

Sesión de proteómica microbiana y de parásitos S.O.S., ¿nos podéis ayudar?

¹Aida Pitarch, ²Antonio Marcilla, ³Ana Oleaga y ⁴Manuel J. Rodríguez-Ortega

¹ Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid e Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS)

² Departamento de Biología Celular y Parasitología, Facultat de Farmàcia, Universitat de València

³ Laboratorio de Parasitología Animal, IRNASA, CSIC, Salamanca

⁴ Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba

Con este título se inició la sesión 5 de las II Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica. A pesar de realizarse a primera hora de la mañana siguiente a la cena de la reunión, por cierto en un ambiente excelente, logramos una audiencia nutrida y participativa. El formato con el que planteamos la sesión fue innovador: presentar los problemas proteómicos de jóvenes investigadores en el campo de la microbiología y parasitología, y esperar una respuesta dinámica de los expertos presentes en la sesión. Desde luego el devenir de la sesión no decepcionó, siendo la más participativa con 7 comunicaciones orales y 16 en póster. Con esta fórmula hemos salido de las presentaciones clásicas de resultados (que por cierto se pueden seguir en las respectivas publicaciones), y llegar a la discusión de problemas en un ambiente distendido, refiriendo cada cual las dificultades con las que se encuentra a diario. Creemos, no sin poca inmodestia, que esta sesión ha traído una bocanada más de aire fresco a unas jornadas de por sí interesantes, ágiles y participativas. Y la guinda del pastel fue el reconocimiento por parte de la organización a dicho esfuerzo concediéndonos el premio a la mejor sesión de dichas jornadas. Antes de nada muchísimas gracias al jurado y a Thermo Scientific, patrocinadora de dicho premio.

1. Las enfermedades desatendidas, ¿también en proteómica?

Como introducción a la sesión, y para despertarnos un poco (la conciencia, y también de la resaca de la noche anterior), Antonio Marcilla nos introdujo en la problemática de las enfermedades desatendidas, o también denominadas olvidadas. Hizo hincapié en que estas enfermedades definidas así por la Organización Mundial de la Salud carecen de atención tanto en los medios de comunicación como en la implementación de programas de control y en la dotación de fondos para investigación. Remarcó además que el que estén causadas en su mayor parte por organismos huérfanos (así se les denomina a aquéllos que carecen de proyecto de secuenciación de su genoma) hace aún más arduo y difícil su estudio, en especial el proteómico. Pensamos que los avances en ciencia y tecnología deben tener como objetivo final ayudar a las personas a tener una vida mejor, y precisamente aquellos afectados por estas enfermedades desatendidas merecen, si cabe, un mayor esfuerzo por aquéllos que disfrutamos de las ventajas de vivir en el “primer mundo”. Es por ello que, unido a nuestro interés investigador, encontramos la gratificación de poder ayudar a aquéllos que más lo necesitan. En este cambio de época que estamos viviendo, los avances en la ciencia y la tecnología deben disminuir la distancia entre ambos mundos acercando a los países en desarrollo y haciendo posible su incorporación al progreso científico, económico y social.

2. ¿Qué problemas se han abordado en la sesión de proteómica de microorganismos y parásitos?

Tras despertar nuestras conciencias, la sesión continuó con una comunicación en la que se introdujo uno de los problemas más comunes en el estudio proteómico de estos

microorganismos y parásitos huérfanos. Ésta fue seguida de tres grandes bloques de comunicaciones en los que se abordaron los principales problemas relacionados con el análisis proteómico de bacterias, hongos y parásitos. Todos ellos se detallan a continuación y se resumen en la Tabla 1.

