

Explorando algunas técnicas proteómicas: Western blot, Dot blot y electroforesis bidimensional complementada con espectrometría de masas

Exploration of some proteomic techniques: Western blot, Dot blot and two-dimensional electrophoresis, complemented by mass spectrometry

Ambar López-Macay,* Delina Montes-Sánchez,† Juana Narváez-Morales,§
Martín Salas-Paniagua,¶ Silvia Barrios-Aguilar,|| Yessica Zamudio-Cuevas,*
Javier Fernández-Torres,* Karina Martínez*

Palabras clave:

proteína, Western blot, Dot blot, electroforesis bidimensional, inmunodetección, semicuantitativa.

Keywords:

protein, Western blot, Dot blot, two-dimensional electrophoresis, immunodetection, semiquantitative.

Resumen

El desarrollo de la proteómica en la biomedicina es crucial, ya que las proteínas son clave en funciones celulares, convirtiéndolas en moléculas indispensables en la investigación para lograr entender su papel biológico. Para ello, es necesario considerar tanto sus propiedades bioquímicas, como electrofísicas, para lograr su separación y determinación. Para estudiar la expresión proteica se realizan técnicas como Western blot (WB), Dot blot (DB) y electroforesis bidimensional, que permiten identificar su expresión, su intensidad y modificaciones postraduccionales importantes durante la actividad biológica. El WB se basa en la separación de proteínas de acuerdo con su carga y peso molecular (PM), y posterior transferencia a una membrana sólida para que un anticuerpo específico reconozca a la proteína de interés. Para el DB, no se requiere de una separación electroforética, sino que se colocan las muestras directamente sobre una membrana para estimar semicuantitativamente la concentración de proteína. Por último, está la electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE), que es capaz de separar más de 1,500 proteínas de una sola muestra de manera simultánea, además permite combinarla con diversos colorantes y otras técnicas como espectrometría de masas. Es importante señalar que estos métodos, además requieren medios particulares para identificar las proteínas de interés, como un marcador de PM, tinciones o anticuerpos acoplados a enzimas o fluoróforos. La aplicación de las técnicas proteómicas va desde el área de investigación básica, hasta la clínica, con el fin de detectar nuevos biomarcadores de interés biomédico. El objetivo de esta revisión es brindar un panorama general del fundamento de estas técnicas.

Abstract

The development of proteomics in biomedicine is crucial because proteins are key to cellular functions, making them essential molecules in research to understand their biological role. To do this, it is necessary to consider both their biochemical and electrophysical properties in order to achieve their separation and determination. To study the expression of proteins, techniques such as Western blot (WB), Dot blot (DB)

Citar como: López-Macay A, Montes-Sánchez D, Narváez-Morales J, Salas-Paniagua M, Barrios-Aguilar S et al. Explorando algunas técnicas proteómicas: Western blot, Dot blot y electroforesis bidimensional complementada con espectrometría de masas. Invest Discapacidad. 2024; 10 (3): 187-202. <https://dx.doi.org/00.00000/00000>

* Laboratorio de Líquido Sinovial, Instituto Nacional de Rehabilitación «Luis Guillermo Ibarra Ibarra».

† Laboratorio de Investigación Biomédica Básica en Estomatología, Licenciatura en Estomatología, Complejo Regional Sur, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

§ Laboratorio de Toxicología Renal, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional.



† Coordinación de la Licenciatura en Estomatología, Complejo Regional Sur, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

‡ Licenciatura en Biología, Universidad Autónoma de Sinaloa.

Correspondencia:

Karina Martínez

E-mail: karinabiologist@hotmail.com

Recibido: 8 de mayo de 2024

Aceptado: 30 de junio de 2024

and two-dimensional electrophoresis are used to identify their expression, intensity and important post-translational modifications during biological activity. WB is based on the separation of proteins according to their charge and molecular weight (MW) and their subsequent transfer to a solid membrane so that a specific antibody recognizes the protein of interest. DB does not require electrophoretic separation, but samples are applied directly to a membrane to provide a semiquantitative estimate of protein concentration. Finally, there is two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE), which can simultaneously separate more than 1,500 proteins from a single sample and can also be combined with different dyes and other techniques such as mass spectrometry (MS). It is important to note that these methods also require specific means of identifying the proteins of interest, such as a PM marker, stains or antibodies coupled to enzymes or fluorophores. The application of proteomic techniques ranges from basic research to the clinic, with the aim of discovering new biomarkers of biomedical interest. The aim of this review is to provide an overview of the rationale behind these techniques.

Abreviaturas:

2D-PAGE = electroforesis en gel bidimensional
 BCA = ensayo de ácido bicinonínico
 BCTA = bromuro de cetiltrimetilamonio
 DB = Dot blot
 DTT = ditioneitol
 HRP = peroxidasa de rábano
 MS = espectrometría de masas
 pI = punto isoeléctrico
 PM = peso molecular
 PVDF = polifluoruro de vinilideno
 RIPA = radioinmunoprecipitación
 SDS-PAGE = electroforesis en dodecilsulfato de sodio
 TEMED = tetrametiletilendiamina
 UV = ultravioleta
 WB = Western blot

INTRODUCCIÓN

Las proteínas son moléculas cruciales para los organismos, ya que son las efectoras del trabajo celular. Sus perfiles de expresión o cambios en los mismos, bajo determinadas condiciones fisiológicas o patológicas, permiten entender las interacciones que establecen en una célula. Así surge la definición de proteoma como el conjunto completo de proteínas expresadas en un organismo, considerando todas las proteínas funcionales que una célula puede producir a partir de su genoma. El análisis sistemático de las proteínas expresadas se denomina proteómica, que incluye la interacción entre proteínas, modificaciones postraduccionales, funciones y localización.

En la actualidad, se han adoptado diversos enfoques para evaluar proteomas, al menos a nivel de composición. Sin embargo, algunos enfoques están limitados, ya que sólo evalúan modificaciones postraduccionales como fosforilaciones, acetilaciones o glicosilaciones. Por ello, hoy en día se emplean diversas técnicas como Western blot (WB), Dot blot (DB) y electroforesis en gel bidimensional (2D-PAGE) para identificar y caracterizar diversos microorganismos, tanto patógenos como no patógenos. Esto

permite entender los mecanismos fisiológicos, como la diferenciación celular, y patológicos, facilitando el descubrimiento de biomarcadores de enfermedades como el cáncer, el desarrollo de fármacos, el control de pureza, la purificación de proteínas a microescala y la caracterización de productos.¹⁻³

WB y DB son técnicas que permiten identificar componentes de mezclas complejas en una gran variedad de muestras, implicando la transferencia de las proteínas a una membrana para que, con el uso de anticuerpos, se logren identificar antígenos específicos de las proteínas de interés. La 2D-PAGE acoplada a espectrometría de masas (MS) se considera el estándar de oro para un análisis más detallado de la abundancia de las proteínas reguladas diferencialmente. La 2D-PAGE utiliza la separación, detección y cuantificación relativa de especies de proteínas, mientras que la MS proporciona información sobre las secuencias de péptidos, que se organizan de acuerdo con procedimientos bioinformáticos para identificar las especies de proteínas representadas diferencialmente.^{3,4} Así, los estudios de proteómica proporcionan una representación dinámica de especies de proteínas, ya sea sobreexpresadas o disminuidas, así como una comprensión de diversas señalizaciones moleculares y reacciones bioquímicas que ocurren en las células.^{4,5} Estos análisis proteómicos son de gran utilidad en estudios que evalúan procesos de señalización, así como en el diagnóstico sérico de la presencia del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) y en la evaluación de la respuesta de fármacos en células tumorales. Además, permiten un análisis detallado de bacterias como *Helicobacter pylori*, creando una base de datos clínicamente relevante en enfermedades gástricas como la gastritis crónica o la úlcera abdominal, y apoyan en el diagnóstico clínico de enfermedades parasitarias y fúngicas, incluyendo la equinococosis, toxoplasmosis y aspergilosis.⁶

WESTERN BLOT

La técnica de Western blot (WB) fue introducida por Towbin en 1979 y desde entonces es la técnica más común empleada en los laboratorios que realizan inmunodetección y cuantificación de proteínas en homogenados celulares complejos.^{7,8} Esta técnica se caracteriza por detectar cambios postraduccionales de las proteínas y los resultados que brinda son semicuantitativos.^{8,9} Además, comprende varios pasos que implican la extracción de las proteínas a través de lisados de tejido o células; la separación de proteínas por tamaño a partir de un gel de poliacrilamida mediante electroforesis en dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, por siglas en inglés); la posterior transferencia a membranas de nitrocelulosa y polifluoruro de vinilideno (PVDF); seguido del bloqueo de membrana para evitar que el anticuerpo se una a sitios inespecíficos y por último la incubación con anticuerpos específicos para su posterior detección mediante colorimetría, quimioluminiscencia o fluorescencia, que refleja la unión del antígeno con el anticuerpo, seguido de la evaluación densitométrica de bandas empleando un *software* (Figura 1).⁹

