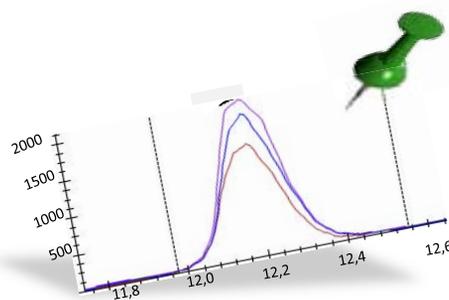
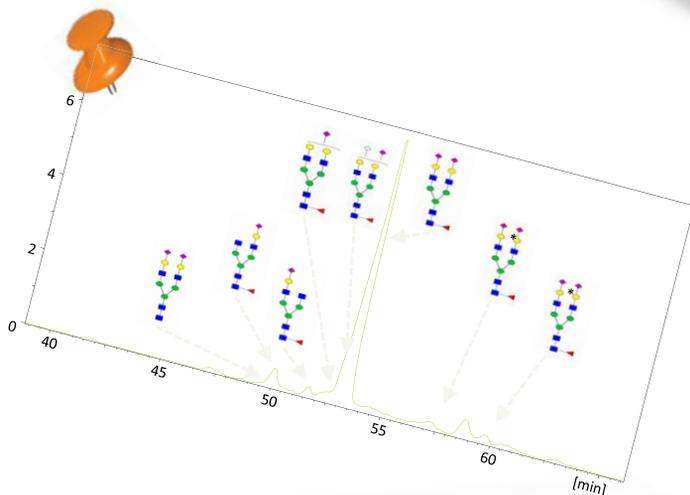
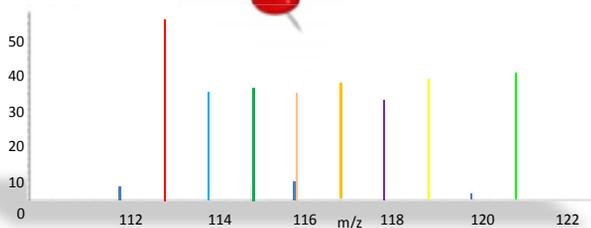
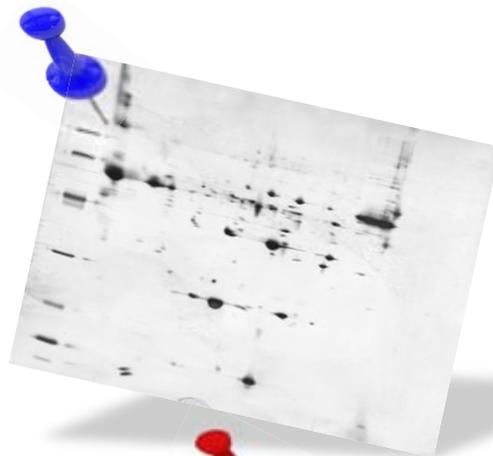
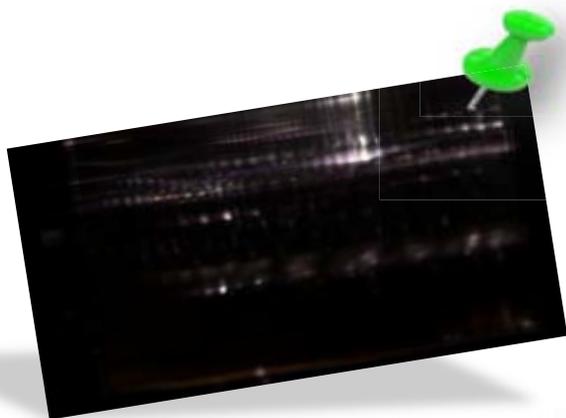


# IDENTIFICACION DE BIOMARCADORES PLASMATICOS DE BIENESTAR EN EL GANADO PORCINO MEDIANTE LA APLICACION DE TECNICAS PROTEOMICAS







Universitat Autònoma de Barcelona

**IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES  
PLASMÁTICOS DE BIENESTAR EN EL  
GANADO PORCINO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE  
TÉCNICAS PROTEÓMICAS**

Tesis Doctoral

Anna Marco Ramell

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular

Facultat de Veterinària

Universitat Autònoma de Barcelona





Universitat Autònoma de Barcelona

# IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PLASMÁTICOS DE BIENESTAR EN EL GANADO PORCINO MEDIANTE LA APLICACIÓN DE TÉCNICAS PROTEÓMICAS

Memoria realizada por

**Anna Marco Ramell**

para optar al título de Doctora

Tesis realizada bajo la dirección de la catedrática Anna Bassols i Teixidó en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària de la Universitat Autònoma de Barcelona, dentro del programa de Doctorado en Bioquímica, Biologia Molecular i Biomedicina.

Anna Marco Ramell

Anna Bassols i Teixidó

Bellaterra, julio de 2013



Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2006-02365 (Ministerio Español de Ciencia y Tecnología) y por la Acción Integrada AT 2009-0007 (Ministerio de Ciencia e Innovación) entre la Universitat Autònoma de Barcelona y la Universität Wien (Austria).

El autor ha sido beneficiario de una beca FPU (Ministerio Español de Ciencia e Investigación), para la realización del doctorado, y una beca e-COST (European Cooperation in Science and Technology) de la COST Action Farm Animal Proteomics, para la realización de una estancia en la Universitet Aarhus (Dinamarca).



## ÍNDICE

<b>ÍNDICE</b> .....	I
<b>LISTADO DE ABREVIATURAS</b> .....	VII
<b>RESÚMENES</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
1. Bienestar y estrés animal .....	15
1.1 Introducción .....	15
1.2 Respuesta de estrés .....	16
1.2.1 Hormonas de estrés .....	17
1.2.1.1 Catecolaminas y glucocorticoides .....	17
1.2.1.2 Otros péptidos y proteínas .....	19
1.2.2 Respuesta fisiológica .....	20
1.2.3 Respuesta conductual .....	21
1.3 Consecuencias del estrés .....	21
1.3.1 Consecuencias fisiológicas .....	21
1.3.1.1 Alteraciones hormonales .....	21
1.3.2 Regulación del sistema inmune .....	22
1.3.3 Aumento del estrés oxidativo .....	22
1.3.4 Otras alteraciones .....	22
1.3.2 Consecuencias en el comportamiento .....	22
2. Biomarcadores .....	23
2.1 Introducción .....	23
2.2 Marcadores de bienestar animal .....	24
2.3 Búsqueda de nuevos biomarcadores .....	28
2.3.1 Tipo de marcadores .....	28
2.3.2 Tipo de muestras .....	29
2.3.3 Técnicas .....	30
2.3.4 Etapas de la búsqueda de biomarcadores .....	31
3. Proteómica en la búsqueda de biomarcadores .....	32
3.1 Introducción .....	32
3.2 Espectrometría de masas: descripción y aplicaciones .....	33
3.2.1 Separación de la muestra .....	33
3.2.2 Digestión de la muestra .....	35
3.2.3 Espectrómetros de masas .....	35
3.2.3.1 Fuentes de ionización .....	35

3.2.3.2 Analizador .....	35
3.2.4 Identificación de proteínas .....	37
3.2.5 Cuantificación de proteínas .....	37
3.2.5.1 Cuantificación relativa .....	37
3.2.5.2 Cuantificación absoluta .....	40
3.3 Búsqueda de nuevos biomarcadores .....	41
3.3.1 <i>Bottom-up</i> .....	41
3.3.2 <i>Top-down</i> .....	42
<b>OBJETIVOS E HIPÓTESIS INICIAL</b> .....	45
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	49
1. Material .....	51
1.1 Determinación de parámetros bioquímicos en un analizador automático .....	51
1.2 ELISAs comerciales .....	52
1.3 Anticuerpos .....	52
1.4 Lectinas .....	53
1.5 Enzimas .....	53
2. Métodos .....	53
2.1 Manejo de los animales .....	53
2.2 Obtención y procesamiento de las muestras .....	54
2.2.1 Sangre .....	54
2.2.2 Saliva .....	54
2.3 Separación de proteínas en un gel: electroforesis monodimensional y bidimensional .....	54
2.3.1 Preparación de la muestra .....	54
2.3.1.1 Geles monodimensionales .....	54
2.3.1.2 Geles bidimensionales .....	55
2.3.2 Primera dimensión: separación de las proteínas por punto isoelectrónico .....	56
2.3.2.1 Polimerización de los geles IPG <i>zoom</i> .....	56
2.3.2.2 Rehidratación de las tiras IPG .....	56
2.3.2.3 Isoelectroenfoco .....	56
2.3.3 Segunda dimensión .....	57
2.3.3.1 Polimerización de los geles SDS-PAGE .....	57
2.3.3.2 Equilibración de las tiras .....	57
2.3.3.3 Electroforesis SDS-PAGE .....	58
2.4 Detección y visualización de las proteínas .....	58
2.4.1 Inmunodetección .....	58
2.4.1.1 <i>Western blot</i> .....	58
2.4.1.2 <i>Slot blot</i> .....	59

2.4.2 Tinciones .....	59
2.4.2.1 Tinción con plata .....	59
2.4.2.2 Tinción con azul de Coomassie .....	59
2.4.2.3 Tinción fluorescente Flamingo .....	60
2.4.2.4 Tinción fluorescente Sypro Ruby .....	60
2.4.3 Visualización de las proteínas marcadas con fluorocromos .....	60
2.4.4 Análisis de las imágenes .....	60
2.5 Visualización de residuos glucídicos: tinción con lectinas .....	60
2.6 Fraccionamiento del proteoma plasmático .....	61
2.7 Purificación de la haptoglobina .....	61
2.8 Digestiones enzimáticas .....	62
2.8.1 Digestión con la N-glicosidasa .....	62
2.8.2 Digestión con la O-glicosidasa y la neuraminidasa .....	62
2.9 Espectrometría de masas .....	62
2.9.1 Preparación de la muestra .....	63
2.9.1.1 <i>Spots</i> procedentes de geles bidimensionales .....	63
2.9.1.2 Muestras para iTRAQ .....	63
2.9.1.3 Muestras para SRM .....	64
2.9.1.4 Muestras para un análisis glicoproteómico .....	64
2.9.2 Identificación de los <i>spots</i> procedentes de geles bidimensionales .....	65
2.9.2.1 Huella peptídica .....	65
2.9.2.2 Espectrometría de masas en tándem .....	65
2.9.3 Cuantificación de las proteínas por espectrometría de masas .....	66
2.9.3.1 Cuantificación por iTRAQ .....	66
2.9.3.2 Cuantificación por SRM .....	67
2.9.4 Análisis glicoproteómico .....	67
2.10 Análisis estadístico .....	68
2.11 Análisis de <i>clustering</i> .....	68
<b>RESULTADOS</b> .....	69
<b>Capítulo 1: Cerdos alojados a una elevada densidad de estabulación</b> .....	71
Diseño experimental .....	71
1. Perfil bioquímico .....	72
1.1 Hormonas de estrés .....	72
1.2 Marcadores de metabolismo lipídico .....	73
1.3 Marcadores relacionados con el estado de salud .....	74
1.4 Proteínas de fase aguda .....	75
1.5 Marcadores de estrés oxidativo .....	76

2. Aproximación proteómica 2-DE DIGE .....	77
3. Estudio de la variabilidad individual .....	80
<b>Capítulo 2: Cerdas primerizas estabuladas en jaulas de gestación .....</b>	<b>83</b>
Diseño experimental .....	83
1. Perfil bioquímico .....	85
1.1 Hormonas de estrés .....	86
1.2 Marcadores de metabolismo lipídico .....	87
1.3 Marcadores relacionados con el estado de salud .....	88
1.4 Proteínas de fase aguda .....	91
1.5 Marcadores de estrés oxidativo .....	92
2. Aproximación proteómica .....	94
2.1 2-DE DIGE .....	94
2.2 iTRAQ .....	97
<b>Capítulo 3: Efecto de la infección por el circovirus porcino 2 sobre la expresión y las modificaciones postraduccionales de proteínas implicadas en la respuesta inmune .....</b>	<b>101</b>
Diseño experimental .....	102
Objetivos .....	102
1. Análisis bioquímico y proteómico general de las muestras .....	103
1.1 Perfil bioquímico acerca el estado del sistema inmune de los animales .....	103
1.2 Análisis de las muestras de suero por 2-DE DIGE .....	103
2. Caracterización estructural de la Hp y la Apo A-I .....	104
2.1 Puesta a punto de los geles <i>zoom</i> bidimensionales .....	104
2.2 Caracterización de las isoformas de la Hp .....	106
2.2.1 Aproximación clásica .....	107
2.2.2 Aproximación glicoproteómica .....	109
2.3 Caracterización de las isoformas de la Apo A-I .....	110
2.4 Caracterización de las PTMs de las inmunoglobulinas .....	112
3. Efecto de la infección por PCV2 sobre el patrón de isoformas y las PTMs de varias proteínas .....	113
3.1 Hp .....	113
3.2 Apo A-I .....	114
3.3 Inmunoglobulinas .....	115
<b>Capítulo 4: Cuantificación de las proteínas de fase aguda mediante SRM .....</b>	<b>117</b>
Diseño experimental .....	117
1. Puesta a punto y optimización del método de SRM .....	117
2. Cuantificación de las APPs .....	120
2.1 Hp .....	120

2.2 Pig-MAP .....	121
2.3 Apo A-I .....	122
2.4 AHSG .....	124
3. Reproducibilidad de la técnica .....	124
<b>DISCUSIÓN</b> .....	127
1. Perfil de laboratorio para la evaluación del bienestar animal .....	129
1.1 Hormonas de estrés .....	129
1.2 Marcadores de metabolismo lipídico .....	131
1.3 Marcadores relacionados con el estado de salud .....	132
1.4 APPs y péptidos antimicrobianos .....	134
1.4.1 APPs .....	134
1.4.2 Péptidos antimicrobianos .....	139
1.5 Marcadores de estrés oxidativo .....	139
1.6 Proteínas de origen celular .....	142
2. Isoformas y modificaciones postraduccionales.....	144
2.1 Caracterización estructural de la Hp y las inmunoglobulinas A y G .....	144
2.2 Caracterización estructural de la Apo A-I .....	145
3. Uso de técnicas proteómicas en el suero porcino .....	147
3.1 2-DE DIGE .....	147
3.2 Geles <i>zoom</i> .....	148
3.3 iTRAQ .....	149
3.4 Glicoproteómica .....	149
3.5 SRM .....	150
<b>CONCLUSIONES</b> .....	151
<b>REFERENCIAS</b> .....	155
<b>ANEXOS</b> .....	179
Anexo 1. Interpretación de los otros resultados de iTRAQ .....	181
Anexo 2. Localización de los péptidos proteotípicos en la secuencia proteica .....	183
Anexo 3. Artículos .....	185



## ABREVIATURAS

Abreviatura	Castellano	Inglés
<b>1-DE</b>	Electroforesis monodimensional	Monodimensional electrophoresis
<b>2-DE</b>	Electroforesis bidimensional	Bidimensional electrophoresis
<b>3-BHB</b>	3 $\beta$ -hidroxibutirato	3 $\beta$ -hydroxybutyrate
<b>ABC</b>	Bicarbonato amónico	Ammonium bicarbonate
<b>ACN</b>	Acetonitrilo	Acetonitrile
<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotropa	Adrenocorticotropic hormone
<b>AHSG</b>	Glicoproteína $\alpha$ 2-Heremans Schmid	$\alpha$ 2-Heremans Schmid-glycoprotein
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa	Alanine aminotransferase
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina	Alkaline phosphatase
<b>Apo A-I</b>	Apolipoproteína A-I	Apolipoprotein A-I
<b>Apo E</b>	Apolipoproteína E	Apolipoprotein E
<b>Apo M</b>	Apolipoproteína M	Apolipoprotein M
<b>APP</b>	Proteína de fase aguda	Acute phase protein
<b>AVP</b>	Arginina vasopresina	Arginine vasopressin
<b>CBG</b>	Globulina de unión a corticosteroides	Corticosteroid binding globulin
<b>CHAPS</b>	Sulfonato de 3-[(3-cholamidopropil) dimetilamonio]-1-propano	3-[3-cholamidopropyl] dimethylammonio]-1-propane-sulfonat
<b>CHCA</b>	Ácido alfa-ciano-4-hidroxicinámico	Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid
<b>chSp</b>	Isoforma constitutiva de las proteínas de choque térmico	Heat shock protein, constitutive isoform
<b>CID</b>	Disociación inducida por colisión	Collision-induced dissociation
<b>CK</b>	Creatina quinasa	Creatine kinase
<b>CO</b>	Grupos carbonilo	Carbonyl groups
<b>ConA</b>	Concanavalina A	Concanavalin A
<b>CRF</b>	Factor de liberación de corticotropina	Corticotropin-releasing-factor
<b>CRP</b>	Proteína C-reactiva	C-reactive protein
<b>DIGE</b>	Electroforesis bidimensional diferencial con tinción fluorescente	Fluorescence difference gel electrophoresis
<b>DNP</b>	2,4-Dinitrofenil	2,4-Dinitrophenyl
<b>DNPH</b>	2,4-Dinitrofenilhidrazina	2,4-Dinitrophenylhydrazine
<b>DTT</b>	Ditiotreitol	Dithiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminetetraacético	Ethylenediaminetetraacetic acid
<b>eGRP</b>	Isoforma extracelular de las proteínas reguladas por glucosa	Glucose-regulated protein, extracellular isoform
<b>eHsp</b>	Isoforma extracelular de las proteínas de	Heat shock protein, extracellular isoform

	choque térmico	
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	Enzyme-linked immunosorbent assay
<b>Epi</b>	Adrenalina (epinefrina)	Epinephrine
<b>ESI</b>	Ionización por electroespray	Electrospray ionization
<b>ETD</b>	Disociación por transferencia de electrones	Electron-transfer dissociation
<b>FA</b>	Ácido fórmico	Formic acid
<b>GC</b>	Glucocorticoides	Glucocorticoids
<b>GSH</b>	Glutación	Glutathione
<b>GSSG</b>	Glutación disulfuro (glutación oxidado)	Glutathione disulfide (oxidized glutathione)
<b>GPx</b>	Glutación peroxidasa	Glutathione peroxidase
<b>GR</b>	Glutación reductasa	Glutathione reductase
<b>GRP</b>	Proteína regulada por glucosa	Glucose-regulated protein
<b>GRE</b>	Elemento de respuesta a glucocorticoides	Glucocorticoid-responsive element
<b>HD</b>	Alta densidad de estabulación	High-density housing
<b>HDL</b>	Lipoproteína de alta densidad	High-density lipoprotein
<b>HPA</b>	Hipotálamo-hipófisis-corteza adrenal	Hypothalamus-pituitary-adrenal cortex
<b>Hp</b>	Haptoglobina	Haptoglobin
<b>HRP</b>	Peroxidasa de rábano	Horseradish peroxidase
<b>Hsp</b>	Proteína de choque térmico	Heat shock protein
<b>IAA</b>	Yodoacetamida	Iodoacetamide
<b>ICAT</b>	Marcaje de afinidad codificado por isótopos	Isotope-coded affinity tag
<b>ID</b>	Diámetro interno	Internal diameter
<b>IEF</b>	Isoelectroenfoque	Isoelectrical focusing
<b>IgA</b>	Inmunoglobulina A	Immunoglobulin A
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G	Immunoglobulin G
<b>iHsp</b>	Isoforma inducible de las proteínas de choque térmico	Heat shock protein, inducible isoform
<b>IL</b>	Interleuquina	Interleukin
<b>IPG</b>	Gradiente de pH inmovilizado	Immobilised pH gradient
<b>iTRAQ</b>	Marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta	Isobaric tag for relative and absolute quantitation
<b>LC</b>	Cromatografía líquida	Liquid chromatography
<b>LC-NA</b>	Neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus	Noradrenergic neurons of the locus coeruleus
<b>LD</b>	Baja densidad de estabulación	Low-density housing
<b>LDL</b>	Lipoproteína de baja densidad	Low-density lipoprotein
<b>Ltf</b>	Lactotransferrina	Lactotransferrin

<b>m/z</b>	Relación masa – carga	Mass-to-charge ratio
<b>MALDI</b>	Desorción/ionización láser asistida por matriz	Matrix-assisted laser desorption /ionization
<b>MRM</b>	Monitorización por reacción múltiple	Multiple reaction monitoring
<b>MS</b>	Espectrometría de masas	Mass spectrometry
<b>MS/MS</b>	Espectrometría de masas en tándem	Tandem mass spectrometry
<b>MW</b>	Peso molecular	Molecular weight
<b>MudPIT</b>	Tecnología multidimensional de identificación de proteínas	Multidimensional protein identification technology
<b>NEFAs</b>	Ácidos grasos no esterificados	Non-esterified fatty acids
<b>NeuAc</b>	Ácido N-acetilneuramínico	N-acetylneuraminic acid
<b>NeuGc</b>	Ácido N-glicolilneuramínico	N-glycolylneuraminic acid
<b>Nor</b>	Noradrenalina (norepinefrina)	Norepinephrine
<b>PCV2</b>	Circovirus porcino 2	Porcine circovirus 2
<b>pI</b>	Punto isoelectrico	Isoelectrical point
<b>Pig-MAP</b>	Proteína de fase aguda porcina más importante	Pig-Major acute protein
<b>PMF</b>	Huella peptídica	Peptide mass fingerprinting
<b>PMWS</b>	Síndrome del desmedro multisistémico después del destete	Postweaning multisystemic wasting syndrome
<b>PNGasa</b>	Proteína N-glicosidasa	Protein N-glycosidase
<b>PRDX2</b>	Peroxiredoxina 2	Peroxiredoxin 2
<b>PTMs</b>	Modificaciones postraduccionales	Post-translational modifications
<b>PVDF</b>	Polifluoruro de vinilideno	Polyvinylidene fluoride
<b>PVN</b>	Núcleo paraventricular	Paraventricular nucleus
<b>ROS</b>	Especies reactivas de oxígeno	Reactive oxygen species
<b>RT</b>	Temperatura ambiente	Room temperature
<b>sAA</b>	α-amilasa salival	Salivary α-amylase
<b>SAA</b>	Amiloide A sérico	Serum amyloid A
<b>SAM</b>	Sistema nervioso simpático – medula adrenal	Sympathetic nervous system – adrenal medulla
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico	Sodium dodecyl sulfate
<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato sódico	Polyacrilamide gel electrophoresis with sodium dodecyl sulfate
<b>SILAC</b>	Marcaje estable isotópico con aminoácidos en cultivos celulares	Stable isotope labeling by amino acids in cell cultura
<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa	Superoxide dismutase
<b>SRM</b>	Monitorización por reacción selectiva	Selected reaction monitoring
<b>TCA</b>	Ácido tricloroacético	Trichloroacetic acid

<b>TEAB</b>	Trietilamonio bicarbonato	Triethylammonium bicarbonate
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético	Trifluoroacetic acid
<b>TGs</b>	Triglicéridos	Tryglicerides
<b>tGSH</b>	Glutación total	Total glutathione
<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral	Tumor necrosis factor
<b>TOF</b>	Tiempo de vuelo	Time-of-flight
<b>Tris</b>	Tris(hidroximetil)aminometano	Tris(hydroxymethyl)aminomethane
<b>v/v</b>	Volumen/volumen	Volume/volume
<b>w/v</b>	Peso/volumen	Weight/volume
<b>WGA</b>	Aglutinina del germen del trigo	Wheat germ agglutinin

---

**Tabla 1.** Listado de las abreviaturas que se han utilizado a lo largo del manuscrito.

## RESÚMENES



## RESUMEN

El bienestar animal es un problema de gran importancia en el mundo de la ganadería actual debido a su relación con la seguridad y calidad alimentaria, con implicaciones legislativas y económicas. Sin embargo, los criterios actuales para evaluar el grado de bienestar aún están lejos de ser lo suficientemente objetivos y específicos. El descubrimiento de nuevos marcadores o de un perfil de marcadores relacionados con el bienestar permitiría mejorar la prevención y el tratamiento de las enfermedades, y optimizar el manejo y la productividad de los animales de granja.

El objetivo principal de esta tesis ha sido la búsqueda de biomarcadores plasmáticos de bienestar en tres situaciones a las que están expuestos habitualmente los cerdos durante su etapa productiva en las granjas de explotación porcina: la elevada densidad de estabulación, el alojamiento en jaulas individuales con fines reproductivos (práctica prohibida en España desde enero del 2013) y la infección por el circovirus porcino 2 (PCV2).