Tema	Problemas proteómicos abordados	Posibles soluciones o sugerencias propuestas	Ponente	
			Nombre	Afiliación
Aspectos generales	- Escasez de secuencias en las bases de datos para microorganismos y parásitos.	- Herramientas bioinformáticas que aumenten el número de secuencias (ej. ESTs).	María Luz Valero	Laboratorio de Proteómica, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia.
	- Espectros de fragmentación de pésima calidad y mala asignación de los mismos a secuencias peptídicas.	- Guanidación de los residuos de lisina y sulfonación N-terminal de péptidos.		
Proteómica de bacterias	- Identificación de glicoproteínas de superficie bacterianas.	- Empleo de resinas de afinidad específicas para la captura de las mismas a través de sus residuos sacarídicos.	Alfonso Olaya	Dpto. de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba.
	- Eliminación de contaminantes (azúcares, ADN,...) que puedan interferir en la captura selectiva de glicoproteínas.	- Diálisis, ultrafiltración (para azúcares y ADN), precipitación selectiva de ADN y/o digestión con nucleasas.		
	- Enfoque deficiente de proteínas en zona básica de pH.	- Empapar los papeles que se colocan sobre los electrodos con tampón urea/tiourea	Mario Ferrer Navarro	Institut de Biotecnologia i de Biomedicina (IBB), Universitat Autònoma de Barcelona.
	- Baja presencia de proteínas de membrana en los geles bidimensionales.	- Empleo de DeStreak como reductor en el isoelectroenfoque.		
	- Fenómeno de "lágrimas" en determinadas zonas del gel.	- Uso de ASB-14 en el tampón de rehidratación.		
	- Contaminación por ADN.	- Debido a la eliminación del SDS en la segunda dimensión.		
- Aumento del tiempo e intensidad de sonicación para la extracción de proteínas.				
Proteómica de hongos	- Variabilidad analítica y biológica entre réplicas independientes.	- Uso de técnicas microbiológicas más reproducibles, y de cepas monoconidiales y/o de la misma generación.	Francisco Javier Fernández Acero	Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, Universidad de Cádiz.
		- Transformación raíz cúbica de los datos.		
	- Extracción de la relevancia biológica a partir de listas de proteínas.	- Empleo de diferentes herramientas bioinformáticas.		
de humanos	- Obtención de extractos proteicos de hongos filamentosos.	- Modificación de protocolos de extracción de proteínas.		
	- Normalización de muestras con diferente cantidad de proteína en el control y en el problema para analizar mediante iTRAQ.	- Igualar el número de células de partida en todos los casos y resuspender en el mismo volumen final antes de marcar con iTRAQ.	Jose Antonio Reales Calderón	Dpto. Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.
	- Igualar la concentración de las muestras antes de marcar con iTRAQ.			
Proteómica de parásitos	- Contaminación con proteínas de la línea celular hospedadora en estudios de interacción parásito-hospedador.	- Uso de columnas desaladoras.	Virginia Marugán Hernández	SALUVET, Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid.
	- Contaminación con proteínas de otras organelas en estudios de fraccionamiento subcelular.	- Empleo de gradientes de sacarosa y ultracentrifugación.		
	- Contaminación con proteínas de otros estadios invasivos del parásito (especialmente con taquizoitos).	- Uso de otros protocolos de fraccionamiento.		
	- Extrapolación de manchas proteicas entre geles bidimensionales al variar condiciones (ej., geles analíticos vs. preparativos, IPGs de rango amplio vs. estrecho,...).	- Realizar estudios posteriores de validación de los subproteomas obtenidos.		
	- Valor estadístico de la abundancia relativa de una proteína al comparar diferentes condiciones mediante 2D-	- Desarrollo de una nueva metodología para purificar y aislar los bradizoitos de los taquizoitos de <i>N. caninum</i> .	Javier González Miguel	Laboratorio de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca.
	- Bases de datos cuyas anotaciones son incompletas o se actualizan cada poco tiempo.	- Comparar el (sub)proteoma de la mezcla de zoitos (taquizoito y bradizoito) con el de los taquizoitos solos.		
		- Identificar solamente aquellas manchas que se correlacionen correctamente (mediante asignación automática y posterior revisión manual).		
	- Optimizar la técnica.			
de nematodos	- Escasez de información en las bases de datos.	- Utilizar una relación constante con significado biológico para comparar abundancia proteica.		
		- Revisar cada cierto tiempo las identificaciones obtenidas para determinar si han variado las anotaciones previas debido a la actualización de las mismas.		
		- Buscar en la Web el mayor número posible de bases de datos con información útil y volcar en ellas los resultados.		

Tabla 1. Resumen de los principales problemas proteómicos abordados en la sesión de microorganismos y parásitos, así como de las posibles soluciones o sugerencias propuestas.

2.1. Aspectos generales.

María Luz Valero nos introdujo en la problemática de los estudios proteómicos con organismos “raros”, como ella misma les denominó. María Luz nos expuso que los métodos actuales de identificación de proteínas se basan generalmente en la comparación de la información de MS (o MS/MS) obtenida con la información de secuencias de proteínas que existe en diferentes bases de datos. Precisamente, éstas son uno de los “cuellos de botella” de dichos estudios. Así por ejemplo, aunque la base de datos del NCBI cuenta con aproximadamente 8.500.000 secuencias, no todos los organismos están representados por igual. Así, de ellas, 508.911 son de proteínas humanas y 110.313 de rata. Pero el número es considerablemente menor para otros organismos de gran interés como parásitos (como ejemplo 54.542 entradas para helmintos trematodos). Es por ello necesario en muchos casos recurrir a la secuenciación *de novo*, la cual requiere de espectros de MS/MS de gran calidad, siendo además costosa tanto en cantidad de muestra como en el tiempo de análisis, por lo que su aplicabilidad es limitada.

2.2. Proteómica de bacterias.

Alfonso Olaya nos mostró su trabajo acerca de los problemas para identificar glicoproteínas en bacterias. Hasta hace muy poco, se pensaba que los procariontes no presentaban este tipo de modificación postraduccional. Sin embargo, se ha demostrado la existencia de proteínas glicosiladas tanto en arqueas como en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. En los procariontes, las glicoproteínas son casi sin excepción proteínas ligadas a la superficie o secretadas al exterior, por lo que, en el estudio de organismos patógenos, *a priori* son buenos candidatos para nuevas vacunas. Alfonso nos mostró el abordaje planteado para la identificación proteómica de estas moléculas, consistente en el empleo de tres tipos de cromatografía de afinidad: (i) la basada en la química de la hidrazida, mediante la cual los grupos cis-diol de los residuos de azúcares de las glicoproteínas, tras ser oxidados irreversiblemente con peryodato, reaccionan con

dicho grupo hidrazida formando un enlace covalente hidrazona; (ii) la de las lectinas, proteínas que reconocen específicamente residuos monosacáridicos u oligosacáridicos unidos a proteínas; y (iii) la del ácido aminofenilborónico (APBA), mediante la cual dicho grupo forma un enlace covalente reversible de tipo diéster con los cis-dioles de los azúcares (Figura 1). Dicho enlace se puede revertir, liberando por tanto el ligando, y aumentando el pH. Los dos primeros tipos pueden usarse asimismo para la detección en geles. Los resultados preliminares en los eluidos, tras digerir en solución con tripsina, evidenciaron una gran cantidad de proteínas citoplasmáticas identificadas por LC-MS/MS, lo cual en principio no era lo esperado, indicando así una posible inespecificidad de las técnicas tal y como habían sido usadas. La presentación de Mario Ferrer Navarro recibió el premio a la mejor comunicación oral individual, haciendo que sobre esta sesión recayeran todos los honores de la presente edición de las Jornadas. Mario nos habló acerca de la utilidad de la proteómica para diferenciar entre distintos aislados clínicos de una bacteria Gram-negativa, *Stenotrophomonas maltophilia*, asociada a una incidencia creciente de infecciones nosocomiales en pacientes inmunodeprimidos. La caracterización y diferenciación de estirpes de una determinada especie puede llevarse a cabo mediante pruebas microbiológicas y bioquímicas, tales como ensayos de motilidad, sensibilidad a sueros humanos, capacidad de formación de biofilms o de adhesión celular. Sin embargo, estas pruebas no siempre dan resultados claramente diferenciadores. La distinción entre estirpes puede abordarse también desde el punto de vista proteómico, caracterizando el proteoma de la bacteria. Para ello, realizó una extracción de proteína total (con presencia de ASB-14 en el tampón de rehidratación, para maximizar la presencia de proteínas de membrana) con el fin de resolverla mediante DIGE. En los primeros intentos, se topó con el problema de un enfoque no demasiado eficiente tras realizar la primera dimensión en tiras de intervalo de pH 3-10: la zona de pH básico estaba mal enfocada y contaba en general con pocas proteínas.