Cabe señalar que en las últimas tres décadas se han desarrollado medios y sistemas que proporcionan imágenes de mejor calidad brindando una detección y cuantificación precisa y exacta de proteínas de baja y alta expresión.⁸ Vale la pena mencionar que las proteínas pueden variar significativamente su expresión, estabilidad y conformación, bajo diferentes condiciones experimentales y amortiguadores de extracción; por tal razón, es importante que se manejen de manera cuidadosa para evitar la contaminación del homogenado. Además, controlar diferentes variables como el tiempo, temperatura de incubación, recolección y mantenimiento de las muestras, y por supuesto, el diseño del ensayo, para garantizar plenamente las diferencias entre los casos y los controles.^{8,9}

Extracción proteica

La preparación de la muestra es un factor importante para obtener resultados confiables, es por ello que, en la extracción de proteínas totales, es fundamental conocer el tipo de amortiguador que se puede emplear para evitar obtener lisados inespecíficos de restos celulares o tisulares, grasas, agregados hidrofóbicos

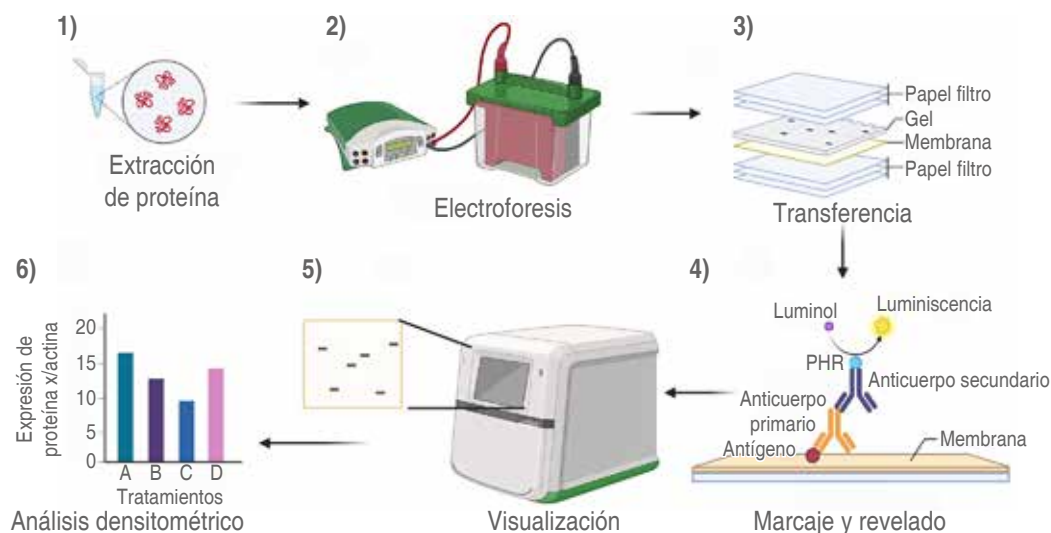


Figura 1: Etapas de la técnica de Western blot. **1)** Extracción de proteína total a partir células o tejidos. **2)** Separación de proteínas a través de electroforesis de acuerdo con su peso molecular (2D-PAGE). **3)** Transferencia de proteínas del gel de poliacrilamida a una membrana ya sea nitrocelulosa o PVDF. **4)** Marcaje con los anticuerpos primarios específicos y anticuerpos secundarios acoplados a enzimas para su revelado incubando con un sustrato (luminol). **5)** La visualización de la reacción química en la membrana se realiza a través de un equipo de fotodocumentación o una placa radiográfica. **6)** Realizar un análisis densitométrico, que toma en cuenta el número de píxeles de las bandas de interés graficándolo como la expresión de la proteína.

de proteínas, ácidos nucleicos y proteasas que puedan afectar de forma negativa este proceso.^{8,9}

El amortiguador de lisis debe facilitar la solubilización adecuada de las proteínas y prevenir la degradación proteolítica para obtener altas cantidades de proteínas blanco.⁶ Se ha indicado que la calidad de la proteína detectada depende del protocolo de preparación, por ejemplo, algunos amortiguadores de lisis dan como resultado una extracción incompleta de ciertas proteínas como las de membrana, las subunidades del proteasoma y las proteínas ribosómicas. Los tejidos son más complejos que las células cultivadas, ya que requieren más disgregación mecánica que las células cultivadas.¹⁰

Para lograr un rendimiento mayor de proteínas que se expresan en bajos niveles, se realiza una sonicación adicional de las muestras para alterar las membranas celulares. La sonicación emplea ondas sonoras de alta frecuencia creadas por una onda que se agranda y contrae rápidamente a altas frecuencias. Estas ondas sonoras pueden alterar la mayoría de las células y tejidos sólidos en segundos, ya que generan una gran cantidad de calor, por lo cual es importante que este procedimiento se lleve a cabo en frío y usando varias ráfagas cortas de 10 a 30 segundos.⁶

En cuanto a los amortiguadores de lisis, éstos varían en su composición de acuerdo con su capacidad de solubilizar proteínas, teniendo efectos sobre la calidad de las proteínas y sitios de reconocimiento antigénico; de esta manera, deben de mantener a las proteínas en su forma funcional y activa para su análisis posterior.⁶

Los amortiguadores de lisis contienen sales para equilibrar la acidez/alcalinidad u osmolaridad del lisado; además, contienen detergentes para disolver la membrana celular y con ello las proteínas que se encuentran adentro de la célula. Cabe señalar que estas proteínas son hidrofóbicas, es decir, no se disuelven en agua, de tal manera que son difíciles de solubilizar. Hoy en día existen diferentes amortiguadores de lisis comerciales; sin embargo, es importante considerar si un amortiguador de lisis específico es el correcto para obtener las proteínas de interés de las células o los tejidos, en especial cuando se usa un agente desnaturizante y el detergente adecuado como el SDS-PAGE, el desoxicolato o bromuro de cetiltrimetilamonio (BCTA). Este tipo de detergentes tienen la capacidad de desnaturizar las proteínas a diferencia de los detergentes no-iónicos o zwitteriónicos como el Tritón X-100 que lisan sin llegar a la descomposición de complejos

proteicos. Otro detergente zwitteriónico de interés es el 3 [(3 colamidopropil) dimetilamonio]-1 propano-sulfonato, el cual no afecta la carga neta o la carga de la proteína solubilizada.¹⁰⁻¹²

Uno de los amortiguadores más utilizados por su eficacia para solubilizar proteínas es el del ensayo de radioinmunoprecipitación (RIPA), el cual ha sido ampliamente empleado para la extracción de proteínas de varios tejidos, incluyendo el músculo liso uterino, para detectar proteínas de choque térmico (HSPs, por sus siglas en inglés), cuyo tamaño varía de 12 a 43 kDa. Otro amortiguador reportado para la extracción de la proteína de choque térmico HSPB6 de músculo liso, está hecho de urea/tiourea. De esta manera, las condiciones de mayor eficacia para comprobar la utilidad de la lisis con RIPA o con urea/tiourea para la extracción de proteínas son: RIPA con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, NaCl 150 mM, Tritón X-100 a 1%, desoxicolato de sodio a 0.5%, SDS-PAGE a 0.1%, EDTA 5 mM e inhibidores comerciales de proteasas y fosfatasa. El amortiguador no utilizado debe congelarse a -20°C para uso futuro; como ocurre con casi todos los amortiguadores de lisis, además deben estar perfectamente disueltos los componentes en el tampón antes de su uso, ya que el almacenamiento en el congelador puede provocar la precipitación de algunos componentes como el SDS-PAGE. Es importante señalar que debe emplearse el SDS-PAGE de un solo fabricante, ya que el patrón de migración de las proteínas puede cambiar.¹¹

En relación al amortiguador de urea/tiourea, este contiene urea 7M, tiourea 2M y CHAPS (p/v) en Tris-HCl 30 mM (pH 8.5) e inhibidores de proteasa libre de EDTA e inhibidor de fosfatasa comercial; posteriormente, se almacena el amortiguador en porciones de 1 mL a -80°C . Es recomendable prepararlo en el momento que vaya a emplearse. Una consideración importante es que una vez que el amortiguador se ha descongelado, no se debe volver a congelar.^{11,12}

Quantificación proteica

Una vez que se obtiene el lisado celular, es importante determinar la concentración de proteínas para asegurar una carga homogénea en cada pozo de un gel, y así lograr comparar los tratamientos con respecto a un grupo control. Los métodos de cuantificación de proteínas empleados son: Bradford, el ensayo de ácido bicinconónico (BCA, por sus siglas en inglés) el de Lowry y por espectrofotometría UV. La selección de estos métodos se basa en su capacidad para de-

tecar la concentración de proteína, la presencia de componentes interferentes en la muestra, el tiempo y la facilidad de realización, así como su compatibilidad con técnicas de análisis posteriores.¹¹

Espectrofotometría UV

La espectrofotometría ultravioleta (UV) es el método más común y simple para determinar la concentración de proteínas, a través de la absorbancia de la solución de las proteínas en un rango de UV, específicamente a una longitud de onda de 280 nm. La mayoría de los aminoácidos, excepto la prolina, tienen una cadena lateral específica. Los aminoácidos tirosina, fenilalanina y triptófano tienen cadenas laterales aromáticas, las cuales tienen una fuerte propiedad de absorción en el rango UV. Como resultado, las proteínas y los péptidos absorben la luz UV en función de las cantidades de estos aminoácidos específicos.¹¹

