

CUANTIFICACIÓN SIMULTÁNEA DE CINCO PROTEÍNAS DE FASE AGUDA EN PLASMA PORCINO MEDIANTE UN MÉTODO UPLC-SRM/MS

Tor^{1*}, M., Palacín-Chauri¹, R.J., Fraile¹, L. y Pena¹, R.N.

¹ Departament de Ciència Animal, Universitat de Lleida – AGROTECNIO-CERCA Center, Lleida
*marc.tor@udl.cat

INTRODUCCIÓN

Las proteínas de fase aguda (PFA) son proteínas plasmáticas cuya concentración está relacionada con la inflamación y se modifica después de un traumatismo o una infección. Su análisis es de utilidad tanto en el diagnóstico veterinario como en el seguimiento de los tratamientos y la evolución de las enfermedades (Murata *et al.*, 2004). También puede tener aplicación en la monitorización del bienestar animal, así como en la evaluación del potencial de crecimiento de los animales de producción (Eckersall, 2000) e incluso en el ámbito de la seguridad alimentaria (Saco y Bassols, 2022). Los métodos de análisis inmunoenzimáticos habituales pueden tener problemas de especificidad y difícilmente pueden ser multiplexados (Vidoba *et al.*, 2019). Mediante los métodos UPLC-SRM/MS (ultra-performance liquid chromatography-selected reaction monitoring mass spectroscopy) se podrían solventar tales inconvenientes e incluso distinguir isoformas o modificaciones post-transcripcionales de las proteínas. El objetivo de este trabajo es la cuantificación simultánea de cinco PFAs porcinas tanto positivas (incremento tras el estrés, Haptoglobina, Pig-MAP, proteína C-reactiva y proteína amiloidea sérica A1) como negativas (disminución tras el estrés, Apolipoproteína A1) mediante un método UPLC-SRM/MS.

MATERIAL Y MÉTODOS

A partir de la secuencia de aminoácidos de cada isoforma de las proteínas candidato, se realizó una digestión "*in silico*", mediante el software Skyline (MacLean *et al.*, 2010) obteniéndose todas las posibles transiciones candidato. Dichas transiciones se monitorizaron en un *pool* digerido de plasma, mediante un sistema UPLC-TQ XevoTQS (Waters, Milford, MA, USA). Posteriormente se construyó el método SRM en dos fases. Primero, a través de Sequence-Specific Retention Calculator 3.0, implementado en SkyLine. En segundo lugar, confirmando visualmente la coelución de al menos tres transiciones para cada péptido. Finalmente se realizó una validación cruzada con métodos inmunoenzimáticos para la Haptoglobina, Pig-MAP y proteína amiloidea sérica A1 en 60 cerdos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la primera fase se obtuvo un total de 17.820 transiciones teóricas posibles para las distintas isoformas estudiadas: Haptoglobina (2 isoformas), Pig-MAP (8 isoformas), proteína amiloidea sérica A1 (3 isoformas), proteína C reactiva (7 isoformas) y Apolipoproteína A1 (2 isoformas). Una vez realizado el refinado de los datos, fue posible encontrar péptidos cuantificables comunes a todas las isoformas, para todas las proteínas candidato, excepto para la proteína amiloidea sérica A1. Por otro lado, se encontraron péptidos cuantificables únicos para 1 isoforma de la Haptoglobina, 3 isoformas de la Pig-MAP, 1 isoforma de la proteína amiloidea sérica A1, 2 isoformas de la proteína C reactiva y 2 isoformas de la Apolipoproteína A1. Los coeficientes de correlación entre los péptidos proteotípicos y los valores de las PFAs determinados por métodos inmunoenzimáticos fueron de 0,55; 0,54 y 0,14 para la Haptoglobina, Pig-MAP y proteína amiloidea sérica A1, respectivamente.

CONCLUSIÓN

El método UPLC-SRM/MS permite cuantificar simultáneamente 9 isoformas de 5 PFAs en el plasma porcino. Dadas las correlaciones moderadas con los métodos inmunoenzimáticos, sería interesante explorar el uso de patrones internos marcados isotópicamente en la validación definitiva del método.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Murata, H., Shimada, N. & Yoshioka, M. 2003. *Vet. J.* 168: 28-40
- Eckersall, P.D. 2000. *Revue Méd. Vét.* 151: 577-584
- MacLean B., Tomazela, D.M., Shulman, N., Chambers, M., Finney, G.L., Frewen, B., Kern, R., Tabb, D.L., Liebler, D.C. & MacCoss M.J. 2010. *Bioinformatics* 26: 966-968
- Saco, Y., Bassols, A. 2022. *Vet. Clin. Pathol.* 00: 1-14.
- Vidova, V., Stuchlikova, E., Vrbova, M., Almasi, M., Klanova, J., Thon, V. & Spacil, Z. 2019. *J. Proteome Res.* 18: 380-391.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades, proyecto RTI2018-097700-B-I00.