

kDa, siendo 3 de ellas fragmentos de proteínas más grandes, posiblemente productos de degradación.

## Conclusiones

En este primer abordaje se ha demostrado que el ProteoMiner es una herramienta muy eficaz para conseguir el enriquecimiento en proteínas menos abundantes en líquidos sinoviales de pacientes con osteoartritis, identificándose nuevas proteínas que pueden tener relación con procesos inflamatorios latentes o menos obvios que en otras patologías articulares como la artritis reumatoide.

## Agradecimientos

Ministerio Sanidad y Consumo-ISCIH-FIS, Proyecto: FIS06/1502 (M.Z.). CSIC; Proyecto: PI-200820I216 (M.Z.). Junta de Andalucía (J.A.), Consejería Innovación Ciencia y Empresa y Consejería Educación y Ciencia. Proyecto: PC08-CTS-

04046 (J.S. y M.Z.). Ministerio Educación y Ciencia (MEC)-Ministerio Ciencia e Innovación (MICINN) Proyecto: SAF-2008-03685 (J.S. y M.Z.). CSIC-Beca JAE Intro a M.D.P.-M.

## Referencias

- [1] Righetti PG y Boschetti E. The ProteoMiner and the FortyNiners: searching for gold nuggets in the proteomic arena. *Mass Spectrom Rev* 2008; 27: 596-608.
- [2] Boschetti E y Righetti P G. The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species. *J Proteomics* 2008; 71: 255-264.
- [3] Herrero-Beaumont G, Guerrero R, Sanchez-Pernaute O, Acebes, C, et al. Cartilage and bone biological markers in the synovial fluid of osteoarthritic patients after hyaluronan injections in the knee. *Clin Chim Acta* 2001; 308: 107-115.

## Estudio de la Estenosis Aórtica Valvular desde un punto de vista proteómico

*Tatiana Martin-Rojas<sup>1</sup>, Félix Gil-Dones<sup>1</sup>, Luis F. López-Almodovar<sup>2</sup>, Fernando de la Cuesta<sup>3</sup>, Gloria Álvarez-Llamas<sup>3</sup>, Fernando Vivanco<sup>3</sup>, Luis R. Padial<sup>4</sup>, María G. Barderas<sup>1,5</sup>*

<sup>1</sup>Laboratorio Fisiopatología Vascular, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo, <sup>2</sup>Unidad de Cirugía Cardíaca, Hospital Virgen de la Salud, SESCAM, Toledo, <sup>3</sup>Departamento de Inmunología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid, <sup>4</sup>Unidad de Cardiología, Hospital Virgen de la Salud, SESCAM, Toledo, <sup>5</sup>Unidad de Proteómica, Hospital Nacional de Paraplégicos, SESCAM, Toledo

En la actualidad diversos autores han señalado que la estenosis aórtica degenerativa comparte los mismos factores de riesgo que la enfermedad coronaria. Además, de compartir características histológicas con las placas ateroscleróticas, lo cual sugiere que la calcificación de la válvula aórtica es un proceso crónico inflamatorio similar a la aterosclerosis. La existencia de datos discordantes con esta teoría hace necesario el estudio de esta patología mediante la aplicación de nuevas técnicas proteómicas (2D-DIGE, LC-MS/MS, etc), con el objetivo de conseguir nuevos datos que puedan contribuir a la comprensión de los procesos implicados en esta

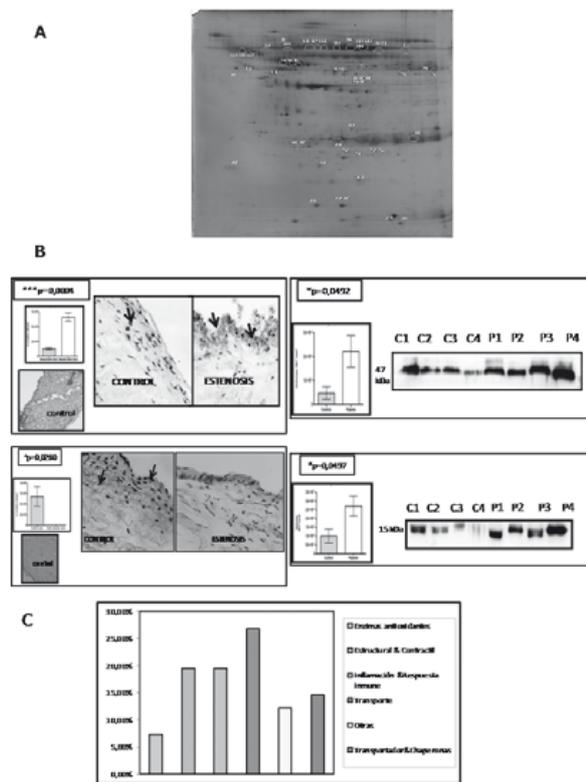
patología, junto con la identificación de nuevos biomarcadores pronóstico, diagnóstico y terapéuticos.