Métodos colorimétricos

Los ensayos que emplean colorantes para la determinación de proteínas, reaccionan con las aminas primarias, es decir, con el extremo N y la cadena lateral de los residuos de lisina de las proteínas que da un color púrpura. Se han desarrollado varios reactivos que interactúan con las proteínas para generar un color que es medido en la longitud de onda de luz adecuada. La reacción del colorante con la solución de proteína será proporcional a la cantidad de proteína y eso se determina al compararla con una curva estándar que tiene concentraciones conocidas de una proteína de referencia purificada.¹¹

El primer método consiste en la reacción de proteínas con iones de Cu^{2+} en un medio alcalino en presencia de un agente que detecta iones Cu^+ con una alta sensibilidad, conocido como BCA. Se ha informado que la estructura molecular de la proteína y tres péptidos específicos (cisteína, triptófano y tirosina) son responsables del cambio de color en las muestras a un tono púrpura que se puede detectar a una longitud de onda de 562 nm. El método de Lowry se caracteriza por el uso del reactivo de Folin-Ciocalteu y cobre y se detecta en una longitud de onda de 750 nm. Sin embargo, sustancias comunes como K^+ , Mg^{2+} , NH_4^+ , EDTA, Tris, carbohidratos y agentes reductores, obstaculizan el método.^{11,12} Otro método colorimétrico es el de Bradford, el cual es rápido y muy sensible, ya que se basa en el cambio de absorbancia máxima del colorante de azul

Coomassie brillante G250 de 465 a 595 nm después de unirse a proteínas desnaturalizadas.^{12,13}

Preparación de la muestra y electroforesis

Una vez que se ha cuantificado la proteína se procede a su desnaturalización, casi siempre la electroforesis de las proteínas se realiza en condiciones desnaturalizantes para asegurar su disociación en polipéptidos individuales y reducir la agregación para ello, se utiliza un tratamiento térmico en un rango de temperatura entre 70 a 95 °C y un amortiguador de carga que proporciona peso, densidad y color a la muestra para permitir que la muestra se cargue en el pozo y evitar cualquier fuga. Este amortiguador de carga contiene 62.5 mm de Tris-HCl a un pH de 6.8, 2% SDS-PAGE, 10% glicerol, 100 mm de ditioneitol (DTT) y 0.01% azul de bromofenol. Entre estos componentes, el DTT o el β -mercaptoetanol se consideran agentes reductores porque rompen los enlaces de disulfuro. Por otro lado, el SDS-PAGE permite la desnaturalización de las proteínas en una estructura primaria y las cubre con una carga negativa, lo que favorece la separación de las proteínas en función de su peso molecular (PM). Además, es importante resaltar que las condiciones de reducción y desnaturalización permiten que el anticuerpo se una al sitio específico de la proteína de interés.^{11,12,14} Una vez desnaturalizadas las proteínas a polipéptidos, éstos se unen a las moléculas de SDS-PAGE, independientemente de su secuencia, pero proporcionalmente a su PM, quedando cargados negativamente, facilitando la migración hacia el ánodo al aplicarle voltaje. La migración en el gel dependerá de su tamaño, las proteínas más pequeñas viajan con mayor facilidad y velocidad que las más grandes.¹⁴

Frecuentemente la electroforesis se realiza en un sistema de amortiguador discontinuo, el cual fue introducido en 1970 por Laemmli.¹⁵ Se caracteriza por emplear dos tipos de geles elaborados con amortiguadores de diferente fuerza iónica; un gel concentrador elaborado con el amortiguador de Tris-HCl 0.5M, pH 6.8 y acrilamida a 4%, que concentra la muestra evitando la movilidad de los complejos del péptido con el SDS-PAGE a su propia velocidad, hasta que migren al gel separador elaborado con Tris-HCl 1.5M, pH 8.8, donde el porcentaje de acrilamida varía de 10 a 20% para que las muestras se separen de acuerdo con su tamaño. El poro pequeño es óptimo para separar las proteínas de bajo PM (menos de 50 kDa), para proteínas de mayor PM (superior a 100 kDa)

se recomiendan geles de poro más grande, es decir, con un porcentaje de acrilamida < 10%. Además, es importante señalar que para la elaboración de los geles se requiere la adición de persulfato de amonio y tetrametiletilendiamina (TEMED), la cual genera radicales libres que aceleran la polimerización de la acrilamida.^{12,14,15}

Transferencia y membranas de nitrocelulosa y PVDF

Una vez separadas las proteínas, se transfieren a un soporte sólido utilizando el mismo principio de SDS-PAGE, en donde las proteínas cargadas negativamente en el gel se transfieren a la membrana al aplicarle una corriente eléctrica lateral. Sin embargo, a partir de ese principio, se han descrito diversos métodos como es el de la electroelución en el que se incluyen la transferencia húmeda y semiseca.^{16,17} Es importante señalar que los dos sistemas de transferencia se caracterizan por el contacto directo entre el gel y la membrana para asegurar una imagen de espejo. Sin embargo, en el sistema húmedo se requiere mayor volumen de amortiguador de transferencia y una exposición más prolongada a temperaturas más bajas (2-12 horas a 4 °C) para reducir el calor producido por los electrodos, esto se logra envolviendo en bolsas de hielo el tanque o colocándolo en una habitación fría. En contraste, el sistema semiseco se realiza en menor tiempo (7-30 min a temperatura ambiente) y con menor volumen de amortiguador, ya que se cambiaron los soportes de plástico por planchas o electrodos metálicos. Este sistema es especialmente adecuado para las proteínas de un peso < 10 a > 55 kDa en contraste al sistema húmedo, que es ideal para proteína de un peso > 100 kDa.^{12,16-18}

En ambos sistemas de transferencia se recomienda el uso de diferentes amortiguadores, como el de Tris-glicina en un rango de varias concentraciones a un pH de 8.3-9.2 y SDS-PAGE (0.025-0.1%), con o sin metanol al 20%, amortiguador de bicarbonato a un pH de 9.9, SDS-PAGE (0.025-0.1%) y TBE 1x (Tris-borato 90 mm, EDTA 1 mm). El amortiguador de Tris-glicina, pH 8.3, contiene SDS-PAGE a 0.1% con metanol a 20%, es el amortiguador empleado con más frecuencia y denominado como amortiguador de Towbin. Una consideración importante es que el metanol cumple dos funciones principales: desencadenar la disociación de SDS-PAGE a la proteína, y mejorar drásticamente la adsorción de proteínas en las membranas en presencia de SDS-PAGE.^{12,18} Es relevante señalar que una transferencia efectiva de proteínas depende en gran

medida del porcentaje de acrilamida en el gel, PM de las proteínas y el tipo de membrana empleada.¹⁷

Las proteínas normalmente se transfieren a membranas de nitrocelulosa o disulfuro de polivinilo PVDF, para ser detectadas mediante técnicas colorimétricas, de quimioluminiscencia o fluorescencia.¹¹ Las características en común de estas membranas son su alta capacidad de unión a las proteínas transferidas, que pueden almacenarse a corto y largo plazo, y que presentan poca interferencia.^{17,19} Sin embargo, se ha comparado la capacidad de ambas membranas, encontrando que el porcentaje de unión de la proteína es mayor en membranas de PVDF en contraste a las de nitrocelulosa.^{19,20}

Membranas de nitrocelulosa y PVDF

La nitrocelulosa es el soporte más adaptable para la transferencia de proteínas, glicoproteínas o ácidos nucleicos. El tamaño del poro es de 0.45 µm. Además, tiene una alta capacidad de unión con la proteína, facilidad de almacenamiento de moléculas inmovilizadas a corto y largo plazo, así como reproducibilidad.^{11,12}

En el proceso de transferencia, la membrana debe ser porosa para que pueda saturarse con amortiguador y permita por convección el paso uniforme de calor y del amortiguador de electrotransferencia. Estudios han sugerido que la interacción entre la membrana y la proteína es no covalente e hidrofóbica, dado que la mayoría de las proteínas tiene valores de pH superiores a 7, además de presentar una carga negativa; sin embargo, pueden unirse de manera eficiente a las membranas de nitrocelulosa a pesar de que estas últimas están cargadas negativamente. Además, otra característica de estas membranas es que, en altas concentraciones de sales, pero bajas de metanol, aumentan la eficiencia de inmovilización. Se puede teñir con diversos colorantes como el negro amido, negro azulado de anilina, rojo Ponceau S, verde rápido y azul de toluidina. En particular la tinción de negro amido puede detectar de manera fácil una concentración de 25 ng de albúmina sérica bovina, con una tinción de fondo aceptable, en contraste con el azul brillante de Coomassie que tiene una mayor tinción de fondo; por último, el rojo Ponceau S ofrece un patrón muy limpio, pero ligeramente menos sensible que el negro amido.¹¹

