

Comparación de métodos de extracción de proteínas de cerebro y linfocitos de rata

Comparison of protein extraction methods from brain and lymphocytes of rat

KAREN MALDONADO-MORENO¹, ROCÍO MARTELL-GAYTÁN¹, BONIFACIO ALVARADO-TENORIO¹,
JOSÉ VALERO-GALVÁN¹, ALEJANDRO MARTÍNEZ-MARTÍNEZ¹, ÁNGEL G. DÍAZ-SÁNCHEZ¹
Y RAQUEL GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ^{1,2}

Recibido: Octubre 13, 2017

Aceptado: Enero 5, 2018

Resumen

En este trabajo se compararon tres técnicas de extracción de proteínas actualmente empleadas en proteómica, para determinar la más eficiente para realizar electroforesis bidimensional (2-DE) en tejido cerebral y linfocitos de sangre periférica de rata. Los métodos utilizados fueron el uso directo de solución de lisis, el método TCA/acetona-DTT y el método TCA/acetona-fenol. Una vez que se realizó la extracción, se separaron las proteínas por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) y 2-DE, con el objetivo de seleccionar cuál de ellos brindó un mayor rendimiento en la cantidad de proteínas totales, así como en el número de bandas bien definidas y manchas bien enfocadas en los geles 2-DE, tanto para cerebro como para linfocitos. Al comparar el perfil proteico, en cerebro se detectaron 13 ± 0 ; 15 ± 1 y 12 ± 1 bandas bien definidas mediante los métodos de TCA/acetona-DTT, TCA/acetona-fenol y solución de lisis, respectivamente. En linfocitos, se encontraron $19 \pm 1.20 \pm 0$ y 19 ± 1 bandas, respectivamente. Con respecto al proteoma, tanto en cerebro como en linfocitos se encontró mayor número de manchas proteicas consistentes y bien enfocadas con el método de TCA/acetona-DTT. Estos resultados mostraron que el mejor método de extracción de proteínas para su uso en la 2-DE correspondió al de TCA/acetona-DTT, siendo además más rápido y sencillo de realizar que el método de TCA/acetona-fenol.

Palabras clave: proteómica, electroforesis bidimensional (2-DE), extracción de proteínas, cerebro, linfocitos.

Abstract

In this work, protein extraction techniques currently used in proteomics were compared to determine the most efficient to carry out two-dimensional electrophoresis (2-DE) on brain tissue and peripheral lymphocytes of rat. The methods used were using lysis solution, TCA/acetone-DTT method, and TCA/acetone-phenol method. Once the extraction was performed, proteins were separated by electrophoresis in polyacrylamide gels under denaturing conditions (SDS-PAGE) and 2-DE, with the aim of detecting which of them gave a greater performance in quantity of total proteins as well as the number of well-defined bands and well-focused spots on 2-DE gels both brain as lymphocytes. When comparing the protein profile in brain, 13 ± 0 ; 15 ± 1 , and 12 ± 1 bands was detected well-defined in the TCA/acetone-DTT, TCA/acetone-phenol lysis solution methods, respectively. In lymphocytes, 19 ± 1 , 20 ± 0 , and 19 ± 1 bands were found, respectively. Regarding proteome, both in brain and lymphocytes, a greater number of consistent and well-focused protein spots were found by TCA/acetone-DTT method. These results showed that the best method of protein extraction to use in 2-DE corresponded to the TCA/acetone-DTT, being faster and easier to perform than the method of TCA/acetone-phenol.

Keywords: Proteomics, two-dimensional electrophoresis (2-DE), protein extraction, brain, lymphocytes.

¹UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CIUDAD JUÁREZ. Bioquímica Funcional y Proteómica del Estrés, Dpto. de Ciencias Químico Biológicas, Instituto de Ciencias Biomédicas. Anillo del Pronaf y Estocolmo s/n, Zona PRONAF, C.P. 32310, Ciudad Juárez, Chihuahua, México-Tel. 688 1821, ext. 1622 y 1821.

²Dirección electrónica del autor de correspondencia: raquel.gonzalez@uacj.mx.

Introducción

La proteómica es el estudio comprensivo de la estructura y funciones de las proteínas. Esta disciplina es más desafiante que la genómica, ya que no solo se basa en una secuencia lineal de aminoácidos que dan una función, sino que se tiene que determinar la estructura terciaria de la proteína para identificar su función biológica (Northrop *et al.*, 2008).

Entre los objetivos principales de la proteómica se encuentra la separación, identificación y caracterización de proteínas, lo cual permite entender su interacción con otras proteínas. A pesar de que la proteómica es una disciplina relativamente nueva, ha tenido un importante avance en estos últimos años para integrar técnicas de alto rendimiento y protocolos que permiten analizar de forma rápida una mayor cantidad de proteínas. En el análisis proteómico se emplea un flujo de trabajo (adecuado al tejido que se analice) en el que se incluyen como pasos principales el diseño experimental, un muestreo, la preparación de las muestras, la extracción y separación de proteínas, análisis por espectrometría de masas (MS), análisis estadístico, cuantificación y análisis, y finalmente el manejo y el almacenamiento de datos (González-Fernández *et al.*, 2014).

La extracción de las proteínas representa un paso crucial en dicha técnica, siendo de vital importancia la elección del método de extracción con base al tipo de muestra de partida. Lo primero a realizar es la ruptura celular o lisis, donde los métodos más empleados se basan en la homogenización del tejido y la destrucción de membranas por medio de procesos físicos y/o químicos, esto con el fin de maximizar la liberación de las proteínas y al mismo tiempo evitando la degradación por factores como la temperatura, o modificaciones por proteólisis, oxidación, entre otros. Las técnicas de ruptura celular se pueden clasificar en métodos físicos mecánicos, métodos físicos no mecánicos y por métodos químicos, entre los que se presenta el tratamiento con álcalis, detergentes, solventes, ácidos o sustancias caotrópicas (González-Fernández *et al.*, 2014).

Una de las situaciones que se presenta después de la disrupción celular es la liberación de proteasas que pueden degradar las proteínas de interés, por lo tanto, es importante que durante la preparación de la muestra

se evite la actividad proteolítica. Entre las acciones que se realizan para evitar este proceso se encuentran: evitar un exceso de ciclos de congelación/descongelación, agregar soluciones inhibitoras de proteasa y trabajar rápido, a temperaturas frías durante el proceso (González-Fernández *et al.*, 2014).

