

## Análisis proteómico de la vía de señalización de CLEC-2 en plaquetas humanas mediante 2D-DIGE y 2-DE combinado con tinción con SyproRuby: comparación de ambas aproximaciones experimentales

Isaac Rosa<sup>1,2</sup>, Andrés F. Parguiña<sup>1,2</sup>, María G. López<sup>1</sup>, Ángel García<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España; <sup>2</sup> Centro de Investigación en Medicina Molecular y Enfermedades Crónicas (CIMUS), Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela, España

[angel.garcia@usc.es](mailto:angel.garcia@usc.es)

En los últimos años la vía de señalización de CLEC-2 en plaquetas se ha convertido en un importante campo de estudio debido a su potencial terapéutico en las enfermedades trombóticas. El agonista exógeno de CLEC-2 es la rhodocytin, una proteína aislada del veneno de la víbora *Calloselasma rhodostoma*. El objetivo de este estudio fue analizar mediante proteómica basada en 2-DE y DIGE la vía de señalización de CLEC-2.

Se comparó el proteoma de plaquetas sin activar y activadas con rhodocytin (300 nM). Se llevaron a cabo dos estudios en paralelo: 2-DE y tinción con SyproRuby y 2D-DIGE. La primera dimensión fue en tiras de 24 cm y pl 4-7, y la segunda en geles del 11% SDS-PAGE. El análisis de imagen se realizó con el software SameSpots y las proteínas de interés se identificaron mediante Maldi-Tof/Tof y se validaron mediante western blot.

En el análisis DIGE se encontraron 73 diferencias significativas (cambios de expresión de al menos 1,5) de las que se identificaron 63, correspondientes a 51 proteínas únicas. De éstas, un 25,5 % eran proteínas de señalización. En el caso del análisis 2-DE se obtuvieron 43 diferencias significativas de las que se identificaron 41, que se correspondían con 26 proteínas únicas. Las proteínas de señalización constituyeron un 26,9 % del total. En total se identificaron 65 proteínas únicas (p.ej. CrkL, Dok-2, Grb-2, pleckstrina...) de las cuales 12 coincidieron entre ambos estudios. Aunque las ventajas del DIGE son conocidas, existe el inconveniente – además del coste - de la necesidad de correr un gel semipreparativo y de la precisión en la co-localización de spots en dicho gel (necesario para la identificación por masas).

En conclusión, este estudio ha aportado información novedosa sobre cambios en el proteoma plaquetario tras la activación de CLEC-2. 2-DE/SyproRuby y 2D-DIGE aportaron informaciones complementarias.