

## ARTÍCULOS ORIGINALES

### **La membrana vitelina de embriones bovinos, un modelo experimental de interés para estudios proteómicos. Análisis del perfil proteico mediante electroforesis bidimensional**

<sup>1,2\*</sup>Álvaro Carlos Galdos-Riveros; <sup>3</sup>Ana Rita Toledo-Piza; <sup>2</sup>Durvanei Augusto Maria; <sup>3</sup>Ronaldo Zucatelli Mendonça; <sup>1</sup>Maria Angélica Miglino

1 Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de São Paulo. Universidade de São Paulo Brasil

2 Laboratório de Bioquímica e Biofísica do Instituto Butantan, São Paulo Brasil

3 Laboratório de Parasitologia e Entomologia do Instituto Butantan, São Paulo Brasil

[1] Autor para correspondencia. E-mail: alvarogaldos@usp.br

#### **Resumen**

El saco vitelino es una de las membranas que desempeñan un papel importante en la supervivencia inicial del embrión en muchas especies de mamíferos, además de producir proteínas necesarias para su desarrollo. Su función es compleja, participando, entre otros, en la hematopoyesis y en la transferencia del material materno como aminoácidos, vitaminas y proteínas. Estas proteínas controlan la mayoría de los procesos celulares que ocurren en gran diversidad durante el desarrollo embrionario, actuando como enzimas, anticuerpos, hormonas, componentes estructurales, receptores celulares y factores de crecimiento embrionario. En el presente trabajo se aborda la puesta a punto de un protocolo de extracción de proteínas de la membrana vitelina de embriones bovinos para su posterior análisis por electroforesis bidimensional. Se han obtenido geles bidimensionales de buena resolución, lo que facilitará el posterior análisis por espectrometría de masas e identificación de proteínas, como etapa previa a la caracterización biológica del sistema.

Palabras clave: perfil proteico de membrana vitelina, saco vitelino.

#### **Introducción**

El saco vitelino está presente en todos los mamíferos y desempeña un importante papel

en el desarrollo embrionario. Sus funciones están siendo estudiadas y se ha demostrado que el saco vitelino o membrana vitelina es uno de los lugares iniciales de la hematopoyesis durante el desarrollo embrionario [1-3]. En roedores, el saco vitelino envuelve el saco gestacional y sirve como principal membrana para los intercambios materno-fetales durante la gestación [4]. Es capaz de sintetizar proteínas que son secretadas en los compartimientos inter y extra embrionario y es utilizado con frecuencia como modelo experimental para estudios en el área de embriología y toxicología reproductiva [5-6].

La expresión de los patrones de proteína en células y tejidos es característica de su desarrollo, fisiología o estado patológico. De esta manera, es muy importante determinar los perfiles de expresión de estas proteínas y las alteraciones que ocurren cuando se pasa de un estadio no-patológico a un estadio específico de la enfermedad.

Existen evidencias considerables de que el papel funcional de una determinada proteína puede depender fuertemente del tipo de célula en la cual es expresada y en el estado de esa célula [7]. Las proteínas controlan la mayoría de procesos celulares, los cuales ocurren en gran diversidad, pudiendo actuar como enzimas, anticuerpos, hormonas, componentes estructurales y receptores celulares [8].

La identificación de las diferencias en la expresión proteica es una de las áreas más importantes de la proteómica. En los últimos años, grandes esfuerzos han sido realizados en el desarrollo de nuevas metodologías para un mejor estudio y entendimiento de la química de proteínas de las diferentes muestras biológicas en estudio.

El estudio de proteínas en amplia escala es conocido como proteómica, asociada tradicionalmente con la exposición de un gran número de proteínas de un linaje celular u organismo en geles bidimensionales de poliacrilamida [9-11].