En la proteómica se emplea una amplia variedad de tecnologías. Entre las más efectivas y ampliamente usadas encontramos la electroforesis por gel bidimensional (2-DE) para separar las proteínas y la MS para su identificación y caracterización. La 2-DE combina la separación de las proteínas primero por isoelectroenfoque y después por el peso molecular a través de un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, permitiéndose de esta forma una mejor separación de las proteínas, que formarán un mapa bidimensional de manchas proteicas denominado proteoma, el cual puede ser caracterizado. Este método se puede considerar como un método de pureza debido al poder de resolución con el que cuenta, aceptándose que la aparición de una mancha (o spot) indica una muestra homogénea (Rabilloud *et al.*, 2010). La 2-DE se ha utilizado ampliamente en el estudio de muchas patologías como el cáncer, la diabetes, las enfermedades cardiacas y los trastornos psiquiátricos a través del análisis proteómico de los tejidos y fluidos corporales, incluyendo suero o plasma sanguíneo y tejidos como el cerebro (Saia-Cereda *et al.*, 2017).

Para realizar estudios de comparación de proteomas entre cerebro y linfocitos es necesario utilizar métodos para la extracción de proteínas que tengan un alto nivel de efectividad y determinar así, que tan similares o distintos son. Los métodos usualmente empleados para cerebro y sangre involucran lavados con ácido tricloroacético (TCA)/acetona, detergentes en soluciones caotrópicas o procesos de precipitación, aunque recientemente se

han reportado protocolos que involucran el uso de fenol (Cilia *et al.*, 2009). Actualmente, la mayoría de los estudios de comparación de métodos de extracción se han realizado en tejidos vegetales (Singh *et al.*, 2017) o en bacterias (Alam y Ghosh, 2014), pero son escasos en tejidos como el cerebro (Masuo *et al.*, 2011), o no hay como en el caso de las células sanguíneas. El objetivo de este trabajo fue determinar la metodología más eficiente tanto para la extracción de proteínas de cerebro como para linfocitos periféricos de rata para su uso en la 2-DE, ya que, a pesar de que actualmente hay una gran cantidad de estudios que involucran estos tejidos, no hay una metodología única y no se conoce cuál de ellas genera la obtención de un mayor rendimiento en la cantidad de proteínas total de proteína y al número de manchas proteicas bien enfocadas en la 2-DE. Los resultados obtenidos mostraron que el método con el que se obtuvo una mejor relación entre el rendimiento de la extracción de proteína, número de bandas bien definidas mediante SDS-PAGE y número de manchas proteicas bien enfocadas mediante 2-DE fue el método de TCA/acetona-DTT. Esto permitirá futuras investigaciones con un alto nivel de confiabilidad en estudios realizados con estos tejidos.

Materiales y métodos

Se utilizaron ratas (*Rattus norvegicus*) hembras Sprague-Dawley de dos meses de edad de 250-320 g. Las condiciones de crecimiento fueron de 25 ± 2 °C de temperatura, ciclos luz/oscuridad de 12/12 h, con comida y agua *ad libitum*. Los animales se sacrificaron por eutanasia inyectando el anestésico pentobarbital sódico (Pisabental, PiSA®). Este protocolo contó con la aprobación del comité de bioética del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez, siguiendo las guías de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.

Recolección de las muestras. Las muestras de sangre se tomaron mediante punción cardiaca, en tubos Vacutainer™ EDTA. Los linfocitos se aislaron siguiendo el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio por Vargas-Caraveo *et al.* (2014). Los cerebros se extrajeron completos, se almacenaron a -80 °C, se liofilizaron durante 5 días utilizando un liofilizador Labconco® mod. FreeZone 6 y se pulverizaron utilizando un mortero.

Extracción de proteínas. En el cerebro la extracción se realizó a partir de 30 y 40 mg de peso seco de cerebro pulverizado para cada método de extracción. En el caso de los linfocitos, se utilizaron todos los linfocitos extraídos. Para el método del uso directo de solución de lisis (adaptado de Pooladi *et al.*, 2014), se agregó a la muestra solución de lisis (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4% (p/v), tritón X-100 0.5% (v/v), DTT 20 mM, inhibidor de proteasas 1% (v/v)). Se sonicó por tres veces durante 10 s, con descansos de 1 min, manteniendo los tubos en hielo. Se centrifugó a 16,000 *xg* durante 10 min a 4 °C y se recogió el sobrenadante.

Para el método TCA/acetona-DTT (adaptado de Deatherage *et al.*, 2015), se agregó a la muestra 600 µL solución fría de 10% (p/v) TCA/ 100% (v/v) acetona, al 0.07% (p/v) DTT. Se sonicó por tres veces durante 10 s, con descansos de 1 min, manteniendo los tubos en hielo. Se dejó precipitar las proteínas a -20 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se centrifugó a 16000 *xg* durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se realizaron tres lavados con acetona al 100% fría, que consistieron en un mezclado en vórtex, una centrifugación a 16000 *xg* durante 10 min a 4 °C y la eliminación del sobrenadante. A continuación, se dejó secar la pella a temperatura ambiente para eliminar los residuos de acetona. Finalmente, se solubilizaron las proteínas con la solución de solubilización mencionada anteriormente.

Para el método de TCA/acetona-fenol (adaptado de González-Fernández *et al.*, 2014), se agregó a la muestra 600 µL solución fría de 10% (p/v) TCA/100% (v/v) acetona. Se sonicó por tres veces durante 10 s, con descansos de 1 min, manteniendo los tubos en hielo. Se centrifugó a 16,000 *xg* durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se agregó una solución fría de 0.1 M de acetato de amonio, en 80% de etanol. Se centrifugó a 16,000 *xg* durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se agregó de acetona al 80% (v/v). Se centrifugó a 16,000 *xg* durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar la pella a temperatura ambiente para eliminar los residuos de acetona. Se agregó tampón denso SDS (30% (p/v) sacarosa, 2% (p/v) SDS, 5% (v/v) 2-mercaptoetanol, 0.1 M Tris HCl, pH 8) / fenol

(1:1), y se dejó incubar durante 5 min. Se centrifugó a 16,000 xg durante 5 min a 4 °C y se pasó la fase de arriba a un tubo limpio. Se agregó una solución fría de 0.1 M de acetato de amonio, en 100% de etanol. Se centrifugó a 16,000 xg durante 10 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Se agregó una solución fría de acetona al 80% (v/v). Se dejó secar la pella a temperatura ambiente para eliminar los residuos de acetona. Finalmente, se solubilizaron las proteínas con la solución de solubilización mencionada anteriormente. Las proteínas se cuantificaron utilizando reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich®), de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Se cargaron 15 mg de proteína en solución tampón de carga (Tris-HCl 62.5 mM, pH 6.8, SDS 2% (p/v), glicerol 25% (v/v), azul de bromofenol 0.01% (p/v)) en geles TGX Precast al 12% para el sistema Criterion® de Bio-Rad® (dimensiones 133 x 87 x 1 mm). Los geles se dejaron correr a 40 mA en solución tampón de electroforesis (Tris 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1% (p/v), pH 8.3) hasta que el frente de elución llegó al final del gel (Laemmli, 1970).