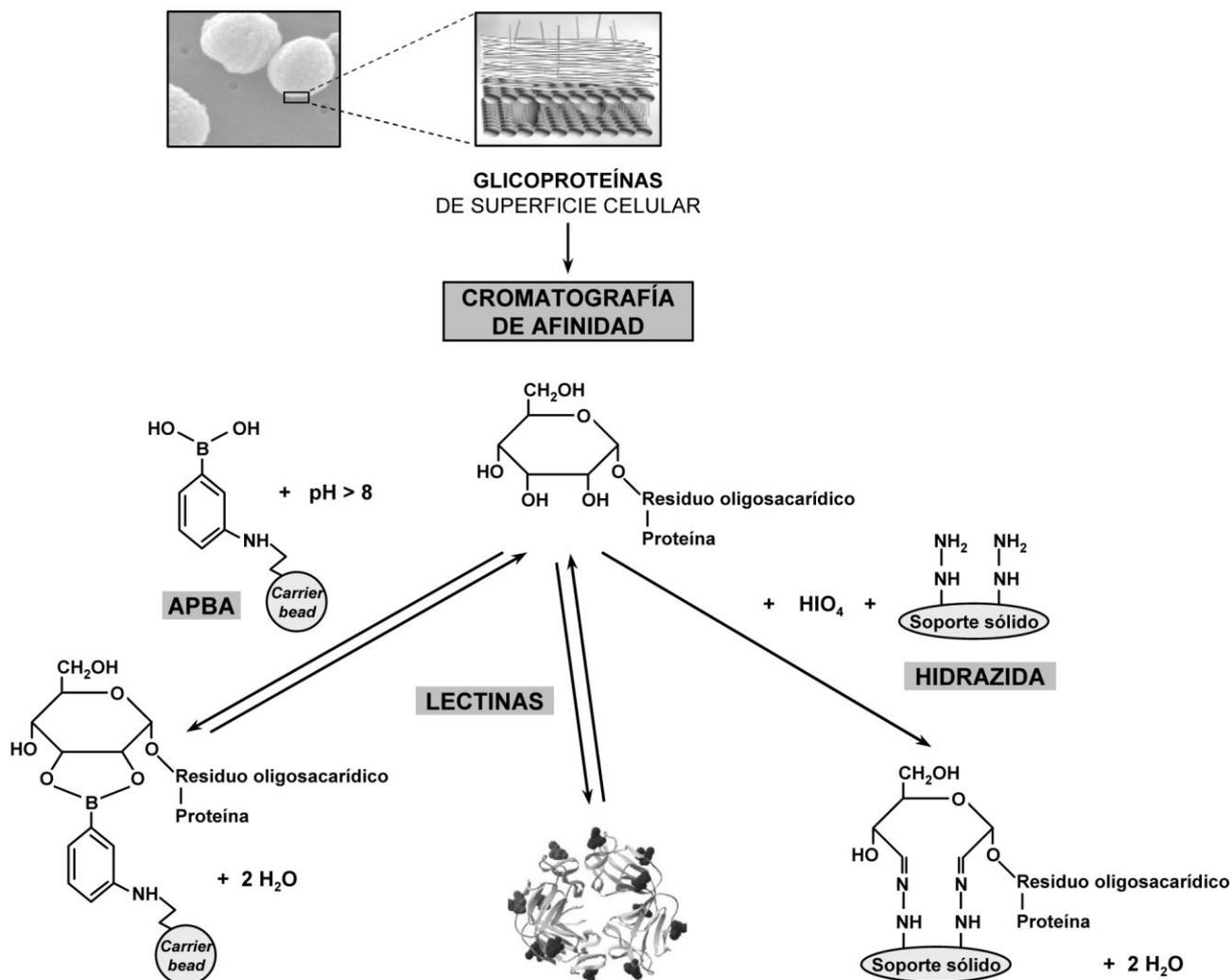


Figura 1. Diferentes aproximaciones para identificar glicoproteínas de superficie celular o secretadas al exterior en procariontes mediante cromatografía de afinidad. APBA, ácido aminofenilborónico.

Además, la eliminación del SDS en la segunda dimensión conllevó que en determinadas zonas del gel, apareciera el fenómeno de “lágrimas”. Sugirió que esto también podría estar ligado a la presencia de demasiado ADN como contaminante. Las pruebas fueron entonces encaminadas a resolver estos problemas.