La membrana de PVDF, a diferencia de las de nitrocelulosa, es más fuerte y proporciona mayor unión a las proteínas; pueden presentar dos tamaños de poro, uno de 0.22 µm y otro de 0.45 µm. Además, estas membranas deben, previo a usarse, humedecerse

en metanol o etanol debido a su naturaleza altamente hidrofóbica.¹² Las proteínas transferidas a este tipo de membranas se retienen bien en la superficie durante todo el proceso de inmunodetección a través de una combinación del dipolo e interacciones hidrofóbicas, teniendo una capacidad de unión a las proteínas de $170 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.¹¹ Puede teñirse con negro amido tinta china y azul de Coomassie, con el fin de visualizar las proteínas y conocer el grado de transferencia.^{11,21}

La tinción con negro amido se caracteriza por teñir en color azul oscuro las proteínas mayores a 50 ng/banda sobre el fondo azul claro, su sensibilidad es similar a la de azul de Coomassie, pero tiñe de manera más rápida; cabe señalar que el azul de Coomassie no se puede emplear en membranas de nitrocelulosa puesto que su alta concentración de disolventes puede afectarla.²¹

En relación con el rojo Ponceau S, éste es menos sensible ya que detecta bandas con una concentración de proteínas mayor a 200 ng por banda y se presentan como bandas rojas sobre un fondo rosa. La ventaja de esta tinción es que es simple, rápida y fácilmente reversible, es decir que puede removerse con varios lavados con agua.²¹

La tinta china detecta proteínas a una concentración mayor a 5 ng por banda y las bandas se detectan en color negro sobre un fondo gris. Su sensibilidad puede mejorarse con tratamiento alcalino de la membrana con un 1% de KOH seguido de varios lavados con PBS.²¹

Inmunodetección

Una vez que las proteínas se retienen en la fase sólida (membrana), los sitios vacíos y no específicos de la membrana deben bloquearse. El bloqueo implica

la incubación con agentes que contienen una alta concentración de proteínas inespecíficas en PBS Tween-20 que puedan unirse a los sitios donde no hay proteína de interés en la membrana, evitando así la unión inespecífica del anticuerpo, esto reduce el ruido de fondo porque el anticuerpo añadido sólo puede unirse a los sitios de las proteínas de interés.^{12,18} Algunos agentes bloqueantes que contienen proteínas, contemplan al suero de ternera, de caballo o fetal bovino y Tween-20 (detergente). Sin embargo, los detergentes no iónicos deben usarse con precaución, ya que pueden solubilizar las proteínas transferidas a la membrana. No obstante, la leche desnatada y la albúmina de suero bovino (BSA, por sus siglas en inglés) son los más empleados. La leche desnatada tiene una función insuficiente en el análisis de proteínas fosforiladas porque contiene caseína, una fosfoproteína que puede competir por el sitio de unión del anticuerpo, reduciendo así la intensidad de una señal no específica. El tiempo de incubación del bloqueo es de 3 horas con leche desnatada en PBS Tween a 10% o toda la noche, cuando el porcentaje es de 5%. Si se emplea BSA a 5% el bloqueo es de una hora.^{12,18}

Una vez bloqueadas las membranas, se incuban con el anticuerpo primario específico de la proteína de interés. Se emplean dos tipos de anticuerpos, los policlonales que reconocen varias regiones o epítomos del antígeno, y los anticuerpos monoclonales que son más específicos al reconocer una sola región o epítopo del antígeno.¹² Además, es importante mencionar que, de acuerdo al tipo de anticuerpo empleado, es el tipo de detección directa o indirecta; es decir, cuando se emplea un anticuerpo primario acoplado o conjugado a un agente revelador como una enzima, la detección es directa porque no es necesario incubarse con un

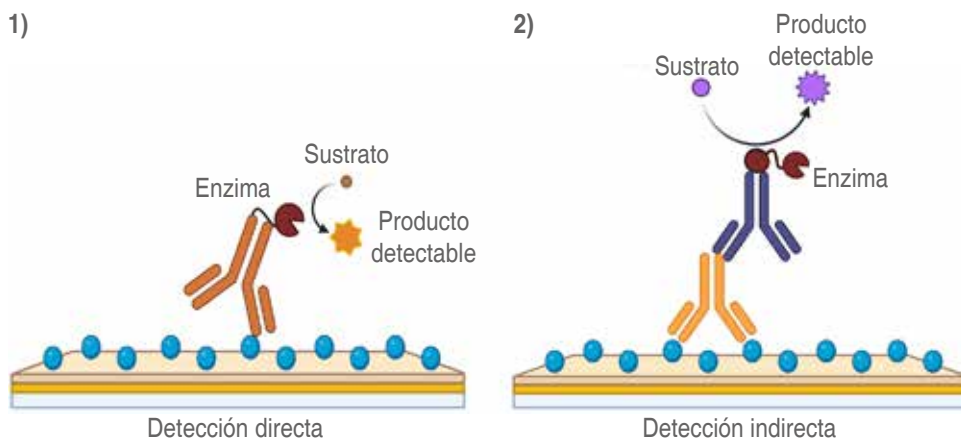


Figura 2:

Tipos de detección antigénica.

1) Detección directa en la que el anticuerpo primario se encuentra conjugado a una enzima o fluoróforo. 2) Detección indirecta en la que se emplea un anticuerpo secundario acoplado a una enzima o fluoróforo.

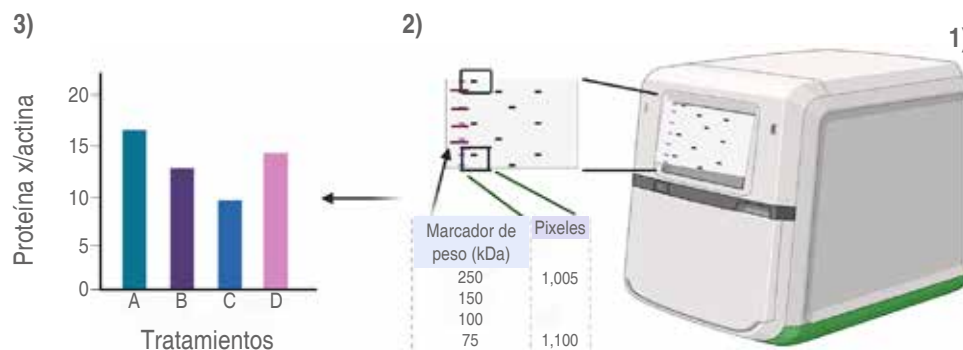


Figura 3: Detección por quimioluminiscencia. 1) Detección de la quimioluminiscencia a través de un sistema de fotodocumentación con cámara digital. 2) Análisis densitométrico de cada banda detectada con un *software* especializado. 3) Gráfico del análisis densitométrico, determinado como la expresión de la proteína de interés.

anticuerpo secundario. Una detección indirecta se da de manera frecuente porque el anticuerpo primario no se encuentra acoplado o conjugado, de tal manera que se requiere de una incubación posterior con un anticuerpo secundario que se encuentra conjugado a fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano (HRP, por sus siglas en inglés) o fluoróforos específicos (Figura 2).

Los anticuerpos secundarios se unen a los anticuerpos primarios en la parte que no está unida al antígeno o fracción cristalizante y se seleccionan dependiendo de la especie en la que se encuentre hecho el anticuerpo primario. La incubación con los anticuerpos primarios y secundarios se realiza con diluciones adecuadas típicamente para anticuerpos monoclonales y secundarios, hechos en cabra o conejo con un rango de dilución de 1:30,000 a 1:120,000; y para anticuerpos no monoclonales, las diluciones pueden ser más bajas. Es importante señalar que se deben realizar varios lavados de 5 minutos cada uno con PBS Tween entre el anticuerpo primario y el secundario, así como dos lavados de 5 minutos con PBS Tween y dos más de PBS posterior a la incubación del anticuerpo secundario para así poder revelar las membranas, ya sea por método colorimétrico, quimioluminiscente o fluorescente, mediante una cámara o dispositivo de imágenes o placas radiográficas.^{12,16,18}

El método colorimétrico o cromogénico, es quizá el más simple y rentable ya que emplea un anticuerpo secundario que ha sido conjugado previamente con HRP o fosfatasa alcalina (140 kDa). La reacción de la enzima con el sustrato produce productos coloreados insolubles que precipitan en la membrana. Los sustratos como el TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina), 4-CN (4-cloro-1-naftol), DAB (3,3'-tetrahidrocloruro de diaminobencidina) se utilizan con HRP; por ejemplo,

HRP oxida a la DAB generando un color marrón. Sustratos para la fosfatasa alcalina consideran al BCIP (5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato-p-toluidina-sal) y NBT (cloruro de nitro-azul de tetrazolio) y se produce un precipitado negro-púrpura insoluble. La cantidad de colorante convertido es proporcional a la cantidad de la proteína en la muestra. La cuantificación se puede realizar escaneando la transferencia con un fotodocumentador o con un escáner estándar y analizando la intensidad de la tinción de la banca a través de un *software* que se encuentre en el fotodocumentador o a través de un *software* disponible gratuitamente como NIH Image J (<https://imagej.net/ij/>).^{16,22}