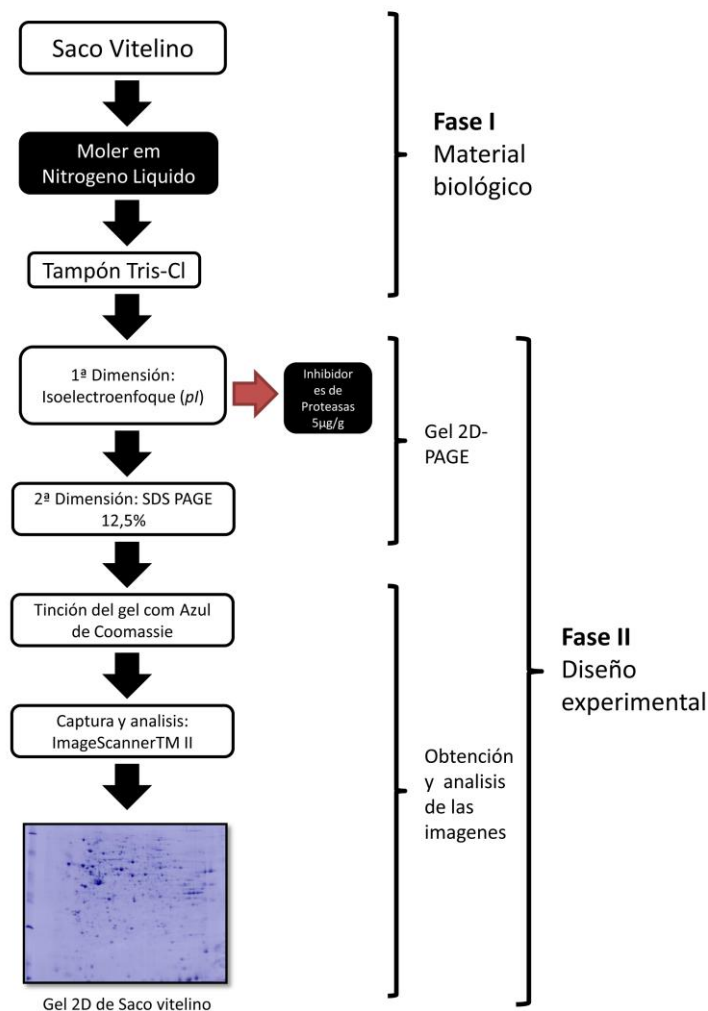
En el presente trabajo estudiaremos el establecimiento de un protocolo de extracción de proteínas de la membrana vitelina de embriones bovinos durante el primer trimestre de gestación. Teniendo conocimientos de las funciones vitelinas, podremos inferir que dicha técnica podrá ser determinante para definir a las proteínas existentes en esta membrana, comparándolas con aquellas descritas en otras especies. Además, la presencia de proteínas desconocidas podrá sugerir nuevas funciones para la membrana vitelina y otros anejos embrionarios en órganos que son influenciados por factores de crecimiento específicos del desarrollo embrionario.