Electroforesis bidimensional (2-DE). Se realizó la primera dimensión o isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas, en el sistema PROTEAN IEF Cell (BioRad), utilizando ReadyStrips IPG Strips (BioRad) de 11 cm, con gradiente de pH 3-10 no lineal. Las tiras de IPG se rehidrataron con solución de rehidratación (urea 7 M, tiourea 2 M, 4% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) anfólitos 3-10, DTT 100 mM, 0.01% (p/v) azul de bromofenol), conteniendo 50 µg de proteína, siguiendo el protocolo de Bio-Rad. Dicha rehidratación se realizó de forma activa durante toda la noche a 50 V. Las condiciones del IEF fueron: 500 V durante 20 min, gradiente lineal hasta 8,000 V durante 1 hora, 8,000 V hasta 26,000 V, manteniendo a 1,500 V. Una vez terminado el IEF, las tiras se conservaron a -20 °C hasta realizar la segunda dimensión. Antes de la segunda dimensión, las tiras se equilibraron durante 10 minutos en tampón de equilibrado (Tris-HCl 1.5 M pH 8.8; urea 6 M; glicerol 20% (p/v); SDS 2% (p/v)) con DTT 2% (p/v) y, a continuación, otros 10 minutos con tapón de equilibrado con iodoacetamida 2.5%

(p/v) (Görg *et al.*, 2009). utilizando geles TGX Precast con gradiente de 10-20% de poliacrilamida del sistema Criterion® de Bio-Rad® (dimensiones 133 x 87 x 1 mm) y se sellaron con agarosa 0.5% (p/v) con azul de bromofenol en tampón de electroforesis. La segunda dimensión se llevó a 40 mA constantes hasta que el azul de bromofenol alcanzó el frente del gel. Los geles se tiñieron con el método de Coomassie coloidal con la solución de tinción compuesta por $(NH_4)_2SO_4$ 60.5 mM, 2.25% (v/v) H_3PO_4 85%, metanol 20% (v/v) y azul de Coomassie G250 0.001% (p/v). Las imágenes se tomaron utilizando un escáner Epson® XP-420 a una resolución de 400 dpi.

Análisis de imágenes y estadístico. Los geles SDS-PAGE se analizaron con el programa de análisis de densitometría de imagen ImageJ (descargado de: <https://imagej.nih.gov/ij/>) y los geles 2-DE con el paquete informático PD Quest 2-D Analysis Software® (Bio-Rad®), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los datos se expresaron como valor medio y desviación estándar. Se realizaron pruebas estadísticas de t-Student, pruebas de medias de Tukey y ANOVA utilizando el programa SPSS v15.0.

Resultados y discusión

El paso más importante para un análisis proteómico es la extracción de proteínas de forma eficiente, es por eso que se realizó este proyecto con la finalidad de encontrar la metodología que brindara un mayor rendimiento de proteínas con la mejor calidad posible. Los métodos más utilizados para extracción de proteínas de tejido o células de origen animal utilizan métodos con soluciones de lisis directamente, con soluciones como cloroformo/metanol, extracciones con cloruro de litio, con amortiguadores hipotónicos, con tripsina y bicarbonato de amonio, entre otros (Shevchenko *et al.*, 2012; Tiong *et al.*, 2015; Moore *et al.*, 2016). En este trabajo, se usaron los métodos de extracción con solución lisis, con solución de TCA/acetona-DTT y con solución de TCA/acetona-fenol, ya que los dos últimos no se suelen utilizar en tejidos de origen animal y brindan mejores resultados en tejidos recalcitrantes (Wang *et al.*, 2006; Sheoran *et al.*, 2009; Jankowska *et al.*, 2016).

Rendimiento en cantidad de proteínas. Los métodos que se utilizaron para tratar las muestras fueron solución lisis, TCA/acetona-fenol y TCA/acetona-DTT. En las concentraciones obtenidas por cada uno de los métodos en cerebro y linfocitos, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$; ANOVA y Prueba de Tukey), siendo el de solución lisis el que obtuvo una mayor concentración de proteína en el tejido cerebral con 3.10 mg/mL de muestra, seguido del método de TCA/acetona-DTT y por último el método de TCA/acetona-fenol (Cuadro 1). En las concentraciones de proteína obtenidas para linfocitos, el método que brindó mayor concentración fue el de TCA/acetona-DTT con 1.56 mg/mL, seguido del método con solución de lisis y finalmente el de TCA/acetona-fenol (Cuadro 1).

Cuadro 1. Concentraciones de proteína promedio obtenidas para cada tejido.

Tejidos	Métodos	Concentración (mg/mL)
Cerebro	Solución lisis	3.10 ± 0.23 ^a
	TCA/acetona-fenol	1.03 ± 0.18 ^c
	TCA/acetona-DTT	2.30 ± 0.19 ^b
Linfocitos	Solución lisis	0.73 ± 0.05 ^d
	TCA/acetona-fenol	0.53 ± 0.22 ^d
	TCA/acetona-DTT	1.56 ± 0.20 ^c

Los datos se presentan como promedio ± desviación estándar ($n = 3$). Las literales distintas representan diferencias significativas entre concentración ($p < 0.05$; ANOVA y Prueba de Tukey).

En cuanto al rendimiento obtenido para cada uno de los métodos de extracción de proteínas realizados en cerebro para los pesos de 30 y 40 mg, se determinó que el método de solución lisis brindó el mayor rendimiento, seguido del de TCA/acetona-DTT y, por último, el de TCA/acetona-fenol, presentando diferencias significativas entre los métodos ($p < 0.05$, prueba de Tukey) (Cuadro 2). Además, se observó un mayor rendimiento de proteínas en las muestras de 30 mg de cerebro que en las de 40 mg del mismo tejido. Se esperaría que el rendimiento fuera mayor en la muestra de 40 mg, sin embargo, sucedió lo contrario al presentarse un mayor rendimiento en las metodologías aplicadas a los 30 mg.