2.3. Proteómica de hongos.

Tras la exposición de algunos de los principales escollos encontrados en la proteómica bacteriana, Francisco Javier Fernández Acero nos introdujo en el estudio proteómico de hongos fitopatógenos, especialmente el del hongo filamentoso *Botrytis cinerea*, indicando los problemas más relevantes que se pueden hallar. Destacó entre ellos (i) la

gran variabilidad analítica y biológica existente entre replicas independientes; (ii) la extracción de la relevancia biológica a partir de la gran información generada en estudios de abundancia diferencial (donde se forjan grandes listas de proteínas) sin aplicar un prisma sesgado, puesto que se puede correr el riesgo de perder la información relativa a otros procesos biológicos y/o funciones moleculares paralelos y posiblemente de gran importancia; (iii) la falta de bases de datos de proteínas para hongos filamentosos, a pesar de que en la actualidad se están concluyendo unos 25 proyectos de secuenciación de genomas fúngicos, y (iv) la dificultad de obtener extractos proteicos de hongos filamentosos, debido principalmente a las características fisicoquímicas de la pared celular (alto porcentaje de polisacáridos y elevada resistencia mecánica, entre otros).

Jose Antonio Reales Calderón nos mostró su trabajo sobre el análisis de abundancia diferencial de proteínas del citoesqueleto del macrófago tras su interacción con *Candida albicans*, el principal agente etiológico de las candidiasis humanas. Su estudio es de gran interés ya que la fagocitosis conlleva alteraciones substanciales en el citoesqueleto de actina, tubulina y miosina y de las proteínas asociadas a ellas. Jose Antonio nos presentó un método específico para extraer dicho subproteoma y los problemas asociados al mismo. Destacó entre ellos el aumento significativo de la cantidad de proteína tras la interacción en comparación con el control (Figura 2).

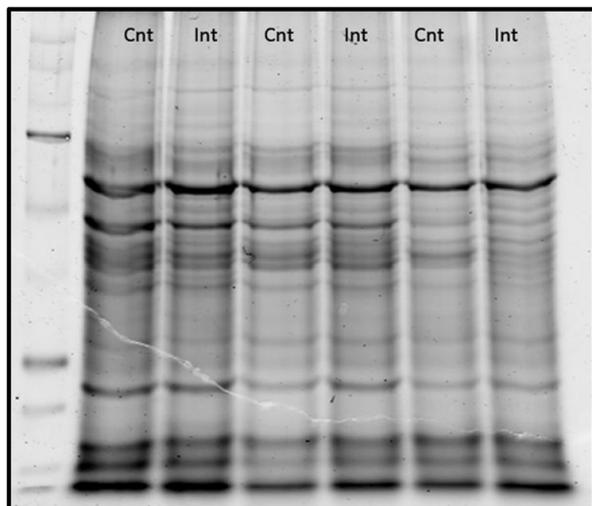


Figura 2. Gel de poliacrilamida de muestras enriquecidas en proteínas de citoesqueleto de macrófago. Cnt: macrófagos control; Int: macrófagos tras su interacción con el hongo *C.albican*.

Indicó que esta peculiaridad dificulta considerablemente la normalización de las muestras a analizar mediante la técnica cuantitativa sin gel “iTRAQ” (*isobaric tag for relative and absolute quantitation*), donde se iguala la concentración de las muestras antes de marcar. Nos planteó que si las muestras se igualasen de este modo, podría acarrear un problema serio, o al menos cierta incertidumbre, ya que se aumentaría las concentraciones de las proteínas de la muestra de macrófagos control, modificando los resultados del análisis de abundancia diferencial, y por tanto la fiabilidad y consistencia del experimento proteómico.

2.4. Proteómica de parásitos.

Virginia Marugán Hernández nos presentó varios problemas proteómicos relacionados con la identificación de proteínas de *Neospora caninum* implicadas en invasión y virulencia como posibles nuevas dianas diagnósticas y/o vacunales. *N.caninum*, un protozoo intracelular obligado, es el agente etiológico de la neosporosis bovina, una de las principales causas de fallo reproductivo (aborto) en el ganado bovino. Entre los problemas que planteó, asociados a la obtención de muestra, despuntan principalmente posibles contaminaciones: (i) con proteínas de la línea celular hospedadora en estudios de interacción parásito-hospedador; (ii) con proteínas de otras organelas en experimentos de fraccionamiento subcelular (para el estudio de organelas implicadas en invasión-proliferación) y (iii) con proteínas de diferentes estadios invasivos del parásito en el ganado bovino, el de taquizoíta (forma de la fase aguda de la infección y de rápida multiplicación) y el de bradizoíta (forma de persistencia, acantonamiento y evasión del sistema inmunitario) (Figura 3). Por otro lado, entre los problemas relacionados con la identificación de proteínas que expuso, destacan: (i) la dificultad de extrapolar manchas proteicas entre geles bidimensionales analíticos y preparativos o entre aquéllos que utilizan tiras de gradiente de pH inmovilizado de rango amplio y estrecho; (ii) el conflicto de determinar cuál es la relación que se debería establecer para considerar la abundancia de una proteína significativamente diferencial cuando se comparan distintas condiciones mediante 2D-DIGE y (iii) el problema asociado a las bases de datos cuyas anotaciones no son completas y que se van actualizando cada muy poco tiempo, modificándose en ciertas ocasiones las anotaciones previas.

