mediante su disolución en etanol 100%, ha sido empleado previamente en estudios de microdissección combinada con DIGE de marcaje mínimo sin que se hayan observado efectos negativos⁶⁹. Los resultados obtenidos en nuestro estudio, sugieren un efecto deletéreo del violeta de cresilo en el análisis mediante 2-D DIGE de marcaje a saturación de tejidos aislados mediante LMD. Este efecto, no observado para el caso del DIGE de marcaje mínimo, parece deberse al escaso contenido proteico de la muestra analizada en el DIGE de marcaje a saturación, lo que incrementaría el efecto del colorante presente en el extracto, algo que será magnificado por la presencia del fluorocromo sobrante de la

reacción de marcaje. Estos efectos fueron eliminados mediante el empleo de una cantidad mínima de fluorocromo (TCEP: Cy3/Cy5 = 1nmol: 2nmol) y, principalmente, mediante la inclusión de un paso de limpieza de la muestra mediante una columna cromatográfica (Protein Desalting Spin Columns, Pierce) que retiene sales y moléculas pequeñas, como es el caso de los colorantes. La inclusión de esta etapa cromatográfica permitió obtener perfiles 2-DE empleando ambos protocolos de tinción. Aún así, la visualización del tejido sin montar en el sistema de microdissección resulta más sencilla en el caso del violeta de cresilo, facilitando el reconocimiento de las capas de la arteria, lo que ayuda en el desarrollo de la LMD. Además, este colorante disuelto en etanol 100% contribuye a minimizar la acción de las proteasas, algo que siempre es conveniente cuando se realizan procesos de LMD de larga duración. En relación a las condiciones más adecuadas de solubilización del tejido, de los tampones ensayados, únicamente la adición de SDS o DTT al tampón de lisis recomendado para el DIGE aumentó la solubilización del proteoma arterial tras LMD. En concreto el DTT ofreció unos resultados algo mejores al SDS, por lo que se empleó durante los estudios diferenciales de abundancia de proteína de las capas íntima y media de la coronaria aterosclerótica.

Con el fin de confirmar el correcto aislamiento de las capas íntima y media y el contenido proteico de los extractos de éstas, se analizaron mediante LC-MS/MS, debido a que la cantidad de proteína cargada en los geles no permitió realizar un análisis de las manchas proteicas mediante espectrometría de masas. Para ello, se analizaron extractos de capa íntima y media de arteria coronaria preaterosclerótica, de tal manera que en este trabajo se describe por vez primera el proteoma de estas capas en la coronaria sin placa de ateroma, complementando los resultados de Bagnato et al. que describieron el proteoma de las capas de la coronaria aterosclerótica⁴². Las únicas proteínas típicas de la sangre identificadas en estos extractos fueron albúmina y hemoglobina, pero se identificaron con un número muy bajo de péptidos, lo que implica que no eran abundantes en los extractos. Esto descarta la presencia de posible contaminación procedente de la sangre en los lisados de los tejidos aislados por LMD, ya que esta mínima presencia de proteínas sanguíneas parece deberse a la microvascularización de la arteria. La elaboración de los árboles jerárquicos de términos GO permitieron asegurar el correcto aislamiento de las capas, y la ausencia de contaminación de los extractos por la capa contigua. La presencia en el árbol GO de ambas capas del término

significativo “constituyente del citoesqueleto” se debe a la presencia común de proteínas mayoritarias de las VSMCs, principalmente variantes de la actina. A pesar de ello, los términos GO significativos en la capa íntima muestran el diferente fenotipo proliferativo de las VSMCs en esta capa, implicadas en secreción de MEC, mientras que en la capa media remarcan el fenotipo contráctil de estas células.

3.2. Análisis diferencial de abundancia de proteína de la capa íntima de arteria coronaria aterosclerótica mediante 2D-DIGE

Los resultados del análisis diferencial llevado a cabo con los extractos proteicos de capa íntima de coronarias ateroscleróticas frente a las arterias control mostraron un total de 12 proteínas diferentes con niveles alterados. En el PCA realizado con las manchas proteicas de los geles que resultaron significativas tras un análisis estadístico mediante test de Anova ($p\text{valor} \leq 0.05$) se observó un correcto agrupamiento de los geles del estudio en las clases predefinidas en el diseño experimental (Figura 17). De hecho, la primera componente principal separa de manera manifiesta las muestras patológicas de aquellas consideradas como controles en el experimento, lo que nos indica la existencia de un perfil proteico característico de la capa íntima de la coronaria aterosclerótica. En cuanto al origen de las muestras, en nuestro estudio podemos observar que las coronarias afectadas que provienen de biopsia no son agrupadas junto con las que provienen de necropsia, lo que implica un diferente componente proteico. Aunque estos resultados podrían indicar que la obtención de la muestra afecta al perfil proteómico obtenido, los resultados del análisis de 2-D DIGE y las validaciones mediante IHQ validan ambas fuentes de muestras para estudios proteómicos. Los dos grupos preateroscleróticos que se emplean como controles de este experimento se ubican bastante próximos entre sí en el gráfico del PCA, a pesar de que se trata de arterias diferentes, lo que nos hace considerar a ambas como controles apropiados para este tipo de estudios. También apoya a esta afirmación el hecho de que el análisis diferencial de comparación de ambos grupos no arrojó ningún resultado significativo tras análisis por t de Student ($p\text{valor} \leq 0.05$).

Teniendo como referente en el estudio de las capas de arteria coronaria el trabajo de Bagnato y colaboradores⁴², nos propusimos buscar las 13 proteínas que encontramos alteradas en el proteoma de arteria coronaria con hiperplasia descrito por ellos. Nueve de estas proteínas aparecían en dicho listado, pero 3 de ellas no habían sido encontradas

en el proteoma de dicha capa, aunque sí cuando se analizó el proteoma total. Estas proteínas son: ANXA4, MRLC y ferritin LC. Esto refuerza nuestra apuesta por un estudio mediante 2D-DIGE como una alternativa al estudio de líquidos-masas tanto por la posibilidad que ofrece de realizar fácilmente análisis diferencial, como por su valor como complemento del LC-MS/MS en la identificación de proteínas en su localización concreta en el tejido de estudio. Estas 3 proteínas fueron validadas por IHQ en un grupo independiente de arterias (6 ACBs vs. 6 PRBs), junto con la vimentina, una de las proteínas más variadas en cuanto a ratio y número de isoformas alteradas.

La proteína ANXA4 se expresa en el organismo fundamentalmente en el tejido epitelial. Aún así, el análisis por IHQ de esta proteína en ACB y PRB mostró la expresión de esta proteína en VSMCs y macrófagos de la capa íntima. La disminución de su expresión observada en la íntima de coronaria aterosclerótica está asociada con un descenso en el nivel de expresión de esta proteína en las VSMCs, que en la íntima de PRB se encuentra muy elevado. La Anexina A5 (ANXA5) es la proteína más conocida de la familia de las anexinas y tiene un 97% de homología con la ANXA4. Ambas proteínas tienen un papel anticoagulante vital en el desarrollo del embarazo, ya que previenen frente a una posible coagulopatía intravascular diseminada⁸. Esto podría indicar que el descenso de ANXA4 encontrado en la íntima aterosclerótica podría conllevar una alteración de la maquinaria de protección frente a la coagulación y, por lo tanto, aumentar el riesgo de trombosis. Las propiedades anti-apoptóticas de ANXA5 son de sobra conocidas, y podrían también estar presentes en su homólogo ANXA4. Por lo tanto, la reducción en los niveles de dicha proteína en las VSMCs de la íntima de la coronaria con placa las hace más susceptibles de eventos apoptóticos, lo que en la cápsula fibrosa supone un mayor riesgo de ruptura de la placa.