A consecuencia de la innovación y el desarrollo de las tecnologías *-ómicas*, que permiten realizar un análisis masivo de las moléculas presentes en una célula, tejido o fluido en un momento determinado, la búsqueda de nuevos biomarcadores ha tomado un fuerte impulso y se ha convertido en uno de los objetivos de mayor interés para los investigadores.

El soporte bibliográfico y el análisis diferencial mediante 2-DE DIGE e iTRAQ del proteoma sanguíneo de los animales sometidos a las dos primeras situaciones de pobre bienestar ha permitido proponer un perfil de bienestar porcino de laboratorio basado en la cuantificación de: 1) cortisol en suero y saliva; 2) parámetros relacionados con el metabolismo de los lípidos (colesterol y sus partículas transportadoras, ácidos grasos y triglicéridos); 3) indicadores del estado de salud del animal (marcadores musculares, hepáticos, renales e inmunoglobulinas); 4) proteínas de fase aguda (haptoglobina, Pig-MAP y apolipoproteína A-I) y otros componentes del sistema inmune innato (péptidos antimicrobianos); 5) marcadores de estrés oxidativo (glutación peroxidasa, superóxido dismutasa, glutación total, peroxiredoxina 2 y grupos carbonilo de las proteínas oxidadas), 6) proteínas estructurales del citoesqueleto; y 7) proteínas de choque térmico.

Además, se han caracterizado estructuralmente las isoformas proteicas de la haptoglobina y la apolipoproteína A-I mediante espectrometría de masas en tándem. Por un lado, se detectaron cadenas glucídicas de tipo N- y O- en las cuatro isoformas principales de la cadena  $\beta$  de la haptoglobina, mientras que las tres isoformas de la apolipoproteína A-I estaban oxidadas. Asimismo, se observó un comportamiento diferente entre las tres isoformas de la apolipoproteína A-I en los cerdos infectados por el virus PCV2: la isoforma que corresponde a la preproteína aumentó y las otras dos disminuyeron. En cambio, la frecuencia relativa de las isoformas de la cadena  $\beta$  y  $\alpha$  de la haptoglobina no variaron.

Por otro lado, se ha iniciado la puesta a punto de una técnica cuantitativa basada en espectrometría de masas, el SRM, para la determinación de algunas proteínas de fase aguda porcinas como la

haptoglobina, la Pig-MAP, la apolipoproteína A-I y la glicoproteína  $\alpha$ 2-Heremans Schmid. Esta tecnología se está erigiendo como una buena alternativa al uso de reactivos comerciales, que no suelen presentar reactividad contra las proteínas de origen porcino.

En los apéndices se encuentran dos artículos publicados por nuestro grupo, no incluidos en el manuscrito, pero con interés para el lector a causa de las técnicas empleadas.

## RESUM

El benestar animal és un problema de gran importància en el món de la ramaderia actual a causa de la seva relació amb la seguretat i qualitat alimentària, amb implicacions legislatives i econòmiques. No obstant, els criteris actuals per avaluar el grau de benestar d'un animal encara estan lluny de ser suficientment objectius i específics. El descobriment de nous marcadors o d'un perfil de marcadors relacionats amb el benestar permetria millorar la prevenció i el tractament de les malalties, i optimitzar el maneig i la productivitat dels animals de granja.

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat la cerca de biomarcadors plasmàtics de benestar en tres situacions a les que estan exposats habitualment els porcs durant la seva etapa productiva a les granges d'explotació porcina: l'elevada densitat d'estabulació, l'allotjament en gàbies individuals amb fins reproductius (pràctica prohibida a Espanya des del gener de 2013) i la infecció pel circovirus porcí 2 (PCV2).

A conseqüència de la innovació i el desenvolupament de les tecnologies *-òmiques*, que permeten fer un anàlisi massiu de les molècules presents en una cèl·lula, teixit o fluid en un moment determinat, la cerca de nous biomarcadors ha pres un fort impuls i s'ha convertit en un dels objectius de més interès per als investigadors.

El suport bibliogràfic i l'anàlisi diferencial mitjançant 2-DE DIGE i iTRAQ del proteoma sanguini dels animals sotmesos a les dues primeres situacions de pobre benestar ha permès proposar un perfil de benestar porcí de laboratori basat en la quantificació de: 1) cortisol en sèrum i saliva; 2) paràmetres relacionats amb el metabolisme dels lípids (colesterol i les seves partícules transportadores, àcids grassos i triglicèrids); 3) indicadors de l'estat de salut de l'animal (marcadors musculars, hepàtics, renals i immunoglobulines); 4) proteïnes de fase aguda (haptoglobina, Pig-MAP i apolipoproteïna A-I) i altres components del sistema immune innat (pèptids antimicrobians); 5) marcadors d'estrès oxidatiu (glutatió peroxidasa, superòxid dismutasa, glutatió total, peroxiredoxina 2 i grups carbonil de les proteïnes oxidades); 6) proteïnes estructurals del citosquelet; i 7) proteïnes de xoc tèrmic.

A més, s'han caracteritzat estructuralment les isoformes proteiques de l'haptoglobina i l'apolipoproteïna A-I mitjançant espectrometria de masses en tàndem. Per una banda, es van detectar cadenes glucídiques de tipus N- i O- a les quatre isoformes principals de la cadena  $\beta$  de l'haptoglobina, mentre que les tres isoformes de l'apolipoproteïna A-I estaven oxidades. Així mateix, es va observar un comportament diferent entre les tres isoformes de l'apolipoproteïna A-I en els porcs infectats pel virus PCV2: la isoforma que correspon a la preproteïna va augmentar i les altres dos van disminuir. En canvi, la freqüència relativa de les isoformes de la cadena  $\beta$  i  $\alpha$  de l'haptoglobina no va variar.

Per una altra banda, s'ha iniciat la posta a punt d'una tècnica quantitativa basada en espectrometria de masses, el SRM, per a la mesura d'algunes proteïnes de fase aguda porcines com ara l'haptoglobina, la Pig-MAP, l'apolipoproteïna A-I i la glicoproteïna  $\alpha 2$ -Heremans Schmid. Aquesta tecnologia s'està erigint

com una bona alternativa a l'ús dels reactius comercials, que no solen presentar reactivitat contra les proteïnes d'origen porcí.

Als apèndixs s'hi troben dos articles publicats pel nostre grup, no inclosos al manuscrit, però amb interès pel lector a causa de les tècniques emprades.

## SUMMARY

Animal welfare is an issue of great importance due to its relationship with food safety and quality, and its legislative, economic, ethical and public opinion implications. However, the current criteria for assessing the degree of animal welfare are still far from being sufficiently objective and specific. The discovery of new markers or combination of markers associated to welfare would improve the prevention and treatment of diseases, and optimize the management and productivity of farm animals.

The main aim of this thesis was the search for new serum biomarkers in three common situations in the pig farm which adversely affect the well-being of the animals: the high density housing, the accommodation in individual cages for breeding purposes (practice banned in Spain since January 2013) and the infection with porcine's circovirus 2 (PCV2).

As a result of the innovation and development of the -omics technologies, which allow a massive analysis of the molecules present in a cell, tissue or fluid at a given time, the search for new biomarkers has taken a strong run and has become one of the most common goals among researchers.

Bibliographical support and experimental analysis of differential serum proteome of animals subjected to these two first situations of poor welfare with 2-DE DIGE and iTRAQ has led to propose a profile of laboratory-based parameters based on 1) cortisol in serum and saliva; 2) lipid metabolism parameters (cholesterol and its transporting particles, fatty acids and triglycerides), 3) indicators of the health of the animal (muscle, liver and kidney markers and immunoglobulins), 4) acute phase proteins (haptoglobin, Pig-MAP and apolipoprotein A-I) and other components of the innate immune system (antimicrobial peptides), 5) oxidative stress markers (glutathione peroxidase and total glutathione, superoxide dismutase, peroxiredoxin 2 and carbonyl groups of the oxidized proteins) 6) filamentous cytoskeletal proteins; and 7) heat shock proteins.

Moreover, we characterized the haptoglobin and apolipoprotein A-I protein isoforms with tandem mass spectrometry. On one hand, we detected N- and O-glycan chains in the four main isoforms of the haptoglobin  $\beta$  chain, while the three isoforms of apolipoprotein A-I were oxidized. Furthermore, we observed a different behaviour between the three isoforms of apolipoprotein A-I in pigs infected with PCV2: the isoform corresponding to the preprotein increased and whereas the other two decreased. However, the relative frequency of the  $\beta$  and  $\alpha$  chain haptoglobin isoforms did not change.

On the other hand, we optimized a quantitative method based on mass spectrometry to measure several acute phase proteins as haptoglobin, Pig-MAP, apolipoprotein A-I and  $\alpha$ 2-Heremans Schmid glycoprotein. SRM is being set up as a good alternative to the use of commercial reagents, which many times have a poor reactivity against proteins of porcine origin.

Two articles published by our group, not included in the manuscript, have been added to the Appendices because their Interest to the reader and the techniques used.



## **ANTECEDENTES**



## ANTECEDENTES

Hace unos años nuestro grupo inició una línea de investigación centrada en el campo del estrés animal. Hemos trabajado, en colaboración con otros grupos, en la investigación de las proteínas de fase aguda (APPs) como marcadores de estrés en cerdos y vacas. En estos estudios hemos demostrado que la determinación de las APPs en el plasma pueden ser marcadores de estrés en situaciones concretas. Por ejemplo, en el cerdo los niveles de la haptoglobina (Hp) y la proteína inter- $\alpha$ -inhibidor cadena pesada 4 (ITIH4, también denominada *Major Acute Phase* porcina o Pig-MAP) incrementaron durante un transporte prolongado por carretera (Saco et al., 2003). Por su parte, se detectó una mayor concentración de la Hp en vacas de leche primíparas estabuladas conjuntamente con animales multíparos que las que se alojaron separadamente (Bach et al., 2005). Así pues, las situaciones de estrés en el ganado se traducen en variaciones en los niveles de proteínas plasmáticas, por lo que la evaluación de estas moléculas podría ser una aproximación adecuada para la identificación de nuevos marcadores de estrés.

Mi incorporación a nuestro grupo de investigación en 2007 se inició con la puesta a punto de las técnicas proteómicas para la búsqueda de nuevos biomarcadores plasmáticos de bienestar en la especie bovina y porcina. En aquel momento las aproximaciones proteómicas en los animales de granja eran escasas, así como el número de publicaciones al respecto, a causa de la poca representación de las proteínas de estas especies en las bases de datos públicas (Soares et al., 2012). En los últimos años, el número de estudios relacionados con el análisis proteómico de fluidos o tejidos de estos animales ha aumentado de manera considerable debido a la importancia económica del cerdo y los rumiantes en la producción de carne y leche (Guy and Fenaille, 2006; Picard et al., 2010) y al reconocimiento del cerdo como un organismo modelo en la investigación biomédica (Bendixen et al., 2010). El interés creciente en la aplicación de las técnicas proteómicas en los animales de granja ha conducido a la formación de la COST<sup>1</sup> Action *Farm Animal Proteomics*, una red formada por investigadores europeos que tiene como objetivo la divulgación del conocimiento sobre las técnicas y las aplicaciones de la proteómica en los animales de granja en relación con la producción, la salud y el bienestar animal, y la calidad y la seguridad de los alimentos de origen animal (<http://www.cost-faproteomics.org/>).

---

<sup>1</sup> COST: European Cooperation in Science and Technology



## **INTRODUCCIÓN**



## INTRODUCCIÓN

### 1. Bienestar animal y estrés

#### 1.1 Introducción

Tradicionalmente, el bienestar de los animales de granja se ha relacionado con la ausencia de enfermedad o de daño. En la actualidad, está ampliamente aceptado que los animales sanos también pueden sufrir, por ejemplo ante situaciones artificiales como la cría intensiva, la estabulación y el transporte con fines productivos (Fraser, 2008; von Keyserlingk *et al.*, 2009).

En las últimas décadas, el bienestar animal se ha convertido en un problema en el mundo de la ganadería actual, de gran importancia para la opinión pública debido a su relación con la seguridad y calidad alimentaria (European Commission, 2007), con implicaciones legislativas y económicas. Desde los años 70, la ley y la industria han acercado posiciones en los aspectos que afectan el bienestar animal (Seng and Laporte, 2005). Por ejemplo, el *Farm Animal Welfare Council* definió en 1979 y revisó en 1992 una serie de reglas, Las Cinco Libertades, para garantizar el bienestar de los animales de cría, las cuales han promovido mejoras en el sistema de cría, alojamiento y manejo de los animales: 1) ausencia de sed, hambre y malnutrición; 2) ausencia de incomodidad física y térmica; 3) ausencia de enfermedades y lesiones; 4) libertad para expresar un patrón de comportamiento normal y 5) ausencia de miedo, dolor y estrés (Farm Animal Welfare Council, 1992, 1979).

Bienestar animal es un concepto abstracto que no hace referencia a las acciones del hombre, sino que se trata de una característica inherente del animal (Duncan, 1981). El bienestar puede variar desde muy bueno a muy pobre, presentar múltiples manifestaciones y su naturaleza puede variar entre individuos, así como a lo largo de la vida del animal (Curtis, 1985). No existe una única definición del concepto, sino tres enfoques diferentes que abordan su significado (Fraser, 2008):

- *Funcionalidad biológica.* El bienestar viene determinado por el estado de salud del animal y su capacidad de adaptación al ambiente.
- *Emociones.* El bienestar y el comportamiento del animal vienen determinados por la intensidad y duración de las emociones positivas (placer o confort) y de las emociones negativas (dolor, miedo o ansiedad) que experimenta el individuo.
- *Comportamiento.* El bienestar viene determinado por el comportamiento del animal. Cuanto menor sea la diferencia en la conducta que muestra el animal respecto a la que adoptaría en su entorno natural, mayor es su bienestar.

La definición de bienestar más utilizada entre los científicos es la de Donald Broom, de la escuela de la funcionalidad biológica: "*El bienestar animal viene determinado por el resultado obtenido en los intentos del individuo de adaptarse al medio que lo rodea*" (Broom, 1986). Esta escuela considera que el bienestar es bueno si el animal se adapta a su entorno con el mínimo coste biológico. Por el contrario, el

bienestar es pobre si el animal no logra adaptarse, y consecuentemente, sufre o muere. Cuando el animal consigue adaptarse con cierto coste biológico, se considera que está estresado (Broom, 1991).

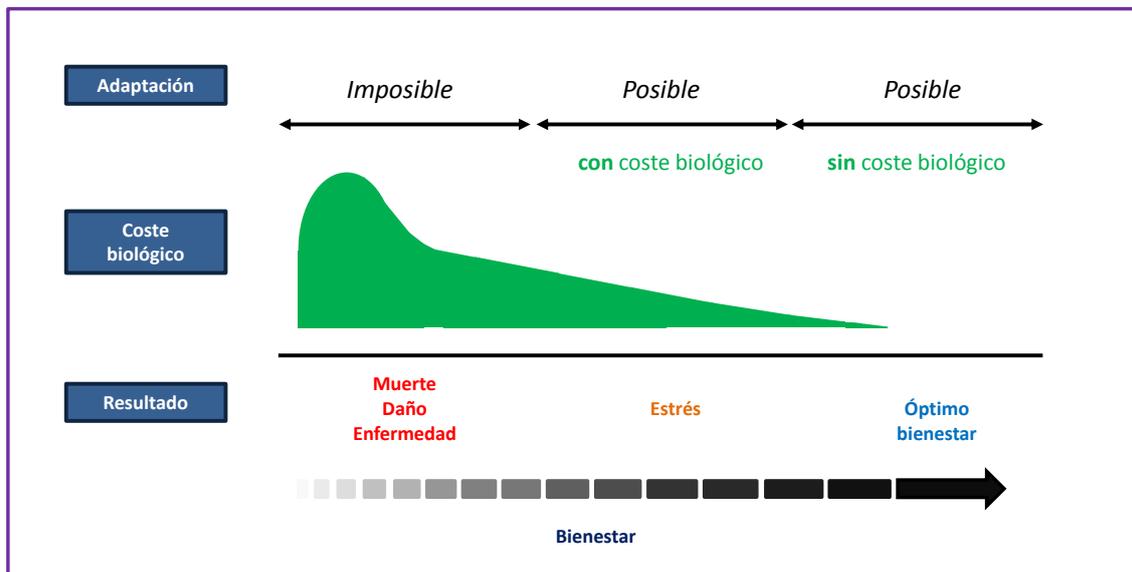


Figura 1. Bienestar, adaptación y coste biológico. Adaptado de Broom and Johnson (1993).

Hans Selye, considerado el "padre del estrés" y seguidor de la escuela de la funcionalidad biológica, acuñó en 1936 la definición más popular de estrés: "El estrés es la respuesta inespecífica del organismo ante cualquier estímulo o amenaza que puede poner en peligro la homeostasis del individuo" (Selye 1936).

Un estresor es un estímulo que puede poner en peligro la homeostasis y el bienestar de un individuo (Pacak and McCarty, 2009). Un estresor puede ser ambiental (temperaturas extremas, humedad, viento, fotoperiodo o alojamiento inadecuado para cubrir las necesidades del animal), nutricional (falta de comida o de agua), social (aislamiento, elevada densidad de estabulación o mezcla con otros animales), interno (enfermedad o infección), etc. Los estresores se clasifican según su duración, intensidad y frecuencia:

- *Estresor agudo.* Se trata de un estresor de corta duración o poco intenso.
- *Estresor crónico.* Se trata de un estresor de larga duración o que se repite con frecuencia.

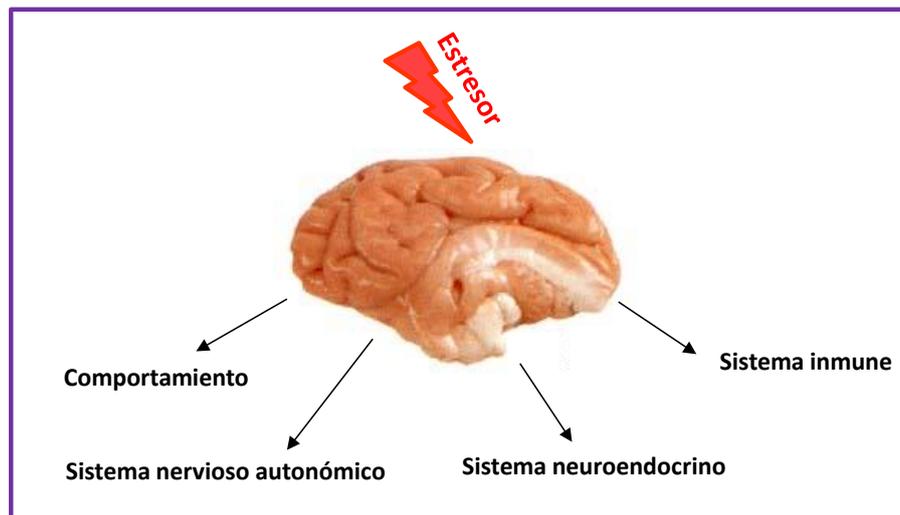
## 1.2 Respuesta de estrés

Ante la presencia de un estresor, el individuo pone en marcha un conjunto de recursos, conocidos como respuesta de estrés, con el fin de afrontar y superar la amenaza, y de restablecer la homeostasis en el organismo (von Borell *et al.* 2007). La respuesta de estrés es necesaria para la supervivencia del animal y viene determinada por (Manteca, 2009):

- *Estresor:*
  - *Naturaleza del estresor.* Intensidad, duración y frecuencia del estresor.

- *Presencia de otros estresores.* Los estresores poseen un carácter aditivo: varios estresores a la vez pueden tener un efecto tan grande como el que provocaría un único estímulo de gran intensidad.
- *Intrínsecas del individuo:*
  - *Estado mental y físico, genética y edad.*
  - *Experiencia previa.* Un nuevo estímulo conlleva novedad e incertidumbre, mientras que uno percibido con anterioridad suele ser predecible y controlable.
- *Otros factores:* condiciones ambientales, dieta, estatus social, etc.

Como resultado de la percepción de una amenaza, se secretan elevadas concentraciones de un conjunto de moléculas, conocidas como hormonas de estrés, entre las que destacan las catecolaminas y los glucocorticoides (Kudielka and Kirschbaum 2007). Éstas son las responsables de los cambios fisiológicos y conductuales que sufre el organismo durante la respuesta de estrés (Moberg, 2000).

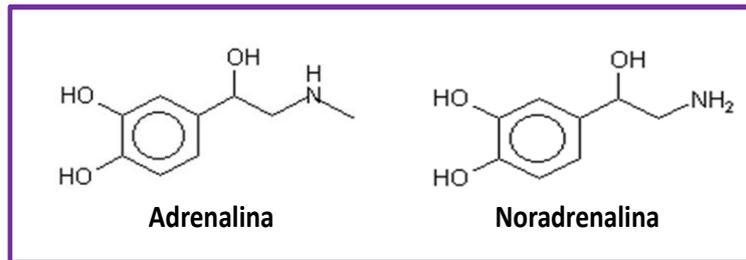


**Figura 2.** Consecuencias del estrés sobre el organismo. Extraído de Moberg (2000).

## 1.2.1 Hormonas de estrés

### 1.2.1.1 Catecolaminas y glucocorticoides

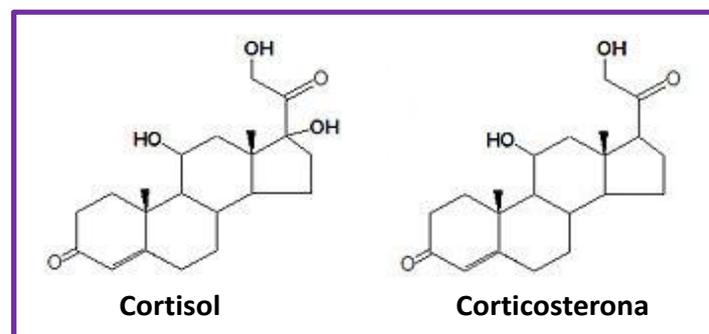
Las catecolaminas son moléculas que pueden actuar como neurotransmisores u hormonas. Están formadas por un grupo catecol y una cadena lateral con un grupo amino, y se sintetizan a partir del aminoácido tirosina. Durante la respuesta de estrés, destacan las catecolaminas noradrenalina (o norepinefrina, Nor) y adrenalina (o epinefrina, Epi).



**Figura 3.** Estructura de la adrenalina y la noradrenalina.

Las catecolaminas se originan a partir de la estimulación del eje neuroendocrino simpático-adrenomedular (SAM). La mayor parte de la Nor se origina en las neuronas noradrenérgicas del locus coeruleus (LC-NA), el cual actúa sobre diferentes áreas del cerebro como la corteza cerebral, el sistema límbico y la médula espinal. La Nor también es sintetizada por las neuronas noradrenérgicas de los nervios postganglionares del sistema nervioso simpático (SNS), cuyas señales se transmiten a los tejidos colindantes. Por otro lado, las células cromafines de la médula adrenal, pertenecientes también al SNS, producen la Epi y un pequeño porcentaje de la Nor, las cuales son secretadas al torrente sanguíneo, mediante el cual viajan hasta los tejidos diana (Sabban, 2007).

Los glucocorticoides (GC) son hormonas esteroideas formadas por un grupo esterano y una cadena lateral que puede contener diferentes grupos funcionales. Son sintetizados a partir del colesterol y su naturaleza lipídica les permite la difusión a través de las membranas celulares, así como penetrar la barrera hematoencefálica (Remesar *et al* 1993).



**Figura 4.** Estructura del cortisol y la corticosterona.

Ante una amenaza, se hiperactiva el eje hipotálamo – hipófisis – corteza adrenal (HPA). El núcleo paraventricular (PVN) secreta el factor liberador de corticotropina (CRF, también conocido como hormona liberadora de corticotropina, CRH), producido en las neuronas parvocelulares del hipotálamo. El CRF viaja por el sistema portal-hipofisario hasta la glándula pituitaria (adenohipófisis) e induce la liberación de la hormona adrenocorticotropa (ACTH), producida en las células corticotropas. La ACTH viaja a través del sistema circulatorio hasta las glándulas suprarrenales y estimula la síntesis de glucocorticoides. Una vez producidos en la zona fascicular de la corteza adrenal, los GC son liberados al torrente sanguíneo y transportados hasta los órganos diana (Mormède *et al.* 2007). El cortisol es el GC más importante en la mayor parte de las especies, mientras que la corticosterona lo es en roedores.

