



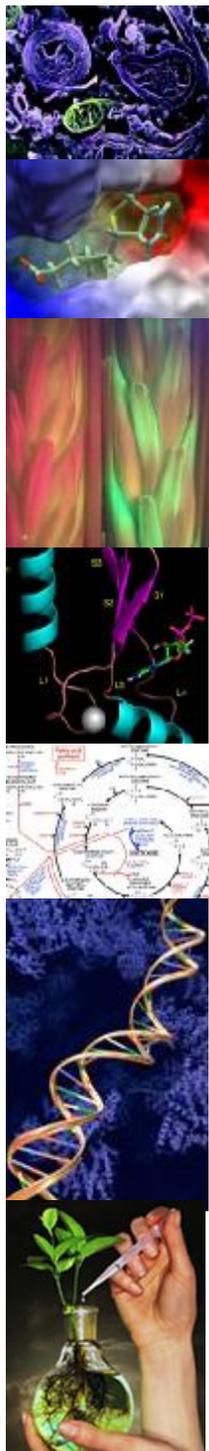
PROTEÓMICA

¿Una herramienta o una utopía?

Blanca Gómez Guerrero
Departamento de Cereales
Laboratorio Tecnológico del Uruguay

Contenido

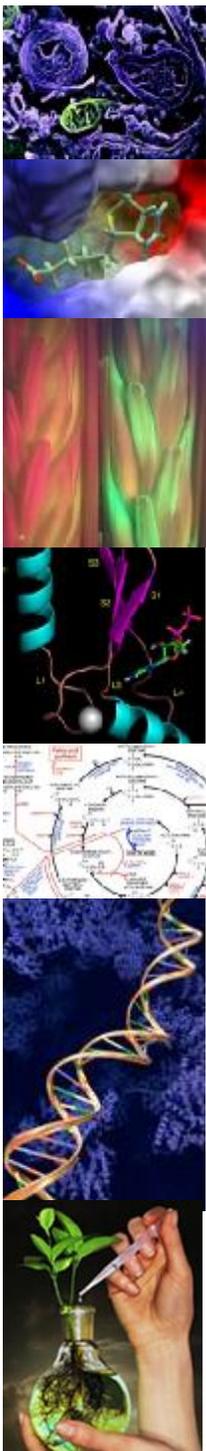
- Que es la proteómica?
- Metodologías utilizadas
- Aplicaciones en el área de los alimentos
- Conclusiones





Proteómica

- Estudio del proteoma



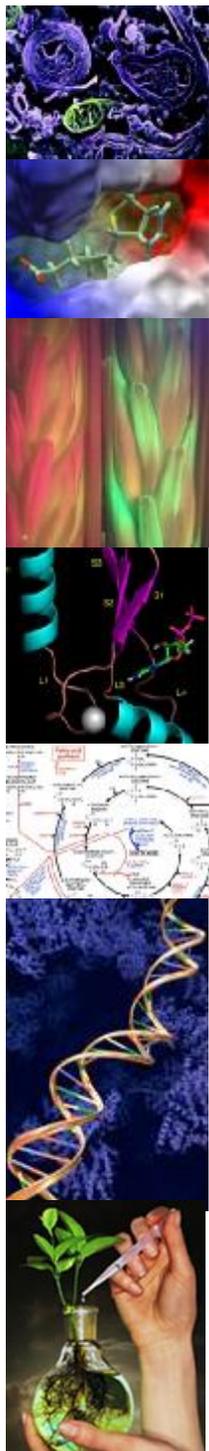
Proteoma

- Es la totalidad de las proteínas presentes en una muestra biológica (tejido, organelo, fluido celular)
- Sistema dinámico (altamente variable):

§ Genes

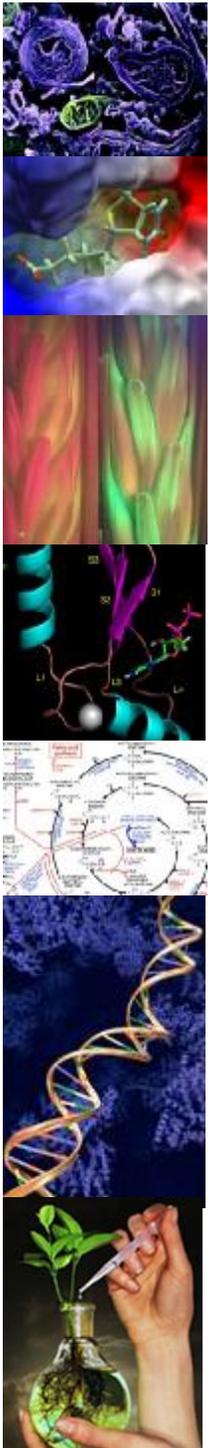
§ Factores externos:

- Estado de desarrollo
- Estado metabólico
- Tipo de tejido
- Interacción con otros organismos
- Sustancias químicas



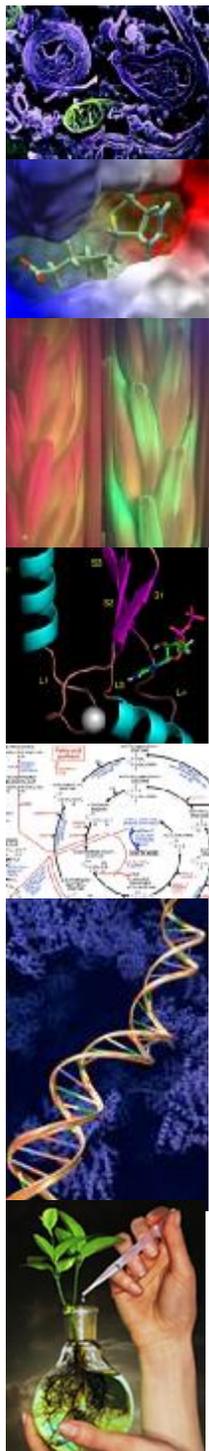
Proteoma

- Refleja el proceso biológico que está ocurriendo en el sistema que se está investigando
- Permite conocer los procesos metabólicos que ocurren en el sistema ayudando a predecir la reacción frente a ciertas condiciones
- Brinda la posibilidad de utilizar proteínas como marcadores característicos de ciertas propiedades, ej: enfermedades



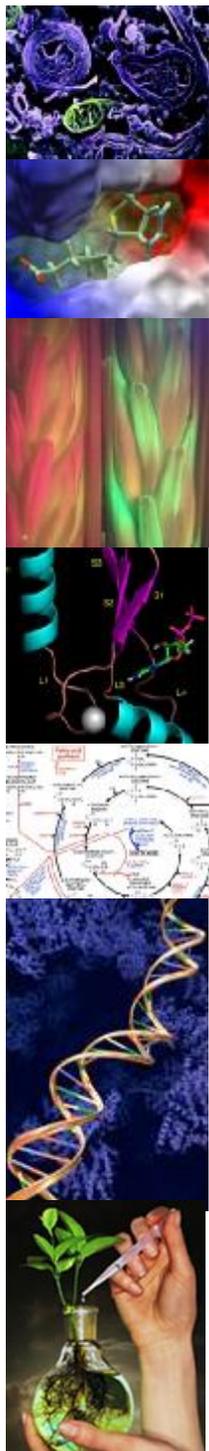
Proteómica

- Estudio del proteoma
- Objetivo entender las diferencias entre dos proteomas en diferentes estados, ej: enfermo vs sano, tratado vs no tratado
- Debido a la complejidad de los sistemas, las metodologías analíticas enfrentan grandes desafíos
 - § Células contienen miles de proteínas diferentes
 - Alta eficiencia en los métodos de separación
 - Herramientas bioinformáticas para manejar gran cantidad de datos



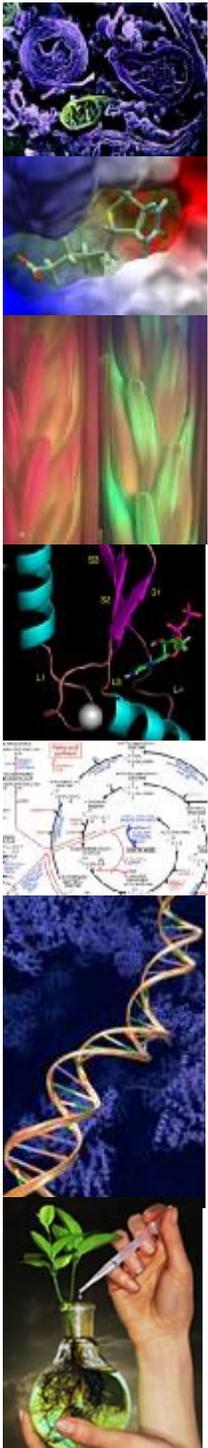
Proteómica

- § Concentración de las proteínas varía inmensamente según el sistema biológico
 - Abundantes proteínas – limitado interés
 - Poco abundantes – importantes
 - Raramente se diferencian por presencia y/o ausencia, sino en los niveles de expresión
- § La identificación debe ser relacionada con la estructura y funcionalidad
 - Métodos altamente sensibles para la identificación



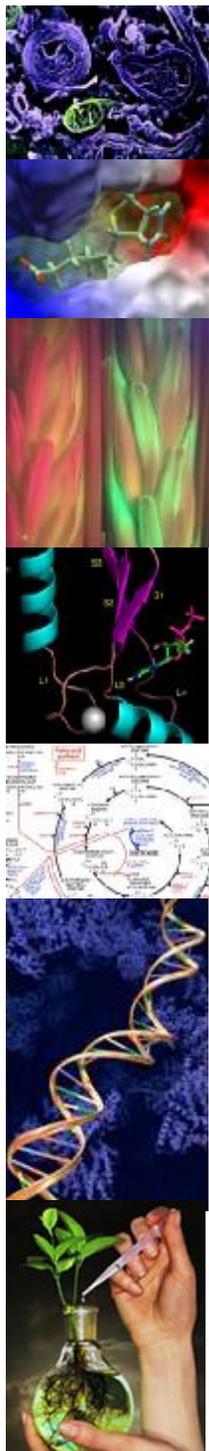
Metodologías

- Separación de proteínas:
 - § Proteínas en su estado original (gral plantas)
 - Buffer isotónicos (previene lisis celular)
 - Centrifugación diferencial (fracciones)
 - Las fracciones individuales – centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa
 - § Todas las proteínas solubilizadas (gral alimentos)
 - Fuerte agente caiotrópico (urea) - rompe los enlaces intermoleculares