MRLC es una subunidad del complejo miosina de las VSMCs que regula la contractilidad de estas células, así como su carácter migratorio. La fosforilación de esta subunidad constituye una señal fundamental para que estas células adquieran capacidad migratoria. La defosforilación de MRLC ha sido probada en VSMCs en cultivo en presencia de LDLs agregadas y también en lesiones coronarias intermedias⁷⁰, lo que supone la inhibición de su capacidad migratoria y de reparación del tejido. El descenso de esta subunidad de la proteína en la íntima aterosclerótica se observó más acusadamente en el núcleo lipídico, en la IHQ. Esto parece deberse a la presencia de depósitos de LDL que estarían afectando a la capacidad migratoria de las VSMCs. El

descenso de la cantidad de proteína total estaría contribuyendo a la defosforilación de MRLC en las VSMCs de la placa, colaborando de esta manera en el cambio del fenotipo de las VSMCs. El descenso de vimentina en la íntima de muestras patológicas iría en la misma línea que la disminución de la MRLC. La proteína vimentina es el componente principal de los filamentos intermedios del citoesqueleto y juega un papel fundamental en la contractilidad y migración celulares. En el análisis diferencial de capa íntima de arteria coronaria se observó un descenso en los niveles de esta proteína, lo que supone la desorganización de la estructura de los filamentos intermedios. La íntima preaterosclerótica de arteria radial presentó un importante número de VSMCs positivas para vimentina y MRLC, lo que indica su carácter migratorio, algo que se corresponde con su reciente reclutamiento procedentes de la capa media. El descenso de células positivas para vimentina apoya la hipótesis planteada para la disminución de MRLC, ya que en ambos casos la consecuencia en las VSMCs es una pérdida de su capacidad migratoria. La presencia de células positivas en los hombros de la lesión aterosclerótica junto con una presencia ocasional en el núcleo lipídico refleja la existencia de un gradiente espacial en el fenotipo migratorio de la célula muscular. Estos resultados corroboran estudios previos de la estructura de filamentos intermedios llevados a cabo en placas ateroscleróticas⁷¹.

La ferritina es un oligómero de 24 subunidades que constituye el más importante mecanismo de almacenamiento de hierro intracelular en todos los organismos⁷². Dos tipos diferentes de subunidades forman la molécula de ferritina: la cadena pesada (H) y la cadena ligera (L). La proporción de cada cadena en el oligómero depende del tejido y está relacionada con su capacidad de unión y liberación de hierro. La cadena pesada dota a la molécula de un almacenamiento y liberación de hierro más dinámico, mientras que la cadena ligera le confiere la capacidad de funcionar como un almacén a largo plazo. La ferritina se ha relacionado con la enfermedad cardiovascular en multitud de estudios, lo que ha dado lugar a la denominada hipótesis del hierro, que sostiene que niveles elevados de hierro producen un aumento del riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular. En concreto, elevados niveles de ferritina circulante han sido asociados con una mayor incidencia de aterosclerosis, infarto de miocardio y enfermedad arterial periférica. La cadena ligera de la ferritina ha sido encontrada aumentada en la placa de ateroma en otros dos estudios llevados a cabo empleando el tejido arterial completo. En el primero de ellos, ferritin LC fue relacionado con inestabilidad de la placa en arterias

carótidas. En el segundo estudio, su aumento fue observado en la arteria coronaria, aunque no se llevó a cabo un estudio que permitiera su localización en el tejido. En este estudio hemos corroborado un incremento en los niveles de ferritin LC en la placa de ateroma de coronaria, y hemos situado ese incremento en la capa íntima, donde el aumento ha resultado muy significativo (ratio de 16.04 en el análisis diferencial). La IHQ mostró una localización de esta subunidad en depósitos extracelulares así como en macrófagos/células espumosas. Por el contrario, la expresión de ferritin LC en las capas íntima y media se limitó a la presencia ocasional de macrófagos. Un aumento de la molécula completa de ferritina en células espumosas en la coronaria y aorta con aterosclerosis había sido observado anteriormente a nuestro estudio⁷³. La toxicidad de los depósitos de hierro libre, que se debe a su capacidad para generar radicales libres es mediado por su almacenamiento en la molécula de ferritina. Nuestros resultados sugieren un aumento de la cadena ligera en la estructura de la ferritina en la íntima aterosclerótica como consecuencia de la necesidad de moléculas que permitan un almacenamiento a largo plazo del hierro depositado en la placa para así evitar el estrés oxidativo de dichos depósitos.

De las 12 proteínas que encontramos variadas en el análisis diferencial de capa íntima, algunas de ellas habían sido asociadas previamente con la aterosclerosis. La osteoglicina, por ejemplo, se ha relacionado con el desarrollo de la enfermedad gracias a estudios realizados tanto en modelos animales como en arteria coronaria humana, utilizando técnicas de hibridación *in situ* e IHQ^{74,75}. En nuestro caso, hemos identificado 5 isoformas diferentes de osteoglicina que disminuyen en la íntima con aterosclerosis de arteria coronaria, algo que está en consonancia con los resultados de estudios anteriores en arteria coronaria que indicaron un aumento de la proteína en las VSMCs al iniciarse la lesión, y un descenso de esta en las placas avanzadas⁷⁵. La hemoglobina en cambio, aparece aumentada en la íntima de la coronaria aterosclerótica.

Un aumento de hemoglobina similar fue observado previamente en ratones deficientes en apoE sometidos a una dieta rica en grasas e inoculados con *Porphyromonas gingivalis*, comparados con ratones similares con la misma dieta pero no inoculados con la bacteria. Estos estudios mostraron la existencia de cambios proteicos que apoyaron la hipótesis de la implicación de infecciones bacterianas en un mayor desarrollo de aterosclerosis³⁴. La hemoglobina, expresada por los eritrocitos, es el principal transportador de oxígeno del organismo. Su aparición en las placas avanzadas de