**Material y métodos**

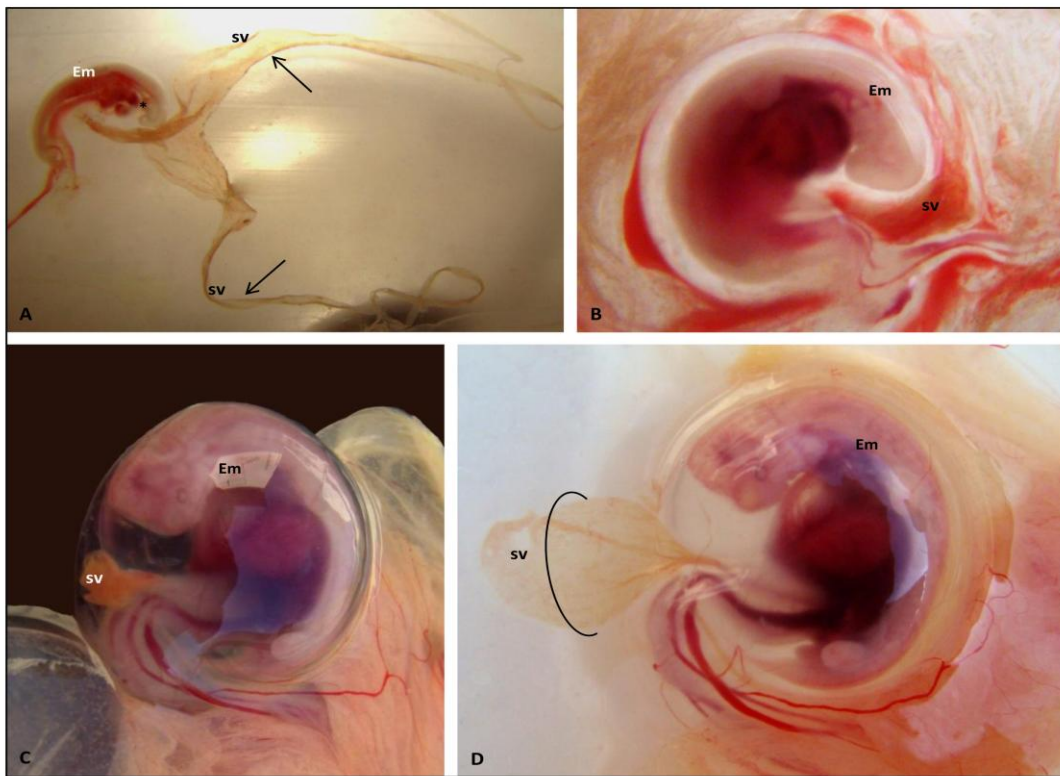
**Material biológico**

El método utilizado está descrito resumidamente en la figura 1. La recogida de los úteros bovinos normales fue realizada en los mataderos de la ciudad de São Jose dos Campos-SP y Poços de Caldas-MG. El embrión junto con el saco vitelino (Figura 2), fueron retirados tras la incisión del útero y congelados inmediatamente en nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>). Los sacos vitelinos de 23 y 37 días de gestación fueron homogeneizados mecánicamente de forma separada en tubos Eppendorf de 2mL en presencia de nitrógeno líquido (N<sub>2</sub>), y el homogeneizado se pasó a tubos Eppendorf de

1,5mL, suspendiéndose, para su lavado, en tampón Tris-Cl 1.5 M, pH 8.8. Tras la centrifugación a 12000 x g por 2 minutos, el pellet se eliminó y el sobrenadante se utilizó para el análisis electroforético.



**Figura 1. Protocolo de separación de proteínas del saco vitelino de embriones bovinos por electroforesis bidimensional.** Se detallan los pasos utilizados. Aquellos pasos esenciales se encuentran en los cuadros de color negro como moler en nitrógeno líquido y el uso de inhibidores de proteasas.



**Figura 2.** *Desarrollo embrionario y formación del saco vitelino de embriones bovinos, con edad gestacional estimada de: A – 23 días, B – 29 días, C y D – 37 días, Em, embrión; sv, saco vitelino.*

## Diseño experimental

### Electroforesis bidimensional

Los lisados de saco vitelino fueron mantenidos a  $-20^{\circ}\text{C}$  en  $250\mu\text{L}$  de tampón de rehidratación (Urea 7M, tiourea 2M, CHAPS 4%, anfolitos 0.5%, DTT 0.3%, e inhibidor de proteasa  $5\mu\text{g/g}$ ) y sometidos a centrifugación a  $12000 \times g$  por 5 minutos, el pellet se eliminó y el sobrenadante se pasó a un tubo Eppendorf de  $1,5\text{mL}$ . Se realizaron las cuantificaciones de proteínas totales de las muestras en los diferentes estadios de gestación a fin de estandarizar la cantidad de proteínas totales para la aplicación en la electroforesis bidimensional. La determinación de la concentración proteica fue realizada por el método de Bradford [12].

El isoelectroenfoque se realizó en el equipo Ettan IPGphor III (Amersham Biosciences), de acuerdo con las instrucciones del fabricante, utilizando tiras con gradiente no lineal de pH inmovilizado 3-10 de  $13\text{cm}$  (IPG strips). Las tiras fueron rehidratadas con tampón