Los resultados de la concentración mostrados en este trabajo (Cuadro 1) concuerdan con los obtenidos por Gao *et al.* (2006), donde, al comparar métodos de extracción en hígado de rata, obtuvieron mayor concentración con una solución compuesta por urea, CHAPS, DTT y PMSF, es decir, una composición muy similar a nuestra solución de lisis. Por otro lado, en un estudio para la optimización de un método con TCA/acetona para el análisis de carne en ganado, se obtuvieron los resultados iguales a los nuestros, obteniendo mayor concentración con el método de lisis seguido del método TCA/acetona-DTT (Hao *et al.*, 2015).

Cuadro 2. Rendimiento promedio de proteínas por método de extracción en cerebro.

Peso seco cerebro (mg)	Método	mg proteína/g peso seco cerebro
30	Solución lisis	10.23 ± 0.64 ^a
	TCA/acetona-DTT	7.73 ± 0.29 ^b
	TCA/acetona-fenol	3.54 ± 0.19 ^d
40	Solución lisis	8.07 ± 0.10 ^b
	TCA/acetona-DTT	5.82 ± 0.37 ^c
	TCA/acetona-fenol	3.42 ± 0.03 ^d

Los datos se presentan como promedio ± desviación estándar ($n = 3$). Literales distintas representan diferencias significativas en el rendimiento de los métodos evaluados ($p < 0.05$, prueba de Tukey).

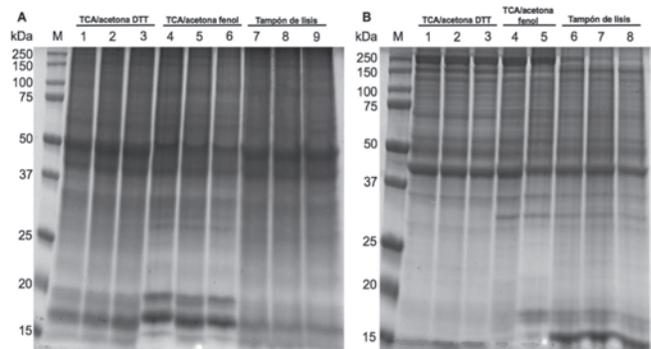
La evaluación de diferentes métodos de extracción de proteínas para su uso en 2-DE, se suele realizar con muestras recalcitrantes de plantas, insectos o bacterias, entre otros. En un estudio donde se compararon el método de TCA/acetona-DTT, extracción con fenol y un método con una solución multi-detergente para obtener proteínas de áfidos, se obtuvo una mayor concentración por el método de TCA/acetona-DTT, seguido del de multi-detergente y por último el método con fenol (Cilia *et al.*, 2009). Asimismo, en un estudio para seleccionar un método de solubilización de proteínas para bacterias fitopatogénicas, se determinó que el método de lisis brindó una mayor concentración de proteínas en las bacterias estudiadas que el método con fenol (Malafaia *et al.*, 2015). Un estudio más reciente realizado en

pulpa de dátil y semilla de palma datilera (*Phoenix dactylifera* L.), donde utilizaron tres métodos basados en fenol, TCA/acetona y TCA/acetona-fenol, se encontró que con el primero se obtuvo un mayor rendimiento de la extracción de proteínas (Lee *et al.*, 2017). Sin embargo, en otro estudio realizado en hoja de *Withania somnifera* (L.) Dunal en respuesta a la infección con *Alternaria alternata*, se presentó el mejor rendimiento con el método basado en TCA/acetona (Singh *et al.*, 2017). Como mencionaron Ericsson *et al.* (2007), se esperaba que después de la desintegración del tejido, los fragmentos más pequeños fueran más efectivos para obtener un mayor rendimiento en la cantidad de proteína debido a la relación entre la superficie y el volumen. Por lo tanto, se podría considerar que no se presentó una buena desintegración por sonicación del tejido de cerebro en los 40 mg, pero sí en los 30 mg y, por esto, se obtuvo un mayor rendimiento en la segunda cantidad. A pesar de esto, los resultados fueron similares a los obtenidos por Maldonado *et al.* (2008) en hojas de *Arabidopsis thaliana* al presentar un mayor rendimiento con el método TCA/acetona-DTT (1.39 mg/g) que con el método TCA/acetona-fenol (1.04 mg/g).

Geles SDS-PAGE. El análisis de las bandas obtenidas por SDS-PAGE mostró que todos los métodos revelaron bandas proteicas en un rango de peso molecular desde los 250 kDa hasta los 15 kDa (Figura 1). En el caso de las proteínas extraídas de cerebro, se observó que el perfil de bandas proteicas fue diferente dependiendo el método de extracción, sobre todo entre los pesos de 37 a 15 kDa (Figura 1A). Así, se detectaron 13 bandas definidas en el método de TCA/acetona-DTT, 15 ± 1 bandas en el de TCA/acetona-fenol y 12 ± 1 bandas para el método de solución de lisis.

En el caso de las proteínas extraídas de linfocitos, se encontró mayor número de bandas en un peso molecular entre 250 kDa y 43 kDa aproximadamente (Figura 1B). El perfil proteico obtenido para cada método en este rango de peso molecular fue similar, encontrándose más diferencias entre los 37 y los 15 kDa. El análisis del número de bandas mostró 19 ± 1 bandas con el método TCA/acetona-DTT, 20 bandas con el método TCA/acetona-fenol y 19 ± 1 bandas con el método de lisis.

Figura 1. Perfil proteico de las muestras de cerebro (A) y linfocitos (B) utilizando el método TCA/acetona-DTT, el método TCA/acetona-fenol y el método de lisis. kDa: kiloDalton. M: marcador de peso molecular «Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards» de Bio-Rad®. Se cargaron 15 µg de proteína en geles TGX Precast al 12% para el sistema Criterion® de Bio-Rad®. Los geles se corrieron a 40 mA en tampón de electroforesis y se tiñieron con el método de Coomassie coloidal.