A medida que avanza la investigación de proteínas, el uso de la HRP (40 kDa) se ha hecho más frecuente debido a su estabilidad y tamaño más pequeño en contraste a la fosfatasa alcalina, lo que permite conjugar más anticuerpos. Además, los sustratos quimioluminiscentes para HRP han permitido mayor sensibilidad.²²

El método de detección quimioluminiscente emplea anticuerpos secundarios conjugados a HRP. En presencia de la enzima HRP y peróxido de hidrógeno, el luminol se oxida, formando un producto denominado 3-aminoftalato que libera energía en forma de luz que se captura en una película radiográfica o en forma digital utilizando una cámara digital para identificar la proteína de interés. Dentro de los sustratos más populares para este método, está el luminol. La sensibilidad de este método depende de la linealidad de detección, que por lo general está presente en cargas menores a 5 µg. Se considera un método de inmunodetección semicuantitativo, debido a que el punto de saturación en la señal es un factor importante para determinar las diferencias en los niveles de expresión de las muestras y podría dar lugar a mediciones inexactas. Además, es

importante señalar que a pesar de que la actividad de la HRP continúe mientras el sustrato esté disponible, es posible que la HRP se inactive por la exposición prolongada al sustrato, ya que los radicales libres generados durante la reacción de oxidación pueden unirse a la HRP; además, los radicales libres pueden también dañar el antígeno, anticuerpo y membrana impidiendo su eficiencia. Para finalizar, en este método, la imagen capturada permite la cuantificación en píxeles de cada banda, tanto de la proteína de interés como de la proteína constitutiva (actina) que se obtiene mediante un análisis densitométrico empleando el *software* de análisis incluido en los sistemas digitales. Después se realiza una normalización dividiendo los píxeles de la proteína de interés entre los píxeles de la actina. El resultado de este cociente se grafica para visualizar los cambios en la expresión proteica (Figura 3).^{12,22}

Por último, el método de inmunodetección fluorescente, se realiza cuando hay dos proteínas de interés y se requiere de alta sensibilidad. Para la detección de éste, es necesario utilizar anticuerpos secundarios acoplados a un marcador fluorescente o fluoróforo, cuyos enlaces químicos se excitan al absorber un fotón de una longitud de onda que hace que emitan luz a una distancia más larga, creando una señal de detección lineal. También, es importante señalar que en este método deben emplearse membranas de fluorescencia o tratadas, porque los polímeros de las membranas autofluorescen en el rango visible del espectro, lo que puede interferir con la detección. Además de emplear fluoróforos con espectros de emisión de excitación que no se superponga, son fundamentales para la

identificación de las proteínas de interés. Un ejemplo de estos son los DyLight 3 de Thermo Scientific que consideran los de 549 y 649 nm o los fluoróforos cercanos al infrarrojo como los DyLight 680 y 800. Estos últimos son particularmente útiles porque las proteínas y los polímeros de la membrana tiene menos autofluorescencia dentro de estos rangos espectrales, dando como resultado menor fondo y mayor sensibilidad.^{12,22}

Para detectar estas señales es necesario un equipo que cuente con una cámara digital con filtros de diferentes longitudes de onda que detecten la luz emitida. Las imágenes capturadas se analizan con el mismo principio de las imágenes capturadas por quimioluminiscencia. Sin embargo, el resultado es cuantitativo debido a la estabilidad de la señal, a diferencia del método de inmunodetección por quimioluminiscencia.^{12,22}

Una vez descrita esta técnica, es importante enfatizar que a lo largo de los años ha sido considerada el estándar de oro para la determinación de proteínas. Sin embargo, ha ido implementando cambios con la finalidad de tener mayor sensibilidad, especificidad y eficiencia para obtener resultados. Esto la convierte en una herramienta importante tanto en la investigación biomédica, para estudiar la expresión de proteínas específicas en diversas condiciones fisiológicas y patológicas, como en el ámbito clínico. Se utiliza para el diagnóstico de enfermedades como el VIH y la identificación de marcadores tumorales. Es relevante señalar que puede complementarse con otras técnicas proteómicas, como el Dot blot, en especial para determinar la especificidad antigénica de anticuerpos.

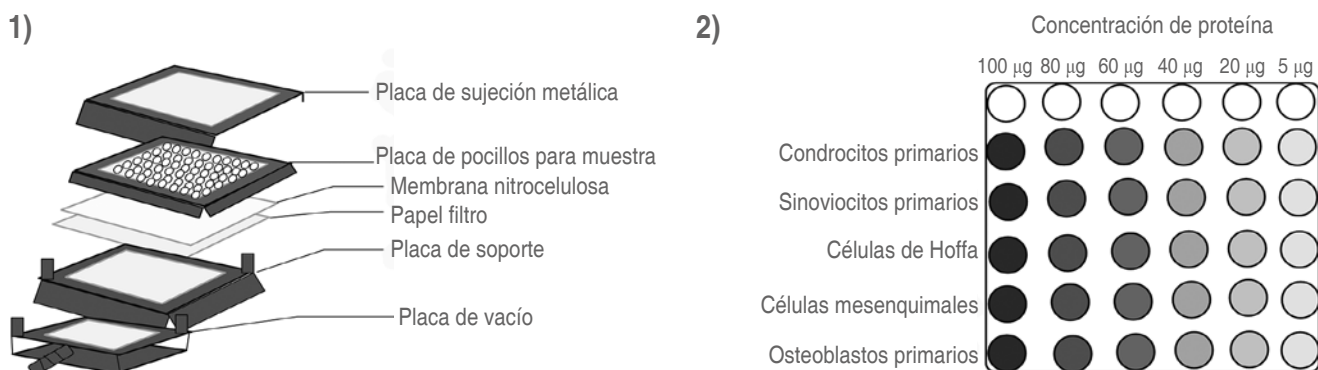


Figura 4: Equipo Minifold y Dot blot. 1) Equipo de filtración acoplado a una placa de vacío para el flujo de la muestra a la membrana de nitrocelulosa. 2) Imagen de un Dot blot que muestra puntos discretos y uniformes, con diferentes concentraciones de proteína en cinco líneas celulares.

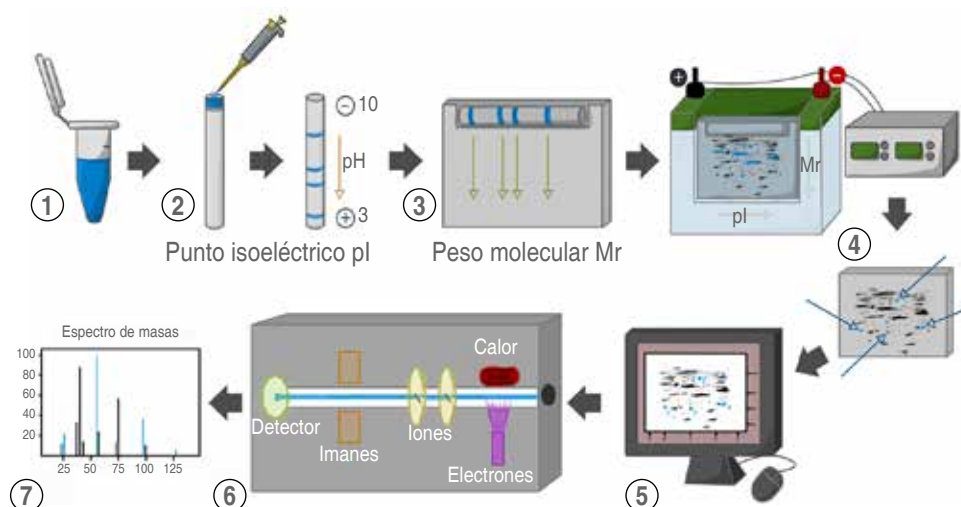


Figura 5: Etapas del análisis bidimensional. 1) Preparación de la muestra obtenida de células, tejido o bacterias. 2) Isoelectroenfoco (pI) por tubos capilares (primera dimensión). 3) Segunda dimensión, separación por peso molecular (Mr). 4) Tinción u observación de las proteínas. 5) Digitalización de los patrones proteicos y análisis bioinformático especializado. 6) Espectrometría de masas. 7) Espectro de masas para identificación de proteínas cruciales.