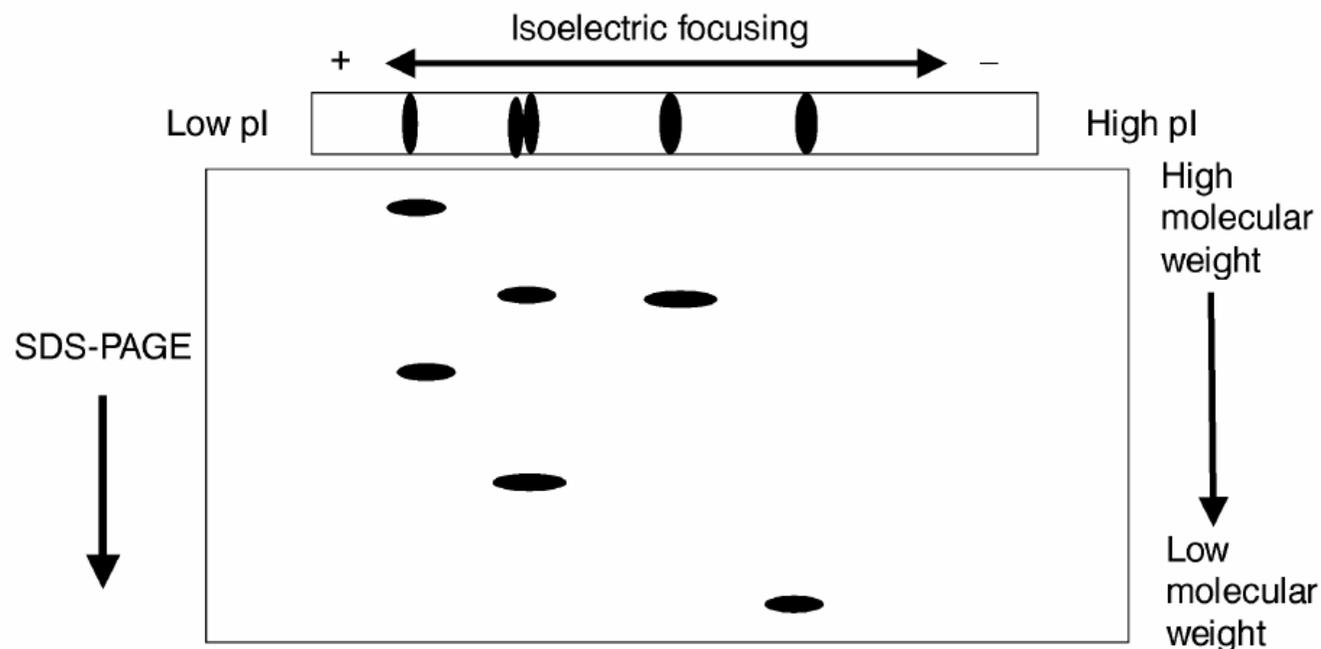
Metodologías

- Para analizar todas las proteínas de un proteoma:
 - § Proteínas intactas son resueltas por IEF (punto isoeléctrico) seguido por un gel SDS-PAGE
 - § Proteínas son hidrolizadas a péptidos y luego estos analizados por LC/MS , Identificación proteica multidimensional (MUDPIT), o 2D-LC



Geles en dos dimensiones

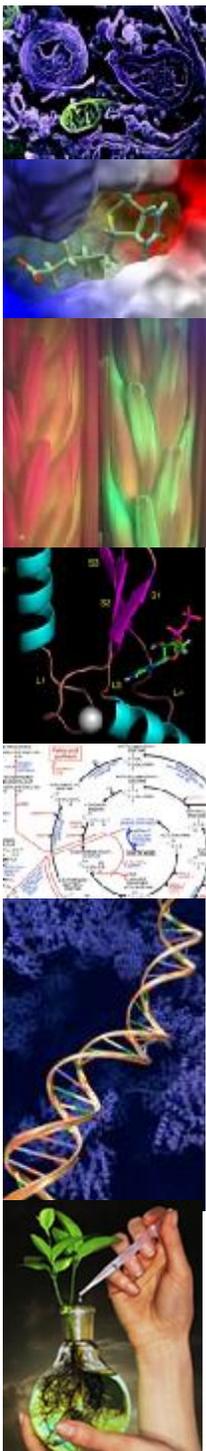
- Técnica muy popular – más de 30 años
- Limitada a proteínas de PM 10-250 kDa
- Principal ventaja - proteínas son analizadas de manera intacta



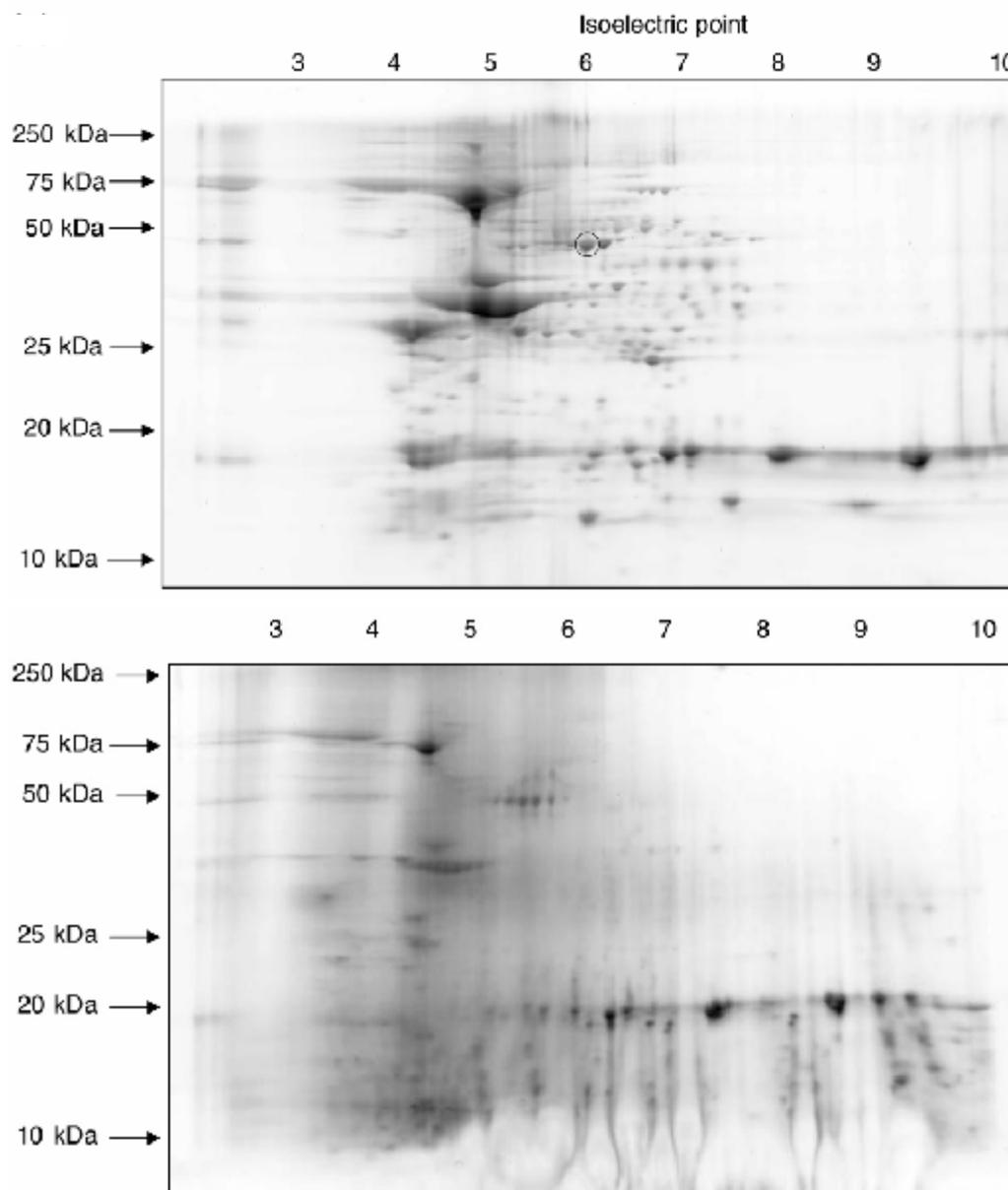
Barnes et al., 2004

Geles en dos dimensiones

- Comparando la posición de las proteínas bajo dos tratamientos diferentes, el efecto del tratamiento puede ser determinado



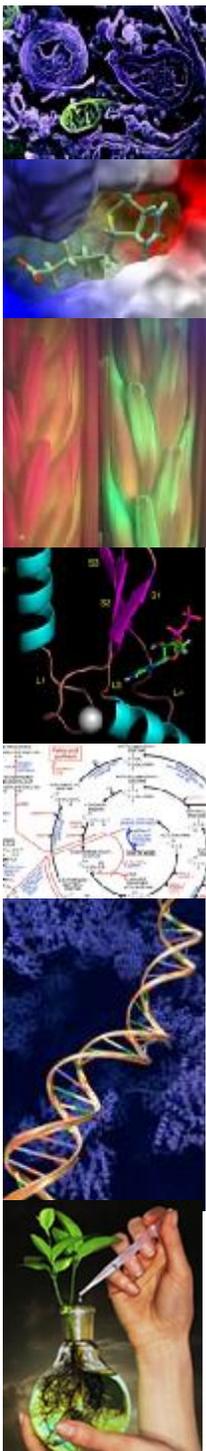
Geles en dos dimensiones



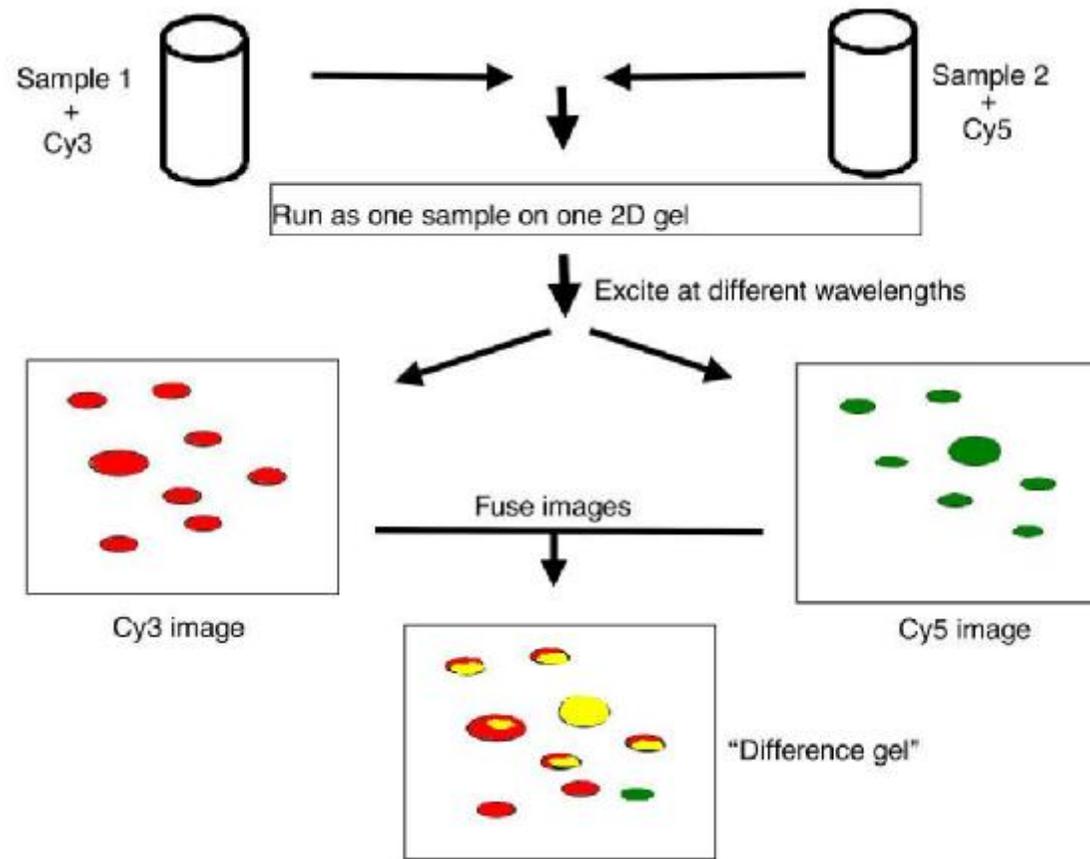
Barnes et al., 2004

Geles en dos dimensiones

- Mayor consistencia en los resultados - tinte con Cianinas (Cy3 y Cy5)
- Los grupos Lys son marcados con un tinte fluorescente
- Cada tratamiento es marcado con un Cy de distinto color
- Las muestras marcadas son mezcladas y corridas juntas en el mismo gel de 2D