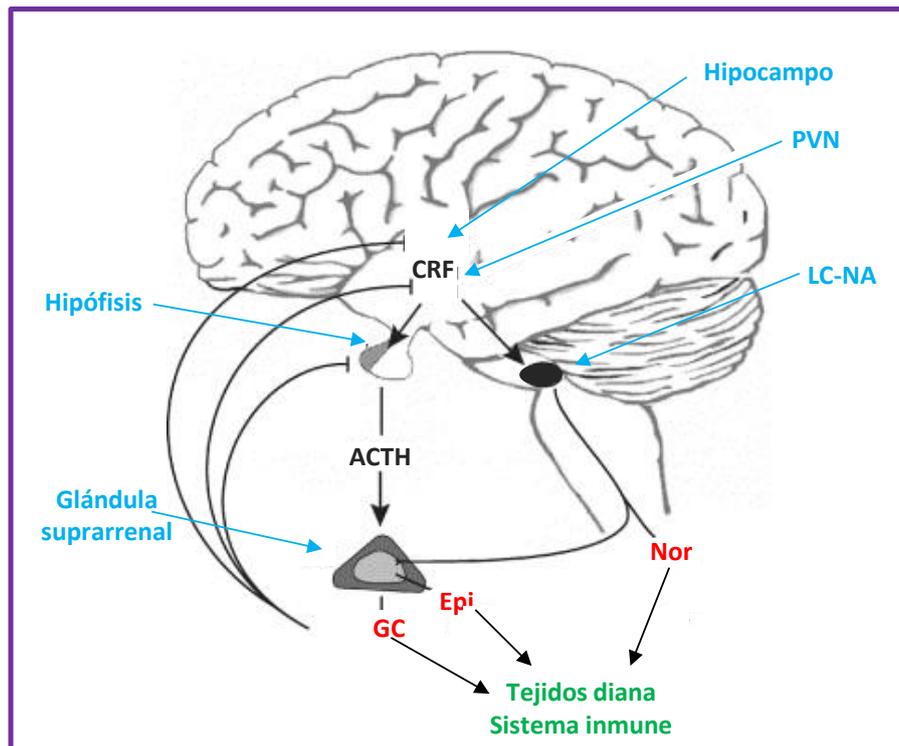


Figura 5. Inicio de la respuesta fisiológica de estrés. Adaptado de Deussing and Wurst (2005).

Durante la respuesta de estrés, la síntesis y liberación de GC y de catecolaminas se inicia, principalmente, a partir de la estimulación del PVN, del LC-NA y del sistema nervioso simpático por parte de los neurotransmisores acetilcolina y serotonina. La producción de GC y catecolaminas se retroalimenta mutuamente, con el objetivo de amplificar la respuesta de estrés. Además, otras moléculas como la hormona arginina vasopresina (AVP), de origen hipotalámico, o las interleuquinas IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ , procedentes del sistema inmune, también participan en el aumento de la producción de GC (Axelrod and Reisine, 1984; Griffin, 1989; McCann et al., 2000; O'Connor et al., 2000; Tsigos and Chrousos, 2002).

Sin embargo, la sobreproducción de las hormonas de estrés, especialmente la de los GC, puede desencadenar un proceso fisiopatológico (Fuchs and Flügge 2003), por lo que los niveles de estas hormonas en el organismo están muy controlados. El principal mecanismo de regulación de la producción de los GC es la retroalimentación negativa que ejercen los propios GC sobre el eje HPA, aunque las hormonas ACTH y CRF y las catecolaminas también pueden inhibir este eje neuroendocrino. El eje SAM viene regulado principalmente por la activación del sistema nervioso parasimpático y por los GC (Axelrod and Reisine 1984; Griffin 1989; McCann *et al.* 2000; O'Connor *et al.* 2000; Tsigos and Chrousos 2002).

### 1.2.1.2 Otros péptidos y hormonas

Asimismo, además de las hormonas de estrés comentadas previamente, existen otros péptidos y hormonas que poseen un papel crucial en la respuesta de estrés conductual resultante. Se trata de

moléculas relacionadas con el aprendizaje y la memoria, el estado de ánimo, la recompensa, el apetito, el sueño, etc., como las  $\beta$ -endorfinas y las encefalinas, la dopamina y la serotonina, los neurotransmisores acetilcolina y ácido  $\gamma$ -aminobutírico, y las hormonas CRF, ACTH, AVP, oxitocina y urocortina, entre otras (Joëls and Baram, 2009; Joëls et al., 2011). Éstas se producen durante la respuesta de estrés a consecuencia de la sobreactivación del eje HPA y de la estimulación del sistema nervioso simpático.

### 1.2.2 Respuesta fisiológica

Ante la aparición de una amenaza, las catecolaminas Nor y Epi se unen a los receptores adrenérgicos presentes en la membrana de las células diana, asociados a la proteína G, inician una serie de mecanismos celulares que conllevan a una gran variedad de cambios fisiológicos (Strosberg, 1993). Por su parte, los GC difunden en el interior de la célula y se unen a un receptor de glucocorticoides o a un receptor de mineralcorticoides, los cuales actúan como un factor de transcripción nuclear. Éste se reconoce la secuencia de DNA "elemento de respuesta a glucocorticoides" (GRE) y modula la transcripción de varios genes (Newton, 2000).

Los recursos fisiológicos que utiliza el organismo durante la respuesta de estrés tienen como objetivo principal redirigir y optimizar el consumo energético en el organismo, con el objetivo de cubrir la elevada demanda de energía que requiere la respuesta de estrés. Para ello, las hormonas de estrés modulan las siguientes acciones fisiológicas (Romero and Butler, 2007):

- *Rápido aumento de fuentes de energía en la sangre.* Las catecolaminas y los GC inducen la movilización y el catabolismo de las reservas energéticas con el fin de hacer frente a la creciente demanda energética que supone la respuesta de estrés. Estas hormonas estimulan la glucogenolisis en el músculo y el hígado y la lipólisis en el tejido adiposo, inhiben la captación de glucosa por parte de los tejidos no implicados en la respuesta de estrés, aumentan la producción de proteínas hepáticas, que participan como enzimas en la gluconeogénesis, etc.
- *Redistribución del torrente sanguíneo.* Las catecolaminas permiten que la sangre se concentre en los órganos de acción (músculo, corazón, cerebro y pulmones) para dar preferencia a aquellos recursos necesarios para hacer frente al estresor.
- *Inhibición o modulación de algunas funciones biológicas.* Los GC modulan o posponen las funciones o procesos biológicos menos relevantes ante una amenaza, como la digestión, el crecimiento o la reproducción.
- *Activación del sistema inmune.* Los GC y las catecolaminas inducen los procesos inflamatorios con el fin de retroalimentar positivamente el eje HPA activo (Elenkov and Chrousos, 2002).

Las catecolaminas desencadenan las respuestas fisiológicas al cabo de unos pocos segundos de la detección del estímulo, mientras que los efectos de los GC sobre el organismo no son inmediatos debido a los diversos pasos que conforman el eje HPA. La producción de estas hormonas se inicia al cabo de

unos pocos minutos de haber percibido el estresor y sus primeros efectos fisiológicos se detectan a partir de los 20-30 minutos del inicio de la respuesta de estrés (Romero and Butler, 2007).

### **1.2.3 Respuesta conductual**

Se han descrito dos grandes patrones de respuesta conductual durante la respuesta de estrés, los cuales dependen de la naturaleza del estresor, de cómo percibe la amenaza el animal y cómo la afronta (Koolhaas and Korte 1999; Koolhaas 2008).

En la respuesta activa el animal muestra una elevada agresividad y control territorial ante la aparición de un estresor físico. Fisiológicamente predominan las acciones de las catecolaminas, las cuales permiten al individuo aumentar su estado de alerta, incrementar su tasa cardiaca y respiratoria, mejorar sus reflejos motores, etc.

En cambio, la respuesta conductual pasiva se caracteriza por la sumisión e inmovilidad del animal. Fisiológicamente predominan las acciones de las hormonas procedentes del eje HPA, las cuales provocan apatía, miedo, cambios de humor bruscos y el cese del comportamiento normal del individuo.

## **1.3 Consecuencias de la respuesta de estrés**

La respuesta de estrés es necesaria para la supervivencia del individuo ya que permite mantener el equilibrio interno necesario para el funcionamiento óptimo del organismo (Moberg, 2000). Sin embargo, la presencia de elevados niveles de las hormonas de estrés durante prolongados períodos de tiempo, debido a la presencia de un estresor crónico, a la activación de una respuesta fisiológica poco adecuada o a la incapacidad del organismo para finalizar la respuesta de estrés una vez superada la amenaza, conlleva a severas consecuencias para el individuo (McEwen, 2006).

Los animales de granja son propensos a experimentar un pobre bienestar y a sufrir las consecuencias del estrés porque la selección genética y la presión ambiental han orientado su metabolismo hacia la productividad, en vez de hacia mecanismos de defensa (Dantzer and Mormède 1983). La muerte precoz del animal puede indicar que los mecanismos fisiológicos utilizados no fueron lo suficientemente eficaces para superar la situación estresante (Moberg, 1985).

### **1.3.1 Consecuencias fisiológicas**

#### **1.3.1.1 Alteraciones hormonales**

Elevadas concentraciones de las hormonas de estrés afectan severamente la secreción de varias moléculas de origen hipotalámico e hipofisario, provocando el retraso o la inhibición del crecimiento (Emack et al., 2008) y de la reproducción del individuo (Dobson and Smith 2000), la disminución de la actividad tiroidea (Cremaschi *et al.* 2000), una menor actividad productiva (Caroprese *et al.* 2010), etc.

### 1.3.1.2 Regulación del sistema inmune

Desde un punto de vista fisiológico, la respuesta de estrés y la respuesta inmunológica son mecanismos biológicos muy similares ya que ambas respuestas poseen mecanismos para detectar los estímulos que pueden alterar la homeostasis, ponen en marcha una serie de recursos para combatirlos y comparten moléculas señalizadoras y receptores celulares (Reiche et al., 2004). El sistema neuroendocrino y el sistema inmune interactúan bidireccionalmente y se modulan, mediante diversos mecanismos.

Tal como se ha comentado anteriormente, durante una respuesta de estrés aguda se inducen los procesos inflamatorios con el fin de mantener la el eje HPA activo (Elenkov and Chrousos, 2002), combatir los patógenos y/o controlar el daño causado por un estresor físico (Dhabhar, 2009). El organismo entra en un estado similar a la respuesta de fase aguda (Black, 2002).

En cambio, durante una respuesta de estrés crónica se activa la respuesta inmune humoral en detrimento de la respuesta celular con el fin de mantener la respuesta inmune bajo control y minimizar el daño que el sistema inmune puede provocar en caso de sobreactivación (Elenkov, 2004). Esta situación aumenta el riesgo de sufrir infecciones y enfermedades, puede activar infecciones latentes, reducir la capacidad de regenerar las heridas, acelerar la progresión tumoral, etc. (Webster Marketon and Glaser, 2008).

### 1.3.1.3 Incremento del estrés oxidativo

Durante la respuesta de estrés aumenta el estrés oxidativo debido a la rotura del equilibrio oxidativo existente en la célula en condiciones fisiológicas, entre moléculas prooxidantes y moléculas antioxidantes, a favor de las primeras. Si el estresor es agudo, este equilibrio se restablece una vez superada la amenaza, mientras que una prolongada exposición a las hormonas de estrés es perjudicial para el funcionamiento del organismo (Costantini *et al.* 2011).

El estrés oxidativo provoca un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y la aparición de lípidos, DNA y proteínas modificados en el interior celular, los cuales interfieren de manera directa en la expresión de numerosos genes y vías de transducción de la señal, relacionados con los mecanismos de proliferación, diferenciación celular, angiogénesis, apoptosis e inflamación (Valko et al., 2007).

### 1.3.1.4 Otras alteraciones fisiológicas

A causa de una elevada exposición a las hormonas de estrés, se ha descrito otras alteraciones fisiológicas, como la aparición de trastornos metabólicos (Pervanidou and Chrousos 2011), atrofia de los tejidos (Marin et al., 2011), hipertensión (Lambert and Lambert 2011), alteraciones gastrointestinales (Ochi et al., 2008) y dermatológicas (Evers et al., 2010), etc.

### 1.3.2 Cambios en el comportamiento

Un exceso de las hormonas de estrés puede afectar a diversas vías neuronales, provocando cambios en el estado de ánimo del individuo, como depresión, ansiedad y psicosis (Femenía et al., 2012). Estos

cambios de humor provocan apatía (Rygula *et al.* 2005) y anorexia (Iio *et al.* 2012), modifican el comportamiento exploratorio (Lupien and McEwen 2009), reducen la capacidad de descansar y de dormir (Meerlo *et al.* 2008), etc.

La incapacidad del animal de llevar a cabo un comportamiento normal conlleva, a menudo, la aparición de estereotipias. Se trata de patrones de movimiento invariables y repetitivos sin un propósito obvio (Mason 1991), como el masticado en vacío, el mordisqueo de las barras de la celda, el enrollamiento de la lengua y el picaje (Mason and Rushen 2007), que se suelen expresar durante periodos de frustración (Vieuille-Thomas *et al.*, 1995).

## 2. Biomarcadores

### 2.1 Introducción

Un biomarcador es un indicador medible, característico de un estado biológico específico, que aporta información acerca de la presencia, el grado o el riesgo de contracción de un proceso patológico (Rifai *et al.*, 2006). Las características de un biomarcador vienen determinadas por el uso que se le da (Aronson, 2005). Un biomarcador ideal debería cumplir las siguientes características (Mayeux 2004):

- *Sensible.* Su expresión debería ser significativamente diferente en amplitud o duración entre el estado biológico normal y el modificado, sin la presencia de valores solapantes.
- *Específico.* La variación de sus niveles debería estar causada únicamente por la situación biológica de interés, pero no debido a la variabilidad genética y de estilo de vida existente entre individuos, ni debida a los cambios que experimenta un ser vivo a lo largo de su vida.
- *Con valor predictivo.* Su presencia o ausencia debería permitir la predicción de la enfermedad antes de que se manifestase.
- *Válido.* Su concentración debería correlacionar con las características de la patología: duración, intensidad, agresividad, etc.
- *Accesible.* Debería obtenerse fácilmente y de manera poco invasiva.
- *Fiable.* Debería existir la mínima variabilidad al medirlo diferentes días, así como entre diferentes analistas.
- *Sencillo, rápido y barato de medir.* Su análisis no requeriría un procesamiento previo y su cuantificación sería veloz y de forma automatizable, usando técnicas poco costosas.
- *Fácil de interpretar.* Su concentración sería fácilmente interpretable por el analista o el clínico.

Se recomienda poseer un perfil de biomarcadores, en lugar de sólo uno, para acotar con mayor precisión la predicción, diagnóstico, pronóstico o tratamiento de un estado patológico (Schiess *et al.*, 2009).

## 2.2 Marcadores de bienestar animal

Los biomarcadores poseen una gran importancia en la investigación veterinaria debido a que su búsqueda implica la caracterización de los procesos patológicos que sufren los animales. Sin embargo, los criterios actuales para evaluar el grado de bienestar de un animal aún no son lo suficientemente objetivos ni específicos. El descubrimiento de nuevos marcadores relacionados con el bienestar permitiría mejorar el manejo, la prevención y el tratamiento de las enfermedades de los animales domésticos y de granja (Moore *et al.*, 2007). Asimismo, un mayor conocimiento de los procesos moleculares implicados en la respuesta de estrés permitiría el desarrollo de metodologías para la selección de los animales con un genotipo o fenotipo resistente al estrés (Kumar *et al.*, 2012). Por ejemplo, los cerdos homocigotos para el gen halotano son muy susceptibles a sufrir las consecuencias del estrés (Leach *et al.*, 1996).

El biomarcador de bienestar animal ideal sería una molécula que cumpliera todas las condiciones anteriores y pudiese ser cuantificada tanto en la clínica veterinaria como en la práctica ganadera.

El marcador más utilizado hasta el momento para valorar el grado de estrés de los individuos es la concentración plasmática<sup>1</sup> de GC, principalmente cortisol y corticosterona. No obstante, los niveles de GC en la sangre presentan una elevada variabilidad (Mormède *et al.* 2007):

- Su secreción depende de la actividad circadiana.
- Éstos pueden aumentar a causa de otros factores que no suponen una amenaza como el cortejo, la cópula o la conducta exploratoria.
- Su concentración puede ser poco elevada durante una situación de estrés crónico.
- Existe una amplia variabilidad entre individuos.
- La obtención de sangre puede iniciar una respuesta de estrés.

Sin embargo, existen algunas alternativas a los niveles plasmáticos de GC, en las que se minimiza su elevada variabilidad:

- Los niveles de GC en otros fluidos biológicos, como la saliva (Hellhammer *et al.* 2009) o la leche (Verkerk *et al.*, 1998), son un indicador de estrés agudo.
- Los niveles de GC en el pelo (Russell *et al.*, 2012) o en las heces (Möstl *et al.* 2002) son marcadores de estrés crónico.

---

<sup>1</sup> Todas las menciones al plasma son aplicables también para el suero. Para agilizar la lectura del manuscrito, se utilizará en este apartado solamente uno de los dos términos, ya que ambas muestras son similares.

Los niveles de catecolaminas en plasma también son usados como marcadores de bienestar. La Epi refleja estrés fisiológico mientras que la Nor está relacionada con la actividad física (Knowles and Warriss, 2000). No obstante, la rápida secreción de estas moléculas y su corta vida media dificultan su análisis, por lo que se recomienda la obtención de la muestra justo en el momento en el que el animal percibe el estresor (Broom, 2006). Se ha propuesto la  $\alpha$ -amilasa salival (sAA) como marcador indirecto de la actividad del eje SAM debido a que la glándula salival contiene  $\beta$ -adrenoreceptores. Durante la respuesta de estrés, la Epi modularía la producción y la secreción de una serie de moléculas, entre ellas la sAA (Van Stegeren et al., 2006).

Asimismo, en algunos estudios se han analizado los niveles plasmáticos de otras hormonas implicadas en la respuesta de estrés, como la ACTH o la AVP (Knights and Smith, 2007; Mitchell et al., 1988), pero se trata de marcadores de bienestar poco utilizados en la práctica veterinaria.

En cambio, es habitual medir las acciones fisiológicas de las hormonas de estrés y sus consecuencias en el organismo, como por ejemplo la frecuencia cardiaca, la frecuencia respiratoria, la presión sanguínea y la temperatura corporal del animal (van Borell, 2001). Sin embargo, estos parámetros pueden presentar una enorme variabilidad entre individuos (Manteca and Deag, 1993).

Tanto durante la respuesta de estrés como en condiciones de ayuno, el organismo recurre a la movilización de sus reservas energéticas como la glucosa, los triglicéridos, a partir de los cuales se obtiene glicerol y ácidos grasos, y los cuerpos cetónicos, como el 3-hidroxiacetil-CoA (3-HAC), la acetona y el acetato. Además, aumentan los niveles de urea plasmática a causa del incremento del catabolismo proteico (Kaneko *et al.*, 2008), y disminuyen los de leptina, con el fin de mantener la homeostasis energética del organismo (Chilliard and Bonnet, 2001).

La deshidratación conlleva el aumento del hematocrito, que refleja la presencia de alteraciones en los niveles de electrolitos en la sangre y en el volumen de este fluido (Jain, 1993). Además, la disminución del volumen sanguíneo incrementa también la concentración de la albúmina, así como los niveles totales de proteína (Kaneko *et al.*, 2008).

El estado de salud del animal es uno de los factores más influyentes en la respuesta fisiológica y conductual resultante, por lo que es habitual evaluar marcadores relacionados con la funcionalidad biológica. A continuación se citan algunos de los marcadores más utilizados (Kaneko *et al.*, 2008):

- *Marcadores musculares.* La incidencia de lesiones, hematomas y magulladuras alteran la membrana celular y provocan la liberación de proteínas de origen muscular, como la creatina quinasa (CK) y la lactato deshidrogenasa. Éstas presentan isoformas específicas de órgano, por lo que es posible determinar qué tejido es el dañado.
- *Marcadores hepáticos.* Cuando la función hepática está alterada, aumentan los niveles plasmáticos de las enzimas alanina aminotransferasa (ALT) y fosfatasa alcalina (ALP), y varía la concentración de ácidos biliares.

- *Marcadores renales.* La función renal se puede analizar mediante varios parámetros, en el plasma o la orina: la concentración de creatinina y urea, la presencia de proteinuria o de sangre en la orina, etc.

El sistema neuroendocrino y el sistema inmune están relacionados entre sí. Además de compartir moléculas señalizadoras y receptores celulares, interactúan bidireccionalmente y se modulan (Reiche *et al.*, 2004), por lo que las moléculas del sistema inmune son un reflejo de la activación de la respuesta de estrés. Se ha utilizado también la ratio entre neutrófilos y linfocitos como indicador de bienestar, debido a que los GC inducen una situación de neutrofilia y de linfocitopenia en el organismo (Jain, 1993), y los niveles de inmunoglobulinas como marcadores de infección (Janeway Jr. *et al.*, 2003).

Las proteínas de fase aguda (APPs) son un grupo de proteínas plasmáticas cuya concentración varía en condiciones de infección, inflamación, trauma quirúrgico o estrés. Son componentes del sistema inmune innato no específico y sus niveles varían en respuesta al aumento de las citoquinas proinflamatorias durante la respuesta de fase aguda (Horadagoda *et al.*, 1999), de manera proporcional a la severidad de la alteración y/o al grado del daño (Murata *et al.*, 2004). Las APPs se clasifican de acuerdo con la magnitud del cambio de su concentración, la cual puede variar entre especies:

	<i>Incremento &gt; 10 veces</i>	<i>Incremento 2-10 veces</i>	<i>Disminución</i>
<b>Perro</b>	Amiloide A sérico Proteína C-reactiva	$\alpha$ 1-glicoproteína ácida Ceruloplasmina Fibrinógeno Haptoglobina	Albúmina Transferrina
<b>Gato</b>	$\alpha$ 1-glicoproteína ácida Amiloide A sérico	Haptoglobina	Albúmina Transferrina
<b>Cerdo</b>	Amiloide A sérico Pig-MAP Proteína C-reactiva	$\alpha$ 1-glicoproteína ácida Fibrinógeno Haptoglobina	Albúmina Apolipoproteína A-I Transferrina
<b>Vaca</b>	Haptoglobina	$\alpha$ 1-glicoproteína ácida Amiloide A sérico	$\alpha$ 2-HS-glicoproteína Albúmina Apolipoproteína A-I Transferrina
<b>Caballo</b>	Amiloide A sérico	$\alpha$ 1-glicoproteína ácida Haptoglobina Proteína C-reactiva	Albúmina Apolipoproteína A-I Transferrina
<b>Pollo</b>		$\alpha$ 1-glicoproteína ácida Amiloide A sérico Ceruloplasmina Ovotransferrina	Albúmina Apolipoproteína A-I

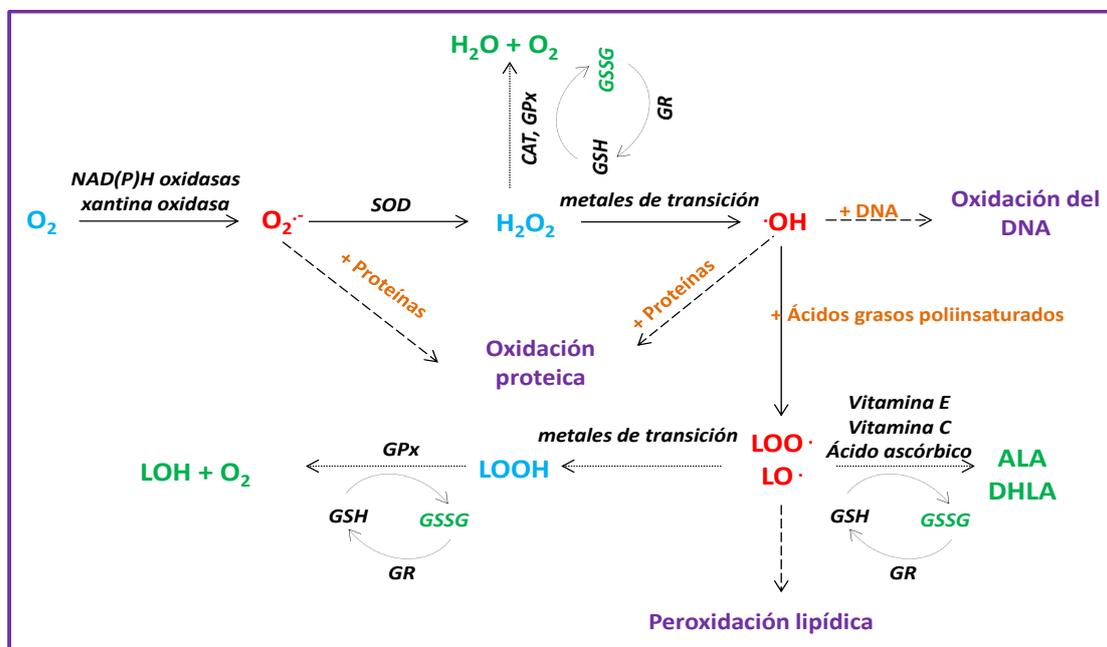
**Tabla 1.** Clasificación de las APPs más importantes en diferentes especies. Extraído de Ceron *et al.* (2005); Cray *et al.* (2009); Gruys *et al.* (2005); Murata *et al.* (2004); Petersen *et al.* (2004).