DOT BLOT

El Dot blot es una técnica de biología molecular útil para detectar, analizar e identificar biomoléculas sin separación por cromatografía; fue desarrollada en 1982, basada en técnicas previas como Northern y Southern blot (detección por sondas de ácidos nucleicos) y Western blot (detección con anticuerpos).²³ El DB, en relación con las proteínas, es considerado un método simple para determinar la presencia y la cantidad de una proteína antigénica, a gran escala para la búsqueda de marcadores proteicos en áreas como bacteriología, inmunología e investigación epidemiológica, demostrándolo a través de una reacción anticuerpo-antígeno.^{24,25}

El DB hoy en día se emplea de acuerdo las especificaciones de las proteínas, como su solubilidad, ya que algunos estudios la han empleado en sustitución de una ELISA. Además, esta técnica es muy similar al WB, porque considera las condiciones de los anticuerpos como las diluciones y los tiempos de incubación. La especificidad del anticuerpo en el DB se garantiza posterior a una validación por Western blot.²⁴

El principio de este método, al igual que el Western blot, se basa en el reconocimiento antigénico empleando en promedio una concentración de 15 µg de proteína total, la cual se deposita en una membrana de nitrocelulosa, mediante un sistema de filtración/incu-

bación de 96 pozos, que elimina el flujo transversal de reactivos a través de la fase sólida, formando puntos discretos y uniformes para facilitar el aislamiento y la cuantificación de los resultados (Minifold I) (Figura 4).²⁴

Otra importante participación de esta técnica, es que se ha empleado como alternativa para la cuantificación de proteínas mediante la tinción con rojo Ponceau S, un método simple, rápido, económico y más confiable que el ensayo de ácido bicinonínico, con muestras biológicas lisadas con el amortiguador RIPA.²⁶ Además, se ha empleado para determinar la identidad antigénica de vacunas conjugadas dirigidas a *Streptococcus pneumoniae* y así evitar el uso de resonancia magnética.²⁷ De tal manera que el DB resulta una técnica proteómica importante para complementar otras técnicas moleculares. Otra técnica proteómica importante es la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida, la cual es considerada el mejor método conocido para llevar a cabo el análisis proteómico de una muestra biológica.

ELECTROFORESIS BIDIMENSIONAL

La técnica de la electroforesis bidimensional, es considerada la más resolutive, ya que permite aislar e identificar proteínas intactas de longitud completa (alrededor de 5,000 proteínas) mediante una doble separación en un gel 2D-PAGE con base en dos características, su punto isoeléctrico (pI) y su PM.²⁸

Puede también combinarse con diversos colorantes, así como con el uso de anticuerpos y otras técnicas de investigación como el WB que, junto con sistemas sofisticados computacionales, permiten un análisis minucioso y detallado que brinda una identificación de modificaciones postraduccionales e isoformas de proteínas a partir de una muestra biológica.²⁹

Esta técnica comprende varias etapas, desde la preparación de la muestra, el isoelectroenfoque o primera dimensión, la etapa de equilibrio, la separación en segunda dimensión, seguido de la tinción para la observación de las proteínas, la digitalización de los patrones proteicos, análisis bioinformático especializado e identificación de proteínas cruciales por espectrometría de masas (Figura 5).

Isoelectroenfoque (primera dimensión)

La base del isoelectroenfoque es el pI que considera las diferencias de cargas eléctricas que presentan las proteínas. El pI es definido como la posición en una escala de pH, en la cual la proteína no se desplaza más, ya que la carga de sus grupos funcionales ha llegado a ser de cero. Es decir, las cargas positivas y negativas de la proteína (molécula anfotérica) se han equilibrado y esto es completamente independiente de su tamaño.

Los dos métodos de separación por isoelectroenfoque son: tubos capilares, establecido por O'Farrell y las revolucionarias tiras de gradiente de pH inmovilizado (IPG strips), conceptualizadas por Görg.^{30,31} En la actualidad, las tiras de gradiente inmovilizado son el método más eficiente y reproducible para llevar a cabo una electroforesis bidimensional exitosa, ya que los métodos de extracción, preparación y solubilización de la compleja mezcla de proteínas en las muestras son procesos altamente controlados para determinar las condiciones óptimas de la separación por isoelectroenfoque.³²

Separación de proteínas por peso molecular (segunda dimensión)

En esta etapa, las proteínas resueltas en la primera dimensión, son inmediatamente transferidas a geles convencionales de SDS-PAGE, para ser resueltas ahora de forma perpendicular de acuerdo con su peso molecular. Es importante señalar que los geles homogéneos de un solo porcentaje de acrilamida, brindan una excelente resolución a las proteínas, de tal manera, que la concentración de acrilamida, determinará

el tamaño de poro que se requiera para visualizar la proteína de interés. Así que, a menor tamaño del poro, se visualizarán proteínas de PM bajo a mediano. Por el contrario, a menor concentración de acrilamida, mayor será el tamaño del poro y entonces, las proteínas que mejor se acomodarán y se visualizarán serán las proteínas de mayor PM.³³

Visualización y detección de las proteínas en los geles

Para lograr una visualización adecuada de las proteínas en los geles de poliacrilamida, es frecuente emplear colorantes visibles (azul de Coomassie) a simple vista o bien, con metales (nitrato de plata). Esto va a depender del tipo de proteína que se quiera observar y de su abundancia en la muestra. Los colorantes son menos sensibles, es decir, la cantidad de muestra de proteína utilizada en los geles debe ser mayor; por lo tanto habrá proteínas que su concentración normal sea muy baja, por lo que no podrán ser observadas con esta tinción. En cambio, la tinción con metales es mucho más sensible y podrá detectar una variedad mucho mayor de proteínas, ya que, aunque estén en baja concentración en la muestra podrán visualizarse.^{34,35} A pesar de las desventajas que estos tipos de tinciones presentan, se siguen utilizando ya que son los más económicos del mercado y en la actualidad han sido modificados de tal manera que, aunque su costo comercial ha aumentado, su compatibilidad con la identificación de la proteína por espectrometría de masas, ahora es posible.

Esta compatibilidad de las tinciones va a depender básicamente del proceso y de los agentes con los que se realiza la primera fase del teñido, que es la fijación de las proteínas en el gel.³⁶

Las tinciones más novedosas son las que se realizan por medio de fluoróforos, obviamente son reactivos mucho más caros, pero tienen la gran ventaja de ser compatibles para la espectrometría de masas; algunas están basadas en extractos vegetales y otras son diseñadas químicamente de forma artificial y producidas en laboratorios. Todas son altamente sensibles, capaces de detectar rangos de concentración de proteínas muy bajos y no son observables a simple vista, sino que las imágenes deben digitalizarse con escáneres láser, ya que los fluoróforos deben ser excitados en un rango de energía específico para que las proteínas de los geles a los que están unidos, sean visibles. Por lo que este tipo de visualización permite tener resultados precisos y analizables, por medio de

programas computacionales especialmente diseñados para este propósito.^{37,38}

La forma en que cada tinción interactúa con las proteínas es diferente, aunque una característica común de todas es que lo hacen con los aminoácidos básicos que forman a las proteínas. De manera frecuente se emplean dos tipos de tinciones a un mismo gel para obtener una buena calidad de imágenes. Otra consideración, en cuanto al proceso de tinción, es el uso de agua de buena calidad para todos los procedimientos y los lavados, ya que esto evitará que en el gel se produzca un fondo muy pesado, que impida visualizar proteínas de bajo peso molecular o menos abundantes.

Por consiguiente, el obtener patrones de proteínas inmejorables, tanto física como digitalmente, brindan una ventaja al procesamiento bioinformático, así como a la identificación de las proteínas que nos parezcan más interesantes o relevantes, por medio de la espectrometría de masas.³⁹

Análisis bioinformático

Para realizar un análisis bioinformático efectivo de las imágenes de geles 2D-PAGE es crucial considerar que éstas pueden presentar irregularidades causadas por ruido de fondo y distorsión. Esto incluye la presencia de polvo o residuos de colorantes en el gel, que a menudo se confunden con pequeñas proteínas, así como variaciones en la saturación debido a la iluminación desigual del sistema de adquisición, lo que puede resaltar algunas proteínas y atenuar otras.⁴⁰

Otros problemas comunes incluyen la presencia de proteínas de baja abundancia que aparecen como puntos difusos o con baja intensidad, así como saturaciones de puntos y rayas causadas por un isoelectroenfoco incompleto en la primera dimensión. También se pueden observar rayas verticales debido a una mala separación en la segunda dimensión, además de variaciones de fondo en las imágenes.⁴⁰

De tal manera, estas irregularidades hacen imprescindible el uso de técnicas avanzadas de procesamiento de imágenes digitales para mejorar la calidad de las imágenes y reducir el impacto de las mismas en la detección e identificación de proteínas.⁴⁰

Para el análisis de este tipo de imágenes, existen varios programas comerciales como PDQuest (Bio-Rad), ImageMaster (GE HealthCare), Melanie II, ProteomeWeaver, GELLAB y Delta2D. Estos programas utilizan técnicas básicas de preprocesamiento para mejorar la apariencia de las imágenes, así como técni-

cas de segmentación y registro que ayudan en la detección de proteínas. Sin embargo, la mayoría de estas herramientas son costosas y requieren la intervención manual de un experto, por lo que el procesamiento de imágenes 2D-PAGE está lejos de ser un proceso automatizado. Los avances significativos en las capacidades computacionales para el procesamiento de imágenes y el creciente interés en el análisis proteómico basado en imágenes 2D-PAGE crean la necesidad de estudiar y desarrollar una metodología que permita procesar la información contenida en múltiples imágenes 2D-PAGE de forma automática y confiable.^{41,42}

En el análisis de imágenes 2D-PAGE, se presentan muchos desafíos para obtener una buena caracterización de sus componentes. Por ello, es necesario utilizar técnicas de procesamiento automático para reducir el ruido, corregir el fondo, disminuir el efecto de *streaking* (rayas verticales y horizontales) y mejorar la detección de proteínas de baja abundancia (puntos difusos o de baja intensidad). El procesamiento de imágenes 2D-PAGE incluye: preprocesamiento, detección de proteínas y fusión de imágenes.^{41,42}

El preprocesamiento tiene como objetivo mejorar la calidad de la imagen, aumentando así la posibilidad de éxito en la etapa de identificación. Además, esta etapa incluye la reducción de ruido, la normalización de intensidades y la corrección de fondo.