Geles en dos dimensiones



- Elimina la variación entre gel y gel
- Resulta más fácil y clara la comparación

Geles en dos dimensiones

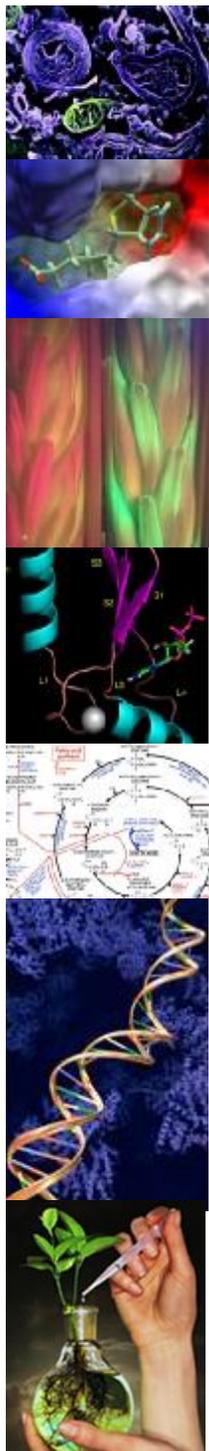
- Software de análisis de imagen son necesarios
- Una vez identificada la proteína se remueve del gel

§ Manualmente

- Riesgos de contaminación de la muestra (queratina)

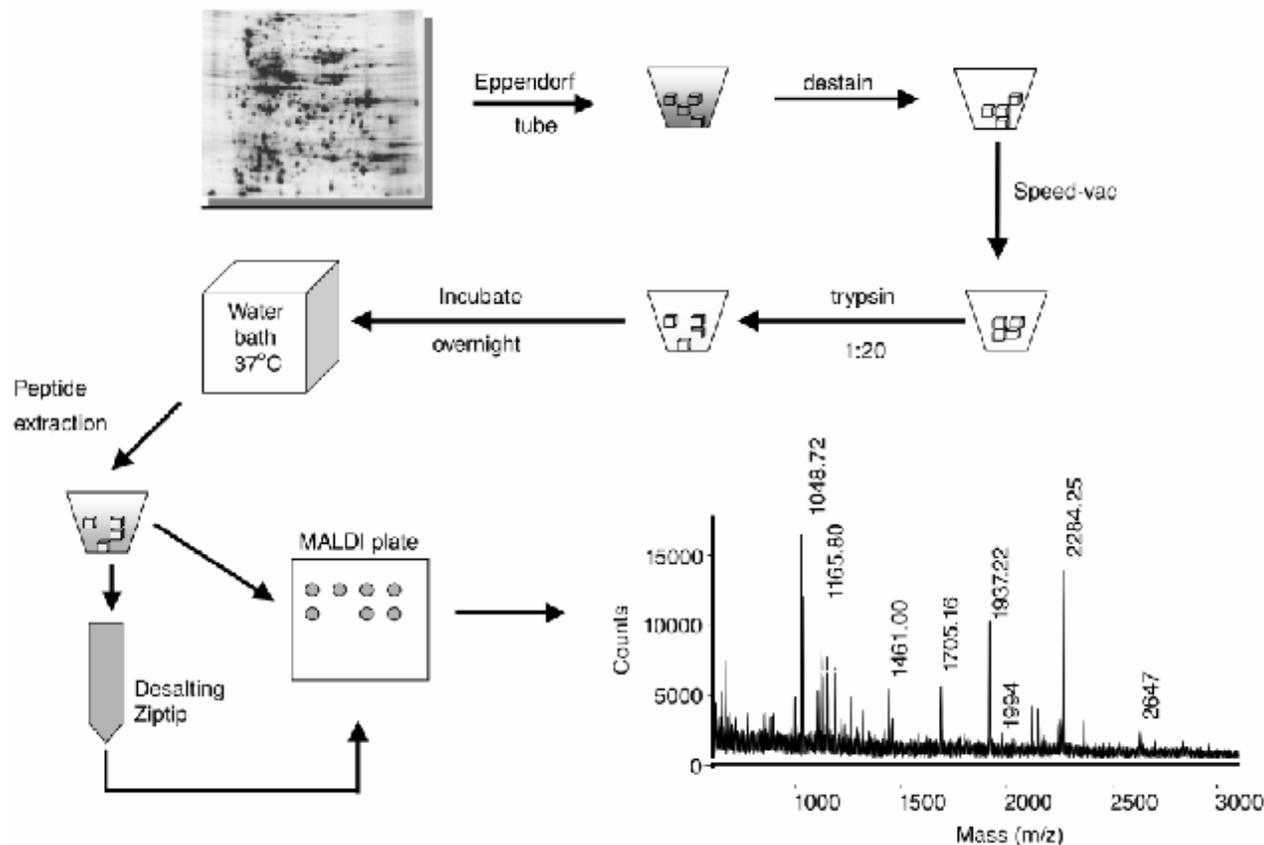
§ Robots

- Más limpio y preciso



Caracterización e identificación

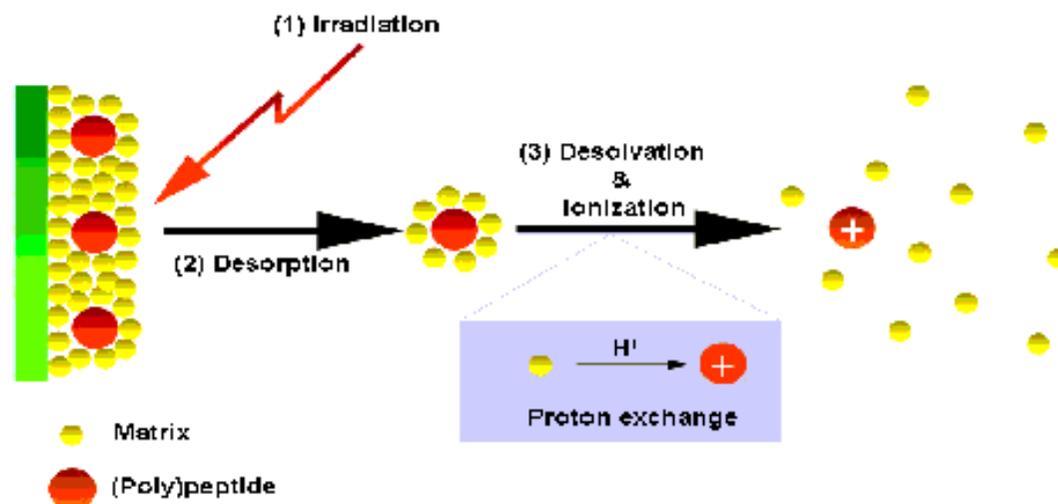
- La región de interés removida del gel es lavada
- Tripsina – corta en los grupos Lys y Arg
- Set de péptidos



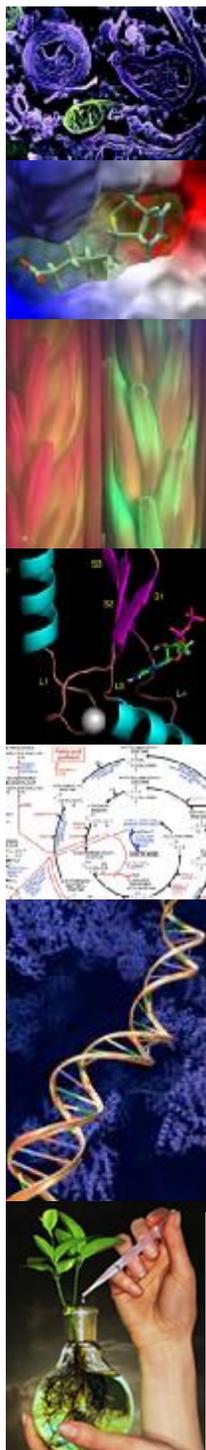
Columna de fase reversa

Caracterización e identificación

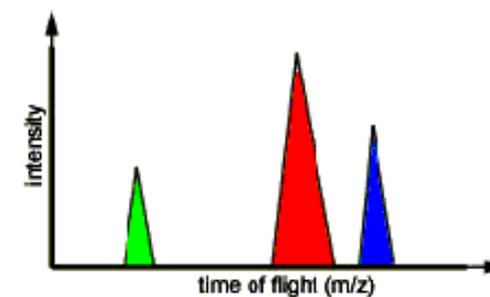
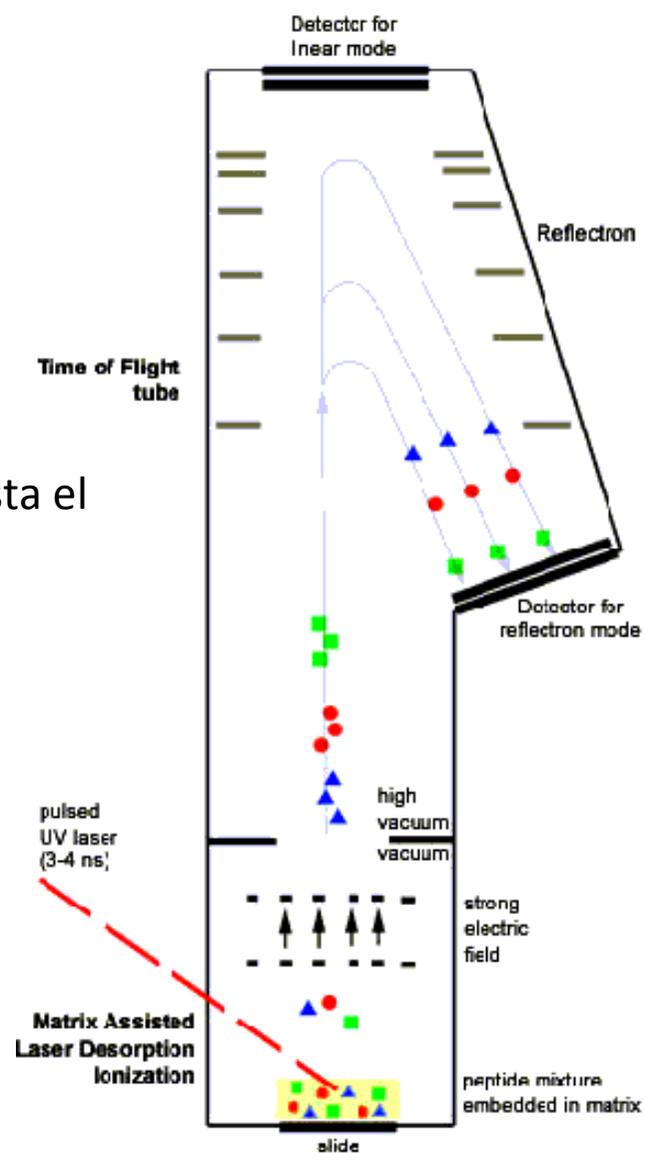
- Para determinar el PM de los péptidos de manera precisa y rápida
 - § MALDI- desorción/ionización láser asistida por matriz - evapora los péptidos
 - § Time of flight (TOF) – analizador de masa con detector de iones