Las APPs han sido ampliamente validadas como indicadores del bienestar animal (Eckersall and Bell, 2010; Giannetto *et al.*, 2011). Asimismo, se ha sugerido que éstas serían mejores marcadores de un proceso infeccioso que las propias inmunoglobulinas (Parra *et al.*, 2006).

Para la valoración del grado de estrés oxidativo en la célula o el organismo existen diferentes aproximaciones que se pueden agrupar en dos grandes categorías (Dalle-Donne et al., 2006; Lykkesfeldt and Svendsen, 2007; Valko et al., 2007):

- *Cuantificación de las modificaciones oxidativas sufridas por las macromoléculas.* Es habitual medir los niveles del malondialdehído, el 4-hidroxi-nonenal o los isoprostanos como indicadores de la oxidación de los lípidos, y de la 8-hidroxi-2'-deoxiguanosina y los grupos carbonilos como marcadores de la oxidación del DNA y las proteínas, respectivamente.
- *Actividad o concentración de las moléculas antioxidantes:*
  - *Antioxidantes enzimáticos.* Las enzimas más analizadas son la superóxido dismutasa (SOD), que capta el radical superóxido y lo transforma en peróxido de oxígeno, la catalasa, que convierte esta última molécula en agua y la glutatión peroxidasa (GPx), que confiere a los peróxidos unas propiedades menos dañinas.
  - *Antioxidantes no enzimáticos.* Las moléculas más estudiadas son el glutatión (GSH), la vitamina C (ascorbato) y la vitamina E (tocoferol), las cuales participan en la eliminación de los lípidos ya oxidados y evitan la propagación las reacciones de oxidación en cadena.

En la figura siguiente se resume los mecanismos de acción de las principales moléculas antioxidantes:



**Figura 6.** Mecanismos de acción de las principales moléculas antioxidantes. Adaptado de Valko et al., (2007).

Nomenclatura: 1) Moléculas con características oxidativas radicales (en rojo): LO•, radical alcoxilo lipídico; LOO•, radical peroxilo lipídico; O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, radical superóxido; •OH, radical hidroxilo. 2) Moléculas con características oxidativas no radicales (en azul): H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, peróxido de oxígeno; LOOH, hidropéroxido lipídico. 3) Moléculas no nocivas resultantes de la acción de las enzimas (en verde): ALA, ácido α-lipoico; DHLA, ácido dihidrolipoico; GSSG, glutatión oxidado; LOH, alcohol lipídico. 4) Moléculas antioxidantes (en negro): CAT, catalasa; GPx, glutatión peroxidasa; GSH, glutatión reducido; GR, glutatión reductasa; SOD, superóxido dismutasa.

El comportamiento de los animales ha sido y sigue siendo muy utilizado entre los veterinarios y ganaderos como marcador de bienestar. La presencia de un comportamiento anormal, como la anorexia, la apatía, la agresividad o las estereotipias, y su duración se consideran indicadores de la dificultad que posee el animal para superar el estresor (Broom, 1991). Existen también evaluaciones que definen el estado emotivo de un animal, como el test de sesgo cognitivo (Douglas *et al.*, 2012).

Además, se han descrito alteraciones en la actividad productiva de los animales en condiciones de escaso bienestar. Estas características son utilizadas por los veterinarios y ganaderos para la valoración del grado de bienestar de los animales:

- *Carne.* El pH, el color y el peso de la carne indican el descenso de las reservas de glucógeno en el músculo y una posible deshidratación del animal (Ferguson and Warner, 2008).
- *Leche.* Una menor o peor producción de leche señala la existencia de un desequilibrio hormonal (Müller-Lindenlauf *et al.*, 2010).
- *Peso.* Las variaciones de peso reflejan una menor ingesta de comida (McGlone and Salak, 1993) o un crecimiento menor de lo esperado (Hemsworth and Barnett, 1991).
- *Reproducción.* Un menor tamaño de la camada y una mayor duración del periodo entre dos ciclos reproductivos indican una alteración de los niveles de las hormonas sexuales (Einarsson *et al.*, 1996).

## 2.3 Búsqueda de nuevos biomarcadores

### 2.3.1 Tipo de marcadores

Existen muchas conexiones entre la cascada de acontecimientos que conlleva un proceso patogénico a sus manifestaciones clínicas. Los biomarcadores pueden encontrarse en cualquier punto de esta cascada, tanto a nivel molecular, como celular o de órgano (Aronson, 2005).

A nivel molecular, se consideran biomarcadores de un proceso biológico a las mutaciones genéticas, la expresión diferencial génica, proteica y hormonal, las modificaciones epigenéticas y postraduccionales (PTMs), las interacciones anómalas entre proteínas, los metabolitos, etc. Las proteínas son las moléculas más utilizadas como biomarcadores debido a que las alteraciones genéticas, epigenéticas o las PTMs causadas por una patología determinada se traducen en cambios en la expresión, función o distribución de las proteínas. Estas características adquiridas pueden afectar al metabolismo y fisiología celular, al crecimiento y la muerte de la célula, y a la secreción de otras moléculas (Maruvada *et al.*, 2005). Sin embargo, las proteínas presentan varios *handicaps* en comparación con el análisis de otras moléculas como los ácidos nucleicos debido a su enorme heterogeneidad fisicoquímica y complejidad estructural, las cuales dificultan su extracción, solubilización, manejo, separación e identificación. Además, no existe una tecnología equivalente a la PCR que amplifique las proteínas poco abundantes (Rose *et al.*, 2004).

### 2.3.2 Tipo de muestras

El objetivo final de la búsqueda de marcadores es el desarrollo de un test que pueda ser utilizado de manera rápida y sencilla en un número elevado de individuos. El plasma es un fluido biológico muy accesible y su obtención es poco invasiva. Además de contener proteínas de origen hepático, también posee moléculas procedentes del "goteo" de las células y los tejidos, por lo que se considera ideal para la medición de un marcador (Liotta *et al.*, 2003). No obstante, esta compleja mezcla de moléculas es de elevado rango dinámico, de más de 10 órdenes de magnitud (Anderson and Anderson, 2002). Por ejemplo, la concentración de la albúmina es de alrededor de 40 mg/mL mientras que las citoquinas se encuentran a 5 pg/mL aproximadamente (Simpson *et al.*, 2008).

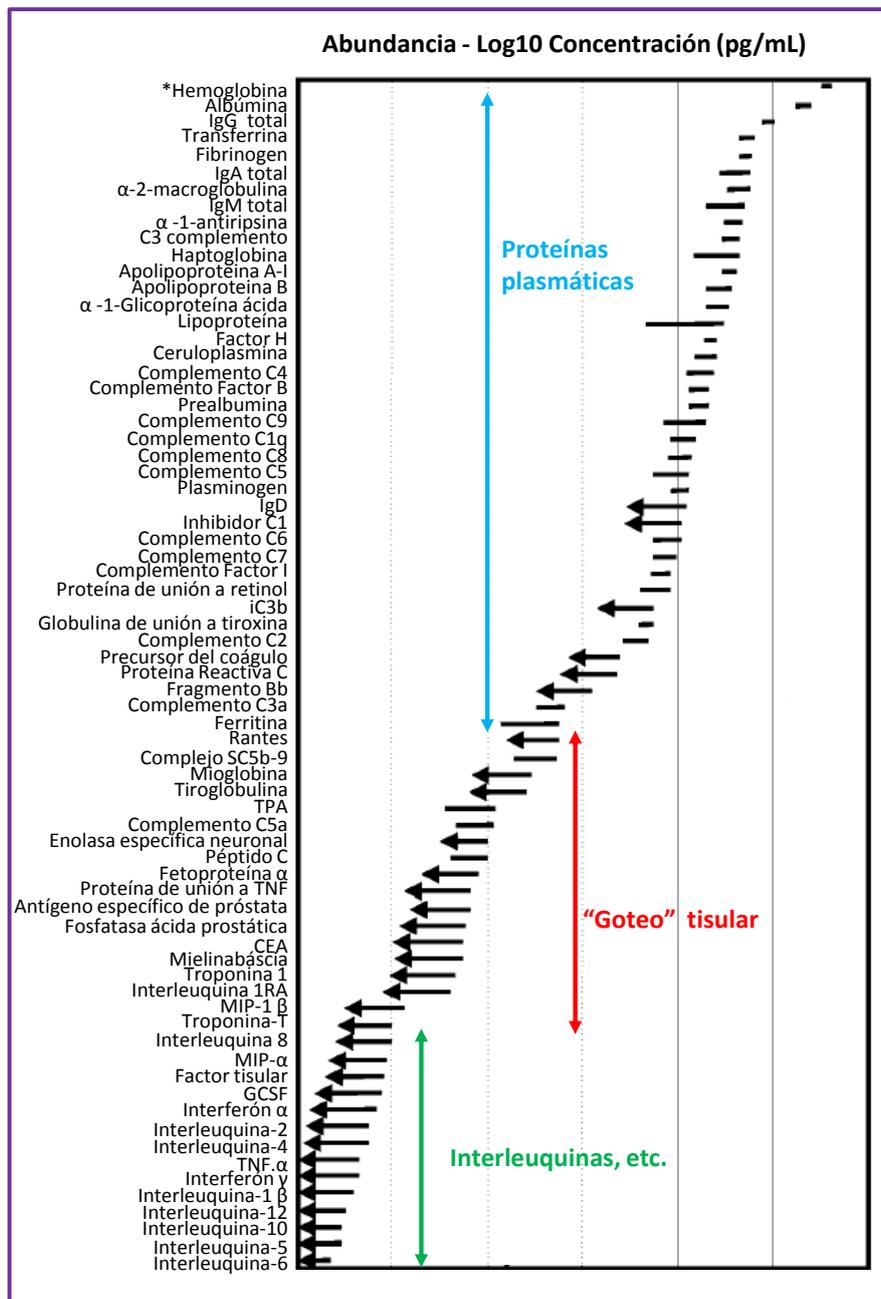


Figura 7. Rango dinámico de las proteínas plasmáticas. Adaptado de Anderson and Anderson (2002).  
 Nomenclatura: \*Proteína no plasmática.

Una docena de proteínas plasmáticas representan el 95% del total de la masa proteica de este fluido, mientras que la fracción de proteínas poco abundantes, entre las que se encuentran mayoritariamente los biomarcadores, está formada por una enorme diversidad de componentes. Este elevado rango dinámico dificulta la detección de las moléculas de baja abundancia (Hortin *et al.*, 2008). Por lo tanto, es conveniente reducir el elevado rango dinámico si se quiere utilizar el plasma como sustrato para la búsqueda de nuevos biomarcadores (Millioni *et al.*, 2011).

En los últimos años se han desarrollado varios métodos basados en la depleción de las proteínas más abundantes para minimizar el elevado rango dinámico del plasma. La mayoría de estos métodos son kits comerciales que captan estas proteínas mediante inmunoafinidad (Fang and Zhang, 2008), aunque también son populares los protocolos de precipitación de la albúmina (Chen *et al.*, 2005) o de exclusión de componentes según su tamaño (Tirumalai *et al.*, 2003). Asimismo, existen también otros métodos que enriquecen selectivamente una fracción del proteoma plasmático, como el aislamiento de proteínas glicosiladas mediante el uso de lectinas (Hirabayashi, 2004) o el enriquecimiento del proteoma medio y poco abundante con el kit ProteoMiner® (Boschetti and Righetti, 2008). Este reactivo ha sido validado por nuestro grupo para el tratamiento del suero bovino y porcino (Marco-Ramell and Bassols, 2010).

Además del plasma, se han utilizado líneas celulares (Esteso *et al.*, 2008) y tejidos (Ramírez-Boo *et al.*, 2011), otros fluidos biológicos, como la saliva (Gutiérrez *et al.*, 2013), la orina (Simon *et al.*, 2008), la leche (Boehmer *et al.*, 2010), las secreciones nasales (Ghazali *et al.*, 2012), el lavado broncoalveolar (Boehmer *et al.*, 2011), el líquido sinovial (Clutterbuck *et al.*, 2011), el líquido amniótico (Koch *et al.*, 2010) y el semen (Novak *et al.*, 2010), los huevos (Omana *et al.*, 2011) y la lana (Choudhury *et al.*, 2006), para el descubrimiento de nuevos marcadores, los cuales pueden estar más relacionados con la situación biológica de interés que el plasma.

### 2.3.3 Técnicas

El desarrollo e innovación de las tecnologías *ómicas* ha revolucionado el ámbito clínico debido a que éstas han permitido el descubrimiento de nuevos biomarcadores.

Las tecnologías *ómicas* permiten el análisis global y simultáneo de un elevado número de dianas moleculares de una célula, tejido o fluido en un momento determinado. Se trata de metodologías que han emergido como potentes técnicas para la búsqueda de nuevos biomarcadores en los últimos años, especialmente tras la finalización de los primeros proyectos de secuenciación de genomas. Estas técnicas requieren el uso de equipos muy potentes, como los espectrómetros de masas o los secuenciadores de DNA de última generación (Ilyin *et al.*, 2004).

Existen muchos tipos de *ómicas*, entre las que destacan:

- *Genómica*. Estudio del DNA presente en una célula.

- *Transcriptómica*. Estudio de los mRNA presentes en una célula, tejido o fluido en un momento determinado.
- *Proteómica*. Estudio de las proteínas presentes en una célula, tejido o fluido en un momento determinado.

### 2.3.4 Etapas de la búsqueda de biomarcadores

La búsqueda de biomarcadores presenta varias etapas (Rifai *et al.*, 2006):

#### *Fase 1: Descubrimiento de biomarcadores candidatos.*

Se analiza la expresión diferencial de algunas o de todas las moléculas de la muestra entre diferentes estados biológicos mediante técnicas semicuantitativas. Como resultado se obtiene una lista de marcadores candidatos que suele oscilar entre las pocas decenas y algunas centenas de moléculas. La tasa de falsos descubrimientos es bastante elevada en esta etapa, principalmente en el caso de las moléculas poco abundantes debido a que su baja frecuencia en alguna de las muestras puede ser inferior a los límites de detección de las técnicas utilizadas.

#### *Fase 2: Calificación*

Se confirma mediante el uso de técnicas cuantitativas y de la literatura existente, la expresión diferencial de los marcadores candidatos entre los estados biológicos de interés y, si es posible, se analizan éstos también en el plasma u otro fluido poco invasivo. Tanto durante el periodo de descubrimiento como en el de calificación, se valora la consistencia de la asociación entre marcador y proceso biológico y su sensibilidad.

#### *Fase 3: Verificación*

Se analizan las moléculas candidatas en un número mayor de muestras en el plasma o un fluido poco invasivo, incorporando un amplio rango de casos y de muestras control que englobe la elevada variabilidad ambiental, genética, biológica y aleatoria existente en la población. Además, se valora su especificidad.

#### *Fase 4: Validación y desarrollo de un ensayo clínico*

Pocas moléculas alcanzan esta etapa. En esta fase se analiza la sensibilidad de los candidatos y se optimiza el método para detectarlos, con el cual se analiza el plasma o un fluido poco invasivo de un número mayor de individuos que representen la enorme variabilidad interindividual. La puesta a punto del método resulta ser uno de los pasos más críticos en la búsqueda de biomarcadores. Una vez superada esta etapa, los biomarcadores validados pueden ser seleccionados para su comercialización y su aplicación clínica.

La siguiente figura resume todo el proceso de búsqueda de biomarcadores:

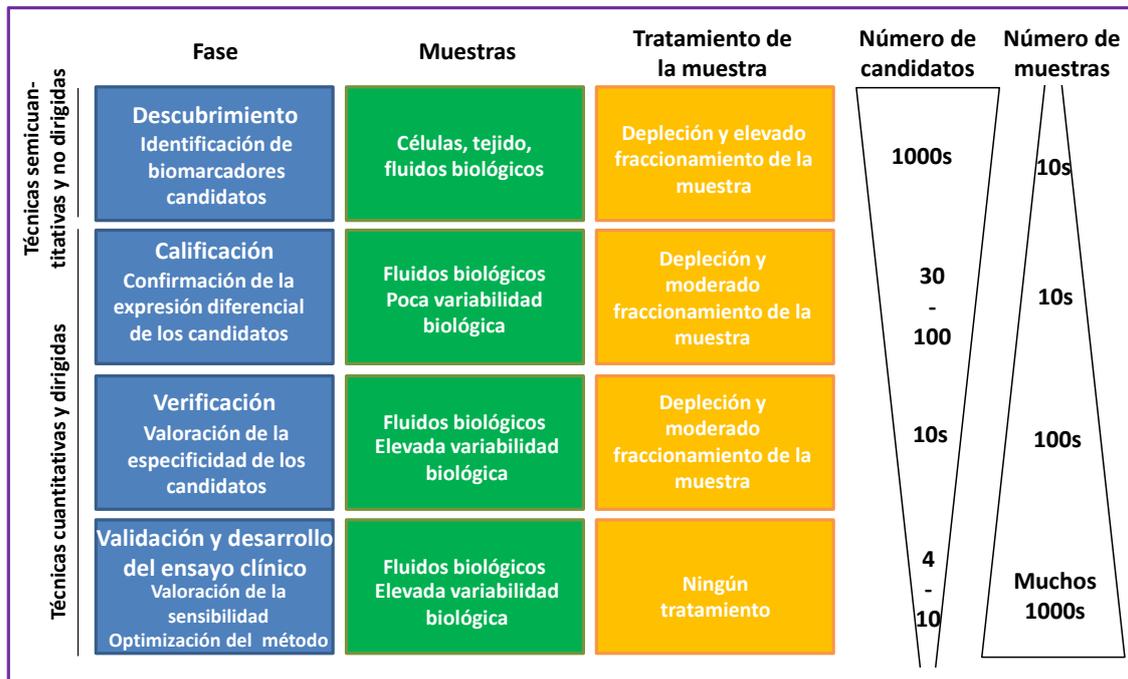


Figura 8. Diagrama del proceso de búsqueda de nuevos biomarcadores. Adaptado de Rifai et al., (2006).

### 3. Proteómica en la búsqueda de biomarcadores

#### 3.1 Introducción

La proteómica es la ciencia que estudia el proteoma. El término proteoma fue usado por primera vez por Mark R. Wilkins, en 1994, como equivalente lingüístico al genoma. El proteoma es el conjunto de proteínas expresadas en una célula, tejido o fluido en un momento determinado bajo unas condiciones determinadas (Wilkins, 2009).

El proteoma es una entidad dinámica con un número de posibles componentes mucho mayor que el genoma o el transcriptoma. La anotación del genoma humano reveló una cifra entre 20000 y 25000 genes (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004), mientras que el número estimado de proteínas codificado por estos genes es de dos a tres órdenes de magnitud mayor. Existen varios mecanismos moleculares que pueden resultar en la expresión de diversas variantes proteicas del mismo gen, como el *splicing* génico, el *splicing* alternativo de los pre-mRNA, la edición del RNA, el desplazamiento en el marco de traducción, las modificaciones que sufren los aminoácidos durante y después de su traducción (PTMs) y los procesos de proteólisis (Rappsilber and Mann, 2002).

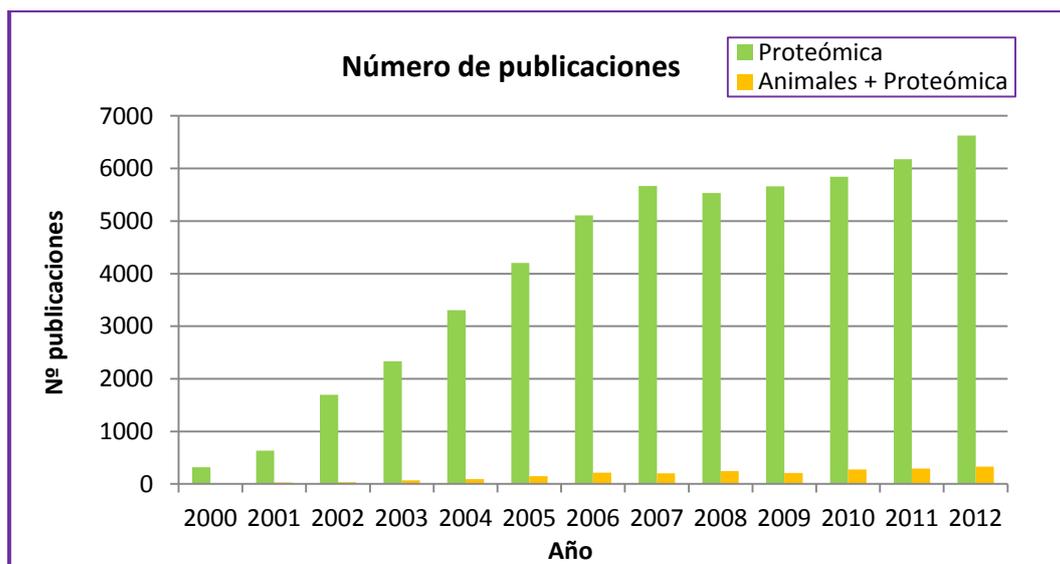
Actualmente, las técnicas proteómicas se utilizan en multitud de situaciones, las cuales se pueden agrupar en cuatro categorías (Soares et al., 2012):

- Caracterización del proteoma de un tejido, célula o fluido en un momento determinado.

- Identificación y cuantificación de las proteínas expresadas diferencialmente en dos o más condiciones experimentales.
- Identificación y caracterización de las interacciones entre proteínas.
- Caracterización de las PTMs de las proteínas.

La espectrometría de masas (MS) es el motor de la proteómica. Se trata de una técnica analítica muy sensible que permite identificar y cuantificar los péptidos de una muestra (Aebersold and Mann, 2003). Esta tecnología existe desde hace más de un siglo y su constante innovación ha recibido a lo largo de la historia varios premios Nobel en los campos de la Física y la Química (El-Aneed *et al.*, 2009). Las mejoras en MS, conjuntamente con los avances en cromatografía, bioinformática y métodos de ionización han permitido el desarrollo de técnicas proteómicas muy potentes (Wu *et al.*, 2006).

Las aproximaciones proteómicas son cada vez más frecuentes en los estudios que se realizan en animales de granja y pequeños animales. Sin embargo, el número de trabajos publicados en el campo de la ganadería y veterinaria, en los que se utiliza esta tecnología, es inferior al 5% de la cantidad total de artículos en los que se emplea, tal como se puede observar en la siguiente figura:



**Gráfico 1.** Número de publicaciones en proteómica y en animales de granja en el periodo 2000-2012. La variable "animales" incluye cerdo, vaca, pollo, conejo, cabra, oveja, caballo, pescado, perro y gato. Obtenido de Scopus.