ateroma, en nuestro caso en la íntima de arteria coronaria, debe provenir del aporte de eritrocitos de las hemorragias intraplaca frecuentes en estas lesiones. Su presencia ha de contribuir a aumentar el estrés oxidativo presente en la placa. Otra de las proteínas aumentadas en la placa que ha sido estudiada previamente es SaP. Esta proteína es una de las principales proteínas del plasma y pertenece a la familia de las pentraxinas, a la que también pertenece una de los principales marcadores de riesgo cardiovascular empleado su expresión en la íntima de aorta aterosclerótica humana⁷⁶, así como en placa de ateroma de coronaria, dónde se vio que se localizaba en las regiones en las que aparecían apolipoproteínas⁷⁷. Además, se ha observado una correlación entre elevados niveles de SaP y riesgo cardiovascular, y se ha observado que se une a las lipoproteínas de alta y muy baja densidad (HDL y VLDL)⁷⁸. Su papel en el desarrollo de la aterosclerosis no está todavía claro, pero valores elevados de esta proteína parecen ser pro-aterogénicos. En cuanto a la transglutaminasa 2, esta proteína fue hallada aumentada en la coronaria preaterosclerótica por IHQ y, con el progreso de la lesión se observó un aumento de su expresión en las regiones fibróticas que rodean al núcleo lipídico, en el que se observó en cambio un descenso de la expresión⁷⁹. Como hemos estudiado la capa íntima en su conjunto, la disminución de dicha proteína observada en la coronaria con placa parece deberse al descenso de esta en el núcleo lipídico. Estos resultados reflejan una de las limitaciones del estudio proteómico de la placa íntima en su conjunto y sugieren el análisis específico de las diferentes regiones de la capa (núcleo lipídico, nódulos calcificados, cápsula fibrosa...) en estudios futuros, que puedan continuar con nuestro propósito de ir delimitando el perfil proteico de la arteria coronaria aterosclerótica. Diferentes subtipos de colágenos han sido observados en la placa de ateroma, en la que el colágeno I y el III son los más abundantes⁸⁰. También se ha observado un aumento en la lesión aterosclerótica, junto con estos dos, de los tipos IV, V⁸⁰ y VI⁸¹. En nuestro estudio hemos encontrado un aumento de la cadena α -1 del colágeno VI en la íntima de la arteria coronaria con placa de ateroma, corroborando los resultados previos⁸¹. El haber encontrado la cadena α -1 variada y no la β no parece deberse a una elevación específica de ésta, sino más bien a las limitaciones de la técnica para cubrir en el análisis el total de proteínas de la muestra. Otra de las proteínas que encontramos alteradas en este experimento, SM22 α , es un marcador del fenotipo contráctil de las VSMCs. Su implicación en el desarrollo de la aterosclerosis ha sido comprobada empleando modelos de ratón^{82,83} y en coronarias ateroscleróticas

humanas⁷⁵. Dichos estudios han demostrado que un descenso de esta proteína en las VSMCs es fundamental para el paso de las células contráctiles de la media al fenotipo proliferativo en la íntima, y por lo tanto para el desarrollo de la lesión. Por otro lado, estudios de calcificación de la capa media de arterias periféricas (denominada esclerosis de Monkeberg), han mostrado un aumento de SM22 α en las VSMCs de las regiones calcificadas⁸⁴, sugiriendo un papel similar en la calcificación de las arterias durante la arterosclerosis. El aumento de SM22 α en la capa íntima de coronaria afectada parece deberse a un aumento de las VSMCs positivas en las regiones calcificadas, algo que decantaría el balance de proteína total, debido a que en la íntima de las arterias preateroscleróticas no hay todavía calcificación importante y las VSMCs en estado proliferativo no expresarán la proteína.

Dos proteínas de respuesta a estrés aparecen aumentadas en las coronarias con placa. La heat shock 70 kDa protein 5 es una proteína de la familia de las hsp70, las cuales se han visto aumentadas en multitud de procesos inflamatorios⁸⁵ y podría jugar un papel citoprotector en la placa de ateroma⁸⁶. El aumento de GRP78 está en consonancia con la relativamente reciente hipótesis que ha definido la arterosclerosis como un proceso inflamatorio^{4,5}. En estudios previos del grupo se observó un aumento de esta proteína en los monocitos circulantes tras un SCA³¹. En varios estudios se ha observado un aumento de GRP78 en arterosclerosis experimental⁸⁷⁻⁹⁰, y se ha observado que regula negativamente la actividad procoagulante del factor tisular⁹¹. En cuanto a la hsp27, estudios previos de nuestro grupo empleando plasma y secretoma de carótida demostraron un descenso de la proteína total en los pacientes con estenosis carotídea⁵⁷. El aumento de la mancha proteica identificada como hsp27 en la íntima arterosclerótica nos indica que en esta capa una de las isoformas, que a juzgar por la intensidad de la mancha proteica es de las menos abundantes, aparece aumentada, a pesar de que el balance de proteína total previsiblemente denote un descenso de hsp27 a tenor de los resultados anteriores. Un estudio detallado de las isoformas de esta proteína en la íntima de arteria coronaria sería necesario para poder afirmar de que isoforma se trata y su posible implicación en el desarrollo de esta patología.

3.3. Análisis diferencial de abundancia de proteína de la capa media de arteria coronaria aterosclerótica mediante 2D-DIGE

El análisis diferencial de abundancia de proteína realizado en la capa media de arteria coronaria aterosclerótica, y la identificación por espectrometría de masas de las manchas proteicas variadas, permitieron obtener 12 proteínas únicas, alteradas en esta capa como consecuencia del desarrollo de la placa de ateroma. El análisis estadístico mediante PCA (**figura**), realizado en base a las manchas proteicas diferenciales, permitió certificar el correcto agrupamiento de las muestras, ya que en el gráfico observamos a ambos grupos de estudio separados por la primera componente principal.

Al igual que se había realizado con las proteínas identificadas en la capa media, se comparó el listado de proteínas identificadas en la media con las proteínas descritas por Bagnato y colaboradores al aislar la capa media por LMD y analizarla por LC-MS/MS⁴². De las 12 proteínas identificadas, 5 no habían sido identificadas por LC-MS/MS en la capa media: carbonil reductasa 3, PGAM1, PEDF, SOD3 y TPI. De nuevo el análisis proteómico mediante 2D-DIGE de las capas de la arteria coronaria aterosclerótica nos ha permitido complementar el proteoma de esta arteria, a nivel descriptivo, al margen del valor que tiene a nivel comparativo. De las proteínas aumentadas en la capa media de la coronaria con placa, dos de ellas (PGAM1 y TPI) son enzimas de la glucólisis, lo que indica una activación de esta ruta metabólica como consecuencia de la formación de la placa de ateroma. Estudios recientes han mostrado que la activación de la glucólisis ejerce un efecto modulador del estrés oxidativo produciendo una reducción de sus efectos en diversas patologías inflamatorias⁹². En concreto, el aumento de TPI ha sido observado recientemente en VSMCs tratadas *in vitro* con homocisteína, un aminoácido cuyo aumento en plasma produce un estrés oxidativo que ha sido asociado con un aumento del riesgo cardiovascular⁹³. La presencia de estrés oxidativo en la arteria coronaria aterosclerótica es un hecho, y al margen del mecanismo protector de la glucólisis, el aumento de la enzima SOD3 forma parte del mecanismo de respuesta de las células ante los efectos negativos de dicho estrés. SOD3 es una superóxido dismutasa extracelular secretada exclusivamente por determinadas células en ciertos tejidos en los que es necesario una actividad enzimática superior a la de las otras isoformas de la familia (SOD1 y SOD2)⁹⁴. Esta enzima parece ser secretada por las VSMCs de la capa media a la MEC ante el entorno de estrés