En el caso de las proteínas extraídas de linfocitos, se encontró mayor número de bandas en un peso molecular entre 250 kDa y 43 kDa aproximadamente (Figura 1B). El perfil proteico obtenido para cada método en este rango de peso molecular fue similar, encontrándose más diferencias entre los 37 y los 15 kDa. El análisis del número de bandas mostró 19 ± 1 bandas con el método TCA/acetona-DTT, 20 bandas con el método TCA/acetona-fenol y 19 ± 1 bandas con el método de lisis.

En ambos geles obtenidos de la Figura 1 se presentó una ligera superposición de bandas debido a la gran cantidad de proteínas presentes en las muestras y las limitaciones de resolución en este tipo de geles, siendo el método TCA/acetona-fenol el que mostró mejor definición de las bandas proteicas. En un estudio realizado para analizar proteínas de ácidos, se observó una mejor separación de proteínas por el método con TCA/acetona-DTT y TCA/acetona-fenol, mientras que en el método con una solución multi-detergente no siempre se presentaron las mismas bandas proteicas ni con la misma concentración (Cilia *et al.*, 2009). Por otra parte, al comparar con los estudios realizados por Maldonado *et al.* (2008), se concluyó que al trabajar con TCA/acetona-fenol y TCA/acetona-DTT se permitió la visualización de bandas de menor intensidad y a la vez aumentó la

intensidad de las manchas comunes. En estos casos se observaron proteínas de bajo peso molecular, aunque con mayor intensidad al utilizar el método de TCA/acetona-fenol, como se muestra en el gel de la Figura 1.

En un estudio realizado en hígado y bilis de pescado, se compararon procedimientos donde se empleaban agentes reductores como el DTT y el 2-mercaptoetanol, en donde los resultados mostrados en este trabajo fueron similares al detectarse bandas definidas en los pesos de 250, 150, 70 y 50 kDa en los métodos donde se emplean estos dos agentes (TCA/acetona-DTT y TCA/acetona-fenol), y al igual que en los geles mostrados en la Figura 1, las diferencias más notables entre los métodos se encuentran en las proteínas de bajo peso molecular (de 15 a 10 kDa) (Tenório-Daussat *et al.*, 2014). Sin embargo, en estudios realizados en hojas de *Ficus deltoidea* y en la pulpa de dátil y semilla de palma datilera, los métodos que fueron más eficientes en la eliminación de contaminantes obteniéndose bandas bien resueltas en un rango más amplio de pesos moleculares mediante SDS-PAGE fueron los basados en solución de fenol y en la combinación de TCA/acetona y fenol (Abdullah *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2017).

Geles 2-DE

Con respecto a cada una de las metodologías de extracción de proteínas realizadas en cerebro, se observaron diferencias en el proteoma. Los métodos de TCA/acetona-DTT y TCA/acetona-fenol presentaron un mejor enfoque de las manchas proteicas, esto es, mayor definición de las manchas (Figura 2A y 2B), que para las proteínas extraídas con solución de lisis (Figura 2C). El método TCA/acetona-DTT presentó una mejor resolución de la separación de las proteínas a lo largo del gel, con un mayor número de manchas proteicas entre los pesos de 75 a 37 kDa a pI por debajo de 7 (Figura 2A).

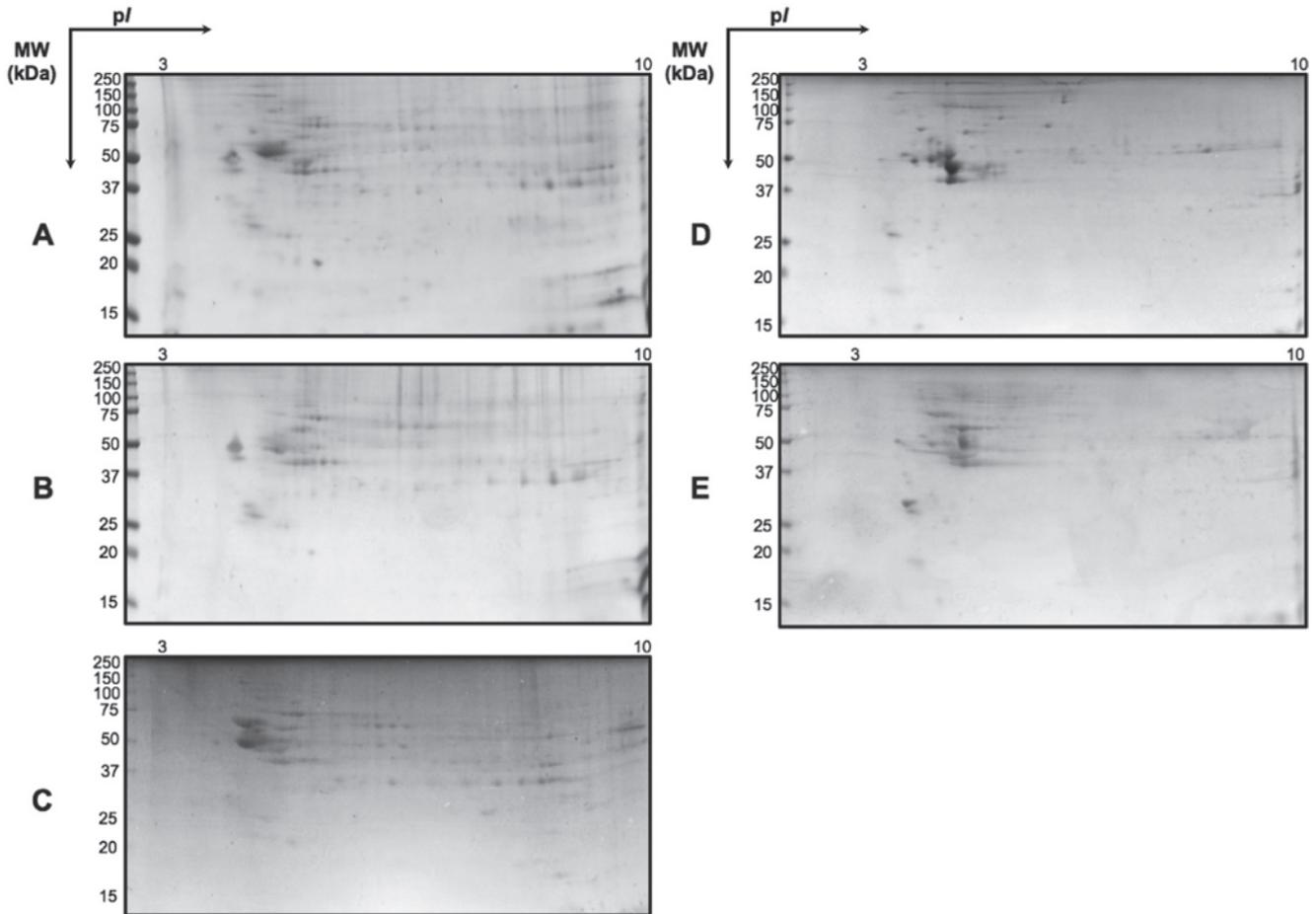
En el caso del gel correspondiente al método de TCA/acetona-fenol no se observó la misma mancha proteica de mayor intensidad que se presentó en los geles con los otros dos métodos de extracción (Figura 2B). Para el caso de la extracción con solución de lisis se observó esta misma mancha de mayor intensidad, estando menos enfocada que la misma mancha en el gel correspondiente al método TCA/acetona-DTT