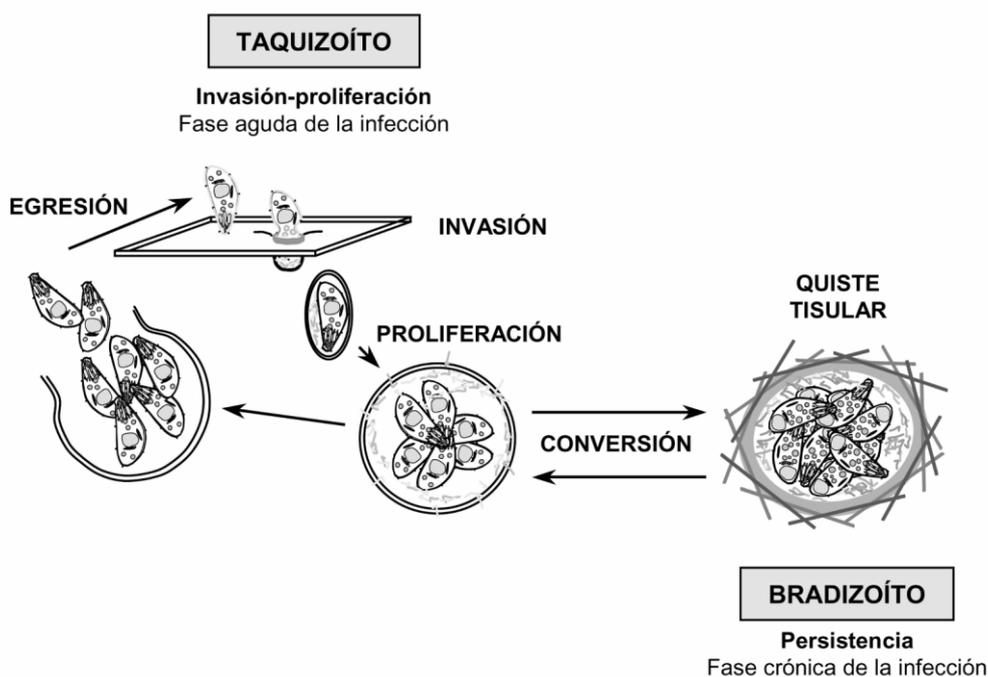


Figura 3. Diferentes estadios de invasión del protozoo *N.caninum* en el ganado bovino.

Javier González Miguel nos expuso su trabajo sobre el estudio de las relaciones parásito-hospedador en la dirofilariosis animal y humana. *Dirofilaria immitis* es un nematodo parásito causante de la dirofilariosis cardiopulmonar canina y felina y de la dirofilariosis pulmonar humana. Señala que la inmunoproteómica clásica (la combinación de electroforesis bidimensional, *western blot* y espectrometría de masas) es una herramienta muy útil para poder conocer las bases moleculares de los procesos patológicos que causa este parásito en cada uno de los hospedadores (Figura 4).

Señaló las siguientes ventajas de las técnicas empleadas: (i) proporcionan una amplia información en, relativamente, poco tiempo, (ii) son técnicas reproducibles y (iii) no han sido muy utilizadas en el campo de las filarias. Los inconvenientes o problemas que encuentra son: (i) poca información en las bases de datos sobre las proteínas de *D. immitis*, (ii) alto coste del proceso de identificación proteica por espectrometría de masas, y (iii) se genera una gran cantidad de información que precisa de mucho tiempo para ser correctamente relacionada.

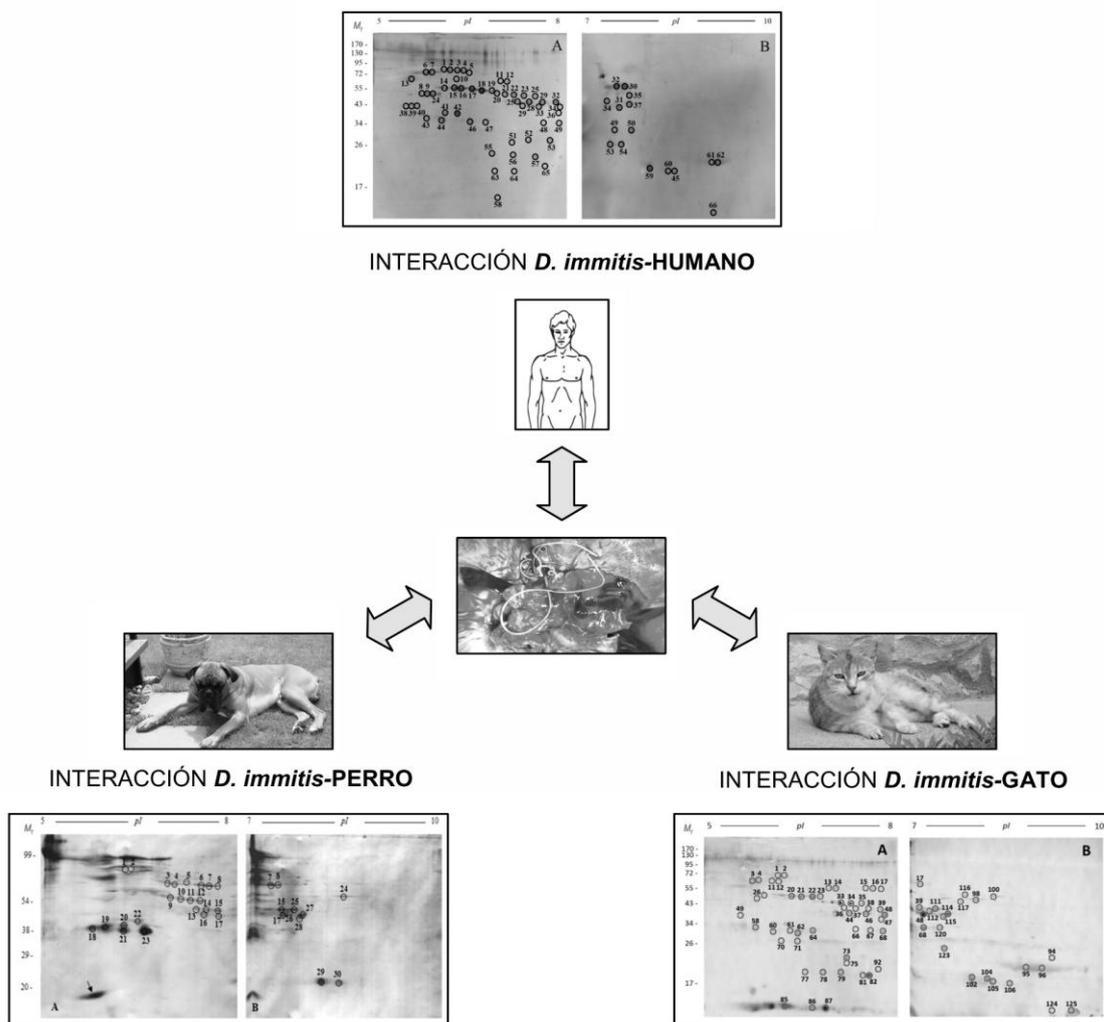


Figura 4. Distintos patrones bidimensionales de proteínas inmunogénicas del nematodo *D.immitis* reconocidos por sus diferentes hospedadores (perro, gato y ser humano).