oxidativo presente en la coronaria aterosclerótica. Otra enzima implicada en la respuesta ante el estrés oxidativo, CBR3, fue hallada en este caso disminuida en la capa media de la arteria coronaria aterosclerótica. Pero esta enzima es mucho menos eficiente metabolizando carbonilos reactivos que la CBR1⁹⁵ y ésta ha sido la única que se ha comprobado que metaboliza los productos de la peroxidación lipídica⁹⁶, de gran importancia en la enfermedad aterosclerótica. Es complicado por lo tanto comprender la disminución específica de esta proteína, que podría deberse simplemente a algún tipo de mecanismo para evitar posible competencia de esta enzima por el sustrato, lo que disminuiría la tasa metabólica de la enzima homóloga CBR1, de mayor eficiencia. La proteína PEDF tiene también un efecto antioxidante⁹⁷, además de antitrombótico⁹⁸, por lo que la disminución de esta proteína en la capa media aterosclerótica supone una mayor vulnerabilidad ante el estrés oxidativo y la trombosis. El efecto antioxidante de otras enzimas y mecanismos de eliminación del estrés oxidativo podrían estar contrarrestando esta disminución de PEDF, y en cuanto a la posibilidad de trombosis, en principio las células de esta región no se pondrán en contacto con el torrente sanguíneo, aún en caso de ruptura de la placa de ateroma. A pesar de ello, la disminución de esta proteína en la capa media podría estar contribuyendo al desarrollo de la placa de ateroma en la arteria coronaria. Una serie de proteínas implicadas en el mantenimiento del citoesqueleto se encuentran disminuidas en la capa media de la coronaria con placa de ateroma: filamina A, gelsolina, tubulina, vimentina y vinculina. Tubulina y vimentina son las proteínas que componen los microtúbulos y filamentos intermedios del citoesqueleto⁹⁹, mientras que la gelsolina estabiliza a los filamentos de actina uniéndose al final de estos evitando cambios de polimerización/despolimerización¹⁰⁰, y filamina A y vinculina están implicadas en unión de los filamentos de actina a la membrana plasmática⁹⁹. Es por lo tanto evidente la desestabilización de la estructura celular de las VSMCs en la capa media de la coronaria aterosclerótica, lo que conllevará una alteración del fenotipo contráctil de estas células, o parte de ellas. En cuanto al carácter migratorio de las células, filamina A¹⁰¹ y vimentina⁷¹ se ha visto que resultan fundamentales para la migración de las células, con lo que las células de la capa media de la coronaria aterosclerótica deben de tener una capacidad migratoria limitada, ya que presentan un descenso significativo de ambas proteínas. En cuanto a la proteína de respuesta a estrés hsp27, su descenso en la capa media de la coronaria con placa de ateroma se corresponde con estudios previos realizados en nuestro grupo⁵⁷.

4. CARACTERIZACIÓN DEL SECRETOMA DE LA ARTERIA CORONARIA ATEROSCLERÓTICA HUMANA

4.1. Optimización del protocolo de obtención de secretoma para enriquecer la muestra en proteínas secretadas

Al realizar el análisis proteómico del secretoma de una arteria, tenemos que tener en cuenta la posible presencia de proteínas contaminantes procedentes del plasma, debida a la presencia de sangre en estos vasos, algo que no se elimina a pesar de realizar innumerables lavados de la muestra previamente a su cultivo. La liberación de las proteínas restantes del plasma decae según avanza el cultivo, de manera inversa a lo que sucede con las proteínas secretadas por el tejido. Por lo tanto, la inclusión de un protocolo previo a la recogida del sobrenadante, constituido por varios intercambios de medio, permitió obtener una muestra enriquecida en proteínas secretadas, debido a un descenso acusado de la presencia de proteínas del plasma. El protocolo empleado, que ha demostrado ser el más adecuado para este fin en estudios realizados con tejido adiposo⁵⁹, mostró un descenso de las dos proteínas mayoritarias del plasma, albúmina e IgG, al analizar los sobrenadantes del cultivo a los diferentes tiempos de intercambio de medio introducidos, tanto por SDS-PAGE (Figura 21) como 2-DE (Figura 22). Por otro lado, ante el aumento del tiempo total de cultivo empleado en la obtención del secretoma, producido al introducir los intercambios de medio y aumentar el tiempo de recogida del secretoma, se evaluó la conservación del tejido a lo largo de todo el proceso mediante una valoración de la necrosis. Esta valoración, llevada a cabo por medio de una medición de los niveles de LDH, demostró que el aumento del tiempo de cultivo no supuso la degradación del tejido, ya que se observó un descenso de la LDH a lo largo de todo el cultivo. Los valores elevados de LDH al principio del proceso fueron debidos al procesamiento del tejido, que se troceó para aumentar la superficie de intercambio con el medio de cultivo, y fueron descendiendo, de manera muy acusada del intercambio de 1h al de 1día y más progresivamente con los siguientes intercambios, alcanzando el valor mínimo en la muestra de secretoma. Esto indica que la LDH es liberada con el procesamiento inicial del tejido se va eliminando con los sucesivos intercambios de medio, de manera similar a lo observado para las proteínas mayoritarias del plasma.

Con el fin de comprobar que las proteínas identificadas en el secretoma eran proteínas procedentes del tejido, y no contaminantes del plasma, se empleó un método de marcaje isotópico en Lys y Arg, añadidas al cultivo, basado en la técnica SILAC. Los resultados obtenidos al analizar el secretoma mediante LC-MS/MS, mostraron una eficiencia baja del marcaje, lo que desaconseja su empleo para este tipo de tejido. Es posible que la presencia de aminoácidos no marcados, procedentes de la degradación de proteínas en el interior de la célula impidan la incorporación de Lys y Arg marcadas, o quizá el proceso de síntesis y secreción de proteínas en las arterias sea un proceso lento de tal manera que la incorporación del marcaje sólo sea evidente en algunas proteínas que presenten una mayor tasa de síntesis.

4.2. Análisis diferencial de secreción de proteínas de arteria coronaria aterosclerótica humana

4.2.1. Análisis diferencial de secreción de coronaria aterosclerótica por 2-D DIGE

Al realizar un análisis proteómico diferencial basado en el empleo de geles 2-DE existen limitaciones a la hora de identificar las manchas proteicas variadas, debidas principalmente a la cantidad de proteína presente en las manchas. En el estudio de las proteínas diferencialmente secretadas realizado por 2D-DIGE, encontramos muchas dificultades para realizar la identificación por MS de varias de las manchas proteicas significativas. A pesar de ello, al haber encontrado gran número de variaciones, 8 proteínas fueron identificadas como diferencialmente secretadas por la coronaria con placa. El análisis estadístico realizado para comprobar que el diseño experimental fue correcto comprendió la realización de un PCA y de un análisis de agrupamiento jerárquico. El PCA mostró dos grupos, correspondientes con los grupos del experimento, bien diferenciados y separados por la primera componente principal. De la misma manera, los niveles de las manchas proteicas diferenciales permitieron agrupar a los dos tipos de muestras en el análisis de agrupamiento jerárquico.