(Figura 2C). En el caso de los linfocitos, solo se realizó la 2-DE para los métodos de extracción de proteína con el método TCA/acetona-DTT (Figura 2D) y con el método de solución con solución de lisis (Figura 2E), debido al menor rendimiento de proteína obtenido con el método de TCA/acetona-fenol, siendo el primer método con el que se obtuvo el mejor enfoque de las especies proteicas.

El análisis del número de manchas proteicas totales realizado mediante el programa de análisis PD-Quest 2D de Bio-Rad® no mostró diferencias significativas entre los tres métodos, ni en cerebro ni en linfocitos ($p < 0.05$; ANOVA t-Student, respectivamente), aunque el método TCA/acetona-DTT mostró una mayor cantidad de manchas y más definidas, seguida por el método TCA/acetona-fenol y por el método con solución de lisis (Cuadro 3). Al comparar manchas proteicas entre metodologías, en cerebro se encontró mayor número de manchas proteicas consistentes en el método de TCA/acetona-DTT, seguido del de TCA/acetona-fenol y solución lisis. En el caso de los linfocitos, fue mediante el método de TCA/acetona-DTT.

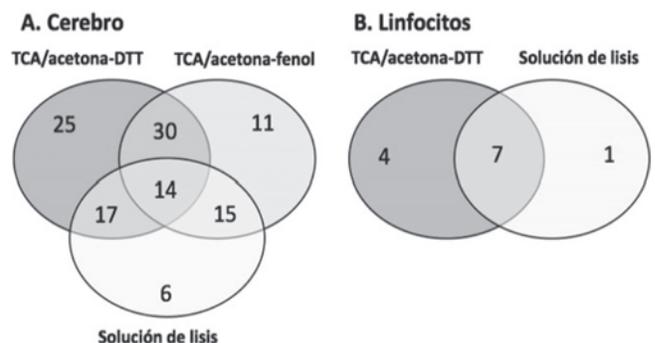
Una explicación para la similitud de nuestros resultados con otros estudios se podría determinar por medio de los componentes usados en cada uno de ellos. En el método de solución de lisis se utilizan agentes caotrópicos como la urea y tiourea los cuales desnaturalizan las proteínas a través de la ruptura de enlaces no covalentes e iónicos entre los residuos de aminoácidos (Glatter *et al.*, 2015). El uso de soluciones solo con urea no se recomienda, ya que tiende a una degradación espontánea a cianato; sin embargo, su combinación con tiourea, en el caso específico del IEF, mejora la solubilización de proteínas de membrana debido a que la tiourea rompe las interacciones hidrofóbicas (Kim y Kim, 2007). Además, la utilización únicamente de agentes caotrópicos no es suficiente a la hora de la extracción de proteínas, ya que no disuelven los lípidos eficientemente y no son capaces de mantener solubles a las proteínas por sí solas bajo las condiciones de IEF (Rabilloud *et al.*, 2011). Es por eso que para alcanzar estas características se utilizan los detergentes como CHAPS, Tritón X-100 y agentes reductores como DTT, debido a que previenen las

Figura 2. Geles 2-DE representativos obtenidos para cerebro, con el método TCA/acetona-DTT (A), el método TCA/acetona-fenol (B) y el método de lisis (C), y para linfocitos con el método TCA/acetona-DTT (D) y el método de lisis (E). MW: marcador de peso molecular «Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards» de Bio-Rad®. kDa: kiloDalton. Se cargaron 50 µg de proteína, la primera dimensión se realizó con tiras ReadyStrips IPG de 11 cm, con gradiente de pH 3 a 10 no lineal de Bio-Rad® y la segunda dimensión con geles TGX Precast de 10-20% de poliacrilamida de Bio-Rad®. Los geles se corrieron a 40 mA en tampón de electroforesis y se tiñieron por el método de Coomassie coloidal.



interacciones hidrofóbicas, solubilizan las proteínas de membrana y promueven la reoxidación de puentes disulfuro, respectivamente (Chevalier, 2010; Malafaia *et al.*, 2015). El uso de Tritón X-100 en el estudio de Shevchenko *et al.* (2012) fue uno de los tres protocolos que presentó mayor número de bandas proteicas en un gel SDS-PAGE y el que brindó un mayor rendimiento en extracción de proteínas. Si bien, el uso de CHAPS solo con urea es superior a Tritón X-100, cuando se emplea la combinación urea-tiourea, el uso de Tritón X-100 se vuelve más eficiente para la solubilización de proteínas que con CHAPS (Rabilloud *et al.*, 2008).

Figura 3. Diagrama de Venn con el número de manchas proteicas consistentes comunes y únicas entre métodos, en cerebro (A) y linfocitos (B), obtenidas en el análisis 2-DE.



Cuadro 3. Número de manchas proteicas totales para cerebro y linfocitos obtenido en el análisis de los geles 2-DE para cada método de extracción.

Método	Cerebro	Linfocitos
TCA/acetona-DTT	90 ± 26	58 ± 33
TCA/acetona-fenol	58 ± 8	---
Solución lisis	51 ± 17	35 ± 13

Los datos se presentan como promedio ± desviación estándar (n = 3).