de rehidratación por 12 horas conteniendo  $60\mu\text{g}$  de proteína. Las condiciones para la electroforesis fueron:  $500\text{V}$ , 1h,  $1000\text{V}$ , 1h,  $8000\text{V}$ , 4h. Tras el isoelectroenfoque, las tiras fueron retiradas y guardadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La SDS-PAGE fue realizada con el método de Laemmli [13] con pequeñas modificaciones. Tras el isoelectroenfoque, las tiras fueron equilibradas en  $15\text{mL}$  de tampón de equilibrado ( $0.05\text{M}$  de tampón Tris-HCL  $1.5\text{M}$  pH 8.8, urea 6M, 30% de glicerol (99%) (v/v), 2% de SDS (p/v)), individualmente en un tubo y se adiciona DTT ( $100\text{mg}/15\text{mL}$ ) por 15 minutos con agitación constante. Después se lava la tira con tampón de electroforesis (Tris base  $0.025\text{M}$ , glicina  $0.192\text{M}$ , SDS 0.1% w/v) y se vuelve a colocar en un tubo adicionando iodoacetamida ( $375\text{mg}/15\text{mL}$ ) por 15 minutos con agitación constante. La tira fue lavada con tampón de electroforesis, colocada en la parte superior del gel (12.5%), sellada con agarosa al 0.5%, y se añade tampón de electroforesis. La segunda dimensión se realizó en el sistema

electroforético Ruby SE600 (Amersham Biosciences/GE Healthcare), con una corriente constante de 15mA/gel por 15 minutos y después de 30mA/gel hasta que el frente de la muestra llegue al final de gel.

Los geles se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie G-250 (Sigma-Aldrich). Los geles fueron fijados en una solución conteniendo 3%(v/v) de ácido fosfórico y 50%(v/v) etanol durante toda la noche, después fueron lavados 3 veces con agua milli-Q por 5 minutos y mantenidos por 1 día en la solución de tinción (0.1% p/v Azul Brillante de Coomassie G-250, 17% p/v de sulfato de amonio, 34% v/v de metanol, 3% v/v de ácido fosfórico). Después fueron lavados con una disolución al 1%(v/v) de ácido acético hasta la eliminación del fondo.

Tras la tinción de los geles, estos se escanearon en un sistema Image Scanner<sup>TM</sup> II (Amersham Biosciences) GE Healthcare en modo de transferencia con una resolución de 300 dpi y en formato *bmp*. Después fueron analizadas las imágenes de los geles utilizando el software Image Master<sup>TM</sup> II 2D Platinum versión 6.0 (Amersham Bioscience /GE Healthcare).

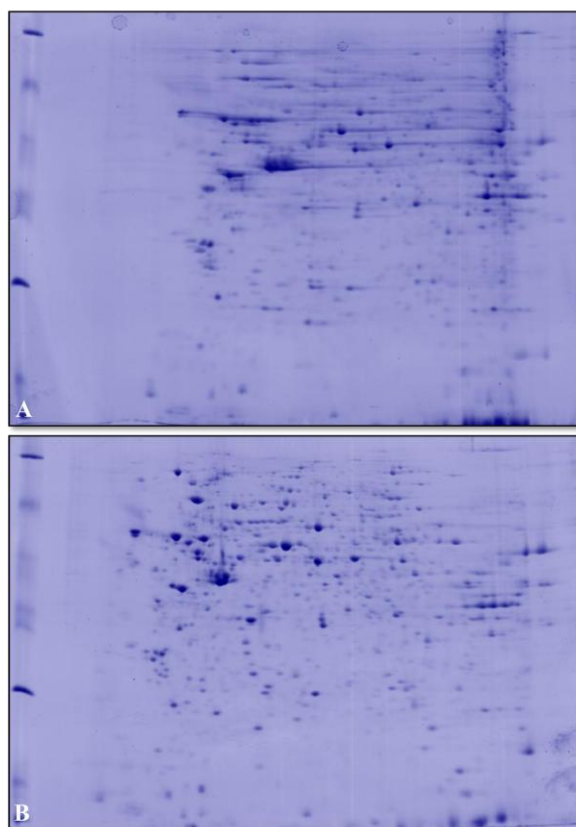
## Resultados y discusión

En este trabajo se presenta un protocolo para la realización de la electroforesis bidimensional de muestras proteicas obtenidas del saco vitelino de embriones bovinos en diferentes periodos gestacionales. Los extractos, conteniendo 60µg de proteína se separaron en tiras IPG de 3-10 como rango de pH. También se analizan las diferencias en abundancia a los diferentes estadios, entre cada condición y se identifican de proteínas diferencialmente expresas en las muestras.