3. ¿Qué posibles soluciones o sugerencias se han propuesto durante esta sesión?

En todas las comunicaciones que se han señalado anteriormente se propusieron soluciones o sugerencias durante nuestra sesión, bien por parte de los mismos ponentes o bien por parte de los más instruidos presentes en la misma, que a continuación se detallan brevemente y se recopilan en la Tabla 1.

3.1. Aspectos generales.

María Luz no quiso pecar de pesimista, aun a sabiendas que hay pocas estrategias que se están aplicando en la actualidad en el caso de disponer sólo de información parcial de MS y MS/MS. Nos señaló que en algunos casos pueden utilizarse herramientas químicas para la mejora de los espectros de MS/MS. En este contexto presentó como ejemplo el resultado de procesos de guanidación y sulfonación que logran aumentar la señal de los péptidos y mejorar los espectros de fragmentación obtenidos consiguiéndose una mejor asignación a secuencia, respectivamente (Figura 5).

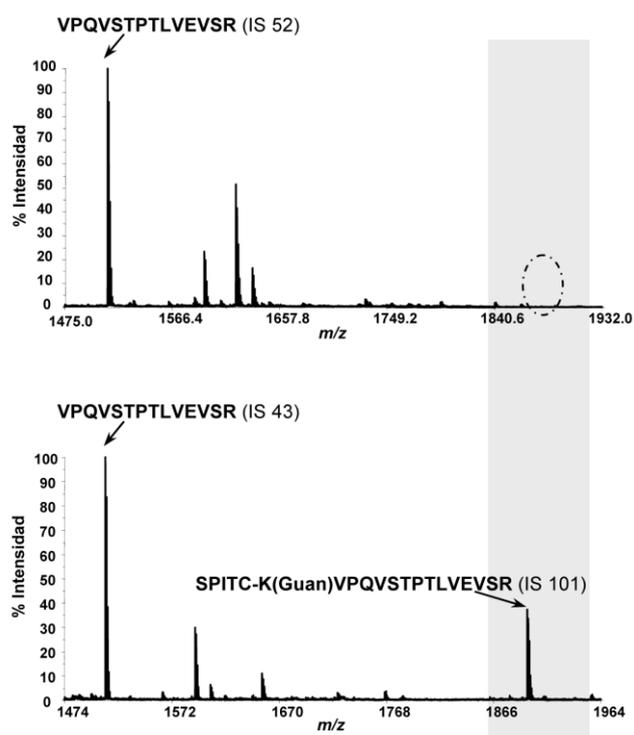


Figura 5. Herramientas químicas para la mejora de los espectros de masas (MS y MS/MS). Análisis MALDI-TOF/TOF (MS-MS/MS) de un digerido de BSA en condiciones estándar (arriba) y con guanidación y sulfonación (SPITC) (abajo). La guanidación de los residuos de lisina aumenta la intensidad de señal de estos péptidos. La sulfonación N-terminal de los péptidos mejora los espectros de fragmentación obtenidos, consiguiéndose una mejor asignación a secuencia.

Asimismo, y como posibles soluciones, también se están desarrollando herramientas bioinformáticas, citando como ejemplo la que presentó en las jornadas y que puede ayudar a traducir información de ESTs en secuencias aminoacídicas (<http://scsie.uv.es/bio/fastamgr>). Información acerca de dicha herramienta se le puede solicitar a ella misma (lvalero@cipf.es).

3.2. Proteómica de bacterias.

Alfonso respondió por sí mismo a algunos de los problemas por él planteados. Con respecto a la presencia de proteínas citoplasmáticas en las fracciones de elución de las cromatografías de afinidad, se lanzó la hipótesis de la competencia con otros azúcares (libres o asociados a otras estructuras) de la misma muestra, por lo que se sugirió la conveniencia de eliminarlos. Para ello, se pueden usar métodos de diálisis o ultrafiltración.

Con respecto a la aproximación basada en geles, la gran cantidad de ADN presente en muestras bacterianas suele dificultar una óptima focalización de las muestras en electroforesis bidimensional, por lo que se sugirió la eliminación de dicho material. Una forma simple es precipitar con ácido tricloroacético o con kits comerciales de limpieza de muestras, pero la pérdida de proteínas es importante. Otra forma consiste en la digestión del ADN con nucleasas, un método cómodo y rápido, pero que requiere la obtención de la muestra en un tampón no desnaturante. Otra forma puede consistir en precipitar selectivamente el ADN, por ejemplo con espermina. Pero ésta, al ser una poliamina, por tanto con carga, sería incompatible para la separación mediante isoelectroenfoque, por lo que habría que eliminarla previamente (por ejemplo, dializando o ultrafiltrando muy bien), añadiendo por consiguiente un paso adicional en el proceso.