## 3.2 Espectrometría de masas: descripción y aplicaciones

### 3.2.1 Separación de la muestra

Las muestras biológicas suelen contener proteomas complejos. De manera previa a su estudio proteómico, las mezclas de proteínas son simplificadas mediante técnicas de fraccionamiento y de separación, como la electroforesis o la cromatografía líquida (Issaq *et al.*, 2002). Para el caso del plasma, se ha de utilizar además algún método de eliminación de las proteínas más abundantes, tal como se describe anteriormente en el manuscrito.

Las proteínas pueden ser separadas en tres tipos de electroforesis:

- *Monodimensional (1-DE)*. Se trata de una técnica muy habitual en el campo de la biología molecular en la que las proteínas son separadas en geles SDS-PAGE. Se origina un conjunto de bandas proteicas que difieren en el peso molecular (MW). Sin embargo, el grado de resolución es bajo debido a que una banda puede contener centenares de proteínas (Somari *et al.*, 2005).
- *Bidimensional (2-DE)*. Se trata de una técnica con gran capacidad resolutive, aunque muy laboriosa (Righetti *et al.*, 2004). Las proteínas son separadas en dos electroforesis sucesivas y perpendiculares, primero según su punto isoeléctrico (pI) sobre un gradiente de pH continuo (IPG) (isoelectroenfoco (IEF)), y posteriormente según su MW, en un SDS-PAGE. Como resultado se obtiene un mapa lleno de *spots* o "manchas proteicas" (Görg *et al.*, 2000), cada uno de los cuales contiene una o varias proteínas. No obstante, esta tecnología presenta ciertas limitaciones, como la poca representación de las proteínas poco abundantes, hidrofóbicas, de elevado MW o con pI extremos (Van den Bergh and Clerens, 2003), y la dificultad de automatizar la técnica (Ong and Pandey, 2001).
- *Electroforesis Blue Native*. Esta técnica permite el aislamiento de complejos proteicos y se basa en la separación bidimensional de éstos mediante el uso de dos electroforesis sucesivas y perpendiculares. A diferencia de las clásicas 2-DE, la electroforesis *Blue Native* separa inicialmente los complejos según su MW en condiciones nativas, mientras que en la segunda dimensión se recurre a un gel SDS-PAGE, en el que se individualizan los componentes del complejo proteico (Schägger and Von Jagow, 1991).

En cambio, la cromatografía líquida (LC) permite separar las proteínas y los péptidos de interés según sus propiedades fisicoquímicas. Los péptidos son la opción más habitual cuando se trabaja con LC porque se solubilizan y separan mejor que las proteínas (Chait, 2006). Existen diversos tipos de soporte cromatográfico, los cuales pueden combinarse entre ellos o con un fraccionamiento previo (1-DE, IEF, etc.) para optimizar la separación de las mezclas complejas de proteínas, las cuales contienen un elevado número de péptidos. Se trata de una técnica más rápida, sensible, reproducible y aplicable a diferentes tipos de muestras y condiciones experimentales que los geles (Issaq *et al.*, 2005). La LC posee un gran potencial debido a que es posible automatizarla y permite su acoplamiento a un espectrómetro de masas. Este proceso se conoce como tecnología multidimensional de identificación de proteínas (MudPIT) (Wolters *et al.*, 2001).

### 3.2.2 Digestión de la muestra

Según el objetivo del análisis proteómico, se puede trabajar en los espectrómetros de masas con péptidos o con proteínas intactas<sup>2</sup>, tal como se detalla en el apartado 3.3 de la introducción.

### 3.2.3 Espectrómetros de masas

Un espectrómetro de masas consta de tres partes esenciales: una fuente de ionización, un analizador y un detector. La fuente de ionización convierte los péptidos de una muestra en iones en fase gaseosa, los cuales son separados en un analizador de masa según su relación masa/carga ( $m/z$ ). El número de iones para cada  $m/z$  es registrado por un detector, que permite la transformación de los datos en forma de espectro de masas (Yates, 2000).

#### 3.2.3.1 Fuentes de ionización

Existen varios métodos de ionización, entre los que destacan la ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) y la ionización por electrospray (ESI). El uso de una u otra técnica depende del tipo de muestra y la información que se desee obtener:

- *MALDI*. Los péptidos son inmovilizados en una matriz cristalina orgánica, la cual posee la capacidad de absorber la energía cuando es excitada por un láser y facilita la sublimación y la ionización de los péptidos que contiene. Este método se utiliza para analizar mezclas de péptidos relativamente sencillas, en las que se requiere una información exacta acerca de la masa del péptido (Karas and Hillenkamp, 1988).
- *ESI*. Los péptidos están disueltos en un solvente volátil y son introducidos en un capilar muy fino, el cual recibe un elevado potencial eléctrico y, como consecuencia, se generan moléculas altamente cargadas. La repulsión de cargas provoca que éstas salgan del capilar en forma de aerosol. Estas pequeñas gotas se van evaporando y su tamaño se reduce hasta que la tensión electrostática de su interior es tan elevada que se origina una explosión columbiana, a partir de la cual los iones pasan a la fase gaseosa. Éstos suelen poseer dos o tres cargas, aunque también pueden estar multicargados. El ESI se utiliza para obtener información exacta acerca de la secuencia aminoacídica del péptido y puede estar acoplado a sistemas cromatográficos (Fenn *et al.*, 1989).

#### 3.2.3.2 Analizador

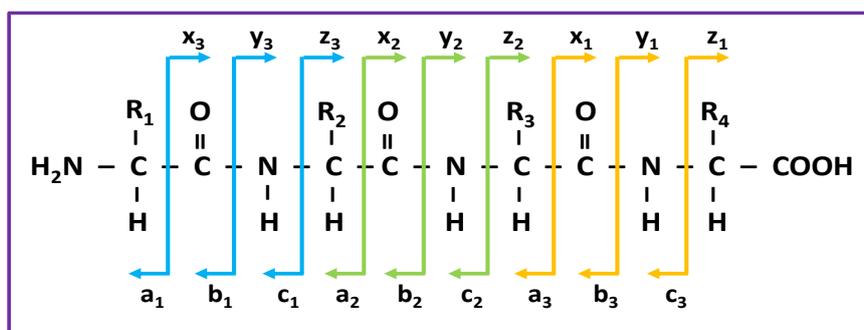
El analizador es la parte más importante del equipo y determina su sensibilidad, resolución, exactitud de la masa y la habilidad de generar buenos espectros de masas (Aebersold and Mann, 2003). Existen varios tipos de analizadores (Hamdan and Righetti, 2005):

---

<sup>2</sup> Todas las menciones a los péptidos durante el análisis por MS son aplicables también a las proteínas intactas. Para agilizar la lectura del manuscrito, se utilizará en este apartado solamente uno de los dos términos, ya que ambas muestras se procesan de manera similar.

- *Tiempo de vuelo (TOF)*. El analizador TOF es el más sencillo. Se basa en medir la duración del vuelo de los iones, el cual es característico para cada  $m/z$ , en un analizador lineal. Si todos los iones poseen la misma carga, el TOF es proporcional a su masa y, por lo tanto, los iones más ligeros alcanzan el detector antes que los pesados. Sin embargo, es posible que los iones no posean la misma energía cinética, por lo que se suele añadir un reflector óptico al final del analizador, el cual ecualiza las energías cinéticas.
- *Trampa iónica*. En una trampa iónica, los iones de interés son captados antes de ser analizados. Cada valor  $m/z$  posee una trayectoria característica, por lo que se puede modificar selectivamente la trayectoria de los iones de interés para aislarlos. Existen diferentes tipos de trampas iónicas, según el tipo de confinamiento de los iones:
  - *Cuadropolo*. Un analizador cuadropolo está formado por cuatro barras de metal paralelas, las cuales están conectadas eléctricamente dos a dos. Al aplicar un voltaje de radiofrecuencia alterno entre las parejas de barras, los iones trazan trayectorias oscilantes a medida que la radiofrecuencia va cambiando.
  - *Trampa iónica lineal*. Consta de un analizador cuadropolo modificado, el cual contiene un electrodo adicional, que permite atrapar los iones.
  - *Trampa iónica tridimensional*. Tres electrodos crean un campo eléctrico tridimensional, en el que los iones son captados y expulsados de forma secuencial.
  - *Orbitrap*. Un electrodo central provoca que los iones giren alrededor de su órbita, en ambos sentidos.
- *Resonancia ciclotrónica de iones - transformada de Fourier (FT)*. Un analizador FT aísla los iones de interés mediante la aplicación de un campo magnético.

Cada analizador posee ventajas e inconvenientes, por lo que es frecuente encontrar varios analizadores conectados en serie para mejorar su rendimiento (El-Aneed *et al.*, 2009). Cuando dos analizadores de masas se acoplan, se sitúa una celda de colisión entre ellos, en la cual se fragmentan los iones seleccionados. La rotura del ión puede darse en cualquier enlace del péptido, tal como se muestra en la figura X, y como consecuencia se genera a una colección de fragmentos de menor tamaño.



**Figura 9.** Fragmentación de los péptidos en el interior de una celda de colisión y generación de iones de tipo a, b, c, x, y y z.

La celda de colisión contiene un gas, con el cual los iones chocan y se fragmentan. Esta técnica se conoce como disociación inducida por colisión (CID) (Johnson *et al.*, 1987). Recientemente, se han desarrollado otros métodos de fragmentación: la disociación por captura de electrones (ECD) y la disociación por transferencia de electrones (ETD) (Domon and Aebersold, 2006).

### 3.2.4 Identificación de proteínas

La MS ha desplazado la degradación de Edman como método de referencia para la determinación de la secuencia aminoacídica de los péptidos (Domon and Aebersold, 2006). Sin embargo, para que una proteína pueda ser identificada, hace falta que su secuencia se encuentre almacenada en una base de datos (Berndt *et al.*, 1999). Existen dos métodos proteómicos que permiten conocer la identidad de las proteínas: la huella peptídica y la MS en tándem.

- *Huella peptídica (Peptide Massfingerprint, PMF)*. La identificación mediante PMF es el método de caracterización de proteínas más sencillo y se suele emplear en *spots* obtenidos a partir de la separación bidimensional de la muestra. Cuando una proteína es digerida con una determinada proteasa, se genera un conjunto de péptidos específicos de la proteína y del protocolo empleado. Mediante MS, se obtiene la masa de estos péptidos y se genera una lista de masas que se denomina PMF. Los programas de búsqueda de resultados generan PMF teóricas para cada una de las proteínas introducidas en las bases de datos. La identidad de la proteína se obtiene al comparar la PMF experimental con todas las PMF virtuales (Thiede *et al.*, 2005).
- *Espectrometría de masas en tándem (MS en tándem o MS/MS)*. La secuencia aminoacídica de una proteína puede ser determinada mediante el acoplamiento de dos analizadores de masas consecutivos. Los péptidos de interés son aislados en el primer analizador y fragmentados en la celda de colisión consecutiva. Como consecuencia, se genera un patrón de fragmentación característico del péptido y del método utilizado. La masa de estos fragmentos es evaluada en el segundo analizador de masas. El patrón de fragmentación es comparado con los patrones teóricos originados por las bases de datos. La determinación de la secuencia de unos pocos péptidos es suficiente para la identificación de la proteína si se utilizan bases de datos adecuadas (Cottrell, 2011).

### 3.2.5 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de la expresión diferencial de las proteínas entre varias condiciones experimentales es uno de los objetivos más importantes de la proteómica (Ong and Mann, 2005). Recientemente, se han desarrollado varias técnicas que permiten cuantificar estas variaciones de manera relativa, es decir, medir la magnitud del cambio o *fold*, y de manera absoluta, con el fin de obtener la concentración de proteína para cada condición (Elliott *et al.*, 2009).

### 3.2.5.1 Cuantificación relativa

La cuantificación relativa de las proteínas puede realizarse mediante técnicas basadas en un gel (*in-gel*) o métodos *off-gel*, los cuales emplean la LC como método de separación.

Las técnicas *in-gel* han sido utilizadas durante décadas en los laboratorios para la cuantificación de los cambios en la expresión de las proteínas. Se basan en la separación bidimensional de la muestra y la comparación del volumen de cada *spot* para cada condición experimental. Sin embargo, se requiere introducir varias réplicas técnicas para minimizar la variabilidad de la técnica (Righetti *et al.*, 2004). La aparición de los fluorocromos comerciales CyDye® para el marcaje diferencial de varios proteomas ha permitido reducir el número de geles 2-DE a utilizar y disminuir su variabilidad. Este protocolo, conocido como electroforesis diferencial (DIGE), permite la separación de hasta tres muestras diferentes en el mismo gel. La intensidad de cada fluorocromo para cada *spot* permite la cuantificación relativa de las proteínas entre las diferentes situaciones (Viswanathan *et al.*, 2006):

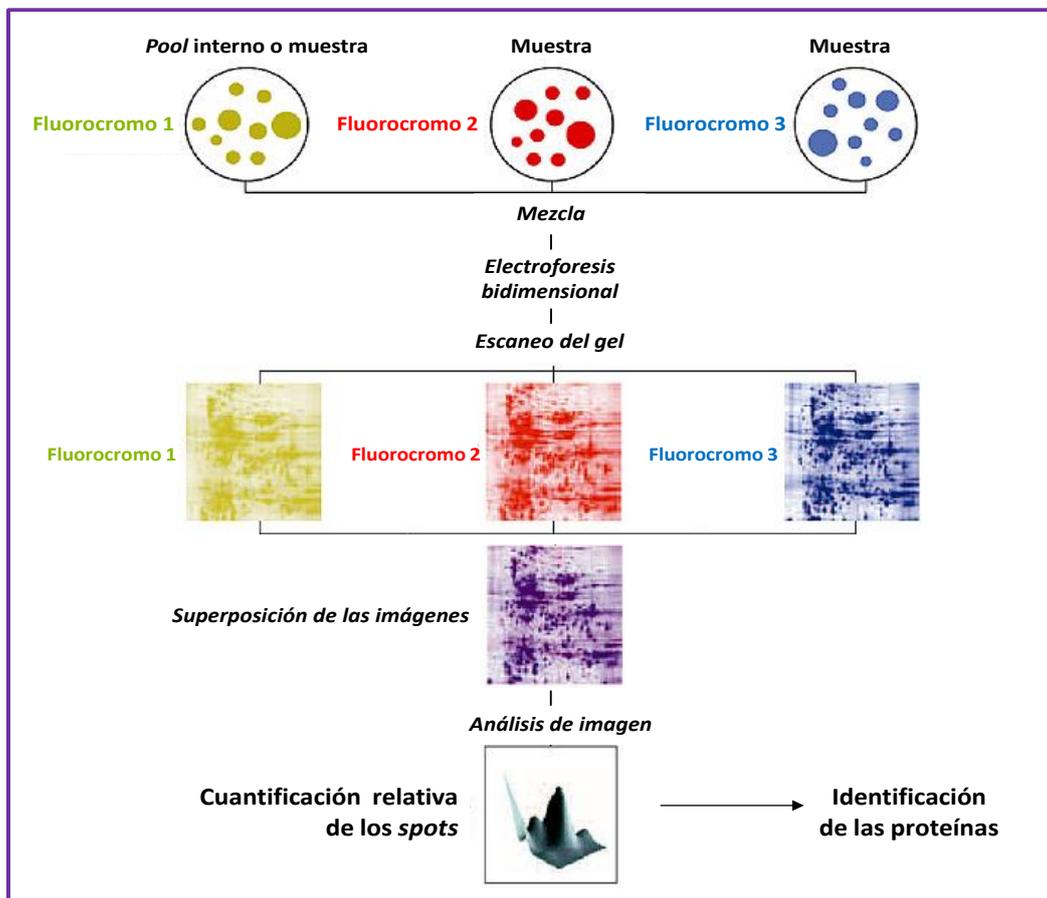
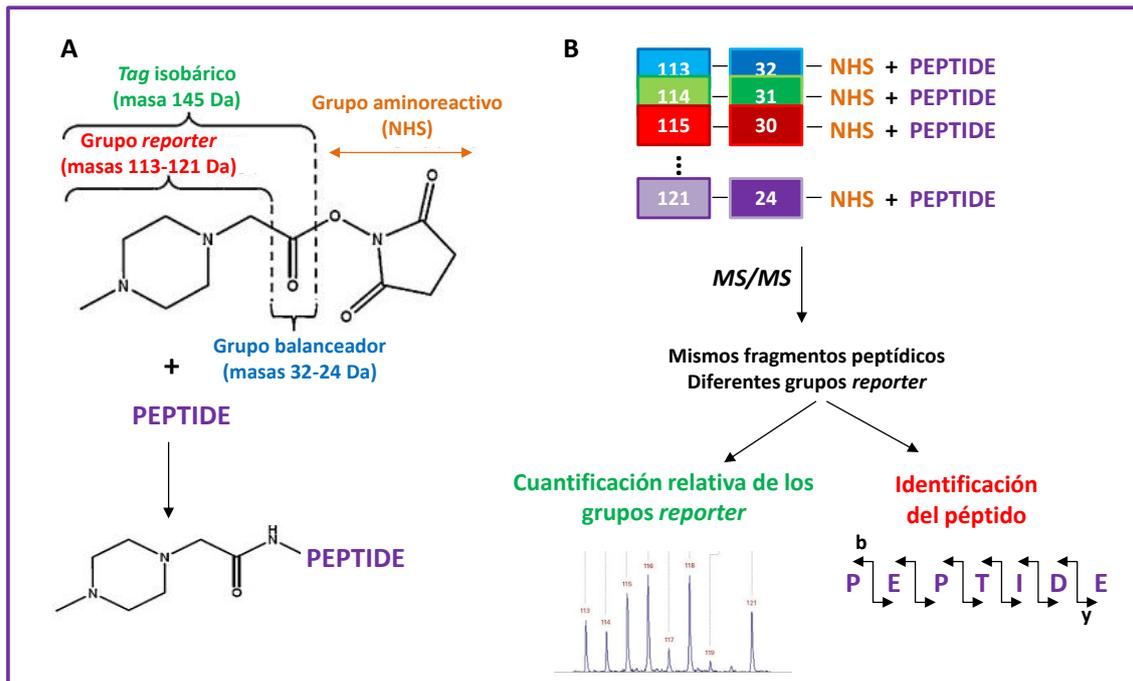


Figura 10. Esquemización de la cuantificación relativa de las proteínas por 2-DE DIGE. Obtenido de GE Healthcare.

Las técnicas *off-gel* también introducen un marcaje diferencial para cada proteoma, el cual permite la comparación de las muestras. La mayoría de los protocolos de cuantificación se basan en el uso de un marcaje isotópico, el cual les confiere masas que difieren uno o unos pocos Da entre ellas y como

resultado, se obtiene una ligera desviación en el espectro de masas. Se han desarrollado varios métodos:

- *Marcaje metabólico.* Se basa en la introducción de isótopos estables en el medio de cultivo de las células, los cuales son incorporados en las proteínas durante su síntesis. De entre todas las técnicas destaca el marcaje estable isotópico con aminoácidos en cultivos celulares (SILAC) (Ong *et al.*, 2002), el cual utiliza diferentes isótopos del hidrógeno, el carbono, el nitrógeno o el oxígeno para el marcaje de los aminoácidos (Gevaert *et al.*, 2008).
- *Marcaje químico.* Existe también la posibilidad de marcar las proteínas químicamente. Los métodos químicos más importantes son:
  - *Marcaje de afinidad codificado por isótopos (ICAT).* Se trata de un marcaje que contiene tres elementos: biotina, una cadena de nueve carbonos que incorpora isótopos ligeros o pesados y un grupo de unión a las cisteínas de la proteína. Las proteínas son purificadas gracias a la elevada afinidad entre la biotina y la estreptavidina. Antes del análisis por MS, la biotina es eliminada (Gygi *et al.*, 1999).
  - *Marcaje isobárico para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ).* El marcaje iTRAQ permite la comparación de cuatro u ocho muestras en el mismo ensayo. Este marcaje también está formado por tres elementos: una etiqueta (*grupo reporter*), la cual posee diferentes masas isotópicas (entre 114 y 117 o entre 113 y 121 Da), una región normalizadora de masa (*grupo balanceador*), la cual compensa la masa del grupo *reporter* e iguala las masas de todos los marcajes, y un grupo de unión a grupos amino de la proteína (NHS). Durante el análisis por MS en tándem, el aislamiento y la fragmentación de cada péptido permite su identificación y la cuantificación de las etiquetas (Ross *et al.*, 2004). En la figura 11 se resume su estructura y aplicación.



**Figura 11.** Esquemización de la cuantificación de los péptidos por iTRAQ. Adaptada de Reichel (2011).  
A) Estructura del marcaje isobárico. B) Proceso de la cuantificación por iTRAQ.

Debido al elevado precio de los marcajes isotópicos se ha desarrollado la tecnología *label-free*, la cual no requiere el uso de marcajes. Se basa en el alineamiento y comparación de los cromatogramas o de los espectros de masas obtenidos durante el análisis de los péptidos de cada muestra (Zhu *et al.*, 2010).

### 3.2.5.2 Cuantificación absoluta

Las técnicas proteómicas dirigidas (*targeted*), como la monitorización por reacción múltiple (MRM) o la monitorización por reacción selectiva (SRM), se basan en la detección de algunos péptidos exclusivos de cada una de las proteínas candidatas por MS y permiten cuantificar simultáneamente un elevado número de moléculas. Estos métodos son muy sensibles porque vienen definidos por la secuencia de aminoácidos, la cual permite al equipo centrar su capacidad analítica en la detección y la fragmentación de los péptidos de interés (Whiteaker *et al.*, 2011), incluso de aquellos relativos a proteínas poco abundantes (Lange *et al.*, 2008):

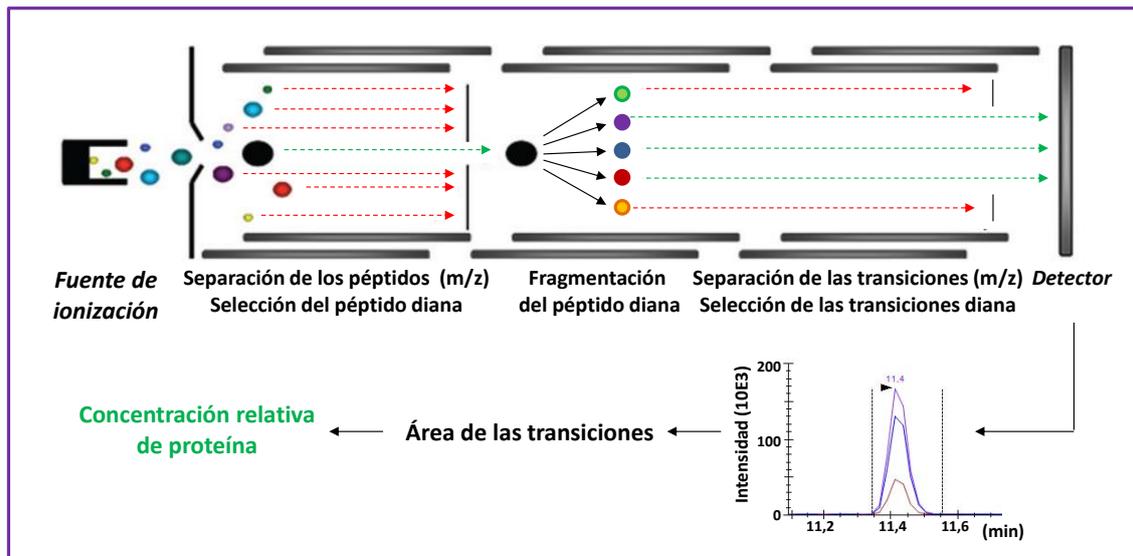


Figura 12. Esquematación de la cuantificación de los péptidos por SRM. Adaptada de Lange et al., (2008).

Estas técnicas dirigidas permiten la cuantificación absoluta de los péptidos. Para ello, se requiere el uso de estándares internos marcados que son analizados conjuntamente con los péptidos de la muestra. Este marcaje les confiere una masa un poco mayor que la del ión precursor y, por lo tanto, se obtiene una ligera desviación en el espectro de masas. Se han desarrollado varios protocolos de cuantificación:

- *Método AQUA*. Se utilizan iones precursores sintéticos que contienen marcajes isotópicos, como el  $^{13}\text{C}$  y el  $^{15}\text{N}$  (Gerber *et al.*, 2003).
- *Método QconCAT*. Se basa en el diseño de un gen sintético formado por las secuencias de todos los péptidos de interés. El gen es introducido en un plásmido y transformado en *E. coli*, el cual crece en un medio que contiene aminoácidos marcados o  $^{15}\text{N}$ . Como resultado se obtienen cantidades importantes de un polipéptido artificial marcado, del cual se obtienen los péptidos de interés al ser digerido (Pratt *et al.*, 2006).