MALDI-TOF



Tiempo de viaje hasta el detector = \sqrt{PM}



Caracterización e identificación

- Cada set de péptidos tiene su PM característico
- El perfil de PM de los péptidos (mass fingerprint) es característico de cada proteína
- El perfil puede ser comparado contra el set de péptidos esperado para esa proteína , calculado por la computadora usando las base de datos

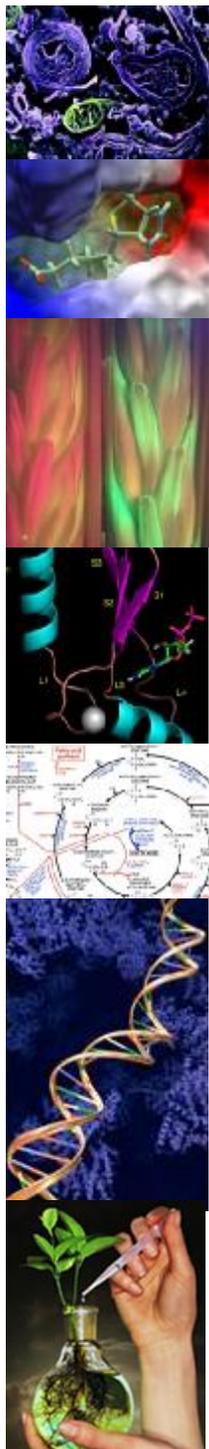
| Program name | Function | URL |
|--------------|------------------------|---|
| MASCOT | Peptide fingerprinting | http://www.matrixscience.com |
| MS-Fit | Peptide fingerprinting | http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm |
| PepMapper | Peptide fingerprinting | http://wolf.bms.umist.ac.uk/mapper/ |
| PepSea | Peptide fingerprinting | http://195.41.108.38/PepSeaIntro.html |
| PeptIdent | Peptide fingerprinting | http://us.expasy.org/tools/peptident.html |
| ProFound | Peptide fingerprinting | http://prowl.rockefeller.edu/ |

Caracterización e identificación

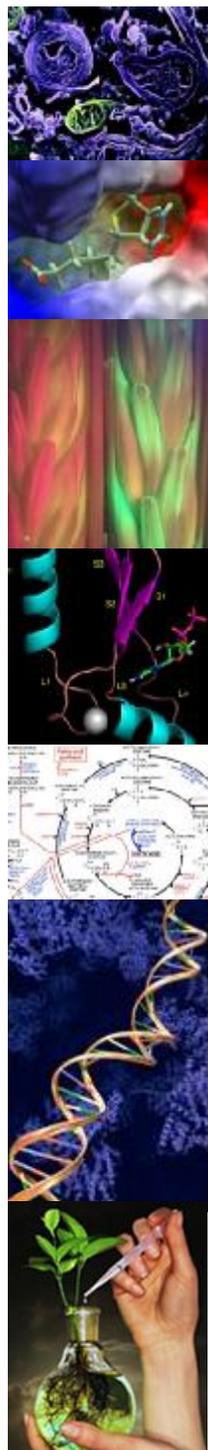
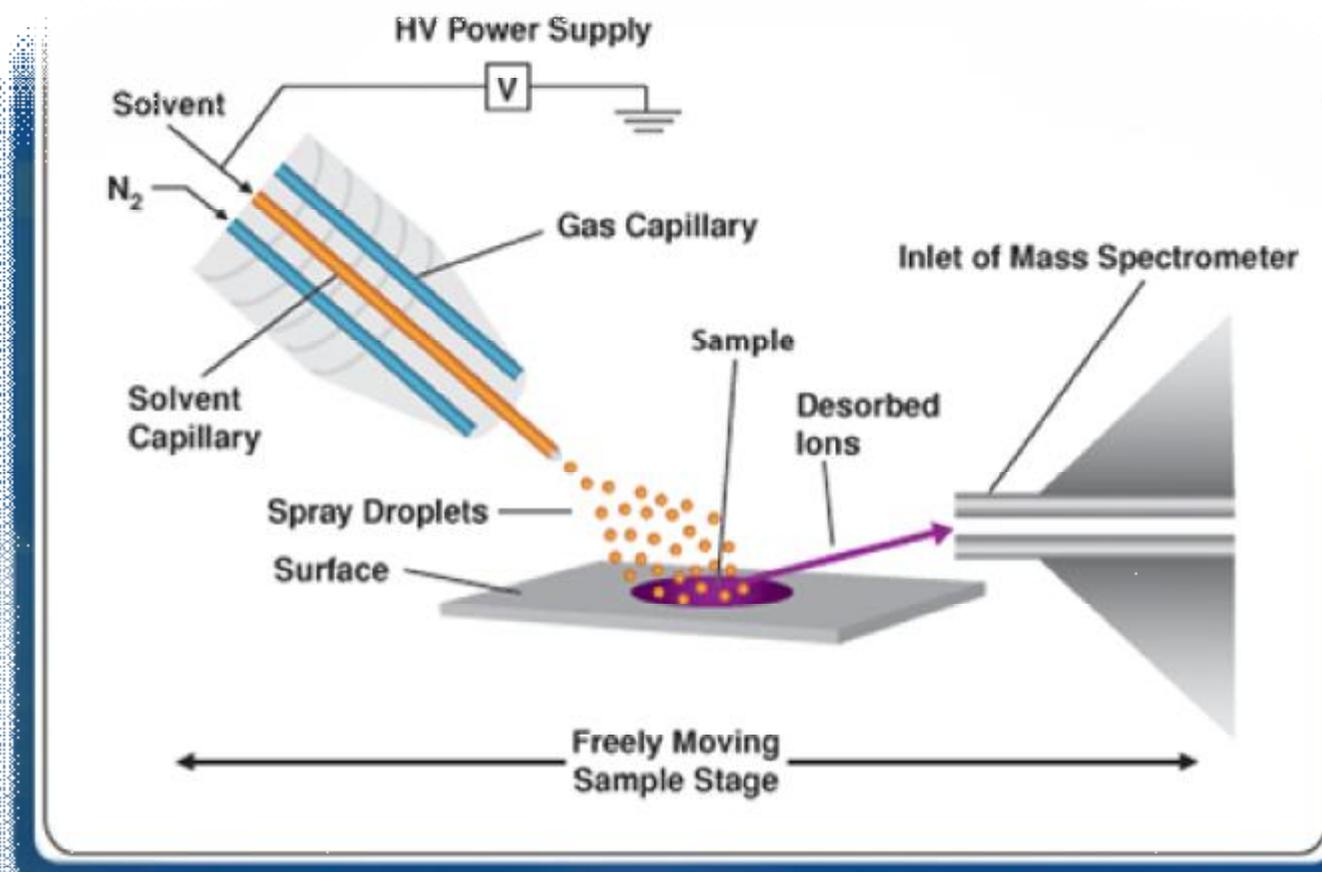
- Necesario determinar la secuencia de amino ácidos:
 - § Secuenciación del N terminal por degradación de Edman
 - § Espectrometría en tandem es un método rápido y con buena sensibilidad – datos MS/MS
 - Quadropolo con captura de iones
 - Triple quadropolo
 - TOF-TOF



Ionización por Electropray (ESI)

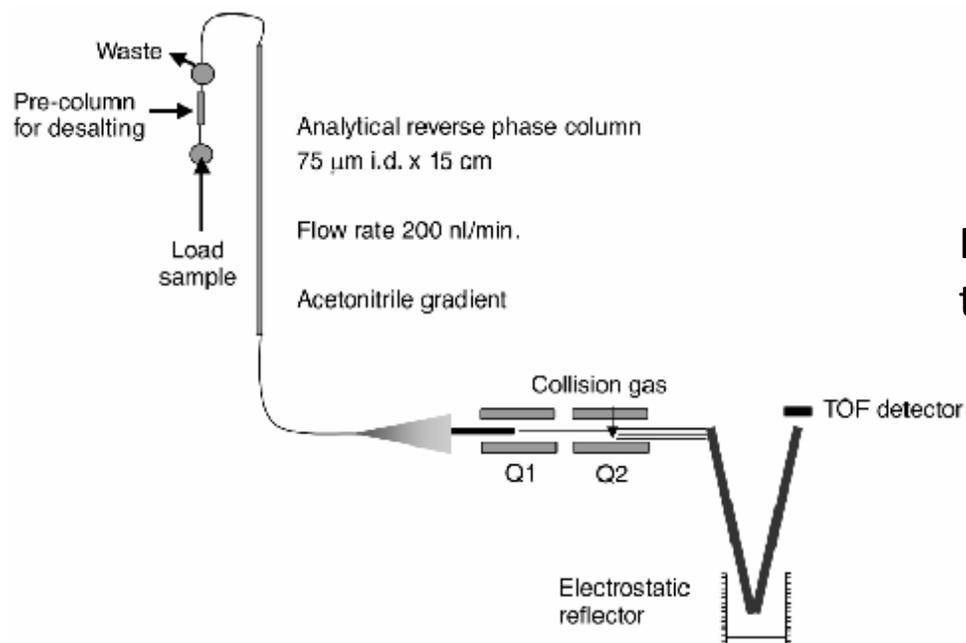


Ionización por electrospray



Ionización por electrospray

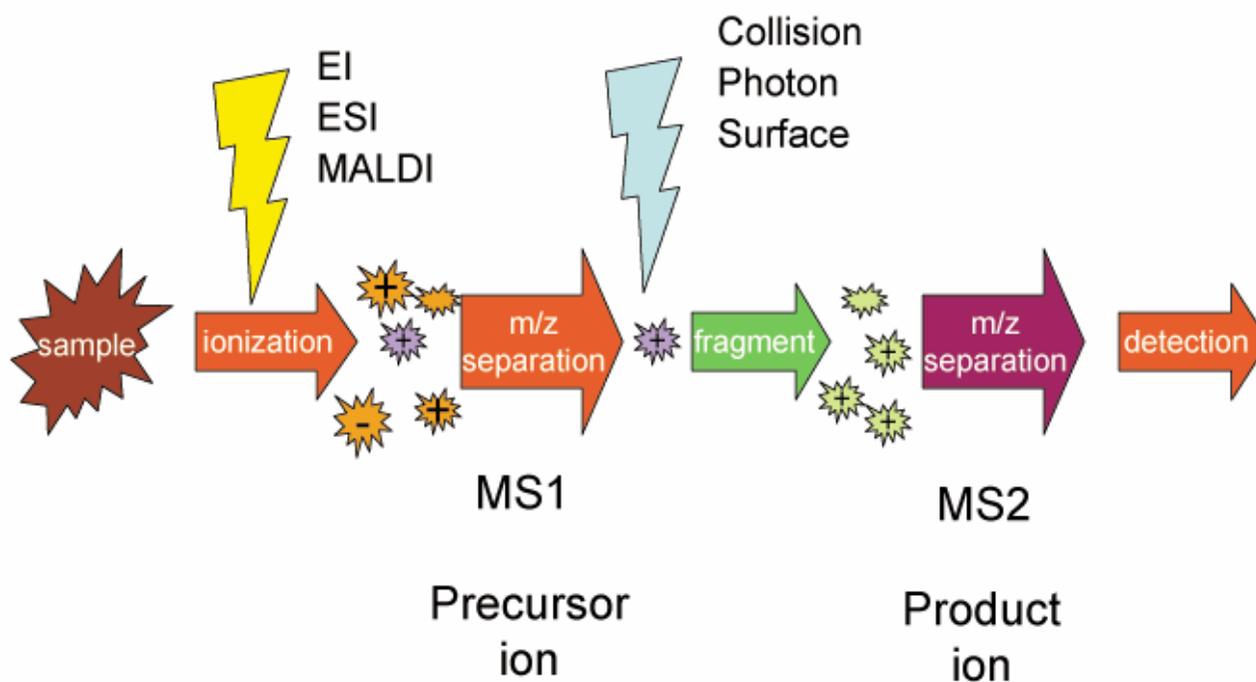
- La sensibilidad del método depende de la concentración de péptidos en el solvente
- Utilizando LC con diámetros internos de columna pequeños, disminuye el vol inyectado aumentando la sensibilidad 748 veces – nano LC