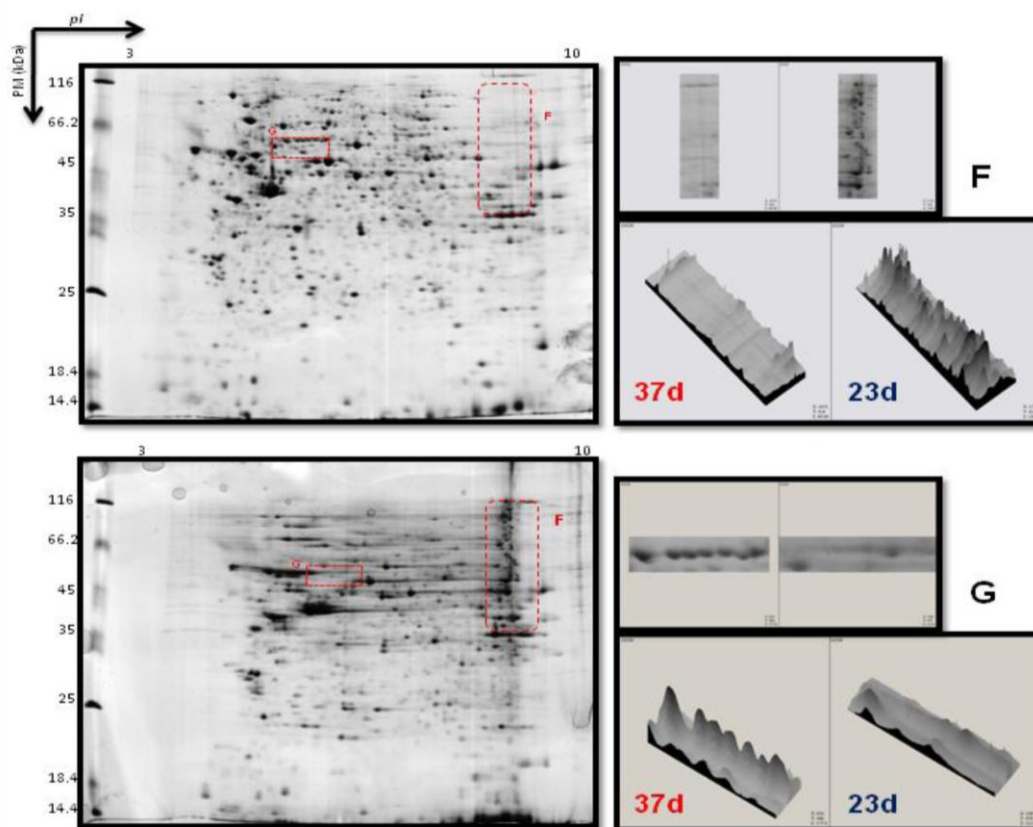
El establecimiento de un protocolo para electroforesis bidimensional 2D-PAGE es esencial para obtener buenos resultados en proteómica. El mejor método de extracción, precipitación y solubilización de proteínas varia

de una muestra a otras y debe ser establecido para cada caso en particular [14].

El método descrito parece adecuado, tanto desde el punto de vista del rendimiento de proteínas (60µg), como del número de spots detectados en el gel (970 spots de proteína en el saco vitelino bovino de edad estimada de 23 días de gestación y 1230 spots de proteína en el saco vitelino bovino de edad estimada de 37 días de gestación, resolución y bajo “streaking” (Figura 3). Para ello la maceración con nitrógeno líquido y la adición de inhibidores de proteasas fue clave (datos no mostrados) [14-16]. Las degradaciones de proteínas a través de la acción de proteasas darían un perfil proteico en el que predominan péptidos de bajo peso molecular, que no es el caso de nuestros geles (Figura 3).