Entre las proteínas variadas, podemos observar la hsp27, cuyo descenso en la placa de ateroma ya fue observado en trabajos anteriores realizados por nuestro grupo con arteria carótida⁵⁷. El aumento del proteoglicano de MEC lumican, se corresponde con resultados de un estudio en el que se observó su aumento en la capa íntima de la arteria carótida aislada por microdissección manual, comparada también frente a arteria mamaria¹¹. El descenso de la filamina A, parece ir en consonancia con los resultados

obtenidos para la capa media, y sería fruto de una menor síntesis de la proteína en el tejido, fruto de una desestructuración del citoesqueleto, algo que explicaría también el descenso de la cadena ligera de la miosina 6. La proteína ANXA5 es una proteína con un importante papel antiapoptótico y anticoagulante, por lo que su secreción aumentada en la coronaria aterosclerótica ha de deberse a un mecanismo de defensa de la arteria frente a estos eventos, que precipitan la ruptura de la placa y el desarrollo de un trombo. El descenso de ANXA4 observado en la capa íntima en el estudio de 2D-DIGE, podría estar contrarrestado por un aumento de la secreción de ANXA5 en la arteria, aunque no podemos asegurar que a nivel de la capa íntima se esté produciendo este efecto. El aumento de fibrinógeno en la sangre ha sido observado tras un infarto de miocardio, y se considera desde hace muchos años un factor de riesgo cardiovascular. En este experimento hemos observado la secreción aumentada de esta proteína en la arteria coronaria aterosclerótica, lo que implica que también la propia arteria contribuye a el aumento de esta proteína en la sangre. También se observan dos tipos de actina cuya secreción se encuentra aumentada en la coronaria con placa. Estas formas de actina no son formas que contengan péptido señal, por lo que no son en principio secretadas. La presencia de estas proteínas puede deberse a una mayor apoptosis y/o necrosis en el núcleo lipídico de la coronaria aterosclerótica, que liberaría de manera fisiológica estas proteínas citoplasmáticas a la sangre.

4.2.2. Análisis diferencial de secreción de coronaria aterosclerótica mediante LC-MS/MS

Ante las dificultades en la identificación de las proteínas diferencialmente secretadas halladas en el análisis mediante DIGE, se decidió realizar un análisis complementario del secretoma de la coronaria con placa de ateroma mediante líquido-masas. De esta manera se obtuvieron 201 proteínas que aparecen secretadas en las diferentes arterias estudiadas: coronaria aterosclerótica, coronaria preaterosclerótica y mamaria. Por otro lado, se realizó un análisis semi-cuantitativo sin necesidad de inclusión de marcas isotópicas, basado en dos programas informáticos comerciales, Sieve y Scaffold, que toman diferentes datos de origen: intensidad de pico y número de espectros de masas adquiridos (contaje espectral), respectivamente.

En ambos casos, en la mayoría de las variaciones significativas suponen una disminución de la secreción de una proteína de CP o CS, con respecto a la mamaria.

Esto parece indicar que la arteria mamaria tiene un secretoma más complejo que el de la coronaria, y en la secreción local de estas proteínas podría residir su mayor resistencia ante la enfermedad aterosclerótica. De todas las proteínas identificadas por ambos métodos, la vinculina, gelsolina, lamina A/C y fosfoglucomutasa 5 fueron halladas como diferenciales al emplear ambos programas informáticos como herramienta de análisis cuantitativo. En el caso de la vinculina y la lamina A/C, los resultados coinciden perfectamente en cuanto a grupos en los que se encontró diferencial y la tendencia de secreción (aumentada o disminuída). La gelsolina se encontró aumentada significativamente en CS respecto a M en ambos casos (Sieve y Scaffold) y también en CP respecto a M, aunque no significativamente en el caso del Scaffold. La fosfoglucomutasa 5 aparece disminuida en CP y CS respecto a M, aunque el nivel de significación varía según el programa empleado.

En cualquier caso, queda patente la complementariedad de ambas herramientas informáticas y por tanto del tipo de datos de origen empleados en el análisis cuantitativo.

CONCLUSIONES

1. La combinación de la microdissección por laser y el DIGE de marcaje a saturación ha permitido obtener por vez primera el mapa bidimensional de las capas íntima y media de arteria coronaria aterosclerótica humana y de arterias humanas no afectadas.
2. El estudio realizado ha llevado a la descripción de un método óptimo de preparación histológica, microdissección por laser, solubilización y marcaje con DIGE de saturación del proteoma de regiones aisladas de arterias humanas, para análisis proteómico mediante técnicas de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas y de electroforesis bidimensional.
3. El análisis diferencial de abundancia de proteína realizado en la capa íntima de la arteria coronaria aterosclerótica humana ha mostrado 12 proteínas alteradas en esta capa arterial, a consecuencia del desarrollo de la placa de ateroma.
4. El estudio mediante técnicas inmunohistoquímicas de cuatro de las proteínas alteradas en la capa íntima, anexina A4, cadena ligera de la ferritina, cadena ligera reguladora de la miosina 2, isoforma de músculo liso, y vimentina, ha permitido definir el patrón de expresión de estas proteínas en la placa de ateroma de arteria coronaria, así como validar las variaciones encontradas en el análisis diferencial.
5. El análisis diferencial de abundancia de proteína realizado en la capa media de la arteria coronaria aterosclerótica humana ha mostrado 12 proteínas alteradas en esta capa arterial, a consecuencia del desarrollo de la placa de ateroma.
6. La obtención del secretoma de arteria coronaria aterosclerótica humana empleando un protocolo previo de intercambio del medio de cultivo ha permitido enriquecer la muestra en proteínas secretadas, minimizando la contaminación por proteínas del plasma.
7. El análisis de los sobrenadantes de cultivo mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas ha llevado a la caracterización del secretoma de las arterias coronaria aterosclerótica, coronaria preaterosclerótica y mamaria, humanas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Kierszenbaum, A. L. *Histology and cell biology: an introduction to pathology*. St. Louis, Missouri (2002).
2. Dzau, V. J., Braun-Dullaeus, R. C. & Sedding, D. G. Vascular proliferation and atherosclerosis: new perspectives and therapeutic strategies. *Nat. Med.* 8, 1249-1256 (2002).
3. Libby, P., Ridker, P. M. & Maseri, A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105, 1135-1143 (2002).
4. Libby, P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420, 868-874 (2002).
5. Ross, R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* 340, 115-126 (1999).
6. van der Wal, A. C., Becker, A. E., van der Loos, C. M. & Das, P. K. Site of intimal rupture or erosion of thrombosed coronary atherosclerotic plaques is characterized by an inflammatory process irrespective of the dominant plaque morphology. *Circulation* 89, 36-44 (1994).
7. Libby, P. & Aikawa, M. Stabilization of atherosclerotic plaques: new mechanisms and clinical targets. *Nat. Med.* 8, 1257-1262 (2002).
8. Virmani, R., Kolodgie, F. D., Burke, A. P., Farb, A. & Schwartz, S. M. Lessons from sudden coronary death: a comprehensive morphological classification scheme for atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20, 1262-1275 (2000).
9. Naghavi, M. *et al.* From vulnerable plaque to vulnerable patient: a call for new definitions and risk assessment strategies: Part I. *Circulation* 108, 1664-1672 (2003).
10. Martinet, W., Knaapen, M. W., De Meyer, G. R., Herman, A. G. & Kockx, M. M. Overexpression of the anti-apoptotic caspase-2 short isoform in macrophage-derived foam cells of human atherosclerotic plaques. *Am. J. Pathol.* 162, 731-736 (2003).
11. Talusan, P. *et al.* Analysis of intimal proteoglycans in atherosclerosis-prone and atherosclerosis-resistant human arteries by mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics.* 4, 1350-1357 (2005).
12. Emmert-Buck, M. R. *et al.* Laser capture microdissection. *Science* 274, 998-1001 (1996).
13. Bjellqvist, B. *et al.* Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *J. Biochem. Biophys. Methods* 6, 317-339 (1982).
14. Twyman, R. M. *Principles of Proteomics*. (2004).
15. Kenrick, K. G. & Margolis, J. Isoelectric focusing and gradient gel electrophoresis: a two-dimensional technique. *Anal. Biochem.* 33, 204-207 (1970).
16. Klose, J. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik.* 26, 231-243 (1975).
17. O'Farrell, P. H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021 (1975).
18. Washburn, M. P., Wolters, D. & Yates, J. R., III Large-scale analysis of the yeast proteome by multidimensional protein identification technology. *Nat. Biotechnol.* 19, 242-247 (2001).
19. Ahmed, F. E. The role of capillary electrophoresis-mass spectrometry to proteome analysis and biomarker discovery. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 877, 1963-1981 (2009).
20. Fang, X., Balgley, B. M. & Lee, C. S. Recent advances in capillary electrophoresis-based proteomic techniques for biomarker discovery. *Electrophoresis* 30, 3998-4007 (2009).
21. Domon, B. & Aebersold, R. Mass spectrometry and protein analysis. *Science* 312, 212-217 (2006).