Espectrometría en tandem Nano LC-ESI

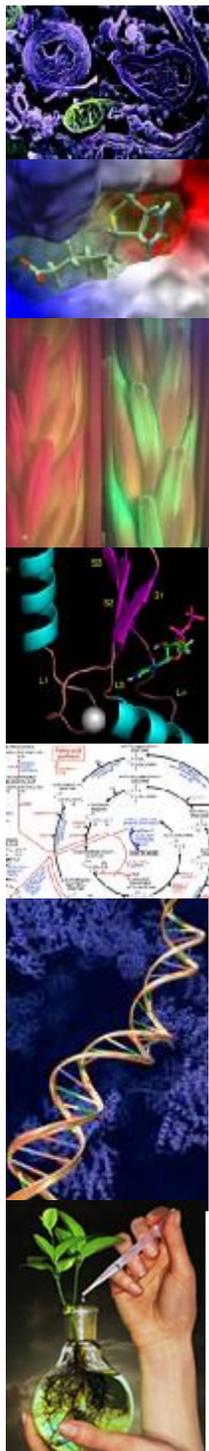
Caracterización e identificación

- TOF –TOF : contiene una puerta selectora de iones permitiendo la entrada de algunos iones a la cámara colisión y así generar nuevos iones a partir del original



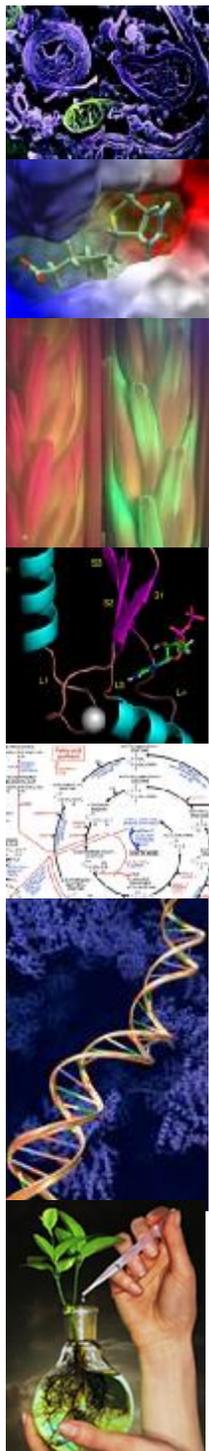
Aplicaciones en alimentos

- Composición de los alimentos
- Seguridad alimentaria de alimentos genéticamente modificados (GM)
- Adulteración de alimentos
- Identificación de alérgenos
- Actividad fisiológica de componentes alimenticios
- Efecto del proceso y almacenamiento en las proteínas
- Mejora de la calidad de los alimentos



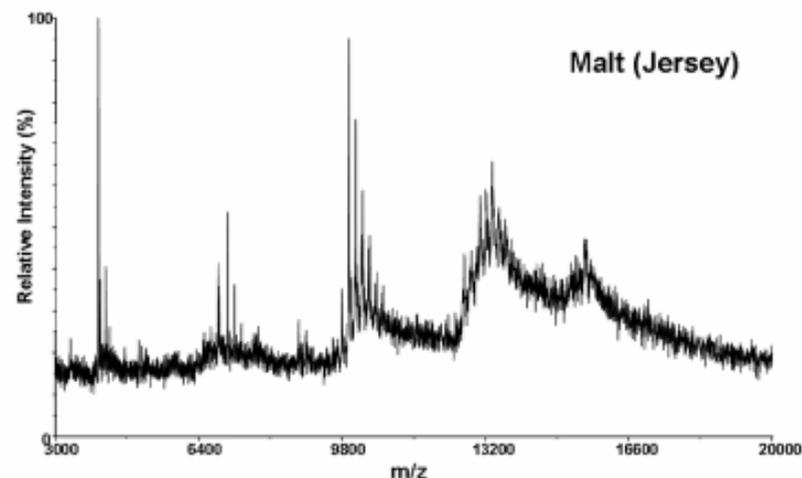
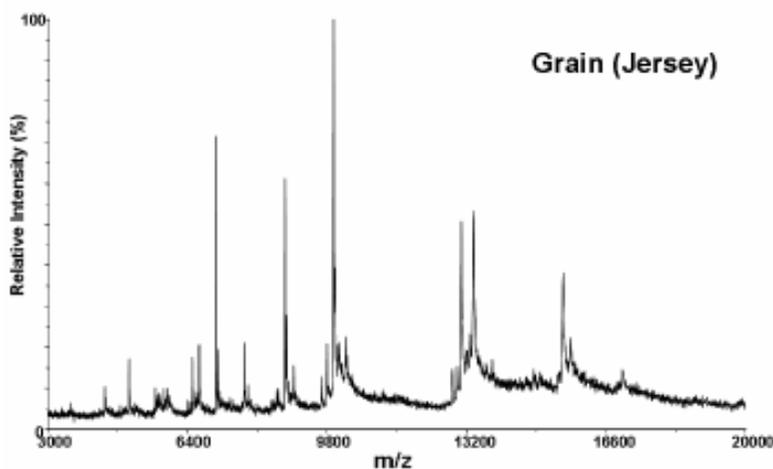
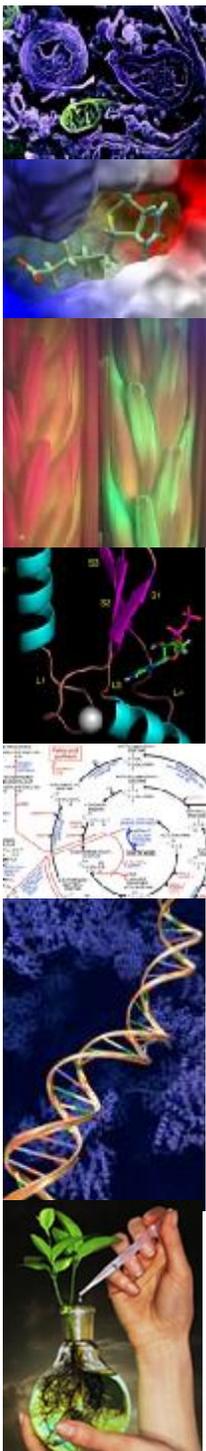
Composición de los alimentos

- Ha sido estudiada por varias décadas por métodos bioquímicos
- Análisis del proteoma permite conocer el comportamiento de las proteínas poco abundantes
 - § Relevancia fisiológica
 - § Relevancia tecnológica
- Ej proteínas de la leche (O'Donnell et al., 2004)
 - § 18 proteínas poco abundantes fueron identificadas
 - § Membrana globular de la grasa – se identificaron 38 nuevas proteínas



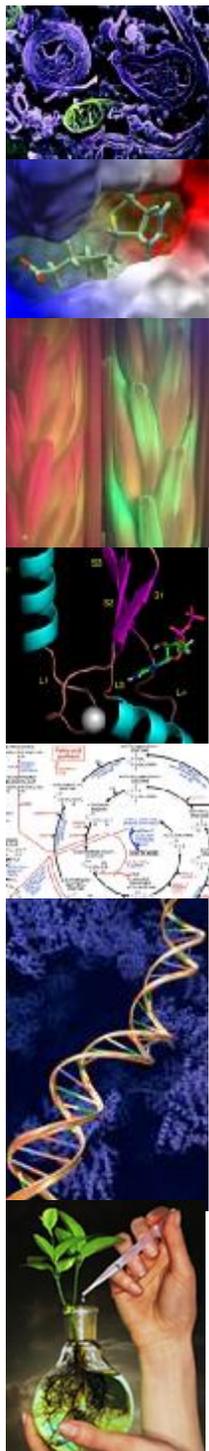
Composición de los alimentos

- Proteínas de cebada (Bobalova et al., 2008)
 - § Investigar el efecto del malteo y el proceso cervecero sobre la composición proteica
 - § MALDI-TOF-TOF



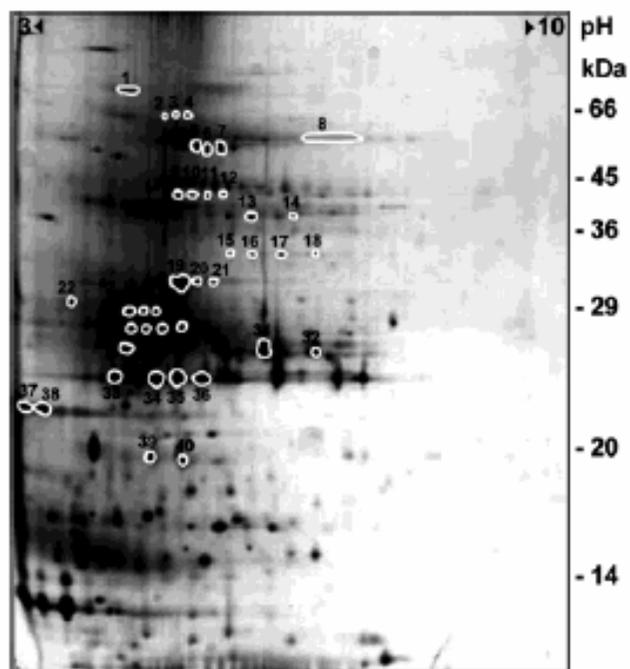
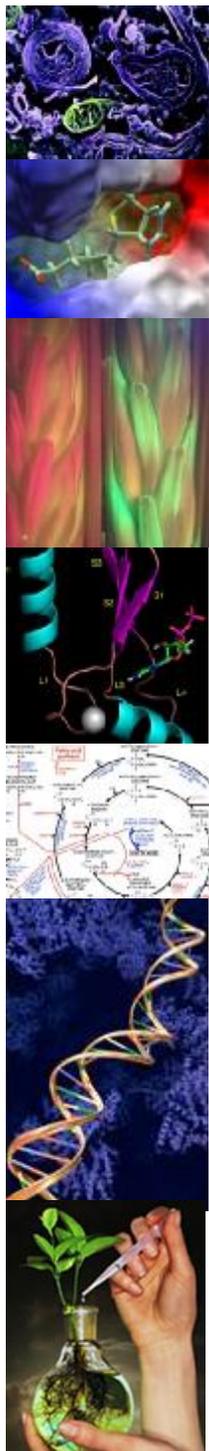
Seguridad alimentos GM