La estenosis aórtica (EA) degenerativa es una enfermedad de elevada prevalencia en los países desarrollados y es la responsable del mayor número de reemplazos valvulares aórticos. En la actualidad, diversos autores han señalado que comparte los mismos factores de riesgo que la aterosclerosis<sup>1</sup>. Por ello, parece esencial profundizar en el conocimiento de la patogenia de la EA degenerativa como paso previo para establecer medidas de prevención de dicha enfermedad.

En la actualidad, el estudio de proteínas individuales, aún siendo esencial, ha sido desplazado por las estrategias proteómicas que permiten el análisis global de las proteínas de una muestra<sup>2</sup>. Las nuevas tecnologías (MALDI-TOF/TOF, LC-MS, DIGE, MS-IMAGIN...) caracterizan miles de especies moleculares en cada análisis y generan perfiles conjuntos que reflejan la situación general de una muestra<sup>3</sup>. Debido a que las proteínas que componen las válvulas aórticas son esenciales para el correcto funcionamiento de estas, su identificación y caracterización mediante herramientas proteómicas es vital para conocer más sobre la fisiología de la válvula aórtica y las posibles patologías de ésta.

Tras la aprobación de la realización del estudio por el Comité Ético del Hospital Virgen de la Salud (SESCAM, Toledo) y solicitar el correspondiente consentimiento informado se incluyeron en el estudio pacientes (n=8) que fueron ingresados en la Unidad de Cirugía del mismo hospital y que fueron sometidos a cirugía de reemplazo valvular aórtico. Como controles se utilizaron válvulas aórtias sanas (n=8) procedentes de necropsias realizadas en el Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Virgen de la Salud (Toledo).

Las válvulas fueron homogeneizadas en tampón de extracción<sup>4</sup>, centrifugadas y el sobrenadante obtenido correspondiente al extracto proteico se cuantificó cuantificado siguiendo el método Bradford-Lowry. Posteriormente se llevó a cabo el análisis proteómico mediante electroforesis bidimensional diferencial (2D-DIGE). Las proteínas fueron marcadas siguiendo las instrucciones de la casa comercial (GE.Healthcare). Se llevó a cabo la primera y segunda dimensión y finalmente las imágenes de los geles se capturaron mediante el escáner de fluorescencia Typhoon 9400 (GE.Healthcare). El análisis de las imágenes se realizó con el programa DeCyder v6.5 (GE.Healthcare) que detectó 51 manchas proteicas diferencialmente expresadas con  $p < 0.05$  entre válvulas aórtica sin estenosis y válvulas aórticas con estenosis. Estas manchas proteicas fueron recortadas de los geles, teñidos previamente con tinción plata, digeridas con tripsina y analizadas con el espectrómetro de masas 4800 Plus MALDI-TOF/TOF Analyzer (Applied Biosystems), seguido de una búsqueda de datos. Las 51 manchas proteicas correspondían a 18 proteínas diferentes (Tabla 1), que se clasificaron atendiendo a su función y se validaron mediante WB e IHC.



**Figura 1.** (A) Gel 2-DE con las proteínas de diferencia entre EA y controles. (B) Validaciones de algunas de las proteínas diferencialmente expresadas realizadas mediante Inmunohistoquímica (izquierda) y Western-blot (derecha). (C) Clasificación por Grupos Funcionales de las proteínas identificadas usando 2-DE y MALDI TOF/TOF combinado con LC-MS/MS.