22. Karas, M. & Hillenkamp, F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal. Chem.* 60, 2299-2301 (1988).
23. Fenn, J. B., Mann, M., Meng, C. K., Wong, S. F. & Whitehouse, C. M. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 246, 64-71 (1989).
24. Zhu, W., Smith, J. W. & Huang, C. M. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J. Biomed. Biotechnol.* 2010, 840518 (2010).
25. Roelofsen, H. *et al.* Comparison of isotope-labeled amino acid incorporation rates (CILAIR) provides a quantitative method to study tissue secretomes. *Mol. Cell Proteomics* 8, 316-324 (2009).
26. Elliott, M. H., Smith, D. S., Parker, C. E. & Borchers, C. Current trends in quantitative proteomics. *J. Mass Spectrom.* 44, 1637-1660 (2009).
27. Wilm, M. Quantitative proteomics in biological research. *Proteomics* 9, 4590-4605 (2009).
28. Pan, S. *et al.* Mass spectrometry based targeted protein quantification: methods and applications. *J. Proteome. Res.* 8, 787-797 (2009).
29. Anderson, N. L. & Anderson, N. G. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell Proteomics* 1, 845-867 (2002).
30. Ekegren, T., Hanrieder, J., Aquilonius, S. M. & Bergquist, J. Focused proteomics in post-mortem human spinal cord. *J. Proteome. Res.* 5, 2364-2371 (2006).
31. Barderas, M. G. *et al.* Circulating human monocytes in the acute coronary syndrome express a characteristic proteomic profile. *J. Proteome. Res.* 6, 876-886 (2007).
32. Barderas, M. G. *et al.* Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome. *Proteomics* 9, 1982-1993 (2009).
33. Mayr, M. *et al.* Proteomic and metabolomic analyses of atherosclerotic vessels from apolipoprotein E-deficient mice reveal alterations in inflammation, oxidative stress, and energy metabolism. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2135-2142 (2005).
34. Madan, M. & Amar, S. Toll-like receptor-2 mediates diet and/or pathogen associated atherosclerosis: proteomic findings. *PLoS. One.* 3, e3204 (2008).
35. Donners, M. M. *et al.* Proteomic analysis of differential protein expression in human atherosclerotic plaque progression. *J. Pathol.* 206, 39-45 (2005).
36. Park, H. K. *et al.* Expression of heat shock protein 27 in human atherosclerotic plaques and increased plasma level of heat shock protein 27 in patients with acute coronary syndrome. *Circulation* 114, 886-893 (2006).
37. Lepedda, A. J. *et al.* A proteomic approach to differentiate histologically classified stable and unstable plaques from human carotid arteries. *Atherosclerosis* 203, 112-118 (2009).
38. Slevin, M. *et al.* Identification of differential protein expression associated with development of unstable human carotid plaques. *Am. J. Pathol.* 168, 1004-1021 (2006).
39. Martinet, W., Schrijvers, D. M., De Meyer, G. R., Herman, A. G. & Kockx, M. M. Western array analysis of human atherosclerotic plaques: downregulation of apoptosis-linked gene 2. *Cardiovasc. Res.* 60, 259-267 (2003).
40. Sung, H. J. *et al.* Proteomic analysis of differential protein expression in atherosclerosis. *Biomarkers* 11, 279-290 (2006).
41. You, S. A. *et al.* Proteomic approach to coronary atherosclerosis shows ferritin light chain as a significant marker: evidence consistent with iron hypothesis in atherosclerosis. *Physiol Genomics* 13, 25-30 (2003).
42. Bagnato, C. *et al.* Proteomics analysis of human coronary atherosclerotic plaque: a feasibility study of direct tissue proteomics by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* 6, 1088-1102 (2007).
43. Stolle, K., Weitkamp, B., Rauterberg, J., Lorkowski, S. & Cullen, P. Laser microdissection-based analysis of mRNA expression in human coronary arteries with intimal thickening. *J. Histochem. Cytochem.* 52, 1511-1518 (2004).
44. Tuomisto, T. T. *et al.* Gene expression in macrophage-rich inflammatory cell infiltrates in human atherosclerotic lesions as studied by laser microdissection and DNA array:

- overexpression of HMG-CoA reductase, colony stimulating factor receptors, CD11A/CD18 integrins, and interleukin receptors. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 23, 2235-2240 (2003).
45. Trogan, E. *et al.* Laser capture microdissection analysis of gene expression in macrophages from atherosclerotic lesions of apolipoprotein E-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 2234-2239 (2002).
 46. Trogan, E. *et al.* Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 3781-3786 (2006).
 47. De Souza, A. I., McGregor, E., Dunn, M. J. & Rose, M. L. Preparation of human heart for laser microdissection and proteomics. *Proteomics*. 4, 578-586 (2004).
 48. Wilson, K. E. *et al.* Comparative proteomic analysis using samples obtained with laser microdissection and saturation dye labelling. *Proteomics*. 5, 3851-3858 (2005).
 49. Anderson, N. L. The clinical plasma proteome: a survey of clinical assays for proteins in plasma and serum. *Clin. Chem.* 56, 177-185 (2010).
 50. Hortin, G. L., Carr, S. A. & Anderson, N. L. Introduction: Advances in protein analysis for the clinical laboratory. *Clin. Chem.* 56, 149-151 (2010).
 51. Florian-Kujawski, M. *et al.* Biomarker profiling of plasma from acute coronary syndrome patients. Application of ProteinChip Array analysis. *Int. Angiol.* 23, 246-254 (2004).
 52. Hong, M. *et al.* The potential biomarkers for thromboembolism detected by SELDI-TOF-MS. *Thromb. Res.* 123, 556-564 (2009).
 53. Dupont, A. *et al.* The proteome and secretome of human arterial smooth muscle cells. *Proteomics*. 5, 585-596 (2005).
 54. Dupont, A. *et al.* Two-dimensional maps and databases of the human macrophage proteome and secretome. *Proteomics*. 4, 1761-1778 (2004).
 55. Ganesh, S. K. *et al.* Detection of venous thromboembolism by proteomic serum biomarkers. *PLoS. One.* 2, e544 (2007).
 56. Duran, M. C. *et al.* Proteomic analysis of human vessels: application to atherosclerotic plaques. *Proteomics*. 3, 973-978 (2003).
 57. Martin-Ventura, J. L. *et al.* Identification by a differential proteomic approach of heat shock protein 27 as a potential marker of atherosclerosis. *Circulation* 110, 2216-2219 (2004).
 58. Duran, M. C. *et al.* Atorvastatin modulates the profile of proteins released by human atherosclerotic plaques. *Eur. J. Pharmacol.* 562, 119-129 (2007).
 59. Alvarez-Llamas, G. *et al.* Characterization of the human visceral adipose tissue secretome. *Mol. Cell Proteomics*. 6, 589-600 (2007).
 60. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685 (1970).
 61. Lawlor, K., Nazarian, A., Lacomis, L., Tempst, P. & Villanueva, J. Pathway-based biomarker search by high-throughput proteomics profiling of secretomes. *J. Proteome. Res.* 8, 1489-1503 (2009).
 62. Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. & Mann, M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858 (1996).
 63. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M. & Cottrell, J. S. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567 (1999).
 64. Lawrie, L. C. & Curran, S. Laser capture microdissection and colorectal cancer proteomics. *Methods Mol. Biol.* 293, 245-253 (2005).
 65. Vivanco, F. *et al.* Quest for novel cardiovascular biomarkers by proteomic analysis. *J. Proteome. Res.* 4, 1181-1191 (2005).
 66. De la Cuesta, F. *et al.* Tissue proteomics in atherosclerosis: elucidating the molecular mechanisms of cardiovascular diseases. *Expert. Rev. Proteomics*. 6, 395-409 (2009).