- Principio de equivalencia sustancial: la composición de alimento GM debe ser igual a la del alimento tradicional = alimento seguro
- Método clásico: análisis de nutrientes claves (carbohidratos, ácidos grasos, amino ácidos)
 - § Desventaja: no tiene en cuenta procesos de transformación
- Análisis del proteoma
 - § Permite identificar cambios de transformación, interrupción de genes o regulación de genes

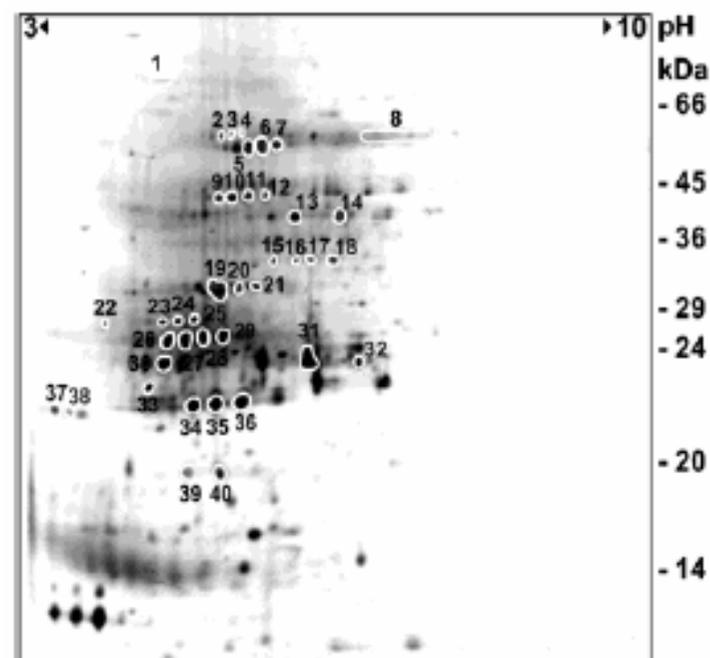


Seguridad alimentos GM

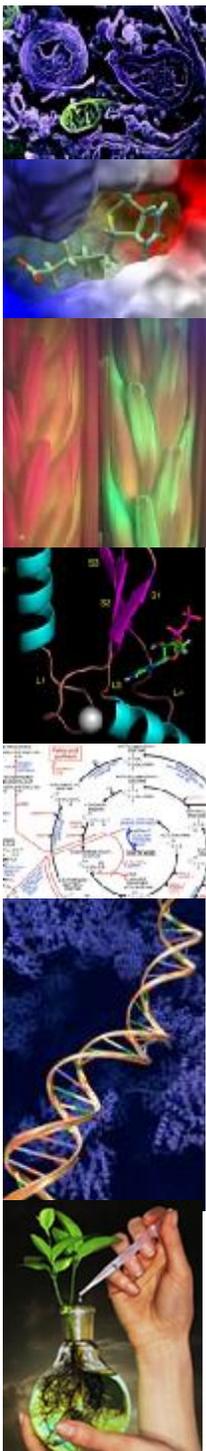
- Ej Tomates con resistencia a virus (Corpillo et al., 2004)
 - § Patrones similares
 - § Niveles de expresión similares



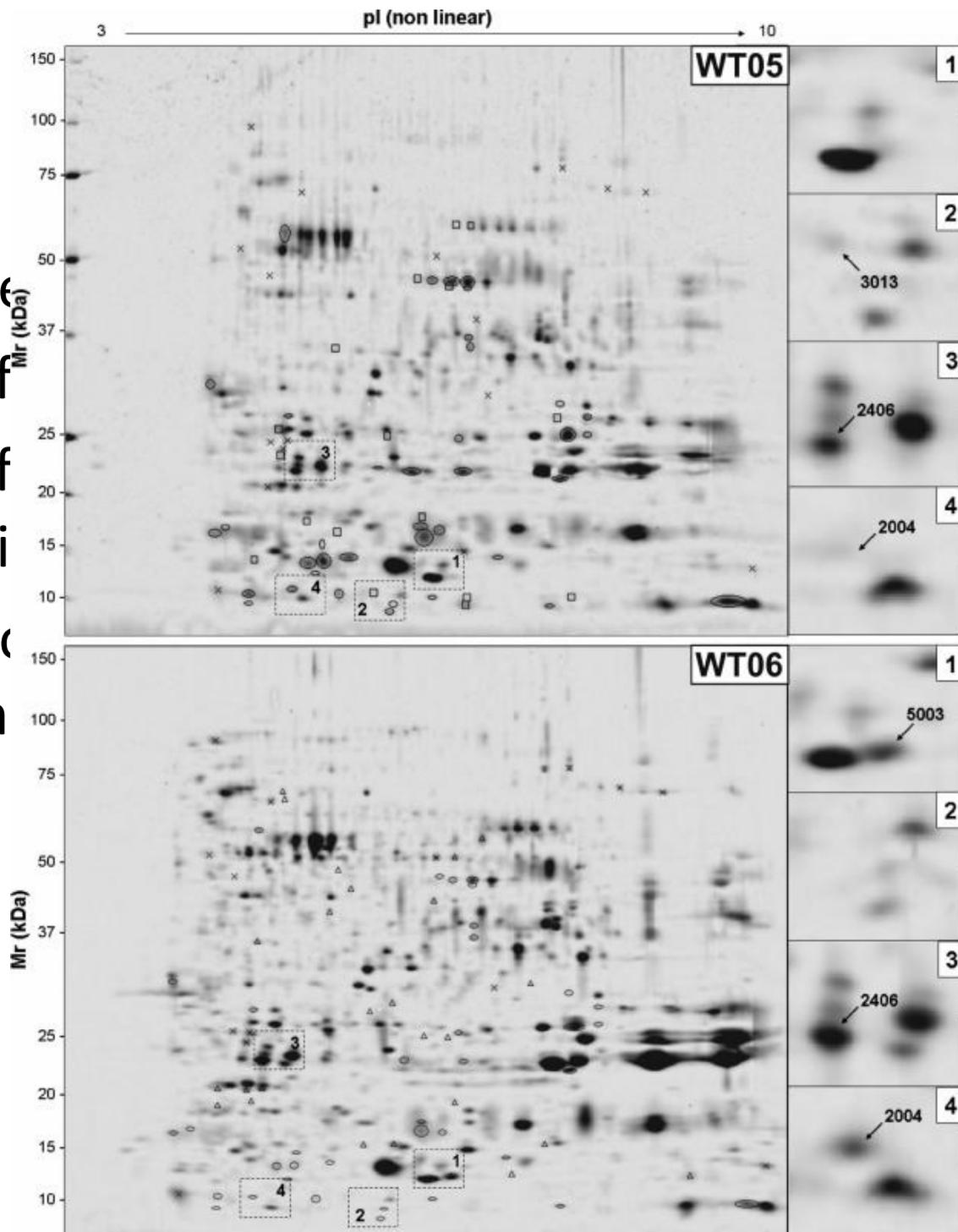
Tipo salvaje



Genéticamente Modificado



- Ej. Se
- § Ef
- § Ef
- di
- Méto
- bom



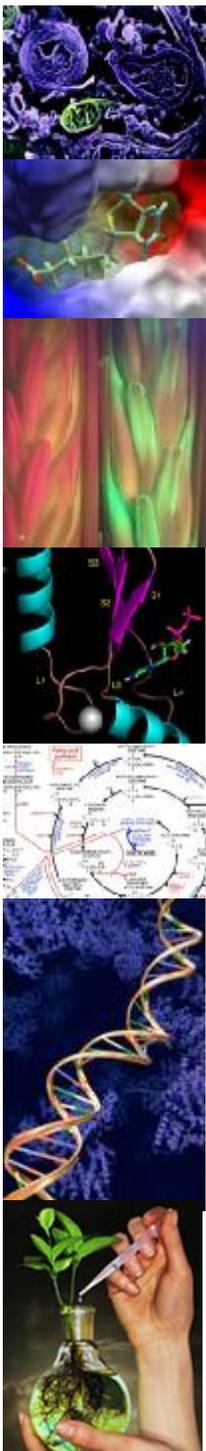
erentes

S

ivo

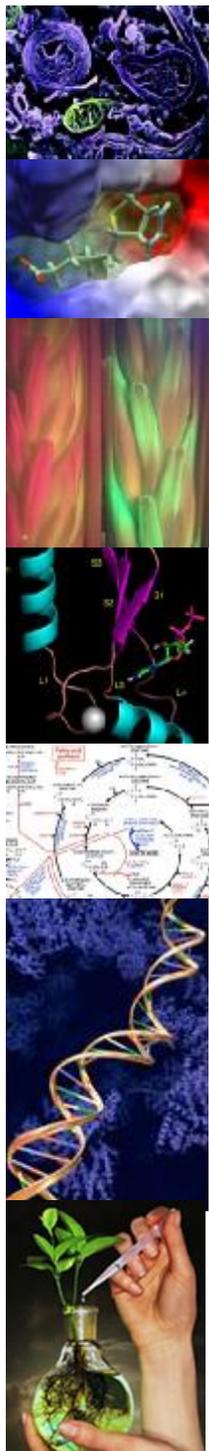
Adulteración de alimentos

- Producto alimenticio debería estar etiquetado con una descripción inequívoca de su contenido
 - § Reemplazo manteca de cacao por otras grasas en la producción de chocolate
 - § Alta calidad de café mezclados con los de baja calidad
- La autenticación del alimento se logra detectando marcadores, característicos de los sustitutos, específicamente proteínas



Adulteración de alimentos

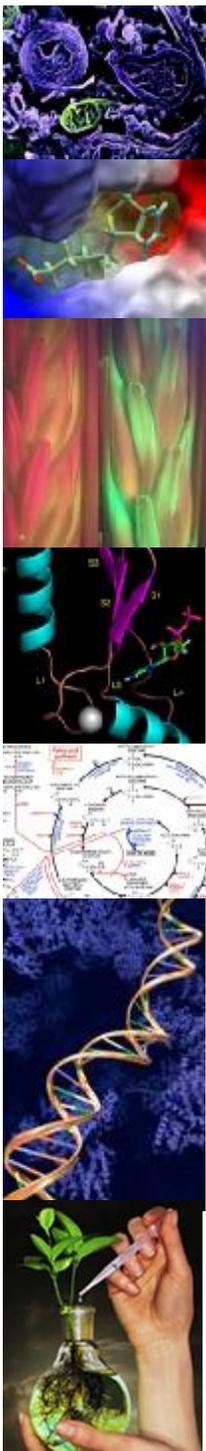
- Ej contaminación de productos cárnicos con tejidos del Sistema Nervioso Central (SNC)
 - § Se identificaron alrededor de 30 proteínas por el perfil de péptidos
 - § Las proteínas presentes en el cerebro del bovino, pero no presentes en el músculo se consideraron candidatas
 - § La proteínas que presentaran mayor niveles de expresión serían seleccionadas como marcadores