La detección de proteínas es importante porque, entre cientos de proteínas, permite reducir la cantidad de datos, pasando de una gran cantidad de píxeles a algunos puntos característicos. Para la detección de estos puntos característicos existen dos metodologías: la primera es la detección independiente de proteínas en una imagen 2D-PAGE y la segunda es la identificación de características comunes a partir de una imagen fusionada de varias imágenes de geles.^{39,40,43}

La fusión de imágenes consiste en la combinación de datos de varias imágenes. Esta fusión tiene por objetivo realzar puntos que no son visibles, complementar datos y detectar cambios en un área, reemplazar datos anómalos y adicionar datos faltantes. De tal manera, este proceso de fusión debe satisfacer tres condiciones: preservación de toda la información pertinente, eliminación de información irrelevante y ruido y minimización de los artefactos y las inconsistencias en la imagen fusionada.

Por lo tanto, en el análisis proteómico de imágenes 2D-PAGE, es necesario conocer un conjunto significativo de posiciones estándar que permitan identificar proteínas en una colección de geles. Esto permite la predicción de la especie de proteína en función de su posición, a partir de lo cual se pueden identificar

las proteínas más relevantes. Posteriormente, estas proteínas serán digeridas en péptidos y analizadas mediante espectrometría de masas.^{39,40,43}

Espectrometría de masas

La aplicación de la espectrometría de masas vino a sustituir la clásica degradación de Edman, de tal manera que se considera el avance principal en la identificación y caracterización de proteínas y péptidos una vez que las proteínas han sido separadas mediante electroforesis bidimensional.^{40,43}

En 1992, el grupo de Rosenfeld describió el método para digerir proteínas separadas en geles de electroforesis *in situ*, que sustituyó a los procedimientos que requerían una electrotransferencia y la digestión en la membrana.⁴⁴ En 1993, el grupo de Pappin describió en paralelo el uso del mapeo peptídico para la identificación de proteínas en geles, acuñando el término *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF).⁴⁵

El fundamento del espectrómetro de masas, es detectar la proporción de masa y energía de una molécula (m/z). Se compone de un conjunto de modulares esenciales que son: una superficie de ionización para las moléculas que serán analizadas, el analizador de la masa molecular, el detector de la carga y el sistema de procesamiento de los datos obtenidos.⁴⁶

En términos básicos, la espectrometría de masas consiste en someter a una proteína a una digestión enzimática, normalmente con tripsina, Glu-C proteasa o endolisina, que son capaces de romper la proteína a través de hidrólisis a nivel del enlace peptídico para obtener una serie de fragmentos peptídicos específicos, cuya masa va a servir para identificar la proteína de interés. En concreto, las enzimas rompen las proteínas en la zona carboxílica de los residuos de lisina y arginina, a menos que estén seguidos por una prolina, lo que da como resultado huellas peptídicas predecibles.

Los fragmentos peptídicos obtenidos son ionizados tras el tratamiento con un láser que les confiere carga. Los fragmentos peptídicos, una vez conferida la carga, se separan en el espectro de acuerdo con su relación masa/carga y posteriormente se analizan con un detector que es capaz de medir la intensidad de cada fragmento.^{43,46}

Por último, la digestión de una proteína permite hacer comparaciones con las masas teóricas del conjunto de péptidos esperados, empleando bases de datos que normalmente son de acceso libre en internet (*Tabla 1*). Las huellas peptídicas resultantes del análisis por espectrometría de masas se utilizan para encontrar la homología que permitirá identificar a la

proteína. La eficiencia de esta técnica es elevada, tanto que incluso con la identificación de una secuencia de cinco residuos de aminoácidos puede ser suficiente para identificar la proteína.⁴³ Por lo tanto, en un análisis peptídico por mapeo, es necesario considerar el grado de purificación de la proteína, el número de péptidos obtenidos en el proceso de digestión, el análisis, así como la sensibilidad y precisión de la medida y la calidad de la base de datos empleada.^{43,47}

En relación a su aplicación, esta técnica es ampliamente utilizada debido a su alto rendimiento para la identificación precisa de los componentes proteicos presentes dentro de una mezcla compleja. Se combina frecuentemente con otras técnicas, como la 2D-PAGE, donde las proteínas aisladas de las manchas de estos geles se descomponen en fragmentos para determinar modificaciones postraduccionales como glicosilación, acetilación y fosforilación o para identificar proteínas de origen desconocido, en especial de origen bacteriano con relevancia tanto ambiental como clínica. Además, esta técnica puede apoyar en el estudio biológico y fisiológico bacteriano.⁴⁸

IMPORTANCIA EN CIENCIA BÁSICA Y CLÍNICA

En los últimos años se han desarrollado diversas técnicas proteómicas como WB, DB, electroforesis 2D-PAGE y la espectrometría de masas, las cuales han tenido un gran impacto en la ciencia básica al permitir la identificación selectiva y sensible de proteínas de interés, así como de modificaciones postraduccionales como fosforilaciones en muestras heterogéneas obtenidas a partir de tejidos, cultivos celulares e incluso plasma. Esta identificación puede basarse en el tamaño molecular de la proteína mediante el uso de colorantes, anticuerpos e incluso comparaciones de masas teóricas.

En el ámbito clínico, estas técnicas han sido fundamentales para investigar los mecanismos moleculares asociados a enfermedades como el cáncer, enfermedades autoinmunes y trastornos neurológicos, así

Tabla 1: Bases de datos para la identificación de proteínas mediante mapeo peptídico o secuenciación de péptidos.

Mapeo peptídico	Secuenciación de péptidos
Aldente	GPMX Hunter
Mascot	Guten Tag
Mowse	Eigen MS
MS-Fit	InsPectT
PepMAPPER	MS Tag

como para la identificación de nuevos biomarcadores diagnósticos y pronósticos. Es importante señalar que también se emplean en el diagnóstico de infecciones no virales de origen fúngico, parasitario y bacteriano. Además, ha surgido una rama de la proteómica denominada farmacoproteómica, la cual estudia la respuesta farmacológica de los pacientes en función de las proteínas que expresan. En el área cardiovascular, la farmacoproteómica puede contribuir a entender los efectos pleiotrópicos de los fármacos utilizados.^{43,49-51}

CONCLUSIÓN

Las técnicas proteómicas tienen como objetivo determinar la expresión de proteínas de manera semicuantitativa, como en el caso del WB y el DB, o cuantitativa, como en la electroforesis bidimensional acoplada a espectrometría de masas. Estos análisis son fundamentales tanto en la investigación biomédica como en la práctica clínica para comprender el papel de las proteínas en los procesos biológicos. El futuro de estas técnicas consiste en continuar evolucionando para adaptarse a las necesidades del ámbito biomédico y clínico, aprovechando los avances en automatización, sensibilidad y capacidad para detectar simultáneamente múltiples proteínas en una sola muestra. Esto permitirá obtener resultados de alta calidad y apoyar de manera eficaz el diagnóstico temprano de enfermedades.