67. Kane, L. A., Neverova, I. & Van Eyk, J. E. Subfractionation of heart tissue: the "in sequence" myofilament protein extraction of myocardial tissue. *Methods Mol. Biol.* 357, 87-90 (2007).
68. Kirana, C. *et al.* Compatibility of toluidine blue with laser microdissection and saturation labeling DIGE. *Proteomics*. 9, 485-490 (2009).
69. Pennington, K., Dicker, P., Dunn, M. J. & Cotter, D. R. Proteomic analysis reveals protein changes within layer 2 of the insular cortex in schizophrenia. *Proteomics* 8, 5097-5107 (2008).
70. Padro, T., Pena, E., Garcia-Arguinzonis, M., Llorente-Cortes, V. & Badimon, L. Low-density lipoproteins impair migration of human coronary vascular smooth muscle cells and induce changes in the proteomic profile of myosin light chain. *Cardiovasc. Res.* 77, 211-220 (2008).
71. Osborn, M., Caselitz, J., Puschel, K. & Weber, K. Intermediate filament expression in human vascular smooth muscle and in arteriosclerotic plaques. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 411, 449-458 (1987).
72. You, S. A. & Wang, Q. K. Proteomics with two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry analysis in cardiovascular research. *Methods Mol. Med.* 129, 15-26 (2006).
73. Yuan, X. M. Apoptotic macrophage-derived foam cells of human atheromas are rich in iron and ferritin, suggesting iron-catalysed reactions to be involved in apoptosis. *Free Radic. Res.* 30, 221-231 (1999).
74. Fernandez, B., Kampmann, A., Pipp, F., Zimmermann, R. & Schaper, W. Osteoglycin expression and localization in rabbit tissues and atherosclerotic plaques. *Mol. Cell Biochem.* 246, 3-11 (2003).
75. Shanahan, C. M., Cary, N. R., Osbourn, J. K. & Weissberg, P. L. Identification of osteoglycin as a component of the vascular matrix. Differential expression by vascular smooth muscle cells during neointima formation and in atherosclerotic plaques. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 17, 2437-2447 (1997).
76. Li, X. A., Hatanaka, K., Ishibashi-Ueda, H., Yutani, C. & Yamamoto, A. Characterization of serum amyloid P component from human aortic atherosclerotic lesions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 15, 252-257 (1995).
77. Stewart, C. R. *et al.* Serum amyloid P colocalizes with apolipoproteins in human atheroma: functional implications. *J. Lipid Res.* 48, 2162-2171 (2007).
78. Li, X. A., Yutani, C. & Shimokado, K. Serum amyloid P component associates with high density lipoprotein as well as very low density lipoprotein but not with low density lipoprotein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 244, 249-252 (1998).
79. Cho, B. R. *et al.* Increased tissue transglutaminase expression in human atherosclerotic coronary arteries. *Coron. Artery Dis.* 19, 459-468 (2008).
80. Katsuda, S. *et al.* Collagens in human atherosclerosis. Immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Arterioscler. Thromb.* 12, 494-502 (1992).
81. Kittelberger, R., Davis, P. F. & Stehbins, W. E. Type VI collagen in experimental atherosclerosis. *Experientia* 46, 264-267 (1990).
82. Wamhoff, B. R. *et al.* A G/C element mediates repression of the SM22alpha promoter within phenotypically modulated smooth muscle cells in experimental atherosclerosis. *Circ. Res.* 95, 981-988 (2004).
83. Feil, S., Hofmann, F. & Feil, R. SM22alpha modulates vascular smooth muscle cell phenotype during atherogenesis. *Circ. Res.* 94, 863-865 (2004).
84. Shanahan, C. M. *et al.* Medial localization of mineralization-regulating proteins in association with Monckeberg's sclerosis: evidence for smooth muscle cell-mediated vascular calcification. *Circulation* 100, 2168-2176 (1999).
85. Jacquier-Sarlin, M. R., Fuller, K., nh-Xuan, A. T., Richard, M. J. & Polla, B. S. Protective effects of hsp70 in inflammation. *Experientia* 50, 1031-1038 (1994).

86. Bielecka-Dabrowa, A., Barylski, M., Mikhailidis, D. P., Rysz, J. & Banach, M. HSP 70 and atherosclerosis--protector or activator? *Expert. Opin. Ther. Targets.* 13, 307-317 (2009).
87. Feaver, R. E., Hastings, N. E., Pryor, A. & Blackman, B. R. GRP78 upregulation by atheroprone shear stress via p38-, alpha2beta1-dependent mechanism in endothelial cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 28, 1534-1541 (2008).
88. Dickhout, J. G. *et al.* Peroxynitrite causes endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human vascular endothelium: implications in atherogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 2623-2629 (2005).
89. Pedruzzi, E. *et al.* NAD(P)H oxidase Nox-4 mediates 7-ketocholesterol-induced endoplasmic reticulum stress and apoptosis in human aortic smooth muscle cells. *Mol. Cell Biol.* 24, 10703-10717 (2004).
90. Zhou, J. *et al.* Association of multiple cellular stress pathways with accelerated atherosclerosis in hyperhomocysteinemic apolipoprotein E-deficient mice. *Circulation* 110, 207-213 (2004).
91. Bhattacharjee, G. *et al.* Regulation of tissue factor--mediated initiation of the coagulation cascade by cell surface grp78. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25, 1737-1743 (2005).
92. Kondoh, H., Lleonart, M. E., Bernard, D. & Gil, J. Protection from oxidative stress by enhanced glycolysis; a possible mechanism of cellular immortalization. *Histol. Histopathol.* 22, 85-90 (2007).
93. Liu, X. *et al.* Proteomic analysis of homocysteine induced proliferation of cultured neonatal rat vascular smooth muscle cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1794, 177-184 (2009).
94. Zelko, I. N., Mariani, T. J. & Folz, R. J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 337-349 (2002).
95. Miura, T., Nishinaka, T. & Terada, T. Different functions between human monomeric carbonyl reductase 3 and carbonyl reductase 1. *Mol. Cell Biochem.* 315, 113-121 (2008).
96. Ellis, E. M. Reactive carbonyls and oxidative stress: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* 115, 13-24 (2007).
97. Yamagishi, S. *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) prevents advanced glycation end products (AGEs)-elicited endothelial nitric oxide synthase (eNOS) reduction through its anti-oxidative properties. *Protein Pept. Lett.* 14, 832-835 (2007).
98. Takenaka, K. *et al.* Pigment epithelium-derived factor (PEDF) administration inhibits occlusive thrombus formation in rats: a possible participation of reduced intraplatelet PEDF in thrombosis of acute coronary syndromes. *Atherosclerosis* 197, 25-33 (2008).
99. Fletcher, D. A. & Mullins, R. D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature* 463, 485-492 (2010).
100. Yin, H. L. & Stossel, T. P. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281, 583-586 (1979).
101. Yu, N., Erb, L., Shivaji, R., Weisman, G. A. & Seye, C. I. Binding of the P2Y2 nucleotide receptor to filamin A regulates migration of vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 102, 581-588 (2008).