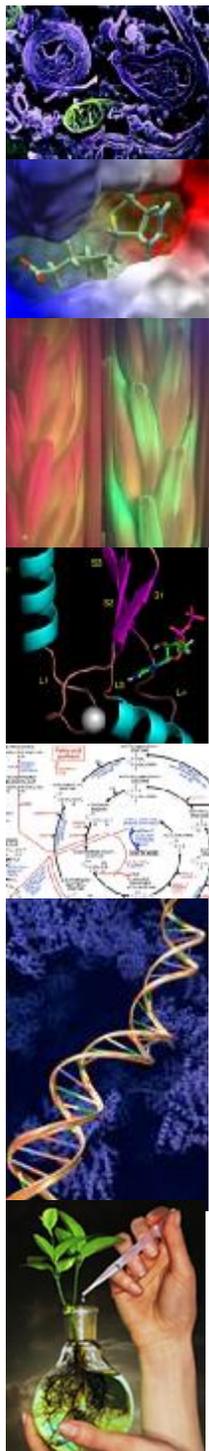
Adulteración de alimentos

- Pescados



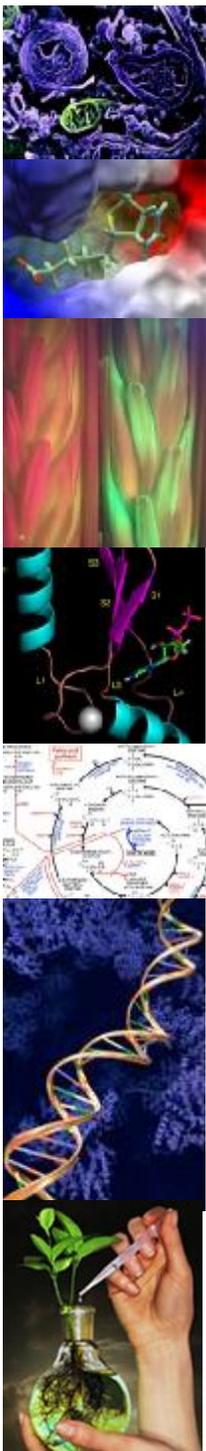
Identificación de alérgenos

- Alergias a los alimentos son reacciones adversas a ciertos componentes del alimento, mediada por una reacción inmunológica (proteínas –IgE)
- Nuevo producto en el mercado – crucial estudiar el potencial de alergenicidad
- Análisis del proteoma requiere un estudio más dirigido, se estudian sólo las proteínas que están ligadas a cierta bioactividad
 - § Separación geles 2D
 - § Western blot análisis incubado con suero de pacientes alérgicos midiendo la unión de IgE
 - § Proteínas-IgE analizadas por MS

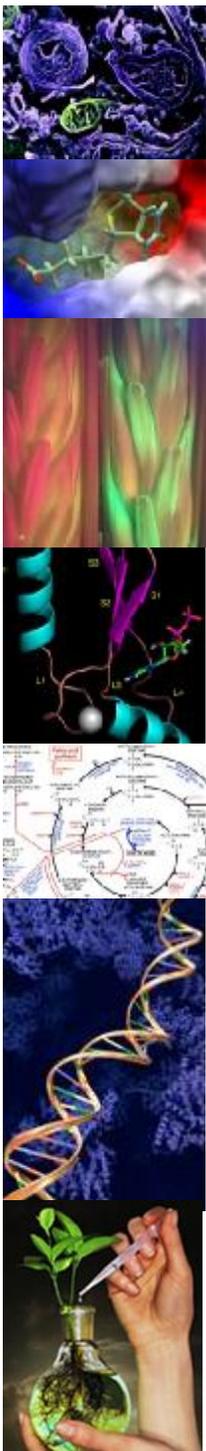


Identificación de alérgenos

- Ej proteínas de trigo (Sotvoský et al., 2008)
 - § De 800 puntos – 80 mostraron inmunoreactividad con IgE – 21 puntos fueron analizados con MS
 - § Inhibidores de alfa amilasa fueron detectados como los activadores de la reacción



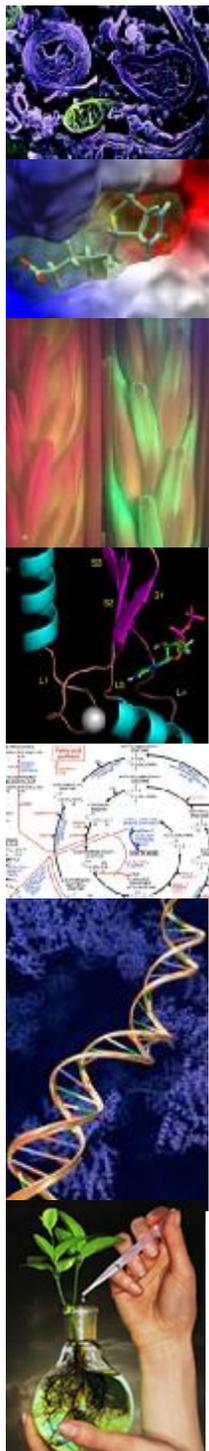
Actividad fisiológica

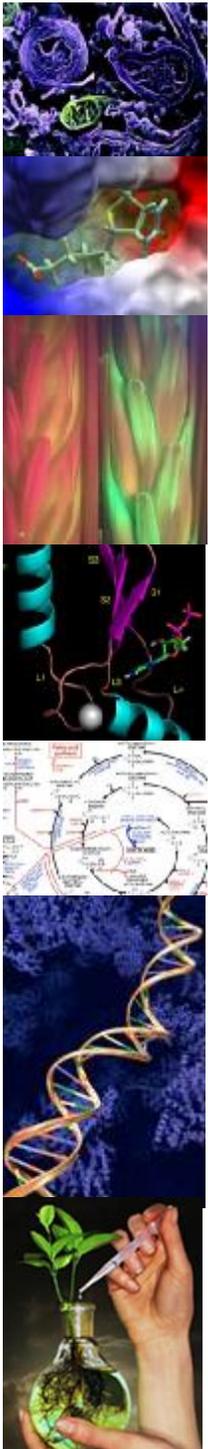


- Hipótesis: la nutrición tiene un fuerte impacto en el desarrollo de muchas enfermedades
- Sigue siendo difícil conectar un efecto fisiológico con un componente químico de un alimento
- Análisis del proteoma
 - § Conocer las consecuencias celulares de los componentes del alimento
 - § Acelerar la búsqueda ingredientes bioactivos relevantes en los alimentos
- Para estudiar la actividad fisiológica se utilizan cultivos celulares

Efecto del proceso y almacenamiento

- Durante el procesamiento y almacenamiento de alimentos - modificaciones no enzimáticas post traduccionales de las proteínas (nePTMs)
 - § Reacciones de oxidación
 - § Reacción de Maillard
 - § Condensación
 - § Hidrólisis de cadenas laterales
- nePTMs consecuencias significativas sobre las propiedades tecnológicas, nutricionales y toxicológicas

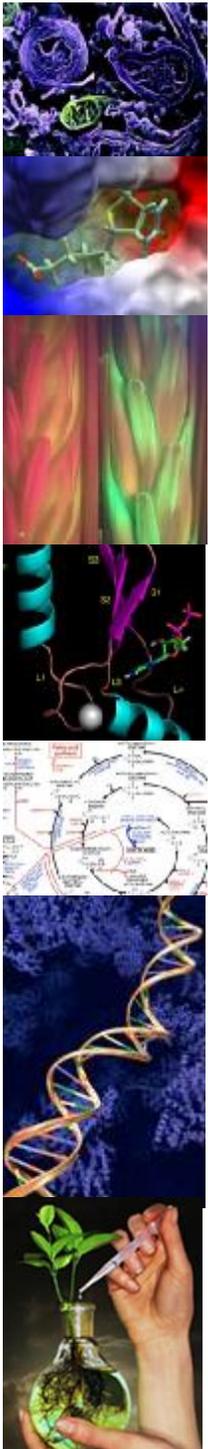




Mejora de la calidad de los alimentos



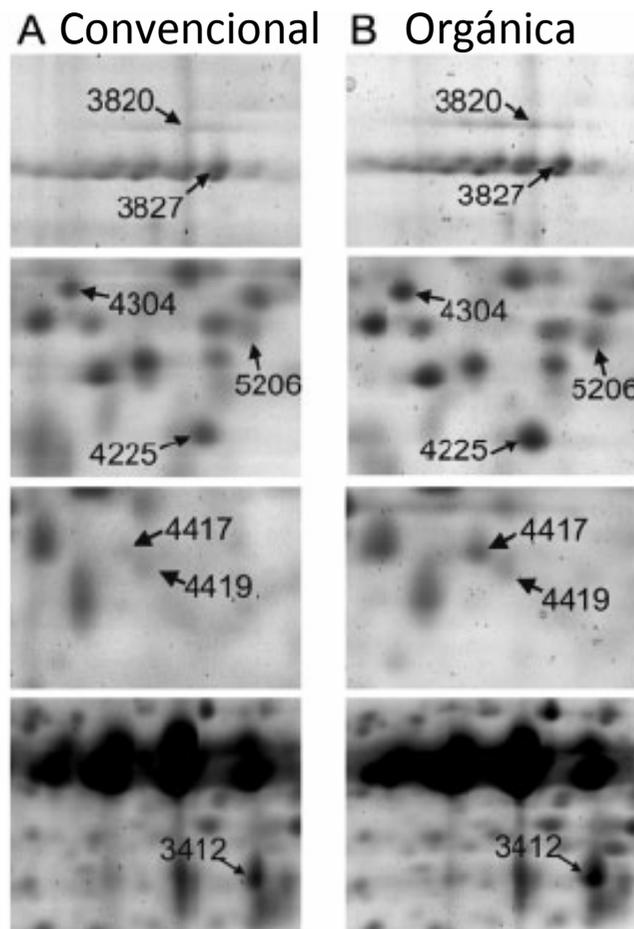
- Ciencia de los alimentos
 - § Entender el efecto de la cadena de procesos sobre las propiedades del alimento
 - § Lograr la mejor calidad con el menor costo de producción
- Prácticas agronómicas influyen la calidad del producto
 - § Ej producción de papas (Lehesranta et al., 2007)
 - Orgánica vs convencional
 - Geles 2D-MS



Mejora de la calidad de los alimentos



- Tipo de fertilización influencia significativa en la composición proteica -160 proteínas diferentes

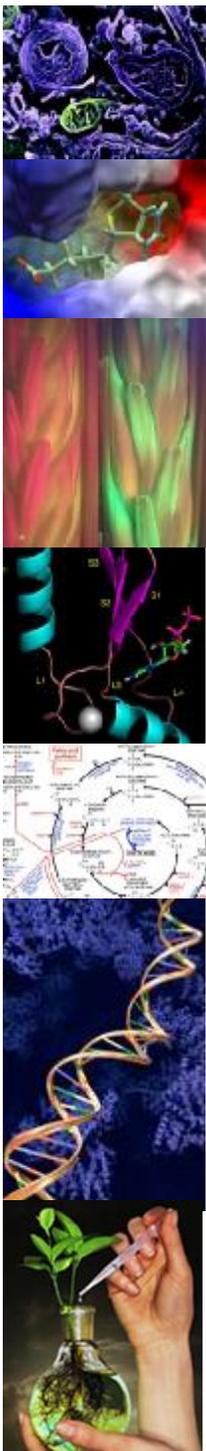


- La fertilización orgánica genera mayor estrés en la papa, ↑ número de proteínas asociadas a la respuesta de estrés