### 3.3 Búsqueda de nuevos biomarcadores

Para la búsqueda de nuevos biomarcadores mediante técnicas proteómicas se pueden utilizar dos aproximaciones complementarias, el *bottom-up* y el *top-down*. Estas dos opciones difieren en sus aplicaciones, así como en las moléculas con las que se realiza el análisis por MS (Calligaris *et al.*, 2011).

#### 3.3.1 Bottom-up

La aproximación *bottom-up* es la más utilizada para la búsqueda de biomarcadores y su objetivo principal es la caracterización y comparación de los proteomas de interés y/o la cuantificación de sus componentes mediante el uso de péptidos (McDonald and Yates, 2002).

En general, se prefiere caracterizar péptidos porque el trabajo con proteínas intactas presenta ciertas limitaciones. Por un lado, la MS realizada con proteínas intactas es menos sensible que cuando se

trabaja con péptidos. Asimismo, la masa de la proteína intacta no es suficiente para su identificación (Aebersold and Mann, 2003).

La digestión proteolítica de las proteínas es llevada a cabo por enzimas, como la tripsina, la quimotripsina, las endoproteasas Lys-C, Asp-N y Glu-C, la pepsina, la proteasa V8 y la papaína, o por productos químicos, como el bromuro de cianógeno y los ácidos 2-yodobenzoico y 2-nitro-5-tiocianobenzoico. La tripsina es la enzima más utilizada debido a que su corte en el extremo C-terminal de los aminoácidos lisina y arginina es muy reproducible (Ren *et al.*, 2009).

Existen dos protocolos *bottom-up*: la aproximación clásica y el *shotgun*, los cuales se diferencian tanto por el momento en que se realiza la digestión de las proteínas, como por los equipos utilizados.

La aproximación clásica se basa en la separación bidimensional de las proteínas. Posteriormente, las proteínas son aisladas del gel y digeridas a péptidos, los cuales son ionizados principalmente por MALDI, analizados por TOF e identificados por PMF, o caracterizados por TOF-TOF (Zimny-Arndt *et al.*, 2009).

El término *shotgun* en proteómica se utiliza como equivalente a la estrategia genómica *shotgun* para la secuenciación del DNA (Yates *et al.*, 2009). Durante la búsqueda de biomarcadores proteicos mediante la estrategia *shotgun* la muestra es digerida completamente en forma de péptidos y como consecuencia se genera una mezcla de péptidos muy compleja, la cual requiere el uso de equipos muy potentes para su separación, caracterización y cuantificación (Han *et al.*, 2008). Generalmente, los péptidos son separados a través de varias LCs en serie y los componentes de cada fracción cromatográfica son ionizados por ESI. Posteriormente, los péptidos son analizados en varios analizadores acoplados e identificados a partir de su patrón de fragmentación (Swanson and Washburn, 2005).

### 3.3.2 Top-down

La estrategia *top-down* permite el estudio del plegamiento proteico (Miranker *et al.*, 1996), la identificación y caracterización de las PTMs (Mann *et al.*, 2001) y de las interacciones entre proteínas (Heck and Van den Heuvel, 2004). Para ello, se utilizan en todo momento proteínas intactas.

La aproximación *top-down* presenta dos ventajas respecto a la *bottom-up*. Primero, se trata de una técnica más rápida debido a que no se requiere digerir las proteínas. Por otro lado, la molécula analizada contiene toda la secuencia proteica, mientras que durante el *bottom-up* es muy difícil poseer una total cobertura de la secuencia, por ejemplo a causa de la pérdida de los extremos amino y carboxi de la proteína o de los fragmentos que contienen PTMs lábiles (Calligaris *et al.*, 2011).

Durante la búsqueda de biomarcadores mediante *top-down*, las proteínas son separadas generalmente mediante electroforesis o por LCs en serie. Posteriormente, éstas son ionizadas por MALDI o ESI, fragmentadas y caracterizadas en potentes MS en tándem (Kelleher, 2004).

El *middle-down* es una estrategia alternativa al *top-down* cuando se trabaja con proteínas muy grandes o la proteína posee un dominio específico de interés. Se basa en la digestión limitada de la proteína, de la que se obtienen péptidos muy grandes (García *et al.*, 2007).

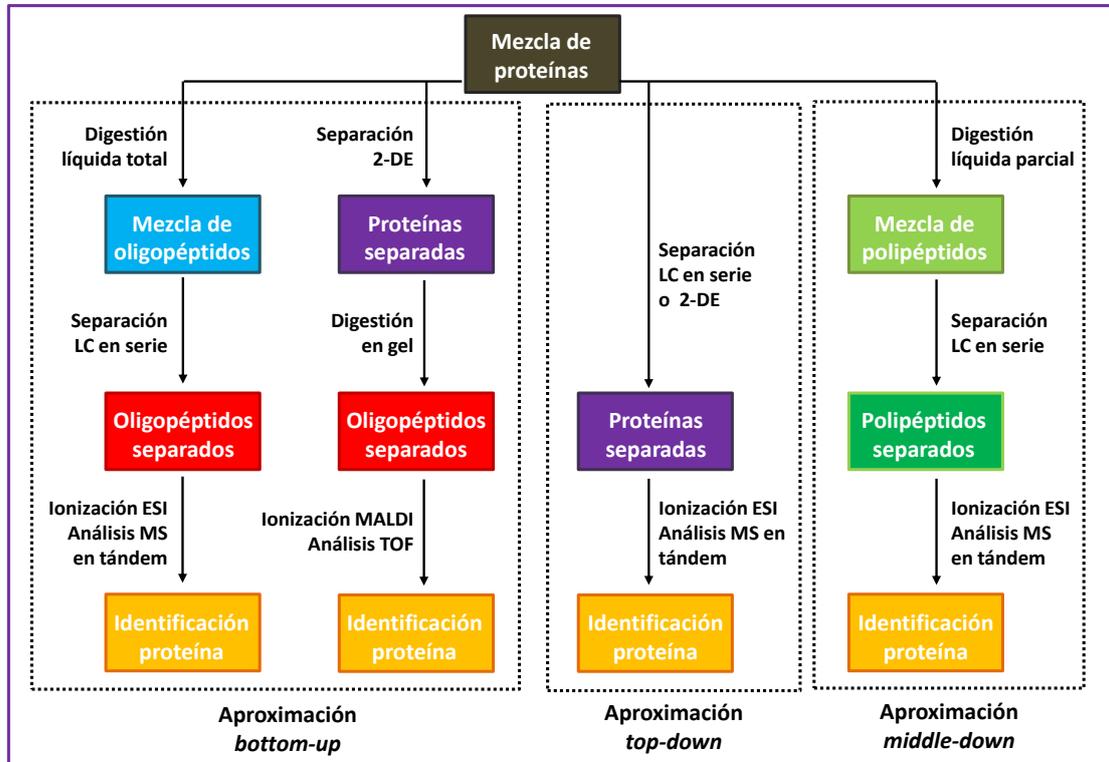


Figura 13. Búsqueda de nuevos biomarcadores mediante técnicas proteómicas.



## **HIPÓTESIS INICIAL Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS INICIAL



Figura 14. Hipótesis sobre los efectos del estrés en el organismo

## OBJETIVOS

A partir de esta hipótesis, se han propuesto tres grandes objetivos durante la realización de esta tesis doctoral:

- La validación de los biomarcadores plasmáticos de estrés descritos con anterioridad por nuestro grupo y búsqueda de nuevos biomarcadores plasmáticos mediante la aplicación de diferentes técnicas proteómicas en dos situaciones a las que están sometidos los cerdos habitualmente durante su etapa productiva: la elevada densidad de estabulación y el alojamiento en jaulas individuales con fines reproductivos.
- La caracterización de las isoformas y las modificaciones postraduccionales de dos APPs, la Hp y la apolipoproteína A-I (Apo A-I), y de las inmunoglobulinas A y G en animales infectados por el circovirus porcino 2.
- La puesta a punto de un método basado en espectrometría de masas, la monitorización por reacción selectiva (SRM), para la cuantificación de algunas APPs relevantes en el cerdo: la Hp, la Pig-MAP, la Apo A-I y la glicoproteína  $\alpha 2$ -Heremans Schmid.



## **MATERIAL Y MÉTODOS**



## 1. Material

### 1.1 Determinación de parámetros bioquímicos mediante un analizador automático

Se utilizó el analizador automático Olympus AU400 (Olympus) para el análisis de varios parámetros bioquímicos. En todo momento, se siguió el protocolo recomendado por el fabricante del kit comercial usado:

Parámetro	Nombre comercial
$\alpha$ -amilasa salival	<i><math>\alpha</math>-amylase</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
3 $\beta$ - hidroxibutirato	<i>Ranbut</i> (Randox)
Ácidos grasos no esterificados	<i>NEFA C</i> (Wako)
Alanina aminotransferasa	<i>Alanine aminotransferase</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Colesterol total	<i>Cholesterol</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Creatina kinasa	<i>Creatine kinase</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Creatinina	<i>Creatinine</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Fosfatasa alcalina	<i>Alkaline phosphatase</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Glutación peroxidasa	<i>Ransel</i> (Randox)
Glutación reductasa	<i>Glutathione reductase assay</i> (Randox)
Glutación total	<i>Glutathione assay</i> (Northwest)
Haptoglobina	<i>Haptoglobin Colorimetric Assay PHASE RANGE</i> (Tridelta)
Lipoproteínas de alto peso molecular	<i>HDL-cholesterol</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Lipoproteínas de bajo peso molecular	<i>LDL-cholesterol</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Proteína C-reactiva	<i>C-reactive protein</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Proteína total	<i>Total protein</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Superóxido dismutasa	<i>RanSOD</i> (Randox)
Triglicéridos	<i>Tryglicerides</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)
Urea	<i>Urea nitrogen</i> (Olympus System Reagent) (Beckman Coulter)

**Tabla 2.** Listado de kits comerciales empleados para la cuantificación de diversos parámetros bioquímicos mediante el analizador automático Olympus AU400.

## 1.2 ELISAs comerciales

Se emplearon los siguientes ELISAs comerciales siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. La lectura de los resultados se realizó en el lector iEMS Reader MF (Labsystems), que estuvo controlado por el *software* Ascent (Thermo Scientific).

Parámetro	Nombre comercial
$\alpha$ 2-HS-glicoproteína	<i>ELISA kit for Alpha 2-Heremans Schmidt Glycoprotein</i> (USCN Life Science) <i>Porcine (<math>\alpha</math>HSG) ELISA kit</i> (SunRed Bio)
Apolipoproteína A-I	<i>ELISA kit for Apolipoprotein A1</i> (USCN Life Science) <i>Pig apolipoprotein A1 ELISA kit</i> (Cusabio)
Cortisol	<i>Cortisol ELISA</i> (DRG Diagnostics) <i>Salivary Cortisol ELISA</i> (DRG Diagnostics)
Inmunoglobulina G	<i>ELISA kit for Immunoglobulin G</i> (USCN Life Science)
Inmunoglobulina A	<i>ELISA kit for Immunoglobulin A</i> (USCN Life Science)
Pig-MAP	<i>Pig-MAP kit ELISA</i> (PigCHAMP ProEuropa)

**Tabla 3.** Listado de ELISAs empleados para la cuantificación de diferentes moléculas.

## 1.3 Anticuerpos

Los anticuerpos primarios y secundarios utilizados durante la fase experimental se citan a continuación:

Anticuerpo	Casa comercial	Uso
Anti- $\beta$ -Actina	Santa Cruz Biotechnology	WB
Anti-apolipoproteína A-I	Cedido por Fermín Lampreave (Universidad de Zaragoza)	WB
Anti-dinitrofenil	Sigma	WB, SB
Anti-haptoglobina	Immunology Consultants Laboratory	WB
Anti-inmunoglobulina G de conejo – HRP	GE Healthcare	WB
Anti-inmunoglobulina G de ratón – HRP	GE Healthcare	WB
Anti-Pig-MAP	Cedido por Matilde Piñeiro (PigCHAMP, Segovia)	WB

**Tabla 4.** Listado de anticuerpos usados para la inmunodetección de las proteínas de interés. Abreviaturas: HRP, peroxidasa de rábano ; SB, *slot blot*; WB, *western blot*.

## 1.4 Lectinas

Lectina	Casa comercial	Uso
Aglutinina del germen del trigo (WGA) – HRP	Sigma	Unión a residuos N-acetilglucosamina
Concanavalina A (ConA) - HRP	Sigma	Unión a residuos D-manosil o D-glucosil

**Tabla 5.** Listado de lectinas usadas para la detección de residuos glucídicos.

## 1.5 Enzimas

Las enzimas utilizadas fueron:

Enzima	Nombre comercial	Uso
N-glicosidasa	N-Glycosidase F recombinant (Roche)	Deglicosilación
Neuraminidasa	Neuraminidase (Sialidase) (Roche)	Deglicosilación
O-glicosidasa	O-Glycosidase (Roche)	Deglicosilación
Tripsina	Trypsin Gold, Mass Spectrometry Grade (Promega)	Digestión triptica de proteínas

**Tabla 6.** Listado de enzimas empleadas con diferentes objetivos.

## 2. Métodos

### 2.1 Manejo de los animales

#### Experimento 1

Se realizó en las Granjas Experimentales de la Universidad Autónoma de Barcelona. Los animales (Duroc x Landrace x Large White) fueron alimentados según las recomendaciones del Instituto Nacional de Investigación Agronómica francés (INRA) y tuvieron acceso a alimento y agua *ad libitum*. Las condiciones de tratamiento, estabulación y manejo siguieron las Guías de la Unión Europea.

#### Experimento 2

El experimento se realizó en una explotación productora de lechones (Landrace x Large White x Duroc), situada en Ponts (Lleida), de la empresa Seponts S.L. Las dimensiones de las naves y las instalaciones en las que se desarrolló el experimento estaban reguladas por el Real Decreto 1135/2002. El pienso que recibieron las cerdas a lo largo del estudio fue de cerda de cría, en la etapa inicial de manera *ad libitum*, y de cerda gestante, durante la fase de estrés de manera racionada. En el apartado Apéndices del manuscrito se detalla la composición de los piensos empleados.

Las cerdas fueron vacunadas durante el periodo de cuarentena, de manera previa al experimento. Se administró a todos los animales el antiparasítico Paramectin® contra algunos vermes redondos gastrointestinales, los vermes pulmonares, los piojos y los ácaros de la sarna. También fueron vacunadas contra el herpesvirus porcino 1, causante de la enfermedad de Aujeszky, y contra *Mycoplasma*. Se les administró también el inyectable Parvosuín® MR, contra el parvovirus porcino, causante de la parvovirus porcina, y contra *Erysipelothrix rhusiopathiae*, causante del mal rojo. Asimismo, se inyectó la

vacuna Griporc®, contra el virus de la influenza porcina A. La última vacuna fue administrada una semana antes del inicio del estudio.

## 2.2 Obtención y procesamiento de las muestras

### 2.2.1 Sangre

Las muestras de sangre se obtuvieron por venipuntura, con especial cuidado para evitar la hemólisis de los eritrocitos. La extracción se realizó a partir de la vena cava o yugular:

- *Suero.* El suero se recogió en tubos Vacutainer (Eurotubo) de 10 mL sin anticoagulantes, se dejó coagular durante 30 min a temperatura ambiente (RT) y se centrifugó a 3000xg durante 10 min a RT. El sobrenadante se alicuotó y se congeló a -80°C.
- *Lisado de eritrocitos.* Se separó 0,5 mL de la sangre recogida en tubos Vacutainer recubiertos con el anticoagulante EDTA. Se centrifugó a 3000xg durante 10 min a RT y se eliminó el sobrenadante. El pellet celular se lavó con 0,9% (w/v) NaCl y se resuspendió en 4 volúmenes de agua fría. El lisado se dejó reposar 15 min a 4°C y se centrifugó a 3000xg durante 5 min a RT. El sobrenadante se alicuotó y se congeló a -80°C.
- *Sangre desproteínizada.* Se separó 50 µL de la sangre recogida en tubos Vacutainer recubiertos con EDTA y se mezcló con 2 volúmenes de 5% (v/v) ácido metafosfórico. Se centrifugó a 300xg durante 5 min a RT y el sobrenadante se alicuotó y se congeló a -80°C.

### 2.2.2 Saliva

Se utilizaron tubos Salivette (Sarstedt) sin conservantes para obtener las muestras de saliva. Se colocó el algodón, que se encuentra en el interior del tubo, sobre las muelas inferiores del cerdo y se obligó al animal a morderlo durante 1 min. El algodón se introdujo dentro del tubo Salivette y éste se centrifugó a 4000xg durante 10 min a RT. Las muestras centrifugadas se alicuotaron y se congelaron a -80°C.

## 2.3 Separación de proteínas en un gel: electroforesis monodimensional y bidimensional

### 2.3.1 Preparación de la muestra

#### 2.3.1.1 Geles monodimensionales

Para realizar una electroforesis SDS-PAGE convencional se diluyó el suero en tampón de muestra 6X (3% (w/v) SDS, 7,5% (v/v) β-mercaptoetanol, 65mM Tris-HCl pH 6,8, 0,02% (w/v) sacarosa y trazas de azul de bromofenol) y agua hasta un volumen final de 20 µL. La muestra se incubó a 95°C durante 10 minutos. Se partió del siguiente volumen de suero:

- *Tinción con plata.* 0,7 µL de suero (~50 µg proteína).
- *Tinción con azul de Coomassie.* 1 µL de suero (~75 µg proteína).

- Western blot. El suero se diluyó previamente 1/50 en agua y se traspasaron 10  $\mu\text{L}$  de suero diluido a un nuevo tubo ( $\sim 15 \mu\text{g}$  proteína).

Para la detección de los grupos carbonilo (*oxyblot*) de las proteínas, se diluyó 1  $\mu\text{L}$  de suero ( $\sim 75 \mu\text{g}$  proteína) en agua hasta alcanzar un volumen de 5  $\mu\text{L}$ . La muestra se mezcló con un volumen de 24% (w/v) SDS y se incubó 5 minutos a RT. A continuación, se añadió otro volumen de la solución derivatizante (10 mM dinitrofenilhidrazina (DNPH) en 10% (v/v) ácido trifluoroacético (TFA)) y se incubó durante 10 minutos a RT en la oscuridad. La reacción de derivatización finalizó al añadir un volumen de la solución STOP (2 M Tris, 30% (v/v) glicerol, 15% (v/v)  $\beta$ -mercaptoetanol).

### 2.3.1.2 Geles bidimensionales

Para realizar un *western blot* bidimensional se empleó el tampón de muestra 2-DE DIGE (7 M urea, 2 M tiourea, 4% (w/v) CHAPS, 1% (v/v) anfolitos pH 4-7, 1% (w/v) DTT, 0,002% (w/v) azul de bromofenol) para diluir el suero:

- Western blot *bidimensional*. El suero fue diluido 1/100 en tampón de muestra y, posteriormente, 20  $\mu\text{L}$  de esta solución ( $\sim 15 \mu\text{g}$  de proteína) fue mezclada con tampón de muestra hasta alcanzar un volumen de 100  $\mu\text{L}$  (tiras IPG de 7 cm) o 150  $\mu\text{L}$  (tiras IPG de 24 cm).
- *Oxyblot bidimensional*. 1  $\mu\text{L}$  de suero ( $\sim 75 \mu\text{g}$  de proteína) fue diluido en tampón de muestra hasta alcanzar 100  $\mu\text{L}$  (tiras IPG 7 cm) o 150  $\mu\text{L}$  (tiras IPG 24 cm).

En el caso del 2-DE DIGE, inicialmente el suero fue desalado con el kit 2-D Clean-Up (GE Healthcare). El *pellet* proteico fue resuspendido en tampón de lisis (7 M urea, 2 M tiourea, 30 mM Tris, 4% (w/v) CHAPS, pH 8,5) y se reajustó su pH a 8,5. Las muestras fueron cuantificadas con el kit RcDc Protein Assay (Bio-Rad). Se añadieron 50  $\mu\text{g}$  de proteína de cada muestra en un nuevo tubo y se formó un *pool* interno de todas las muestras. Los fluorocromos (400 pmol/50  $\mu\text{g}$ ) fueron preparados tal como especificó el fabricante (GE Healthcare y NH DyeAGNOSTICS). La reacción de marcaje se llevó a cabo durante 30 minutos en hielo y en la oscuridad, que fue interrumpida por la adición de 10 mM lisina. Las muestras fueron combinadas en un nuevo tubo y diluidas en un volumen de tampón de muestra 2-DE DIGE 2X (7 M urea, 2 M tiourea, 4% (w/v) CHAPS, 2% (v/v) anfolitos pH 4-7, 2% (w/v) DTT y 0,004% (w/v) azul de bromofenol), a las que se le añadió posteriormente tampón de muestra 2-DE DIGE hasta alcanzar un volumen final de 150  $\mu\text{L}$ . El marcaje de las muestras se hizo de manera cruzada entre grupos para evitar el posible sesgo introducido por la naturaleza intrínseca de los fluorocromos.

En el caso de los geles zoom, que se realizaron en el laboratorio de Ingrid Miller en la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena, se siguieron sus protocolos:

- *Geles teñidos con plata*. 1  $\mu\text{L}$  de suero fue diluido 1/40 en tampón de muestra *zoom* (8 M urea, 2% (w/v) CHAPS, 1% (v/v) anfolitos pH 3,5-9, 1,5% (w/v) DTT) y se traspasaron 20  $\mu\text{L}$  a un nuevo tubo ( $\sim 37 \mu\text{g}$  proteína).

- *Geles teñidos con azul de Coomassie o lectinas.* 1  $\mu\text{L}$  de suero fue diluido en 20  $\mu\text{L}$  de tampón de muestra *zoom* (~75  $\mu\text{g}$  proteína).

### 2.3.2 Primera dimensión: separación de las proteínas por punto isoeléctrico

Este paso se realizó solamente en los geles bidimensionales.

#### 2.3.2.1 Polimerización de los geles IPG *zoom*

Las tiras IPG *zoom*, de 11 cm y de gradiente de pH 4,7 – 5,7, fueron polimerizadas en un *cassete* de vidrio *U-frame* (125 x 260 x 0,5 mm) (GE Healthcare). Sobre uno de los dos cristales se depositó una lámina de GEL-FIX for PAGE (Serva), mientras que el otro fue tratado con el silano Repel (GE Healthcare). Se preparó una solución de acrilamida al 4% ácida (pH 4,7) y una básica (pH 5,7), ambos pH ajustados mediante la combinación de diferentes *stocks* de anfolitos comerciales (Fluka y GE Healthcare). La cantidad de cada anfolito a añadir fue descrita en Westermeier (2005). Se añadieron ambas soluciones en un *gradient maker* (Hoefer Scientific Instruments). Una vez finalizada la polimerización, se desmontó el *cassete* y el gel se incubó en una estufa 1 hora a 37°C, se lavó con 1% (v/v) glicerol y se secó delante de una fuente de aire frío. Las tiras IPG *zoom* se obtuvieron cortando fragmentos longitudinales de 0,5 cm de ancho del gel. Éste fue guardado en el interior de una funda de plástico y se congeló a -20°C.

#### 2.3.2.2 Rehidratación de las tiras IPG

Las tiras IPG fueron rehidratadas de manera previa al IEF:

- *Tiras IPG comerciales* (GE Healthcare). Fueron rehidratadas durante 24 horas a RT en tampón de rehidratación (7 M urea, 2 M tiourea, 4% (w/v) CHAPS, 1% (v/v) anfolitos pH 4-7, 96 mM DeStreak (GE Healthcare), 0,002% (w/v) azul de bromofenol).
- *Tiras IPG zoom.* Fueron rehidratadas durante 8,5 horas a RT en tampón de muestra *zoom*.