**Figura 3. Geles bidimensionales del saco vitelino de embriones bovinos.** Proteínas fueron separadas en los dos periodos gestantes. A: gel bidimensional de saco vitelino de edad estimada de 23 días, B: gel bidimensional de saco vitelino de edad estimada de 37 días, los dos teñidos con Azul de Coomassie G-250.



**Figura 4.** Geles bidimensionales del saco vitelino de embriones bovinos de edad estimada de 23 (G) y 37 (F) días. A la derecha están representadas en 3D las regiones G y F que contienen los spots que presentaron expresión diferencial de proteínas.

El número de spots detectados estuvo comprendido entre 970 y 1200, para respectivamente muestras obtenidas a los dos estadios gestacionales analizados, 23 y 37 días. El gel bidimensional del saco vitelino de embrión bovino de edad estimada de 23 días presentó un grupo de proteínas diferencialmente expuestas (Figura 4) que no están presentes en el grupo de edad gestacional estimada de 37 días.

### Conclusión

Se ha evaluado y optimizado un protocolo de extracción de proteínas de saco vitelino de embrión bovino para su posterior separación por electroforesis bidimensional. Se detectaron entre 900 y 1200 spots, dependiendo del estado de desarrollo, con un buen número de diferencias encontradas. El trabajo se está continuando con el análisis por espectrometría de masas de los spots diferenciales, lo que permitirá, por una parte, profundizar en el

conocimiento del desarrollo embrionario, y, por otra, identificar biomarcadores potencialmente útiles en el diagnóstico preimplantacional embrionario, con el objetivo de prevenir la transmisión de enfermedades genéticas en el embrión producidas por la manipulación en el laboratorio.

### Agradecimientos

Este trabajo fue financiado por la CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Un agradecimiento especial a la Dra. Miryan Lança Vilia Alberto por su colaboración en este trabajo.

**Referencias**

- [1] Medvinsky AL, Samoylina NL, Muller, AM. A early pre-liver intraembryonic source of CFU-S in the developing mouse. *Nature* 1993; 364: 64-67.
- [2] Auerbach R, Huang H, Lisheng L. Hematopoietic Stem Cells in the Mouse Embryonic Yolk Sac. *Stem Cells* 1996; 14: 269-280.
- [3] Palis J, Yoder MC. Yolk-sac hematopoiesis: The first blood cells of mouse and man. *Experimental Hematology* 2001; 29: 927-936.
- [4] Thomas T, Southwell BR, Schreiber G. Plasma protein synthesis and secretion in the visceral yolk sac of the fetal rat: gene expression, protein synthesis and secretion. *Placenta* 1990; 11: 413-430.
- [5] Dunton A, Al-Alousi A, Pratten MK. The giant yolk sac: A model for studying early placental transport. *J. Anat* 1986; 145: 189-206.
- [6] Brent RL, Beckman DA, Jensen M. Experimental yolk sac dysfunction as a model for studying nutritional disturbances in embryo during early organogenesis. *Teratology* 1990; 41: 405-413.
- [7] Godovac-Zimmermann J, Brown LR. Perspectives for mass spectrometry and functional proteomics. *Mass Spectrometry Reviews* 2001; 20: 1-57.
- [8] Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003; 421: 198-207.
- [9] Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC, Jan JX, Gooley AA, Hughes E, Humphery-Smith I, Williams KL, Hochstrasser DF. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Nature Bio Technology* 1996; 14: 61-65.
- [10] Anderson NG y Anderson NL. Twenty years of Two-dimensional electrophoresis: past, present and future. *Electrophoresis* 1996; 17: 443-453.
- [11] Wilkins MR, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser D. Proteome research: new frontiers in functional genomics. (Editores: Springer-Verlag, Germany 1997 pp 243.
- [12] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976, 72: 248-254.
- [13] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227: 680-685.
- [14] Görg A.; Klaus A.; Lück C.; Weiland F. Two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis: A laboratory manual. Disponível em: <<http://www.wzw.tum.de/blm/deg/>>. Acesso em: 3 março 2007.
- [15] Herbert BR. Advances in protein solubilization for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 1999. 20: 660-663.
- [16] Usami M, Mitsunaga K, Nakazawa K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. *Toxicol In vitro* 2007, 3: 521-526.