Proteómica en el Uruguay

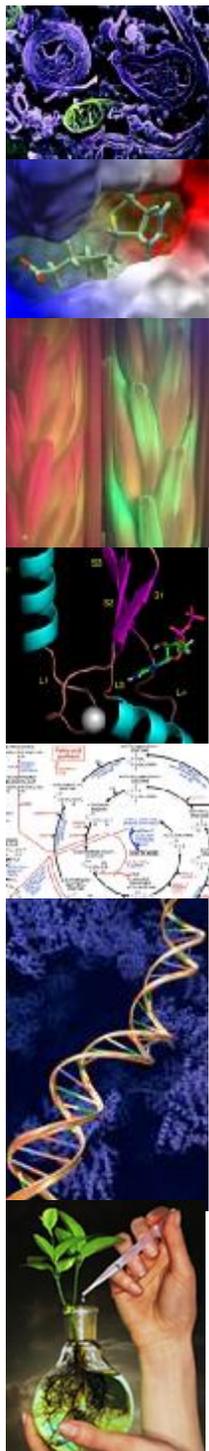
- LATU
- Dpto Cromatografía y Espectrometría de Masa
 - § 2 Cromatógrafo Gaseoso con Detector de Micro Captura Electrónica
 - § Cromatógrafo Gaseoso con Detector de Captura Electrónica
 - § Cromatógrafo Gaseoso con Detector de NPFID
 - § 2 Cromatógrafo Gaseoso con Detector de Masa con Ionización de Impacto Electrónico
 - § Head Space conectado a un Cromatógrafo Gaseoso con Detector de Masa
 - § HPLC con Detector de Arreglo de Diodos
 - § HPLC con Detector de Fluorescencia
 - § HPLC con Detector Índice de Refracción
 - § HPLC con Detector UV de onda variable
 - § LC MS/MS Triple Cuadrupolo





Proteómica en el Uruguay

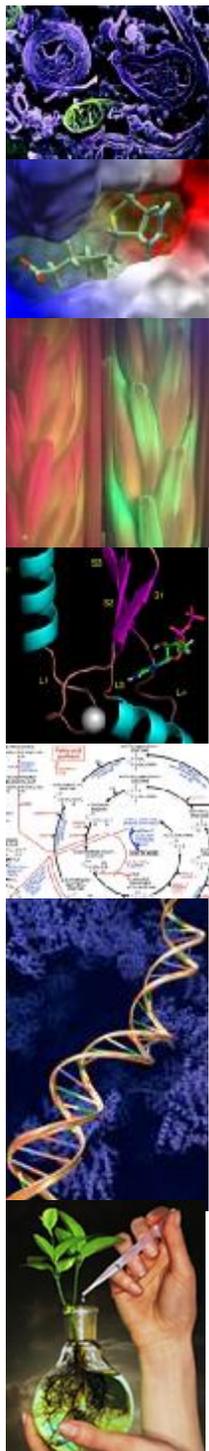
- § Calidad de los ensayos, UKAS y SQS.
- § Residuos de plaguicidas (más de 60), solventes antibióticos, Policloruro de bifenilo (PCB), Vitaminas, Azúcares, Lípidos, entre otros
- § AOAC Int. - Comité Técnico “E” de “Food and Food Nutrition”
- § Proyectos de investigación aplicada (perfil de ácidos grasos en la leche; buenas prácticas agrícolas - arroz)





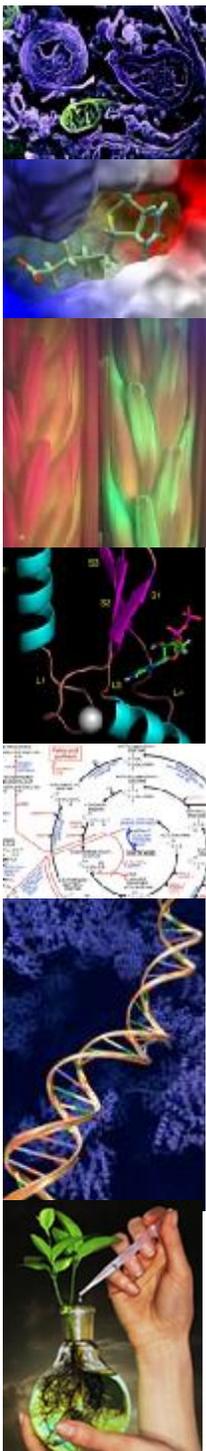
Proteómica en el Uruguay

- Polo Tecnológico – Fac. Química
- Unidad de Servicios Tecnológicos
 - § Proyectos de I + D
 - § Asesoramiento técnico y legal en propiedad intelectual y ambiental
 - § Instalación de empresas de base tecnológica en régimen de incubación
 - § Consultorías en nuevas tecnologías
 - § Cuentan con equipamiento de MS, MALDI-TOF entre otros



Proteómica en el Uruguay

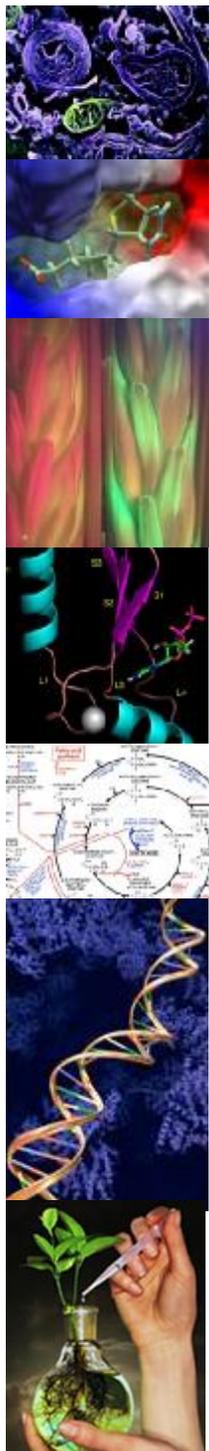
- Instituto Pasteur Montevideo
- Unidad Tecnológica de Bioquímica y Proteómica Analíticas
 - § Sistemas de cromatografía líquida de baja presión;
 - § Sistemas de HPLC a escalas analítica y micro;
 - § Sistemas para electroforesis 1D y 2D;
 - § Liofilización y concentración de muestras líquidas;
 - § Espectrofotometría UV-VIS (DMS200 y Cary 50, Varian);
 - § Espectrofluorometría (Cary Eclipse, Varian);
 - § Espectrómetro de masa MALDI TOF, modelo Voyager DE-PRO (Applied Biosystems, Framingham, E.U.A.);
 - § Espectrómetro de masa MALDI TOF/TOF, modelo 4800 Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, E.U.A.)





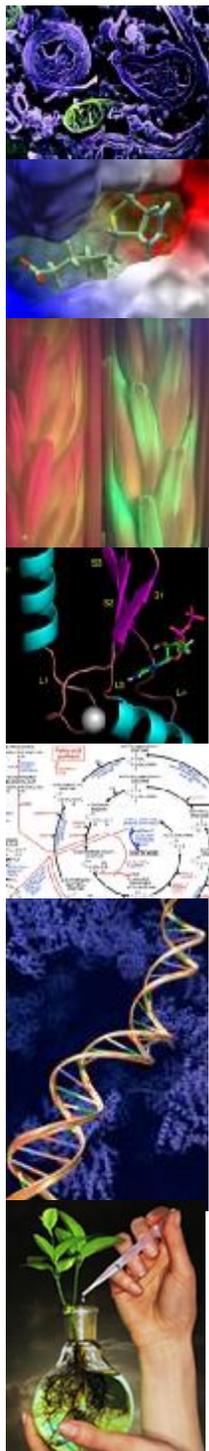
Proteómica en el Uruguay

- § Análisis de muestras por (electroforesis) SDS-PAGE en 1D
- § Análisis de muestras en geles 2D (IEF/SDS PAGE)
- § Análisis de péptidos y proteínas por HPLC (fase reversa, intercambio iónico, gel filtración, etc.)
- § Determinación de masa de proteínas/péptidos (moléculas enteras);
- § Identificación de proteínas por mapeo peptídico con tripsina y búsqueda en bancos de datos de secuencia
- § Análisis de modificaciones postraduccionales
- § Secuenciación parcial de péptidos por MS/MS



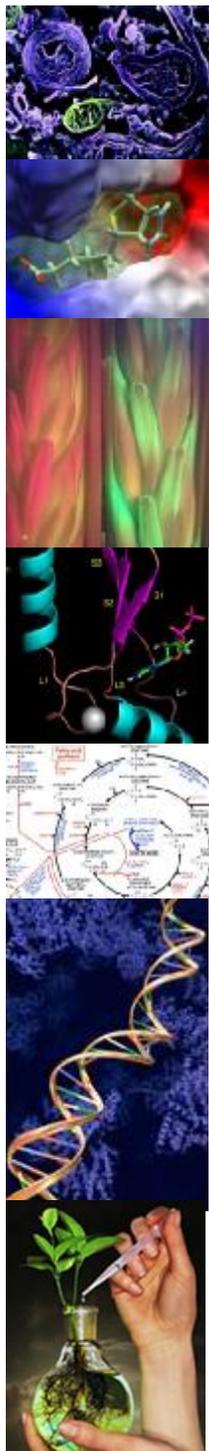
Conclusiones

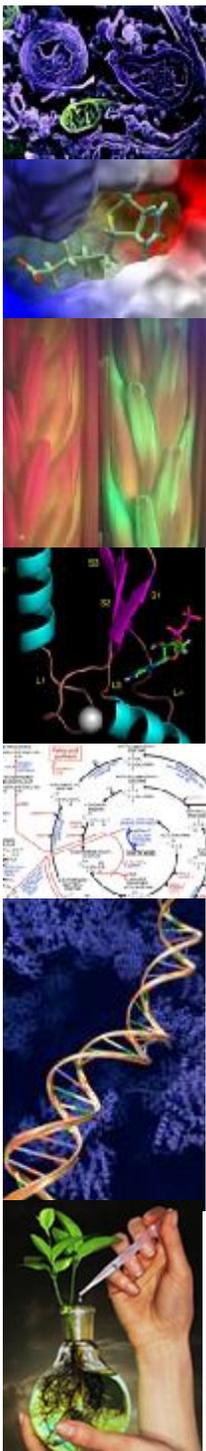
- La Proteómica es una herramienta con mucho potencial, especialmente en el área de los alimentos
- Estudios en el área de los alimentos son muy necesarios, y optimizar las técnicas para los mismos es una necesidad
- Para que esta tecnología sea una herramienta y no una utopía, necesitamos de equipos multidisciplinarios



Conclusiones

- El Uruguay cuenta con distintas plataformas con el equipamiento necesario para el desarrollo de esta tecnología en el área de los alimentos
- Debemos generar equipos interinstitucionales y multidisciplinarios para aprovechar todo lo que esta herramienta nos puede brindar, y desarrollar su utilización en el área de los alimentos





Gracias!!