Como se ha mencionado, en estudios anteriores el uso de TCA/acetona se ha utilizado con éxito en una amplia variedad de muestras biológicas para eliminar los componentes no proteicos que pueden interferir en los geles (Wang *et al.*, 2006; Cilia *et al.*, 2009; Alam y Gosh, 2014; Haudenschild *et al.*, 2014). La combinación de TCA con acetona se usa comúnmente para la precipitación de proteínas y eliminar contaminantes y sales durante la preparación de las muestras para la 2-DE, que pueden competir con la migración de proteínas en el IEF (Feist y Hummon, 2015). En un estudio previo realizado en diferentes partes del cerebro de rata, donde se compararon diferentes métodos de precipitación y solubilización de proteínas, el método basado en una solución solo con TCA y una sonicación posterior dio como resultado una buena separación de proteínas y el mayor número de manchas proteicas en la 2-DE (Fic *et al.*, 2010). Igualmente, Masuo *et al.* (2011) encontraron una buena resolución de bandas en la SDS-PAGE y manchas proteicas en la 2-DE, en cerebro completo y en diversas regiones del mismo, utilizando el método TCA/acetona con 2-mercaptoetanol en lugar de DTT como agente reductor. Por tanto, el uso de estos componentes brindó una ventaja sobre el método con solución de lisis que utiliza solo el detergente SDS, ya que en este estudio se encontró que el método TCA/acetona-DTT incluyendo una etapa de sonicación fue el que tuvo una mayor cantidad de manchas proteicas y mejor enfocadas tanto para cerebro como para linfocitos (Figura 2, Cuadro 3, Figura 4). El método TCA/acetona-DTT también fue el protocolo que obtuvo mayor número de manchas proteicas a lo largo de todo el gradiente de pI y peso molecular en el proteoma de la infección de *W. somnifera* causada por *A. alternata* en comparación con el método basado en fenol (Singh *et al.*, 2017).

En el caso del método de TCA/acetona-fenol se utilizan otros reactivos aparte de los ya mencionados con anterioridad; por ejemplo, el acetato de amonio en combinación con metanol permite neutralizar el TCA residual e incrementar el pH > 7, facilitando la subsecuente extracción de proteínas con fenol (Wang *et al.*, 2006), además de ayudar a la remoción de polisacáridos de bajo peso molecular (Kim y Kim, 2007). El fenol minimiza también la degradación de las proteínas debido a la actividad proteolítica endógena (Zheng *et al.*, 2007). A pesar de que se ha encontrado que el método de TCA/acetona-fenol brinda un mayor rendimiento de proteínas para ciertos tejidos vegetales y bacterianos (Sheoran *et al.*, 2009), en el caso del cerebro y de linfocitos de rata no sucedió así, siendo el segundo método en número total de manchas consistentes bien enfocadas (Figura 2, Cuadro 3, Figura 4). A pesar de esto, entre el método de TCA/acetona-DTT y TCA/acetona-fenol se obtuvo el mayor número de manchas proteicas consistentes comunes entre ambas metodologías (Figura 4).

Por tanto, aunque el método de lisis sea uno de los más utilizados en tejidos y/o células de origen animal y el método de TCA/acetona-fenol en tejidos vegetales o microorganismos para la extracción de proteínas para la 2-DE, el uso del método de TCA/acetona-DTT mejora la resolución con respecto al de lisis y conlleva un ahorro en tiempo y dinero con respecto al de TCA/acetona-fenol al constar de un número menor de pasos y requerir menos cantidad de reactivos.

Conclusiones

Se logró comparar los métodos de extracción de proteínas en cerebro y linfocitos de sangre periférica de rata. A pesar de no presentarse diferencia significativa entre las metodologías analizadas, el método de TCA/acetona-DTT resultó más adecuado para la extracción de proteínas en estos tejidos, ya que generó un mayor número de manchas proteicas y con una mayor calidad (mejor enfoque proteico y resolución en la 2-DE). Además, el método TCA/acetona-DTT es más rápido y sencillo de realizar en comparación del método de TCA/acetona-fenol y generó un mayor rendimiento en la cantidad de proteínas que el método de lisis.

Agradecimientos

Este proyecto fue financiado con fondos del proyecto de Apoyo a Nuevos PTC de Prodep (convenio DSA/103.5/15/7004, UACJ-PTC-326) y con infraestructura y fondos propios de la UACJ. KMM fue beneficiaria de una beca para estudiante de Prodep.