#### 2.3.2.3 Isoelectroenfoque

Una vez rehidratadas las tiras, se procedió con la separación de las proteínas según su pI:

	Sistema	Volumen	Aplicación
Tiras IPG comerciales	Ettan IPGphor II (GE Healthcare)	150 $\mu\text{L}$ (24 cm) 100 $\mu\text{L}$ (7 cm)	Extremo anódico vía <i>cup loading</i>
Tiras IPG <i>zoom</i>	Multiphor II (GE Healthcare)	20 $\mu\text{L}$	Extremo anódico o catódico mediante un papel de filtro

**Tabla 7.** Condiciones empleadas para la aplicación de las muestras en los sistemas de IEF.

El voltaje aplicado a las tiras IPG comerciales fue el recomendado por el fabricante. El programa de IEF para la tiras IPG *zoom* se dividió en dos etapas; tras la primera, los papeles de filtro situados sobre los extremos de las tiras fueron reemplazados por nuevos papeles:

Programa	
IPG comerciales	Tiras de 7cm: 300V (4h), 300-1000V (0:30h), 1000-5000V (1:30h), 5000V (0:36h) Tiras de 24 cm: 300V (3h), 300-1000V (6h), 1000-8000V (3h), 8000V (5:40h)
IPG zoom	Etapas 1: 100V (1h), 200V (1h), 500V (7h), 1000V (6:24h) y 2000V (1:30h) Etapas 2: 500V (0:30h), 1000V (0:57h) y 2000V (0:25h)

**Tabla 8.** Voltaje empleado para la separación de las proteínas por IEF.

### 2.3.3 Segunda dimensión: separación de las proteínas por peso molecular

Este paso se realizó fue común en los dos tipos de separación de proteínas (monodimensional y bidimensional), excepto la etapa de equilibración.

#### 2.3.3.1 Polimerización de los geles SDS-PAGE

Se polimerizaron geles de tamaño pequeño (10 x 8 x 1,5 cm), geles de dimensiones medianas (18 x 16 x 1,5 cm) y geles grandes (20 x 24 cm x 1,5 cm) en *cassetes* de polimerización (GE Healthcare y Hoefer Scientific Instruments), en el que se colocaron cristales de baja fluorescencia intercalados con láminas de plástico separadoras. Paralelamente, se prepararon las soluciones de polimerización:

	Gel concentrador	Gel separador
Geles pequeños	4% acrilamida	12,5% acrilamida
Geles medianos	-	12,5% acrilamida
Geles grandes	5% acrilamida	gradiente 10-15% acrilamida

**Tabla 9.** Concentración de acrilamida de los geles polimerizados.

#### 2.3.3.2 Equilibración de las tiras

De manera previa a la separación de las proteínas en un gel SDS-PAGE, las tiras IPG fueron equilibradas. Durante la etapa de equilibración, que se dividió en dos etapas, las tiras fueron incubadas a RT en agitación suave con:

- *Tiras IPG comerciales.* Al tampón de equilibración 2-DE DIGE (6 M urea, 0,1 M Tris, 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glicerol, pH 8) se le añadió un 0,5% (w/v) DTT en la etapa de reducción y un 2,25% (w/v) iodoacetamida (IAA) en la etapa de alquilación. Ambas incubaciones fueron de 15 minutos.
- *Tiras IPG zoom.* Al tampón de equilibración *zoom* (6 M urea, 0,5 M Tris, 2% (w/v) SDS, 30% (w/v) glicerol, pH 6,8) se le añadió 2% (w/v) DTT o 2,5% (w/v) IAA en cada una de las etapas, que duraron 10 y 5 minutos, respectivamente.

En el caso del *oxyblot* bidimensional, la tira IPG comercial fue incubada durante 10 minutos a RT en tampón derivatizante (10 mM DNPH en 2 N HCl) de manera previa a su equilibración.

Una vez finalizada la equilibración se depositó la tira sobre la superficie del gel, polimerizado tal como se detalla en el apartado *western blot*, y se cubrió con una solución de agarosa (1% (w/v) agarosa, 0,002% (w/v) azul de bromofenol en tampón de electroforesis).

### 2.3.3.3 Electroforesis SDS-PAGE

Los geles fueron introducidos en las cubetas electroforéticas, que contenían tampón de electroforesis (25 mM Tris, 192 mM glicina y 0,1% (w/v) SDS) y estaban conectadas a una fuente de refrigeración externa. Se colocó la cámara electroforética superior sobre los cristales, excepto en el caso de los geles pequeños, y se rellenó de tampón de electroforesis, que poseía un 0,2% (w/v) SDS. Se aplicó el siguiente voltaje:

	Cámara de electroforesis	Voltaje
Geles pequeños	SE250 Multivertical Unit (GE Healthcare)	100 V (20 min) 120 V (aprox. 2h)
Geles medianos	SE600 Vertical Electrophoresis Chamber (Hoefer Scientific Instruments)	25 mA/gel (aprox. 4h)
Geles grandes	Ettan Dalt Six (GE Healthcare)	2,5 W/gel (30 min) 17 W/gel (aprox. 5h)

**Tabla 10.** Parámetros empleados para la separación de las proteínas en geles SDS-PAGE.

La electroforesis finalizó cuando el frente distó solamente 1 cm del final del gel.

## 2.4 Detección y visualización de proteínas

### 2.4.1 Inmunodetección

#### 2.4.1.1 Western blot

Los geles fueron transferidos a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) o nitrocelulosa en el sistema Trans-Blot SD Semy-Dry Transfer Cell (Bio-Rad) durante 1:15h a 0,75 mA/cm<sup>2</sup> membrana. El mismo protocolo se utilizó para la transferencia de las proteínas separadas únicamente por pl en tiras IPG, las cuales no sufrieron ningún tratamiento adicional previo.

Las membranas fueron bloqueadas durante 1 hora a RT con 5% (w/v) leche descremada en 0,02 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,4 con 0,1% (v/v) Tween-20 (TBS-T). A continuación las membranas fueron incubadas *overnight* a 4°C con el anticuerpo primario en solución de bloqueo y lavadas con TBS-T. Posteriormente, las membranas fueron incubadas durante 1 hora a RT con el anticuerpo secundario correspondiente en solución de bloqueo y nuevamente lavadas con TBS-T. Finalmente, las bandas proteicas fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia (ECL Western Blotting Detection kit, GE Healthcare) en el sistema de imagen LAS-3000 (Fujifilm) y cuantificadas por densitometría con el *software* MultiGauge (Fujifilm).

Molécula	Membrana	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Actina	PVDF	1/1000	Anti-IgG ratón-HRP 1/5000
Apolipoproteína A-I	PVDF	1/5000	Anti-IgG conejo-HRP 1/10000
Dinitrofenil	PVDF	1/5000	Anti-IgG conejo-HRP 1/10000
Haptoglobina	PVDF	1/5000	Anti-IgG conejo-HRP 1/10000
Pig-MAP	Nitrocelulosa	1/1000	Anti-IgG ratón-HRP 1/5000

**Tabla 11.** Condiciones empleadas para la inmunodetección de diferentes moléculas por *western blot*.

#### 2.4.1.2 Slot blot

Se diluyó el suero en agua 1/14000 mediante diluciones seriadas. 75  $\mu$ L del suero diluido ( $\sim$  0,5  $\mu$ g) fue aplicado en cada pocillo del *slot blotter* (GE Healthcare) que ya contenía 25  $\mu$ L de agua. Se succionó el contenido de los pocillos con una bomba de vacío.

La membrana fue derivatizada durante 5 minutos a RT en la oscuridad con 10 mM DNPH en 2N HCl y lavada con 2N HCl (Robinson et al., 1999). A continuación, la membrana fue bloqueada durante 1 hora a RT con 5% (w/v) leche descremada en TBS-T y se procedió tal como se ha descrito previamente.

Molécula	Membrana	Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
Dinitrofenil	PVDF	1/25000	Anti-IgG conejo-HRP 1/10000

**Tabla 12.** Condiciones empleadas para la inmunodetección de diferentes moléculas por *slot blot*.

### 2.4.2 Tinciones

#### 2.4.2.1 Tinción con plata

La tinción se realizó a RT en agitación suave. Los geles fueron incubados *overnight* con la solución de fijación (30% (v/v) etanol, 10% (v/v) ácido acético) y durante 1 hora con la solución de sensibilización (0,5 M acetato de sodio, 8 mM tiosulfato de sodio, 30% (v/v) etanol). Éstos fueron lavados posteriormente con agua y teñidos durante 30 minutos con 2 g/L nitrato de plata. A continuación, se lavaron con agua y se visualizaron los *spots* con la solución de velado (0,7 M carbonato de sodio, 3,75% (v/v) formaldehído). La reacción de velado finalizó mediante la adición de 10 g/L glicina. Los geles fueron escaneados en el ImageScanner III (GE Healthcare) con una resolución de 300 dpi.

#### 2.4.2.2 Tinción con azul de Coomassie

La tinción se realizó a RT en agitación suave. El gel se fijó *overnight* en 40% (v/v) metanol, 5% (v/v) ácido fosfórico. Las proteínas fueron visualizadas con el colorante azul de Coomassie coloidal G-250, provisto en el Novex Colloidal Blue Staining Kit (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. La imagen (mapa) fue digitalizada en el escáner ImageScanner III con una resolución de 300 dpi.

### 2.4.2.3 Tinción fluorescente Flamingo

Se visualizó la proteína total de los geles mediante la tinción fluorescente Flamingo (Bio-Rad). Los geles fueron fijados durante 24 horas a RT con una solución de 40% (v/v) etanol y 10% (v/v) acético y teñidos durante 3 horas a RT en la oscuridad con 10% (v/v) Flamingo. Los mapas resultantes fueron digitalizados mediante el escáner Typhoon 9400 (GE Healthcare) a 532 nm.

### 2.4.2.4 Tinción fluorescente Sypro Ruby

Algunas membranas fueron teñidas con Sypro Ruby (Sigma) inmediatamente después de la transferencia de las proteínas. Se fijaron las proteínas durante 15 minutos a RT en 10% (v/v) etanol, 7% (v/v) ácido acético. Posteriormente, la membrana fue lavada con agua y teñida con Sypro Ruby, diluido 1/50000, durante 30 minutos a RT en la oscuridad. Después de varios lavados con agua, la tinción fluorescente fue visualizada en el escáner Typhoon 9400 con las longitudes de onda de excitación/emisión 610 nm y 457 nm.

### 2.4.3 Visualización de las proteínas marcadas con fluorocromos.

Los geles 2-DE DIGE fueron escaneados en el Typhoon 9400. Se utilizaron las longitudes de onda de excitación/emisión recomendadas para cada fluorocromo: Cy2 y G-100 a 488 nm/520 nm, Cy3 y G-200 a 532 nm/580 nm, y Cy5 y G-300 a 633 nm/670 nm, a una resolución de 100  $\mu$ m.

### 2.4.4 Análisis de las imágenes

Los mapas monodimensionales y bidimensionales fueron analizados con diferentes *softwares*. La densitometría de los *spots* de los geles *zoom* fue realizada con el *software* Quantity One 4.4.0 (Bio-Rad). En cambio, el análisis de los geles 2-DE DIGE se llevo a cabo con los *softwares* DeCyder 6.0 (GE Healthcare) y SameSpots (Nonlinear).

Los *softwares* DeCyder y el SameSpots alinearon las imágenes correspondientes a cada muestra, normalizaron la intensidad de cada *spot* respecto al *pool* interno presente en cada gel y compararon el área de los *spots* entre las diferentes muestras. Asimismo, seleccionaron los *spots* diferenciales candidatos mediante la eliminación de los *spots* cuyo *fold* fue inferior a 1,2 y cuya posibilidad de cambio fuese debida a la situación biológica estudiada (*P*) superior a 0,05. Los *spots* seleccionados fueron alineados con los *spots* obtenidos con la tinción fluorescente Flamingo. El alineamiento generó una tabla con las coordenadas de cada *spot* en el gel.

### 2.5 Visualización de residuos glucídicos: tinción con lectinas

Para la visualización de los residuos glucídicos, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa, tal como se ha descrito previamente. La membrana fue incubada durante 2 minutos a RT con 0,2% Tween en PBS (PBS-T) y posteriormente lavada con PBS (0,14 M NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4). Se incubó la membrana *overnight* a RT con la lectina diluida en

tampón de lectina (1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, and 1 mM MgCl<sub>2</sub> en PBS-T). Tras varios lavados con PBS, las bandas glucídicas fueron visualizadas mediante quimioluminiscencia (ECL Western Blotting Detection kit, GE Healthcare).

Molécula	Membrana	Lectina	Dilución
Residuos N-acetilglucosamina	Nitrocelulosa	Aglutinina del germen del trigo (WGA) - HRP	1/10000
Residuos D-manosil o D-glucosil	Nitrocelulosa	Concanavalina A (ConA) - HRP	1/20000

**Tabla X.** Condiciones empleadas para la tinción de los residuos glucídicos de interés con lectinas.

## 2.6 Fraccionamiento del proteoma plasmático

Se recogió toda la resina que contenían las microcolumnas del kit comercial ProteoMiner (Bio-Rad) y se depositó en un nuevo tubo. Se mezcló con cuidado toda la resina recuperada y se traspasó el volumen deseado a nuevas microcolumnas. Se eliminó la solución conservante y encima de la resina se añadió el volumen de suero necesario para mantener la relación 1:10 (mg proteína:µL resina), tal como recomendó el Servicio Técnico de la casa comercial Bio-Rad. Se utilizó un mínimo de 20 mg de proteína con el objetivo de recuperar alrededor del 25% de la proteína inicial (5 mg) para futuros experimentos.

El enriquecimiento del proteoma plasmático fue llevado a cabo siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Los lavados se realizaron con PBS y la elución de las muestras con una solución de 8 M urea, 2% (w/v) CHAPS y 5% (v/v) ácido acético.

## 2.7 Purificación de la haptoglobina

Se resuspendieron 2 g de Sefarosa activada por CNBr de cianógeno (GE Healthcare) en 1 mM HCl, en un tubo de 50 mL, y se lavó con el tampón de unión (0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 0,5 M NaCl, pH 8). Una vez rehidratada la Sefarosa, se obtuvo un volumen de resina de 6 mL aproximadamente. 60 mg hemoglobina porcina (Sigma) fueron disueltos en el tampón de unión y añadidos lentamente a la resina. La mezcla rotó durante 2 horas a RT y posteriormente, ésta fue lavada con tampón de unión, bloqueada *overnight* con 0,1 M Tris-HCl pH 8, y lavada en ciclos alternos de tampones 0,15 M NaCl a pH 3 y pH 11 (Liau et al., 2003).

Se añadió un volumen de suero a la resina, la mezcla rotó durante 2 horas a RT y posteriormente fue lavada en 0,15 M NaCl pH 7. La haptoglobina fue eluida inicialmente con 0,15 M NaCl pH 11 y sucesivamente con 6 M urea en 0,15 M NaCl pH 11. Rápidamente, el pH extremo de la solución fue reducido con 1 M Tris-HCl pH 7.

La solución de haptoglobina fue dializada durante 48 horas a 4°C contra 0,1% (v/v) ácido acético, 0,1% (v/v) acetonitrilo (ACN). Posteriormente, ésta fue concentrada en los tubos concentradores Centriprep (Millipore) y cuantificada con el Bradford Protein Assay (Bio-Rad). Se conservó a -20°C.

## 2.8 Digestiones enzimáticas

### 2.8.1 Digestión con la N-glicosidasa

Se diluyó la haptoglobina pura en tampón de digestión 5X para N-glicosidasa (PNGasa) (250 mM fosfato de sodio, pH 7,5) hasta alcanzar una concentración de 0,5 µg/µL y se le añadió 0,1 volumen de tampón de desnaturalización (2% (w/v) SDS, 1 M β-mercaptoetanol). La mezcla hirvió durante 10 minutos a 95°C y a continuación, se le añadió 0,1 volúmenes de 15% (v/v) Tritón X-100 y 20 mU enzima PNGasa. La muestra fue digerida *overnight* a 37°C. La reacción finalizó al hervir la muestra.

### 2.8.2 Digestión con la O-glicosidasa y la neuraminidasa

Se diluyó la haptoglobina pura con tampón de digestión 5X para O-glicosidasa (250 mM fosfato de sodio, pH 5) o para neuraminidasa (sialidasa) (250 mM fosfato de sodio, pH 6) hasta obtener una concentración de 0,5 µg/µL. Se añadieron 20 mU de enzima a la muestra y se incubó la mezcla *overnight* a 37°C. La reacción finalizó al hervir la muestra.

Asimismo, se empleó también el protocolo de la PNGasa con estas dos enzimas. Cuando la digestión enzimática se realizó con las tres enzimas conjuntamente, se utilizó el tampón de digestión de la neuraminidasa y se trabajó en condiciones desnaturalizantes.

## 2.9 Espectrometría de masas

La MS se realizó en diferentes laboratorios:

- Servicio de Proteómica del Institut d'Oncologia Vall d'Hebron (VHIO), en Barcelona (miembro de la Red Española de Proteómica, ProteoRed-ISCI): caracterización de los *spots* diferenciales procedentes de los geles 2-DE DIGE y preparación de las muestras para su análisis por iTRAQ.
- Servicio de Proteómica VetOMICS, de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena: identificación de las proteínas y las PTMs presentes en los *spots* de los geles *zoom*.
- Servicio de Proteómica del Parc Científic, en Barcelona (miembro de la Red Española de Proteómica, ProteoRed-ISCI): cuantificación e identificación de los péptidos mediante iTRAQ.
- Departamento de Biología Molecular de la Universidad de Aarhus, en Dinamarca: cuantificación de los péptidos por SRM.
- Departamento de Sistemas Biomoleculares del Instituto Max Planck de Coloides e Interfases, en Potsdam: glicoproteómica.

## 2.9.1 Preparación de la muestra

### 2.9.1.1 Spots procedentes de geles bidimensionales

#### Protocolo VHIO

La escisión de los *spots* de los geles 2-DE DIGE se realizó mediante el Ettan Spot Picker (GE Healthcare), que utilizó las coordenadas generadas por los *softwares* de análisis de imagen. Los *spots* recortados fueron lavados con 25 mM bicarbonato amónico (ABC) y con 50 mM ABC en 50% (v/v) ACN. A continuación, los *spots* fueron deshidratados con ACN y rehidratados en una solución de 40 ng de tripsina en 25 mM ABC (Shevchenko et al., 1996). Los *spots* fueron digeridos durante 3 horas a 37°C. Se extrajeron los péptidos resultantes (péptidos trípticos) con 0,2% (v/v) TFA, que fueron purificados en la placa 96-well Zip Plate C18, del kit Montage in Gel Digest ZT (Millipore) y reconstituidos con 0,1% (v/v) TFA en 50% (v/v) ACN.

#### Protocolo VetOMICS

Los *spots* fueron recortados manualmente del gel, lavados con agua *milliQ* y 100 mM ABC y desteñidos durante 2 minutos aproximadamente con 15 mM ferricianuro de potasio en 50 mM tiosulfato de sodio (Gharahdaghi et al., 1999). El *spot* fue lavado con agua *milliQ* y 100 mM ABC, y deshidratado con ACN. Éste fue secado, reducido durante 1 hora a 56°C en 5 mM DTT y alquilado durante 45 minutos con 55 mM IAA (Jiménez et al., 2001). La digestión se realizó durante 8 horas con 2 µg tripsina en 50 mM ABC, 5 mM CaCl<sub>2</sub> (Shevchenko et al., 1996). Los péptidos fueron desalados con Zip-Tips C18 (Millipore) y reconstituidos en 0,1% (v/v) TFA.

### 2.9.1.2 Muestras para iTRAQ

Las muestras fueron desaladas con el kit 2-D Clean-Up, resuspendidas en 6 M urea, 0,5 M trietilamonio bicarbonato (TEAB) y cuantificadas con el kit RcDc Protein Assay. 150 µg proteína fue reducida durante 1 hora a 37°C con 10 mM DTT y alquilada durante 30 minutos a RT en la oscuridad con 30 mM IAA. El exceso de IAA fue contrarrestado con 37,5 mM N-acetilcisteína. Las muestras fueron diluidas en el tampón TEAB (0,5 M TEAB pH 8,5) y digeridas con 1,5 µg de tripsina *overnight* a 37°C. Los péptidos trípticos obtenidos fueron purificados en discos Empore de C18 (Varian), evaporados y resuspendidos en tampón TEAB.

Se traspasaron 100 µg de péptidos a un nuevo tubo. Además, se formó un *pool* interno de todas las muestras. El marcaje isobárico de los péptidos fue realizado con el kit iTRAQ Reagents - 8plex (AB Sciex) siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Una vez finalizado el marcaje, todas las muestras fueron combinadas. La muestra fue desalada en columnas C18 OASIS (Waters), evaporada y resuspendida en tampón *off-gel* 1,25X (12% (v/v) glicerol, 1,2% (v/v) anfolitos) a una concentración de 0,1 µg/µL.

Para reducir la complejidad de la muestra, los péptidos fueron fraccionados por pi en el 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies) utilizando tiras IPG comerciales de 13 cm con un gradiente de pH 3-10, sobre las cuales se colocaron aplicadores con doce pocillos. Se añadió 40 µL de tampón de rehidratación *off-gel* 1X en cada pocillo y 15 minutos más tarde, 150 µL de muestra por pocillo. Los péptidos se separaron por IEF, siguiendo el protocolo del fabricante.

Al finalizar el fraccionamiento, se recogió el volumen de cada pocillo y se combinaron las fracciones homólogas de las dos tiras IPG. Las 12 fracciones obtenidas fueron purificadas en discos Empore de C18, evaporadas y resuspendidas en 0,1% (v/v) ácido fórmico (FA). Para validar la distribución y la intensidad de cada una de las fracciones, se inyectó 1 µg de cada fracción en la trampa iónica Esquire HCT (Bruker) (el método empleado se detalla más adelante, en el apartado identificación de proteínas por MS en tándem, protocolo VHIO). Las fracciones que presentaron una menor concentración de proteínas fueron combinadas entre sí, con el objetivo de trabajar con un menor número de fracciones peptídicas.

### 2.9.1.3 Muestras para SRM

50 µg de proteína fueron transferidos a un nuevo tubo y diluidos en tampón desnaturante (8 M urea, en 100 mM ABC, pH 8). Las proteínas fueron reducidas durante 30 minutos en solución reductora (10 mM DTT en 50 mM ABC) y alquiladas durante 20 minutos en tampón alquilante (55 mM IAA en 50 mM ABC). La mezcla fue diluida 4 veces en 50 mM ABC. Se añadió 1 µg tripsina a la muestra y la digestión se llevó a cabo *overnight* a 37°C. Posteriormente, se paró la reacción con 100% (v/v) FA hasta alcanzar un pH de 2. Los péptidos fueron purificados mediante StageTips (Proxeon), evaporados y resuspendidos en 0,1% (v/v) FA.

### 2.9.1.4 Muestras para un análisis glicoproteómico

2 - 5 µg de glicoproteínas fueron separadas en geles 1-DE o 2-DE y transferidas a una membrana de PVDF, siguiendo los protocolos descritos previamente. La membrana fue teñida con el colorante Direct Blue 71 (Sigma), tal como se describe en el trabajo de Kolarich et al. (2012), para visualizar las bandas proteicas. Éstas fueron recortadas y bloqueadas con 1% (w/v) polivinilpirrolidona-40 en 50% (v/v) metanol.

La escisión de los glicanos se realizó tal como se describe en el trabajo de Jensen et al. (2012). Las membranas fueron incubadas *overnight* a 37°C con 2,5 U PNGasa F y se recuperó el sobrenadante, que contenía los N-glicanos. Éstos fueron incubados 1 hora con 100 mM acetato de amonio (pH 5) y reducidos durante 3 horas a 50°C con 1 M NaBH<sub>4</sub> en 50 mM KOH. Los O-glicanos fueron escindidos de la membrana posteriormente mediante una β-eliminación reductora. La membrana fue incubada *overnight* a 50°C con 0,5M NaBH<sub>4</sub> en 50 mM KOH.

Los N- y O-glicanos fueron desalados mediante una cromatografía de intercambio catiónico (Dowex) en microcolumnas caseras. El borato de la solución fue eliminado mediante coevaporación con metanol. Los glicanos fueron purificados en microcolumnas caseras de C18 y resuspendidos en 10 mM ABC.

