

Marcadores peptídicos para determinar el origen animal en productos cárnicos procesados

Sentandreu MA^a, Mora L^b, Gerrish C^a, Halket JM^a, Patel RK^a, Fraser PD^a, Bramley PM^a.

^aCentre for Chemical and Bioanalytical Sciences, Royal Holloway, University of London, Egham TW20 0EX, U.K. ^bInstituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), P.O. Box 73, 46100 Burjassot, Valencia, Spain

Introducción

Para la mayoría de los alimentos existe una obligación legal de etiquetar los distintos constituyentes contenidos en ellos, con el fin de que el consumidor tenga información objetiva sobre los productos que compra. Para cumplir con este objetivo es necesario disponer de métodos de análisis robustos, precisos y sensibles. Los métodos de detección de ADN que se emplean normalmente para este propósito suelen ser poco fiables y precisos cuando se emplean en el análisis de alimentos procesados. Las modernas técnicas de proteómica empleando la espectrometría de masas pueden ser una alternativa sólida en la identificación del origen animal de los productos cárnicos cocinados.

Material y métodos

100 g de carne de pollo y otros tantos de carne de cerdo se cocinaron en un horno a 200 °C. Posteriormente se picaron las carnes y se homogeneizaron separadamente con 10 mL de tampón Tris, pH 8.0. El homogenado se centrifugó (20 min a 10000 rpm, 4°C), recogiendo el precipitado y solubilizándolo en el tampón Tris pH 8.0 conteniendo 6M de urea y 1 M de tiourea. Se añadió la cantidad necesaria del extracto de pollo en el extracto de carne para obtener un extracto mixto de carne de cerdo conteniendo un 1 % de proteínas de pollo. 2,5 mg de este extracto mixto se fraccionaron por isoelectroenfoque en el intervalo de pH 4-7. Las proteínas de las fracciones obtenidas se separaron en SDS-PAGE, recortando la banda correspondiente a la isoforma 3 de la cadena ligera de miosina (MLC-3) para hidrolizarla posteriormente con tripsina. Después de desalar las muestras con puntas Zip-tip, 1,5 µL de cada muestra se depositaron en una placa MALDI, añadiendo a continuación el mismo volumen de una solución de ácido 2,5-dihidroxibenzoico. Una vez secas, las muestras se analizaron empleando un

espectrómetro de masas MALDI-TOF Reflex III (Bruker Daltonics).

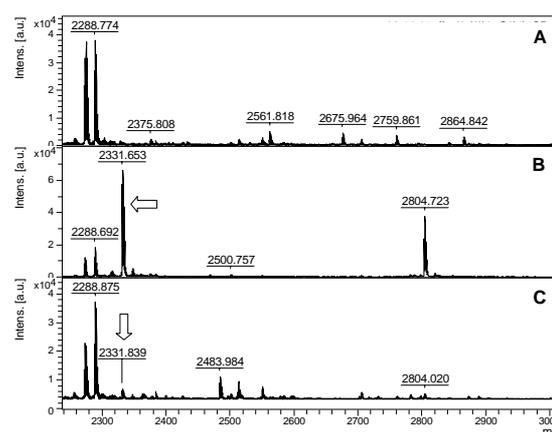


Figura 1: Espectros de masas MALDI-TOF de las digestiones con tripsina de MLC-3 obtenidas para: A) cerdo 100 %, B) pollo 100 % y C) 1% de pollo en un extracto de cerdo. La flecha blanca indica el péptido seleccionado como biomarcador para detectar la carne de pollo.

Resultados

Este trabajo se desarrolló elaborando un extracto mixto de carne conteniendo un 1 % de proteínas de pollo contaminando el extracto de carne de cerdo. El enriquecimiento de las proteínas de pollo empleando isoelectroenfoque y SDS-PAGE es una etapa crucial para poder identificar marcadores peptídicos específicos con capacidad para detectar la presencia de carne de pollo en productos cárnicos de cerdo. La Figura 1 muestra el análisis por espectrometría de masas MALDI-TOF de la fracción enriquecida en MLC-3 de pollo del extracto mixto y digerida posteriormente con tripsina. El estudio detallado de los péptidos específicos de la MLC-3 de pollo permitió identificar el péptido HVLATLGEKMTEEEVEELMK (M+H⁺ 2332, correspondiente a la forma monooxidada) como un buen biomarcador de la presencia de pollo en productos cárnicos cocinados, aún en concentraciones tan bajas como el 1%.

Conclusiones

La proteómica supone una alternativa robusta y precisa para detectar la presencia de distintas es-

pecies animales en productos cárnicos cocinados, superando las limitaciones que los métodos de detección de ADN presentan actualmente en alimentos procesados.

Determinación y validación de dianas implicadas en la carcinogénesis del osteosarcoma infantil mediante plataformas de genómica y proteómica

Zalacain M, Folio C, Corrales FJ, Mora MI, Sierrasesúmaga L, Toledo G, Patiño-García A.

Introducción

El osteosarcoma es el tumor óseo más frecuentemente diagnosticado en la infancia y adolescencia. La tasa de supervivencia con la quimioterapia disponible en la actualidad se sitúa en 70%, únicamente limitada en aquellos pacientes con tumores metastásicos o quimiorresistentes (Picci, 2007).

Material y métodos

Se han aislado osteoblastos normales y tumorales de 5 pacientes afectados de osteosarcoma. Los análisis comparativos de sus proteomas se realizaron mediante DIGE (150µg proteína/gel). Los análisis de imagen se realizaron con Decyder y las bandas diferenciales se localizaron en geles bidimensionales preparativos (400µg proteína/gel) que se tiñeron con SYPRO-Ruby y se cortaron para su identificación. Se realizó digestión en gel con tripsina y los péptidos resultantes se analizaron mediante MALDI-TOF-MS y nanoLC-ESI-MS/MS para identificar las proteínas utilizando los motores de búsqueda Proteinlynx Global Server y Phenyx. Las proteínas, identificadas en Swissprot, se validaron mediante IHQ en un TMA (*tissue microarray*) compuesto por 233 puntos de tejido (46 pacientes): hueso normal (17,2%), osteosarcomas primarios (37,3%), recidivas (10,1%) y metástasis (35,4%).

Resultados

Se han identificado 58 puntos proteicos diferencialmente expresados, de las que se han obtenido 27 identificaciones. Las proteínas con mayores diferencias entre hueso normal y osteosarcoma se cotejaron con una lista de genes obtenida de la comparación de los mismos tejidos mediante el *array* de expresión GeneChip/HG-U133A (Affymetrix). Entre otras, las siguientes dianas eran comunes en ambos estudios: CRYAB (Incrementada en osteosarcoma, I), HEBP1 (disminuida, D), hnRNH1 (D), PCBP1 (D), EZRI (D), FSCN (D) y LMNA (D). Se ha validado en TMA la proteína CRYAB detectándose, no sólo un incremento significativo en los tumores ($p < 0.01$), sino un incremento progresivo en estadios avanzados de la enfermedad; tumores primarios vs metástasis vs recidivas ($p = 0,011$).

Conclusiones

El estudio comparativo mediante plataformas de genómica y proteómica y la validación en sistemas de alto rendimiento es un método útil para determinar dianas implicadas en patologías infrecuentes y de muestra escasa y de difícil acceso, como el osteosarcoma infantil.

Bibliografía

Picci P. Osteosarcoma (Osteogenic sarcoma). 2007. Orphanet Journal of Rare Diseases;2:6.