Mario planteó las siguientes soluciones al problema de la menor calidad del enfoque en determinadas zonas de los geles, principalmente en la de pH básico: empapar los trocitos de papel que se colocan sobre los electrodos (en el lado básico) en tampón urea/tiourea; por otro lado, para mejorar el enfoque en la zona básica, usar DeStreak como agente reductor en el isoelectroenfoque (Figura 6). Para contribuir a reducir la cantidad de ADN en la muestra, propuso aumentar la intensidad y el tiempo en la sonicación cuando se lleva a cabo la rotura mecánica de las células para la extracción de las proteínas. Con todo esto, logró aumentar la calidad de los geles y por tanto el número de proteínas bien enfocadas en geles bidimensionales en los que el intervalo de pH de la primera dimensión fue de 3 a 10. Tras llevar a cabo un análisis DIGE entre la estirpe de referencia ATCC 13637 y el aislado clínico M30, logró determinar diferencias a nivel de abundancia de proteínas, concluyendo que la proteómica puede ser útil para la diferenciación de estirpes bacterianas. En su grupo, han obtenido los mutantes para algunas de las proteínas identificadas que se expresan diferencialmente, y están llevando a cabo la caracterización de dichos mutantes.

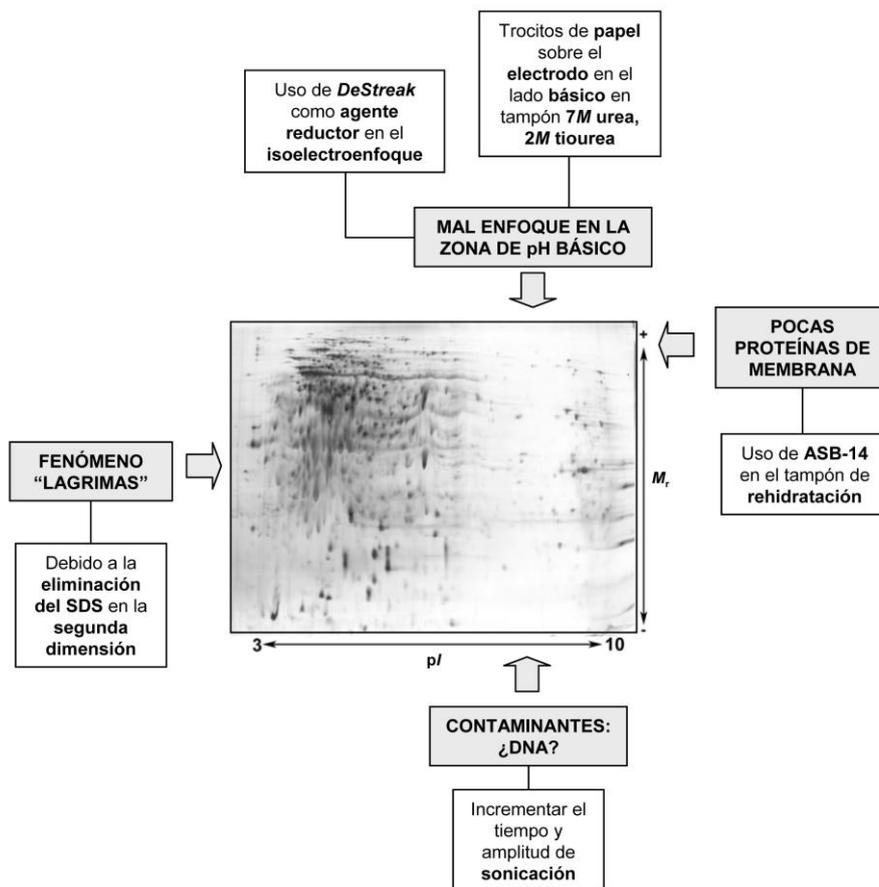


Figura 6. Posibles soluciones y/o propuestas para la mejora de la resolución de los geles bidimensionales.

3.3. Proteómica de hongos.

Francisco Javier propuso algunas soluciones a los problemas que presentó. Sugirió que para disminuir la variabilidad analítica y biológica entre replicas independientes se podrían usar protocolos y/o técnicas microbiológicas más reproducibles así como cepas monoconidiales y/o de la misma generación, entre otras. También se planteó posteriormente, como un posible recurso, la transformación raíz cúbica de los datos para disminuir la variabilidad entre las intensidades obtenidas con manchas proteicas de gran

tamaño. Respecto a la relevancia biológica de las proteínas identificadas en estudios proteómicos, Francisco Javier nos comentó que PANTHER (“Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships”, disponible en www.pantherdb.org) es una herramienta útil para clasificarlas en función de los procesos biológicos y funciones moleculares en las que están implicadas siguiendo las anotaciones de “Gene Ontology” (Figura 7). Además indicó que existen algunos algoritmos disponibles para identificar posibles dianas terapéuticas a partir de estos datos proteómicos.