ANEXO

Trabajos publicados durante la Tesis Doctoral:

1. Gil-Dones F., Martin-Rojas T, Lopez-Almodovar LF, Juarez-Tosina R, **De la Cuesta F**, Alvarez-Llamas G, Alonso-Orgaz S, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG. *Valvular aortic stenosis: A Proteomic insight*. Clinical Medicine: Cardiology 2010. 4;1-7.
2. Gil-Dones F., Martin-Rojas T, Lopez-Almodovar LF, **De la Cuesta F**, Darde VM, Alvarez-Llamas G, Juarez-Tosina R, Barroso G, Vivanco F, Padial LR, Barderas MG. *Obtención de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de válvulas aórticas humanas sanas y estenóticas*. Rev Esp Cardiol. 2010;63(1):46-53.
3. Alvarez-Llamas G., **De la Cuesta F.**, Barderas MG., Darde VM., Caramelo C., Vivanco F. *A novel combined methodology for the analysis of membrane and cytosolic sub-proteomes of erythrocytes by 2-DE*. Electrophoresis. 2009;30 (23): 4095–4108.
4. **De la Cuesta F.**, Alvarez-Llamas G., Maroto AS., Donado A., Juarez-Tosina R., Padial LR., Pinto AG., Barderas MG.*, Vivanco F*. *An optimum method designed for 2D-DIGE analysis of arterial intima and media layers isolated by laser microdissection*. Proteomics Clinical Applications. 2009;3: 1174–1184.
5. **De la Cuesta F.**, Alvarez-Llamas G., Gil F., Martin-Rojas T., Zubiri I., Pastor C., Barderas MG., Vivanco F. *Tissue proteomics in atherosclerosis: elucidating molecular mechanisms of cardiovascular diseases*. Expert Rev Proteomics. 2009;6(4):395-409.
6. Lazaro A.*, Alvarez-Llamas G.*, Gallego-Delgado J., **de la Cuesta F.**, Osende J., Barderas MG., Vivanco F.. *Pharmacoproteomics in cardiac hypertrophy and atherosclerosis*. Cardiovascular & Hematological disorders: drug target. 2009;9(2):141-8.
7. Barderas MG., Tuñón J., Dardé VM., **De la Cuesta F.**, Jiménez-Nácher JJ., Tarín N., López-Bescós L., Egado J., Vivanco F. *Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome*. Proteomics, 2009. 9 (7): 1982-93.
8. Álvarez-Llamas G., **De la Cuesta F.**, Barderas MG., Darde VM., Padial LR., Vivanco F. *Recent advances in atherosclerosis-based proteomics: new biomarkers and a future perspective*. Expert Rev. Proteomics, 2008. 5, 679-691.
9. Barderas M.G., Dardé V.M., **De la Cuesta F.**, Martin-Ventura J.L., Blanco-Colio L.M., Julio Jiménez-Narcher, Alvarez-Llamas G., Lopez-Bescos L., Tuñón J., Egado J., Vivanco F. *Proteomic Analysis of Circulating Monocytes Identifies Cathepsin D as A Potential Novel Plasma Marker of Acute Coronary Syndromes*. Clinical Medicine: Cardiology 2008;2 191–200.
10. Vivanco F., Padial L.R., Darde V.M., **De la Cuesta F.**, Alvarez-Llamas G., Diaz-Prieto N., M.G. Barderas. *Proteomic Biomarkers of Atherosclerosis*. Biomarker Insights 2008;3 101–113.
11. Vivanco F., Mas S., Dardé V.M., **De la Cuesta F.**, Alvarez-Llamas G., Barderas M.G. *Vascular Proteomics*. Proteomics, Clin. Appl. 2007. 1: 1102-1122.

12. Barderas MG , Tuñón J, Darde VM, **De la Cuesta F**, Jiménez-Nacher J, Lopez Bescós L, Egido J, Vivanco F. *Circulating human monocytes in the acute coronary syndrome express a characteristic proteomic profile*. Journal of Proteome Research. 2007 Feb;6(2):876-86.
13. Vivanco F, Darde V M, **De la Cuesta F**, Barderas M G. *Cardiovascular Proteomics*. Current Proteomics. 2006 Oct; 3 (3):147-170.
14. Vivanco F, Darde VM, Mas S, **De la Cuesta F**, Barderas MG. *Nuevos abordajes proteómicos en la búsqueda de biomarcadores de aterosclerosis*. Cardiovascular Risk Factors, 2006; 15:41-51.
15. Darde VM, Barderas M G, **De la Cuesta F.**, Durán M.C., Egido J., Vivanco F. *La depleción de las proteínas mayoritarias del plasma facilita el análisis proteómico del plasma en pacientes con Síndrome Coronario Agudo*. Investigación Cardiovascular. Enero-Junio, 2006. Vol 9. Nº 1.
16. Vivanco F, Barderas MG, Darde VM, **De la Cuesta F**, Egido J. y Tuñón J. *Proteómica Cardiovascular*. Monocardio, 2006; 8 (1): 39-48.
17. Vereda A., **De la Cuesta F.**, Barderas M.G., de las Heras M. Niño alérgico a múltiples alimentos, con eritema perioral y urticaria tras comer carne de ternera. En: M.V.Cardona Dahl, (Editor). *Casos Clínicos de Residentes en Alergología 2006*. Madrid: Luzán 5, S.A. de Ediciones, 2006: 213-6.
18. Barderas MG, Duran MC, Darde VM, Lazaro A, Gallego-Delgado J, **De la Cuesta F.**, Martin-Ventura JL, Gomez-Hernandez A, Jimenez-Nacher JJ, Tuñon J, Lopez Bescos L, Egido J y Vivanco F. *Expresión diferencial de proteínas de monocitos circulantes en el síndrome coronario agudo mediante análisis proteómico*. Investigación Cardiovascular. 2005, vol. 8, Nº 1.