Número spot	Peso Molecular teórico	P.I. teórico	Score total	DIGE P	DIGE Av. Ratio	Función
1	38405	6.16	163	0,03717	1,585	Estructural
2	47621	5.33	394	0,002017	1,9598	Inflamación
3	51908	5.65	165	0,01701	1,6833	Desconocida
4	69321	5.92	442	0,004436	1,9458	Transporte
5	46707	5.37	109	0,0008152	2,9606	Inflamación
6	48084	4.29	118	0,01925	-1,6281	Chaperona
7	53619	5.06	249	0,02175	1,9018	Estructural
8	51479	5.6	106	0,01859	1,7482	Coagulación
9	25371	4.5	360	0,002002	2,9514	Respuesta inmune
10	25371	4.5	231	0,02304	2,5134	Transporte
11	22313	7.83	70	0,02893	-1,99	Chaperona
12	45177	6.13	99	0,01829	-1,9375	Transportador
13	23341	5.43	90	0,01985	2,1109	Enzima antioxidante
14	25537	8.26	175	0,02862	-1,8192	Enzima antioxidante
15	22611	8.54	112	0,02055	-2,4012	Contractil
16	25851	5.70	215	0,02523	2,5087	Enzima antioxidante
17	15877	5.52	123	0,00341	2,2091	Transportador
18	14849	6.29	80	0,04459	1,5956	Transporte

**Tabla 1.** Proteínas identificadas por espectrometría de masas (MALDI TOF/TOF) mostrando diferentes niveles de expresión diferencial entre válvulas aórticas sanas y válvulas aórticas con estenosis, analizadas mediante DeCyder software v 6.5 con  $p < 0.05$ .

## Agradecimientos

Beca Esteve de la Sociedad Española de Cardiología. Instituto de Salud Carlos III (FIS PI070537), Fondo de Investigación Sanitaria de Castilla la Mancha (FISCAM, PI2008/08), Fondo de Investigación Sanitaria de Castilla la Mancha (FISCAM, PI2008/28), Redes Temáticas de Investigación Cooperativa (RD06/0014/1015).

## Referencias

- [1] Butany J, Collins MJ, Demellawy DE et al. Morphological and clinical findings in 247 surgically excised native aortic valves. *Can J Cardiol* 2005; 21:747-55.
- [2] Odile Carrette, Pierre R Burkhard, Jean-Charles Sanchez & Denis F Hochstrasser. State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research. *Nature Protocols* 1, - 812 - 823 (2006).
- [3] F. Vivanco, L.R Padial, V. M. darde, F de la Cuesta, G. Alvarez-Llamas, N. Diaz-Prieto, et al. Proteomic biomarkers of atherosclerosis. *Biomarkers Insights* 2008:3, 101-113.
- [4] Tatiana Martín-Rojas, Félix Gil Dones, Luis F. López-Almodovar, Rocío Juárez-Tosina, Fernando de la Cuesta, Gloria Álvarez-Llamas, Sergio Alonso-Organza, Fernando Vivanco, Luis Rodríguez-Padial, y María G. Barderas. Obtención de un protocolo óptimo para el análisis proteómico de válvulas aórticas humanas sanas y estenóticas. *Rev Esp Cardiol*. 2010;63.

## Metabolic labelling of primary culture human cartilage cells to analyze the effect of Interleukin-1 $\beta$ in the extracellular matrix metabolism

*Valentina Calamia, Beatriz Rocha, Patricia Fernández, Jesús Mateos, Cristina Ruiz-Romero, Francisco J. Blanco*

Osteoarticular and Aging Research Lab, Nodo Asociado de Proteo-Red. INIBIC-Hospitalario Universitario A Coruña, Xubias 84, 15006 - A Coruña, SPAIN

## Introduction

Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) is a proinflammatory cytokine that acts as an arthritic mediator with the capacity to drive the key pathways typically associated with osteoarthritis (OA) pathogenesis. This degenerative joint disease, characterized by articular cartilage degradation, involve in its initial stages an increased cellular proliferation and synthesis of matrix proteins, proteinases, growth factors, cytokines and other inflammatory mediators by cartilage cells. Therefore, research has focused on the chondrocyte (the unique cell type of cartilage) as the cellular mediator of OA pathogenesis. Chondrocytes of OA patients, as well as synovial cells, produce increased levels of inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  [1]. This cytokine shifts the biology of the chondrocytes towards articular cartilage degradation by increasing the expression

of matrix metalloproteinases while inhibiting the expression of genes encoding essential components of the cartilage extra cellular matrix (ECM).

We have recently used 2-DE technology to describe the intracellular proteome of normal and OA human chondrocytes [2-3]. In the present work, we have standardized the stable isotope labelling by amino acids in cell culture (SILAC) technique on primary culture human articular chondrocytes, and have applied for the first time this strategy for studying the chondrocyte extracellular matrix metabolism in basal conditions and under the effect of the proinflammatory cytokine IL-1 $\beta$ .

## Methods

Cartilage obtained from patients undergoing joint replacement was provided by the Tissue Bank at