Literatura citada

- ABDULLAH, F. I., L. S. Chua and Z. Rahmat. 2017. Comparison of protein extraction methods for the leaves of *Ficus deltoidea*. *Journal of Fundamental and Applied Sciences* 9(2):908-924.
- ALAM, M., and W. Ghosh, 2014. Optimization of a phenol extraction-based protein preparation method amenable to downstream 2DE and MALDI-MS based analysis of bacterial proteomes. *Proteomics* 14:216-221.
- CHEVALIER, F. 2010. Highlights on the capacities of «Gel-based» proteomics. *Proteome Science* 8:23.
- CILIA, M., T. Fish, X. Yang, M. McLaughlin, T. W. Thannhauser, And S. Gray. 2009. A comparison of protein extraction methods suitable for gel-based proteomic studies of aphid proteins. *Journal of Biomolecular Techniques* 20:201-215.
- DEATHERAGE, B. L., D. S. Wunschel, M. A. Sydor, M. G. Warner, K. L. Wahl, and J. R. Hutchison. 2015. Improved proteomic analysis following trichloroacetic acid extraction of *Bacillus anthracis* spore proteins. *Journal of Microbiological Methods* 118:18-24.
- ERICSSON, C., I. Peredo, and M. Nistér. 2007. Optimized protein extraction from cryopreserved brain tissue samples. *Acta Oncology* 46:10-20.
- FEIST, P., and A. B. Hummon. 2015. Proteomic challenges: Sample preparation techniques for microgram-quantity protein analysis from biological samples. *International Journal of Molecular Sciences* 16:3537-3563.
- FIG, E., S. Kedracka-Krok, U. Jankowska, A. Pirog, and M. Dziedzicka-Wasylewska. 2010. Comparison of protein precipitation methods for various rat brain structures prior to proteomic analysis. *Electrophoresis* 31(21):3573-9.
- GAO, M., N. Li, J. Zhang, P. Yang, and X. Zhang. 2006. The study of three extraction methods for pre-separation and enrichment: Application to the complex proteome separation in rat liver. *Separation and Purification Technology* 52:170-176.
- GLATTER, T., E. Ahrné and A. Schmidt. 2015. Comparison of different sample preparation protocols reveals lysis buffer-specific extraction biases in gram-negative bacteria and human cells. *Journal of Proteome Research* 14:4472-4485.
- GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, R., J. Valero-Galván and J. V. Jorrín-Novo. 2014. Proteómica en hongos fitopatógenos. In: Corrales F, and J. J. Calvete. (eds.). *Manual de Proteómica. Sociedad Española de Proteómica, Madrid, p. 585-607.*
- GÖRG, A., O. Drews, C. Lück, F. Weiland, and W. Weiss. 2009. 2-DE with IPGs. *Electrophoresis* 30(S1):S122-132.
- HAO, R., C. Adoligbe, B. Jiang, X. Zhao, L. Gui, K. Qu, S. Wu and L. Zan. 2015. An optimized trichloroacetic acid/acetone precipitation method for two-dimensional gel electrophoresis analysis of qinchuan cattle longissimus dorsi muscle containing high proportion of marbling. *PLoS one* 10:1-12.
- HAUDENSCHILD, D., A. Eldridge, P. Lein, and B. Chromy. 2014. High abundant protein removal from rodent blood for biomarker discovery. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 455:84-89.
- JANKOWSKA, U., A. Latosinska, B. Skupien-Rabian, B. Swiderska, M. Dziedzicka-Wasylewska, and S. Kedracka-Krok. 2016. Optimized procedure of extraction, purification and proteomic analysis of nuclear proteins from mouse brain. *Journal of Neuroscience Methods* 261:1-9.
- KIM, M., and C. Kim. 2007. Human blood plasma preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of Chromatography B* 849:203-210.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-5.
- LEE, H. X., F. Ahmad, B. Saad, and M. N. Ismail. 2017. Evaluation of extraction methods for the identification of proteins from date palm (*Phoenix dactylifera* L.) seed and flesh. *Preparative Biochemistry and Biotechnology, in press.*
- MALAFIA, C., M. Guerra, T. Silva, P. Paiva, E. Souza, M. Correia and M. Silva. 2015. Selection of a protein solubilization method suitable for phytopathogenic bacteria: a proteomics approach. *Proteome Science* 13:5.
- MALDONADO, A., S. Echeverría-Zomeño, S. Jean-Baptiste, M. Hernández, and J. Jorrín-Novo. 2008. Evaluation of three different protocols of protein extraction for *Arabidopsis thaliana* leaf proteome analysis by two-dimensional electrophoresis. *Journal of Proteomics* 71:461-472.
- MASUO, Y., M. Hirano, J. Shibato, H. W. Nam, I. Fournier, C. Mériaux, M. Wisztorski, M. Salzet, H. Soya, G. K. Agrawal, T. Ogawa, S. Shioda, and R. Rakwal. 2011. Brain proteomics: sample preparation techniques for the analysis of rat brain samples using mass spectrometry. In: A. Ivanov and A. Lazarev (eds.). *Sample Preparation in Biological Mass Spectrometry. Springer, Dordrecht, p. 171-195.*
- MOORE, S., S. Hess and J. Jorgenson. 2016. Extraction, enrichment, solubilization, and digestion techniques for membrane proteomics. *Journal of Proteome Research* 15:1243-1252.
- NORTHROP, R. B., and A. N. Connor. 2009. Introduction to Molecular Biology, Genomics and Proteomics for Biomedical Engineers. *CRC Press. Estados Unidos. 464 p.*
- POOLADI, M., S. K. R. Abad and M. Hashemi. 2014. Proteomics analysis of human brain glial cell proteome by 2D gel. *Indian Journal of Cancer* 51:159-162.
- RABILLOU, T., and C. Lelong. 2011. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial *Journal of Proteomics* 74:1829-1841.
- RABILLOU, T., M. Chevallet, S. Luche and C. Lelong. 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *Journal of Proteomics* 73:2064-77.
- RABILLOU, T., M. Chevallet, S. Luche and C. Lelong. 2008. Fully denaturing two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: a critical update. *Proteomics* 8:3965-3973.
- SHEORAN, I., A. Ross, D. Olson and V. Sawhney. 2009. Compatibility of plant protein extraction methods with mass spectrometry for proteome analysis. *Plant Science* 176:99-104.
- SHEVCHENKO, G., S. Musunuri, M. Wetterhall and J. Bergquist. 2012. Comparison of extraction methods for the comprehensive analysis of mouse brain proteome using shotgun-based mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 11:2441-2451.

- SAIA-CEREDA, V. M., A. Aquino, P. C. Guest and D. Martins-De-Souza. 2017. Two-dimensional gel electrophoresis: a reference protocol. In: P. Guest (ed). *Proteomic methods in neuropsychiatric research. Advances in Experimental Medicine and Biology. Vol. 974. Springer, Cham. p. 175-182.*
- SINGH, V., B. Singh, R. Joshi, P. Jaju, and P.K. Pati. 2017. Changes in the leaf proteome profile of *Withania somnifera* (L.) Dunal in response to *Alternaria alternata* infection. *PLoS ONE 12(6)*: e0178924.
- TENÓRIO-DAUSSAT, C., M. Martinho, R. Ziolli, R. Hauser-Davis, D. Schaumloffel, D. and T. Saint'pierre. 2014. Evaluation and standardization of different purification procedures for fish bile and liver metallothionein quantification by spectrophotometry and SDS-PAGE analyses. *Talanta 120*:491-497.
- TIONG, H., S. Hartson and P. Muriana. 2015. Comparison of five methods for direct extraction of surface proteins from *Listeria monocytogenes* for proteomic analysis by orbitrap mass spectrometry. *Journal of Microbiological Methods 110*:54-60.
- VARGAS-CARAVEO, A., H. Castillo-Michel, G. E. Mejía-Carmona, D. G. Pérez-Ishiwara, M. Cotteb and A. Martínez-Martínez. 2014. Preliminary studies of the effect of psychological stress on circulating lymphocytes analyzed by synchrotron radiation based-Fourier transform infrared microspectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy 128*:141-146.
- WANG, W., R. Vignani, M. Scali and M. Cresti. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis 27*:2782-2786.
- ZHENG, Q., J. Song, K. Doncaster, E. Rowland and D. Byers. 2007. Qualitative and quantitative evaluation of protein extraction protocols for apple and strawberry fruit suitable for two-dimensional electrophoresis and mass spectrometry analysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry 55*:1663-1673. 

Este artículo es citado así:

Maldonado-Moreno, K., R. Martell-Gaytán, B. Alvarado-Tenorio, J. Valero-Galván, A. Martínez-Martínez, Á. G. Díaz-Sánchez y R. González-Fernández. 2017. Comparación de métodos de extracción de proteínas de cerebro y linfocitos de rata. *TECNOCIENCIA Chihuahua 11(3)*:127-137.