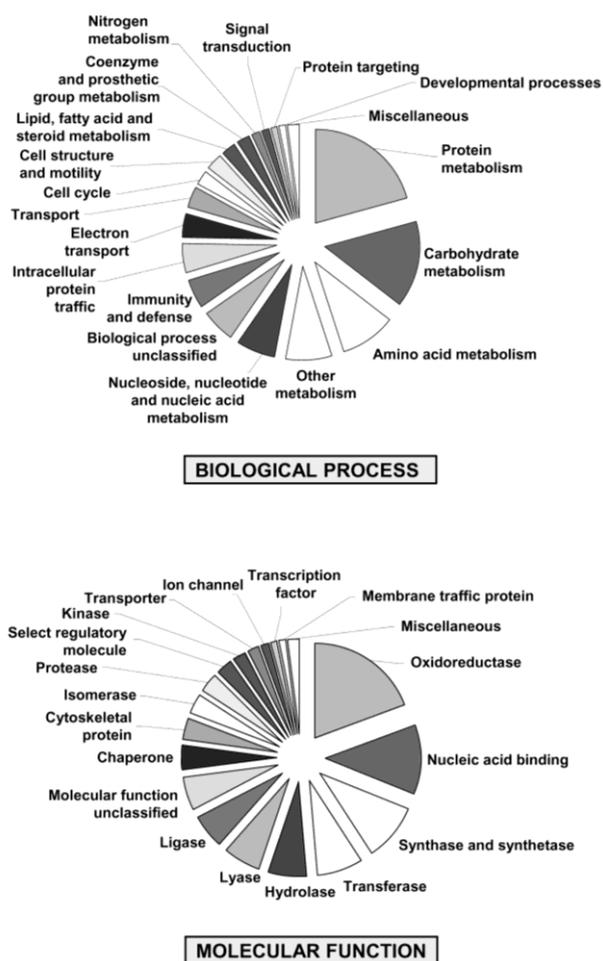


Figura 7. Extracción de relevancia biológica de una lista de proteínas en base a las anotaciones de “Gene Ontology”.

El problema, o más bien el rompecabezas, que planteó Jose Antonio recibió, como era de esperar, una respuesta activa y esmerada por parte de los más versados presentes en la sesión, creando una gran polémica al florecer dos tendencias bastante diferenciadas. Una de éstas se basó principalmente en igualar el número de células de partida en todos los casos y resuspender en el mismo volumen final antes de marcar con los reactivos de iTRAQ. En cambio, la otra se decantó en igualar la concentración de las muestras antes de marcar, como es propio de dicha técnica. Ante esta dualidad y sin llegar a un consenso definitivo, se comentó finalmente que para determinar cuál de ellas era más viable, se debería abordar el problema con ambas opciones, y decidir posteriormente con los resultados obtenidos la fiabilidad de ambas.

3.4. Proteómica de parásitos.

Respecto a los problemas que expuso Virginia, se indicó que para eliminar posibles contaminaciones con proteínas propias de las células hospedadoras se podían emplear columnas desaladoras. Este abordaje da buenos resultados, ya que se identifican muy pocas proteínas de la línea hospedadora. También se señaló que los gradientes de sacarosa seguidos de ultracentrifugación son una buena herramienta para el enriquecimiento de organelas, pero que son necesarios poner a punto otros protocolos de fraccionamiento así como realizar apropiados estudios de validación de los subproteomas obtenidos. Aunque se propuso desarrollar una nueva metodología para aislar o purificar los bradizoítos de los taquizoítos de *N.caninum*, también se barajó la posibilidad de trabajar con mezclas de zoítos y comparar el (sub)proteoma de éstas con el de los taquizoítos solos. En cuanto a los problemas en la identificación de proteínas difíciles de extrapolar entre geles, se sugirió que se deberían identificar solamente aquéllas que fuesen seguras o, más bien, optimizar la técnica. También se insinuó que se debería utilizar una relación constante con significado biológico para comparar abundancia proteica mediante la técnica de 2D-DIGE con el fin de alcanzar resultados consistentes. Por último, se apuntó que se debería revisar cada cierto tiempo las identificaciones llevadas a cabo con bases de datos cuyas anotaciones no son completas, con el objetivo de determinar si se han variado las anotaciones previas debido a la actualización de las mismas.

En relación con los problemas que señaló Javier se le comentó que parte de ellos son problemas inherentes a la propia técnica. Con respecto a la escasez de información en las bases de datos (tema abordado por María Luz), se volvió a matizar que es un problema muy común en los parásitos ya que la mayor parte de sus genomas no están secuenciados. Otro aspecto que se comentó es que la información se genera a una gran velocidad, pero sin embargo la capacidad para organizarla es mucho más lenta. Puede estar dispersa por lo que es importante seleccionar adecuadamente las bases de datos en las que se vuelcan los resultados.

4. Una sesión innovadora pero susceptible de mejoras.

Aunque durante el transcurso de nuestra sesión se abordaron varios problemas proteómicos y posibles soluciones que podrían ser de interés para cualquier joven (o no tan joven) investigador, una apuesta un tanto innovadora en este tipo de jornadas, siempre este tipo de eventos es susceptible, sin lugar a dudas, de mejoras. Algo que se podría enmendar para futuros eventos sería disponer de más tiempo para que se pudiesen dar más propuestas a los problemas que se presenten, lo cual previsiblemente haría aún más dinámica, útil y práctica la sesión. Nuevos formatos no tendrían sentido si no se promoviese el debate así como la búsqueda de nuevas ideas o soluciones a los problemas proteómicos que se pudiesen

plantear, que al fin y al cabo, son a los que los jóvenes investigadores (a quienes van principalmente, pero no únicamente, dirigidas estas jornadas) se enfrentan día a día en su jornada de trabajo.

Agradecimientos.

Nuestra especial gratitud a Thermo Scientific y al jurado por otorgarnos el premio a la mejor sesión de estas II Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica. También agradecemos a los 23 jóvenes investigadores que participaron en nuestra sesión, en especial a aquéllos que tuvieron la valentía de presentar sus problemas proteómicos durante esta sesión (M.L. Valero, A. Olaya, M. Ferrer Navarro, F.J. Fernández Acero, J.A. Reales Calderón, V. Marugán Hernández y J. González Miguel), así como a todos los que estuvieron presentes en la misma por aportar soluciones y sugerencias, o al menos debatir los problemas que se presentaron. Además extendemos nuestra gratitud a estos siete ponentes por proporcionarnos material para la elaboración de las figuras de la presente comunicación. Por último, pero no por eso menos importante, también expresamos nuestro más sincero agradecimiento a las organizadoras de estas jornadas, A.M. Maldonado Alconada, S. Echevarría Zomeño, R. González Fernández e I. Redondo, por su excelente labor realizada, así como a J. Vázquez, el catalizador de dicho evento.