Referencias

1. Sandoval-Usme MC, Umaña-Pérez A, Vallejo-Pulido AF, Arévalo-Ferro C, Sánchez-Gómez M. La proteómica en la era postgenómica. *Acta Biol Colomb*. 2009; 14 (3): 19-30.
2. Carbonara K, Andonovski M, Coorssen JR. Proteomes are of proteoforms: embracing the complexity. *Proteomes*. 2021; 9 (3): 38. doi: 10.3390/proteomes9030038.
3. Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z et al. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics*. 2014; 11 (1): 16. doi: 10.1186/1559-0275-11-16.
4. Stott DI. Immunoblotting, dot-blotting, and ELISPOT assays: methods and applications. *J Immunoassay*. 2000; 21 (2-3): 273-296. doi: 10.1080/01971520009349537.
5. Gallo G, Scaloni A. Differential proteomics based on 2D-difference in-gel electrophoresis and tandem mass spectrometry for the elucidation of biological processes in antibiotic-producer bacterial strains. *Methods Mol Biol*. 2018; 1716: 267-289. doi: 10.1007/978-1-4939-7528-0_12.
6. Mishra M, Tiwari S, Gomes AV. Protein purification and analysis: next generation Western blotting techniques. *Expert Rev Proteomics*. 2017; 14 (11): 1037-1053. doi: 10.1080/14789450.2017.1388167.
7. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; 76 (9): 4350-4354. doi: 10.1073/pnas.76.9.4350.
8. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 361590. doi: 10.1155/2014/361590.
9. Singh KK, Gupta A, Bharti C, Sharma H. Emerging techniques of western blotting for purification and analysis of protein. *Futur J Pharm Sci*. 2021; 7: 239. Available in: <https://doi.org/10.1186/s43094-021-00386-1>
10. Glatter T, Ahrné E, Schmidt A. Comparison of different sample preparation protocols reveals lysis buffer-specific extraction biases in gram-negative bacteria and human cells. *J Proteome Res*. 2015; 14 (11): 4472-4485. doi: 10.1021/acs.jproteome.5b00654.
11. Kurien BT. Western blotting for the non-expert. *Techniques in life science and biomedicine for the non-expert*. 2021. doi: 10.1007/978-3-030-70684-5.
12. Martínez-Flores K, Salazar-Anzures AT, Fernández-Torres J, Pineda C, Aguilar-González CA, López-Reyes A. Western blot: a tool in the biomedical field. *Investigación en Discapacidad*. 2024; 6 (3): 128-137.
13. Kielkopf CL, Bauer W, Urbatsch IL. Bradford assay for determining protein concentration. *Cold Spring Harb Protoc*. 2020; 2020 (4): 102269. doi: 10.1101/pdb.prot102269.
14. García-Solaesa V, Abad SC. SDS-polyacrylamide electrophoresis and western blotting applied to the study of asthma. *Methods Mol Biol*. 2016; 1434: 107-120. doi: 10.1007/978-1-4939-3652-6_8.
15. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 1970; 227 (5259): 680-685.
16. Bass JJ, Wilkinson DJ, Rankin D, Phillips BE, Szweczyk NJ, Smith K et al. An overview of technical considerations for Western blotting applications to physiological research. *Scand J Med Sci Sports*. 2017; 27 (1): 4-25. doi: 10.1111/sms.12702.
17. Gibbons J. Western blot: protein transfer overview. *N Am J Med Sci*. 2014; 6 (3): 158-159. doi: 10.4103/1947-2714.128481.
18. García Trejo JJ, Ortega R. Inmunotransferencia de geles de proteínas de poliácridamida tipo Western blot. *Mens Bioquim*. 2022; 46: 103-116.
19. Xiang Y, Zheng Y, Liu S, Liu G, Li Z, Dong W. Comparison of the sensitivity of Western blotting between PVDF and NC membranes. *Sci Rep*. 2021; 11 (1): 12022. doi: 10.1038/s41598-021-91521-8.
20. Kurien BT, Scofield RH. Western blotting: an introduction. *Methods Mol Biol*. 2015; 1312: 17-30. doi: 10.1007/978-1-4939-2694-7_5.

21. Goldman A, Harper S, Speicher DW. Detection of proteins on blot membranes. *Curr Protoc Protein Sci*. 2016; 86: 10.8.1-10.8.11. doi: 10.1002/cpps.15.
22. Alegria-Schaffer A, Lodge A, Vattem K. Performing and optimizing Western blots with an emphasis on chemiluminescent detection. *Methods Enzymol*. 2009; 463: 573-599. doi: 10.1016/S0076-6879(09)63033-0.
23. Hawkes R, Niday E, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem*. 1982; 119 (1): 142-147. doi: 10.1016/0003-2697(82)90677-7.
24. Guillemin N, Meunier B, Jurie C, Cassar-Malek I, Hocquette JF, Leveziel H et al. Validation of a Dot-Blot quantitative technique for large scale analysis of beef tenderness biomarkers. *J Physiol Pharmacol*. 2009; 60 Suppl 3: 91-97.
25. Uritani M, Hamada A. A simple and inexpensive dot-blotter for immunoblotting. *Biochemical Education*. 1999; 27 (3): 169-170.
26. Helbing DL, Bohm L, Oraha N, Stabenow LK, Cui Y. A ponceau s staining-based dot blot assay for rapid protein quantification of biological samples. *Gels*. 2022; 8 (1): 43. doi: 10.3390/gels8010043.
27. Cabrera-Blanco O, Pisonero-Triana M, Rodríguez-Bejerano M et al. Dot Blot para determinar la identidad antigénica en vacunas conjugadas contra *Streptococcus pneumoniae* serotipo 19F. *Vaccimonitor*. 2017; 26 (1): 1-7.
28. San Miguel-Hernández A, Martín-Gil FJ, Armentia-Medina A. Metodología y aplicaciones en proteómica clínica. *Dial Traspl*. 2009; 30 (4): 139-143.
29. Rozanova S, Barkovits K, Nikolov M, Schmidt C, Urlaub H, Marcus K. Quantitative mass spectrometry-based proteomics: an overview. *Methods Mol Biol*. 2021; 2228: 85-116. doi: 10.1007/978-1-0716-1024-4_8.
30. Gorg A. Two-dimensional electrophoresis. *Nature*. 1991; 349: 545-546. Available in: <https://doi.org/10.1038/349545a0>
31. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem*. 1975; 250 (10): 4007-4021.
32. Gorg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R et al. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 2000; 21 (6): 1037-1053. doi: 10.1002/(SICI)1522-2683(20000401)21:6<1037::AID-ELPS1037>3.0.CO;2-V.
33. Wilkins MR, Pasquali C, Appel RD, Ou K, Golaz O, Sanchez JC et al. From proteins to proteomes: large scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Biotechnology (N Y)*. 1996; 14 (1): 61-65. doi: 10.1038/nbt0196-61.
34. Westermeier R, Naven T. *Proteomics in practice, a laboratory manual of proteome analysis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2002.
35. Westermeier R. *Electrophoresis in practice*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH; 2001.
36. Stasyk T, Hellman U, Souchelnytskyi S. Optimizing sample preparation for 2-D electrophoresis. *Life Sci*. 2001; 9: 8-11.
37. Mackintosh JA, Choi HY, Bae SH, Veal DA, Bell PJ, Ferrari BC et al. A fluorescent natural product for ultra sensitive detection of proteins in one-dimensional and two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics*. 2003; 3 (12): 2273-2288. doi: 10.1002/pmic.200300578.
38. Tonge R, Shaw J, Middleton B, Rowlinson R, Rayner S, Young J et al. Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics*. 2001; 1 (3): 377-396. doi: 10.1002/1615-9861(200103)1:3<377::AID-PROT377>3.0.CO;2-6.
39. Yan JX, Harry RA, Spibey C, Dunn MJ. Postelectrophoretic staining of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using SYPRO dyes. *Electrophoresis*. 2000; 21 (17): 3657-3665. doi: 10.1002/1522-2683(200011)21:17<3657::AID-ELPS3657>3.0.CO;2-2.
40. Villegas-Rivera GA, Torres-Madronero MC, Rothlisberger-Booth S, Delgado-Trejos E. Procesamiento de imágenes de electroforesis bidimensional: una revisión. *Scientia Et Technica*. 2019; 24 (1): 76-84.
41. Kendrick N, Darie CC, Hoelter M, Powers G, Johansen J. Correction to: 2D SDS PAGE in combination with western blotting and mass spectrometry is a robust method for protein analysis with many applications. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1140: C1. doi: 10.1007/978-3-030-15950-4_47. Erratum for: *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1140: 563-574.
42. Vargas Altamirano R. Sistema informático de análisis de geles de electroforesis bidimensional: de la adquisición de imágenes a la identificación de proteínas. *Acta Nova*. 2001; 1 (1): 01-25. Disponible en: http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1683-0789200100000007&lng=es&tlng=es
43. López Farré A, González Armengol J, Mateos-Cáceres PJ, Macaya C. Horizontes de la proteómica en el diagnóstico y el tratamiento de la enfermedad cardiovascular. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*. 2008; 20 (4): 164-172.
44. Rosenfeld J, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P. In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal Biochem*. 1992; 203 (1): 173-179. doi: 10.1016/0003-2697(92)90061-b.
45. Pappin DJ, Hojrup P, Bleasby AJ. Rapid identification of proteins by peptide-mass fingerprinting. *Curr Biol*. 1993; 3 (6): 327-332. doi: 10.1016/0960-9822(93)90195-t. Erratum in: *Curr Biol*. 1993; 3 (7): 487.
46. Birhanu AG. Mass spectrometry-based proteomics as an emerging tool in clinical laboratories. *Clin Proteomics*. 2023; 20 (1): 32. doi: 10.1186/s12014-023-09424-x.
47. Abián J, Carrascal M, Gay M. Introducción a la espectrometría de masas para la caracterización de

- péptidos y proteínas en proteómica. *Proteómica*. 2008; 2: 16-35.
48. Curreem SO, Watt RM, Lau SK, Woo PC. Two-dimensional gel electrophoresis in bacterial proteomics. *Protein Cell*. 2012; 3 (5): 346-363. doi: 10.1007/s13238-012-2034-5.
 49. Begum H, Murugesan P, Tangutur AD. Western blotting: a powerful staple in scientific and biomedical research. *Biotechniques*. 2022; 73 (1): 58-69. doi: 10.2144/btn-2022-0003.
 50. Villafañez F, Gottifredi V, Soria G. Development and optimization of a miniaturized western blot-based screening platform to identify regulators of post-translational modifications. *High Throughput*. 2019; 8 (2): 15. doi: 10.3390/ht8020015.
 51. Rodríguez-Vázquez R, Mouzo D, Zapata C. Phosphoproteome analysis using two-dimensional electrophoresis coupled with chemical dephosphorylation. *Foods*. 2022; 11 (19): 3119. doi: 10.3390/foods11193119