## 2.9.2 Identificación de los *spots* procedentes de geles bidimensionales

### 2.9.2.1 Huella peptídica

#### Protocolo VHIO

1  $\mu$ L de péptidos fueron cargados en la placa AnchorChip (Bruker Daltonics) que contenía ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA). La adquisición de los espectros se realizó en el Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics), los cuales fueron analizados con el *software* FlexAnalysis 2.2 (Bruker Daltonics). La búsqueda se realizó en el motor de búsqueda Mascot, que utilizó las bases de datos SwissProt y NCBI utilizando la taxonomía mamíferos u otros mamíferos (excluyendo los primates y los roedores).

#### Protocolo VetOMICS

0,5  $\mu$ L de péptidos fueron cargados en la placa AnchorChip (Bruker Daltonics), que contenía CHCA. La adquisición de los espectros se realizó en el Ultraflex II TOF/TOF (Bruker Daltonics) y fueron analizados con los *softwares* FlexAnalysis y Biotools (Bruker Daltonics). La búsqueda se realizó en el motor de búsqueda Mascot, que empleó las bases de datos SwissProt y NCBI utilizando la taxonomía mamíferos u otros mamíferos.

### 2.9.2.2 Espectrometría de masas en tándem

La espectrometría de masas en tándem se empleó para caracterizar las proteínas no identificadas y verificar las identificadas por huella peptídica.

#### Protocolo VHIO

Los péptidos trípticos fueron atrapados en una precolumna microPepMap C18 (300  $\mu$ m, 500  $\mu$ m x 1 mm diámetro interno (ID)) (Dionex) y separados en una columna Acclaim PepMap C18 (75  $\mu$ m, 15 cm x 3  $\mu$ m ID) (Dionex) en el interior del sistema cromatográfico nanoHPLC UltiMate 3000 (Dionex). Posteriormente fueron separados en un gradiente creciente de solvente B (80% (v/v) ACN en 0,1% (v/v) FA) del 0 al 60% en 22 minutos con un flujo de 300 nL/min e ionizados en una fuente nanoESI.

El análisis MS en tándem fue realizado en el analizador Esquire HCT (Bruker). Los dos picos más intensos de cada escaneo (310-1500 m/z) fueron fragmentados. Los espectros MS/MS fueron analizados mediante el *software* ProteinScape 2.1 (Bruker), que empleó el buscador Mascot, las bases de datos SwissProt y NCBI y la taxonomía mamíferos u otros mamíferos.

## Protocolo VetOMICS

Los péptidos fueron reconstituidos en 0,1% (v/v) TFA y separados en una columna Acclaim PepMap C18 (75  $\mu$ m, 15 cm x 3  $\mu$ m ID) (Dionex) en el interior del sistema cromatográfico nanoHPLC UltiMate 3000 RSLC (Dionex). Posteriormente fueron separados en un gradiente creciente de solvente B (80% (v/v) ACN en 0,1% (v/v) FA) del 4 al 55% en 30 minutos con un flujo de 300 nL/min e ionizados en una fuente nanoESI.

El análisis MS en tándem fue realizado en el analizador Esquire HCT (Bruker Daltonics). Los tres picos más intensos de cada escaneo (310-1500 m/z) fueron fragmentados. Los espectros MS/MS fueron analizados mediante el *software* HyStar 3.2 (Bruker Daltonics), en combinación con los *software* Esquire Control 6.1 (Bruker Daltonics), Chromoleon DCMS link (Dionex) y ProteinScape 2.0 (Bruker Daltonics). Éstos emplearon el buscador Mascot, las bases de datos SwissProt y NCBI y la taxonomía mamíferos u otros mamíferos.

### 2.9.3 Cuantificación de las proteínas por espectrometría de masas

#### 2.9.3.1 Cuantificación por iTRAQ

Los péptidos fueron resuspendidos en 5% (v/v) ACN, 1% (v/v) FA. 0,5  $\mu$ g de péptidos fueron atrapados en la precolumna Symmetry C18 (5  $\mu$ m, 180  $\mu$ m x 20 mm ID) (Waters) y separados en la columna nanoACQUITY UPLC BEH C18 (75  $\mu$ m, 25 cm x 1,7  $\mu$ m ID) (Waters), en el interior del sistema cromatográfico nanoACQUITY (Waters). Posteriormente fueron separados en un gradiente creciente de solvente B (0,1% (v/v) FA en 100% (v/v) ACN) del 2 al 35% en 155 minutos y del 35 al 45% en 20 minutos con un flujo de 250 nL/min e ionizados en una fuente nanoESI.

El análisis MS en tándem fue realizado en el analizador LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific). Los diez picos más intensos de cada escaneo (300-1800 m/z) fueron fragmentados. Los espectros MS/MS obtenidos fueron analizados por el *software* Xcalibur Thermo 2.1.0.1140 (Thermo Scientific), que empleó el buscador Mascot, la base de datos SwissProt y la taxonomía otros mamíferos para identificar las proteínas. La cuantificación de los 8 marcajes isobáricos se realizó mediante el *software* Proteome Discoverer (Thermo Scientific).

Se calculó la media de los valores de todos los péptidos correspondientes a la misma proteína y la ratio de cada proteína en la muestra respecto al promedio obtenido en el *pool* interno. Las ratios de cada proteína fueron normalizadas mediante el centrado en la media y el valor medio de la distribución de su frecuencia fue aplicado como factor de normalización, asumiendo que la gran mayoría de las proteínas no varió entre las diferentes condiciones.

### 2.9.3.2 Cuantificación por SRM

De manera previa a la cuantificación de los péptidos por SRM, se creó el método de análisis en el *software* Skyline (MacCoss Lab Software), en el cual se insirieron las secuencias de las proteínas de en formato .fasta, procedentes de la base de datos SwissProt. En el *software* se fijaron los siguientes filtros para las proteínas y las transiciones (iones originados durante la fragmentación) para seleccionar los péptidos proteotípicos:

- *Filtros para las proteínas.* Digestión: tripsina; sitios de corte perdidos permitidos: 1; modificaciones fijas: carbamidometil (C); modificaciones variables: oxidación (M); longitud mínima: 7; longitud máxima: 20; excluir aminoácidos desde N-term.: 25, excluir los péptidos que contienen: Cys, Met.
- *Filtros para las transiciones.* Carga del ión precursor: 2; carga del ión (fragmentado): 1; tipo de ión: y; masa de los iones (precursor y fragmentado): monoisotópica.

Además, se excluyeron manualmente aquellas transiciones inferiores a y4 (excepto para transiciones con muy pocos aminoácidos, en los que se incluyó y3), el ion precursor, el ión precursor-1 y aquellas transiciones cuya relación m/z fue superior a 1100.

5 µg de péptidos fueron separados en una columna ReproSil-Pur C18-AQ (5 µm, 2 cm x 100 µm ID) (Thermo Scientific) y a continuación en una columna capilar ReproSil-Pur C18-AQ casera (3 µm, 16 cm x 75 µm ID), en el interior del sistema cromatográfico EASY-nLC (Proxeon). Los péptidos fueron separados en un gradiente creciente de solvente B (0,1% (v/v) FA, 90% (v/v) ACN) del 5 al 35% en 12 minutos con un flujo de 250 nL/min e ionizados en una fuente nanoESI (NanoSpray III (AB Sciex)).

El análisis MS en tándem fue realizado en el analizador QTrap 5500 (AB Sciex). Durante la fase de puesta a punto y optimización del método, se obtuvieron hasta 6 espectros MS/MS por escaneo, mientras que durante la fase de cuantificación, el número de espectros MS/MS por escaneo dependió de las características de cada transición. El *software* Analyst 1.6.1 (AB Sciex) controló el proceso y los espectros MS/MS fueron exportados y analizados en el *software* Skyline.

### 2.9.4 Análisis glicoproteómico

Los glicanos fueron atrapados en una precolumna (5 µm, 5 mm x 0,2 mm ID) y separados en una columna de carbón poroso grafitizado Hypercarb (5 µm, 100 mm x 0,32 mm ID), ambas de Thermo Scientific, en el interior del sistema cromatográfico UltiMate 3000 UHPLC (Dionex). Posteriormente fueron separados en un gradiente creciente de solvente B (10 mM ABC en 90% (v/v) ACN) del 0 al 2% en un minuto, del 2 al 20% en 48 minutos y del 20 al 98% en 2 minutos con un flujo de 6 µL/min y eluidos hasta la fuente de ionización nESI.

En análisis de MS en tándem fue realizado en el analizador AmaZon ETD Speed (Bruker Daltonics). Los tres picos más intensos de cada escaneo (400-1800 m/z) fueron fragmentados. Los espectros MS/MS obtenidos fueron caracterizados manualmente en función de su masa, el tiempo de retención y los oligosacáridos generados después de su fragmentación por colisión (Pabst et al., 2007). Complementariamente, se utilizaron las bases de datos GlycoSuit y GlycoMod.

### 2.10 Análisis estadístico

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante el *software* SPSS 17.0. Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para examinar el tipo de distribución que presentaron los diferentes marcadores. Los parámetros que presentaron una distribución normal fueron evaluados con el test ANOVA de una vía, en el que se aplicó el test de Duncan, mientras que las moléculas cuya distribución no se ajustó a la normalidad fueron examinadas con el test Kolmogorov-Smirnov y Kruskal-Wallis. Se empleó la correlación de Pearson para comparar variables.

### 2.11 Análisis de *clustering*

El análisis de *clustering* se realizó mediante el *software* Cluster 3.0 y los resultados fueron visualizados mediante la aplicación TreeView 1.60. Para ello, se calculó la ratio de la concentración o actividad de cada marcador entre el día 25 y el 19, para su normalización, y los valores fueron transformados a logaritmo de base 2.

## RESULTADOS



## CAPÍTULO 1: CERDOS ALOJADOS A UNA ELEVADA DENSIDAD DE ESTABULACIÓN

(Marco-Ramell *et al.* (2011) Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Vet J.* 190:66–71)

La elevada densidad de estabulación (HD) se asocia a un pobre bienestar y es una de las fuentes de estrés más comunes que existen en cerdos criados con fines comerciales (Leek *et al.*, 2004).

En condiciones de HD, el reposo es de menor duración ya que no hay espacio suficiente para que todos los animales descansen a la vez. A veces, deben reposar sobre las heces y la orina porque las áreas destinadas a las diferentes actividades se solapan (Stolba and Wood-Gush, 1989) y lo hacen de manera decúbito esternal ya que la postura lateral requiere que ocupen una área mayor (European Food Safety Authority, 2007).

A la hora de comer, los individuos que se encuentran más arriba en el rango social se alimentan en la zona central del comedero y fuerzan a que los otros se peleen físicamente o se amenacen por un puesto en los extremos del comedero, por lo que los cerdos de menor rango social reducen su dieta y ganan menos peso (Gonyou and Stricklin, 1998; Meunier-Salaun *et al.*, 1987).

Asimismo, aumentan las agresiones y actividades orales contra otros cerdos, pero éstos no pueden evitarlas ni huir ya que el espacio es insuficiente (Bornett *et al.*, 2000). Desde el punto de vista patológico, una elevada densidad de estabulación predispone a la caudofagia (Schrøder-Petersen and Simonsen, 2001), al dolor y las infecciones (Manteca, 2009), a la transmisión de parásitos (Thamsborg *et al.*, 1999), y a la prevalencia de lesiones en las pezuñas y problemas en las patas de los animales, como inflamación, dolor en las articulaciones, cojeras y rigidez (Jensen *et al.*, 2009).

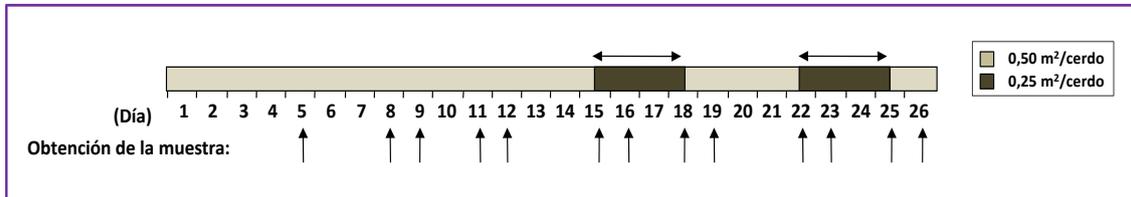
### Diseño experimental

El experimento se realizó en el Servicio de Granjas Experimentales de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) en colaboración con el grupo de Etología (Dr. Ruíz de la Torre, Prof. Manteca y Dr. Temple), del departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos en la Unidad de Producción Animal de la Facultad de Veterinaria de la UAB.

Se emplearon ocho cerdos macho de la raza Duroc x Landrace x Large White, de 18 kg al inicio del experimento. Los ocho animales convivieron durante 26 días en una celda bajo las mismas condiciones nutricionales e higiénicas. Ninguno de ellos presentó un comportamiento anormal ni signos clínicos de enfermedad.

Los ocho cerdos fueron alojados en un corral con suelo de listones a una densidad de 0,50 m<sup>2</sup>/cerdo (100 kg/m<sup>2</sup>, baja densidad de estabulación, LD). Se mantuvieron estabulados a esta densidad durante 15 días, período que se consideró oportuno para reducir los efectos psicológicos y fisiológicos asociados al transporte, al nuevo alojamiento y a los nuevos compañeros, y para establecer la jerarquía social. A lo

largo del experimento se redujo dos veces, en períodos de 72h, las dimensiones del corral. Para ello, se movió una de las vallas que delimitaba el perímetro del corral y se colocó en el centro de éste, disminuyendo el espacio disponible a la mitad, es decir a  $0,25 \text{ m}^2/\text{cerdo}$  ( $200 \text{ kg}/\text{m}^2$ , HD), tal como se observa en la figura 15 y en las imágenes siguientes. Se extrajeron muestras de sangre diferentes días del experimento (figura X).



**Figura 15.** Esquema representativo del diseño experimental de este estudio. Los días marcados en gris claro representan el período de LD de estabulación, mientras que en gris oscuro el período de HD de estabulación. Las flechas señalan los días en que se extrajeron las muestras.



**Imágenes 1 y 2.** Toma de muestras en un día en que los cerdos estaban alojados a HD de estabulación.

El objetivo de este capítulo es valorar la respuesta fisiológica de estrés de un grupo de 8 cerditos jóvenes cuando son alojados en condiciones de HD de estabulación y encontrar nuevos marcadores de bienestar porcino.

## 1. Perfil bioquímico

Se realizó un perfil bioquímico de todas las muestras que conforman el experimento, basado en la literatura existente acerca de los marcadores bioquímicos de bienestar porcino actuales y los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo (Saco et al., 2008, 2003). Se muestran los resultados bioquímicos obtenidos a partir del día 12 del estudio.

### 1.1 Hormonas de estrés

Se determinó por ELISA la concentración del cortisol total presente en el suero de todos los animales que formaban parte del estudio:

Día	Cortisol (µg/dL)	Periodo densidad
12	1,86 ± 1,36	LD
15	2,01 ± 1,17	
16	1,66 ± 0,76	HD
18	1,67 ± 1,09	
19	1,63 ± 1,16	LD
22	2,58 ± 1,72	
23	1,46 ± 0,82	HD
25	2,16 ± 1,54	
26	1,31 ± 0,86	LD

**Tabla 13.** Evolución de los niveles del cortisol plasmático a lo largo del experimento (n=8; media ± desviación estándar).

Periodo	Cortisol
Periodo días 12 - 18 (LD → HD)	NS
Periodo días 16 - 22 (HD → LD)	NS
Periodo días 19 - 25 (LD → HD)	NS
Periodo días 23 - 26 (HD → LD)	NS

**Tabla 14.** Evaluación del comportamiento del cortisol plasmático en varios periodos del experimento en los que se llevó a cabo un cambio de densidad. Abreviaturas: NS; no significativo ( $P > 0,05$ ).

No se observaron variaciones significativas en el cortisol plasmático a lo largo del experimento, ni en condiciones de HD ni durante la LD.

## 1.2 Marcadores de metabolismo lipídico

Se cuantificaron en el analizador automático Olympus AU400 varios parámetros de metabolismo lipídico como el colesterol total, el colesterol asociado a las lipoproteínas de alta densidad (HDLs), el colesterol asociado a las lipoproteínas de baja densidad (LDLs), los triglicéridos (TGs) y los ácidos grasos no esterificados (NEFAs).

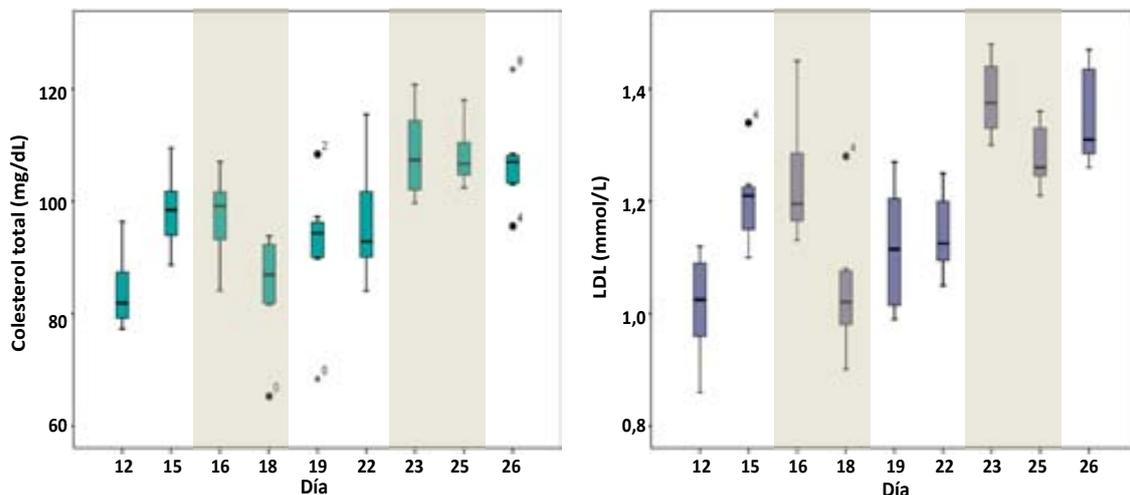
Día	Colesterol total (mg/dL)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	TGs (mg/dL)	NEFAs (mmol/L)	Periodo densidad
12	84 ± 6	0,78 ± 0,10	1,01 ± 0,09	63 ± 21	0,07 ± 0,01	LD
15	98 ± 7	0,90 ± 0,10	1,20 ± 0,07	69 ± 14	0,08 ± 0,01	
16	97 ± 8	0,89 ± 0,12	1,23 ± 0,11	60 ± 16	0,08 ± 0,01	HD
18	85 ± 9	0,82 ± 0,16	1,04 ± 0,11	47 ± 11	0,08 ± 0,01	
19	92 ± 11	0,88 ± 0,17	1,12 ± 0,11	58 ± 13	0,08 ± 0,01	LD
22	96 ± 10	0,93 ± 0,13	1,14 ± 0,07	60 ± 22	0,08 ± 0,01	
23	108 ± 8	0,98 ± 0,12	1,38 ± 0,07	51 ± 11	0,07 ± 0,01	HD
25	108 ± 5	1,01 ± 0,08	1,28 ± 0,05	56 ± 16	0,08 ± 0,01	
26	107 ± 8	1,03 ± 0,13	1,35 ± 0,08	65 ± 20	0,08 ± 0,01	LD

**Tabla 15.** Evolución de los niveles de varios marcadores de metabolismo lipídico a lo largo del experimento (n=8; media ± desviación estándar).

Periodo	Colesterol	HDLs	LDLs	TGs	NEFAs
Periodo días 12 - 18 (LD → HD)	***	NS	***	NS	NS
Periodo días 16 - 22 (HD → LD)	NS	NS	**	NS	NS
Periodo días 19 - 25 (LD → HD)	**	NS	***	NS	NS
Periodo días 23 - 26 (HD → LD)	NS	NS	*	NS	NS

**Tabla 16.** Evaluación del comportamiento de algunos marcadores de metabolismo lipídico en varios periodos del experimento en los que se llevó a cabo un cambio de de densidad. Abreviaturas: NS, no significativo ( $P > 0,05$ ). Nomenclatura: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

Los niveles del colesterol total y las LDLs aumentaron significativamente a causa de la HD, mientras que el resto de lípidos examinados no presentaron variaciones significativas en su concentración a lo largo del experimento. Se detectó un incremento de estos dos parámetros el día después de alojar a los animales en HD, pero éstos disminuyeron posteriormente. Asimismo, sus niveles fueron superiores en los últimos días del experimento respecto a los días previos al primer cambio de densidad. Por su parte, las LDLs fueron más sensibles a los cambios de densidad que el colesterol total:



**Gráficos 2 y 3.** Evolución de los niveles del colesterol total y las LDLs a lo largo del experimento. En blanco se señalan los periodos de LD de estabilización y en gris los de HD de estabilización.

### 1.3 Marcadores relacionados con el estado de salud

Se evaluó en el analizador automático Olympus AU400 la existencia de daño muscular a partir de la determinación de la actividad de la enzima creatina quinasa (CK) en el suero:

Día	CK (U/mL)	Periodo densidad
12	0,41 ± 0,14	LD
15	0,51 ± 0,28	
16	0,61 ± 0,48	HD
18	1,03 ± 1,42	
19	0,46 ± 0,20	LD
22	0,50 ± 0,24	
23	0,76 ± 0,61	HD
25	0,97 ± 0,52	
26	1,11 ± 1,40	LD

**Tabla 17.** Evolución de la actividad de la CK a lo largo del experimento (n=8; media ± desviación estándar).

Periodo	CK (P)
Periodo días 12 - 18 (LD → HD)	NS
Periodo días 16 - 22 (HD → LD)	NS
Periodo días 19 - 25 (LD → HD)	NS
Periodo días 23 - 26 (HD → LD)	NS

**Tabla 18.** Evaluación del comportamiento de la CK en varios periodos del experimento en los que se llevó a cabo un cambio de de densidad. Abreviaturas: NS; no significativo ( $P > 0,05$ ).

La actividad de la CK no varió de manera significativa durante los cambios de densidad aplicados en el corral, a pesar de que se detectó una elevada variación interindividual en los periodos de HD y en el día 26, momento en que los animales eran más grandes.

#### 1.4 Proteínas de fase aguda

Se determinó la concentración de algunas de las proteínas de fase aguda (APPs) más importantes en el cerdo en todas las muestras de suero del experimento. La haptoglobina (Hp) se midió mediante un ensayo colorimétrico, la proteína inter- $\alpha$ -inhibidor cadena pesada 4 (ITI4, también denominada como *Major Acute Phase* porcina o Pig-MAP) por ELISA, la proteína C-reactiva (CRP) a partir de un ensayo inmunoturbidimétrico y la apolipoproteína A-I (Apo A-I) mediante *western blot*. De esta última proteína solamente se compararon los niveles del día 19, como día representativo de la LD de estabulación, y el día 25, como muestra relativa al segundo periodo de HD en el corral.

Día	Hp (mg/mL)	Pig-MAP (mg/mL)	CRP ( $\mu$ g/mL)	Apo A-I (ratio)	Periodo densidad
12	0,88 $\pm$ 0,51	0,55 $\pm$ 0,15	17,26 $\pm$ 10,33	-	LD
15	0,98 $\pm$ 0,71	0,47 $\pm$ 0,20	16,64 $\pm$ 10,24	-	
16	0,90 $\pm$ 0,58	0,42 $\pm$ 0,14	20,71 $\pm$ 10,40	-	HD
18	0,69 $\pm$ 0,48	0,35 $\pm$ 0,13	17,25 $\pm$ 12,15	-	
19	0,79 $\pm$ 0,52	0,37 $\pm$ 0,15	17,60 $\pm$ 13,93	1,00 $\pm$ 0,00	LD
22	1,01 $\pm$ 0,89	0,37 $\pm$ 0,13	14,19 $\pm$ 10,92	-	
23	0,68 $\pm$ 0,47	0,49 $\pm$ 0,29	17,24 $\pm$ 9,93	-	HD
25	0,74 $\pm$ 0,34	0,73 $\pm$ 0,16	18,96 $\pm$ 8,35	0,85 $\pm$ 0,42	
26	0,85 $\pm$ 0,45	0,62 $\pm$ 0,27	23,10 $\pm$ 15,51	-	LD

**Tabla 19.** Evolución de la concentración de varias proteínas de fase aguda a lo largo del experimento (n=8; media  $\pm$  desviación estándar)

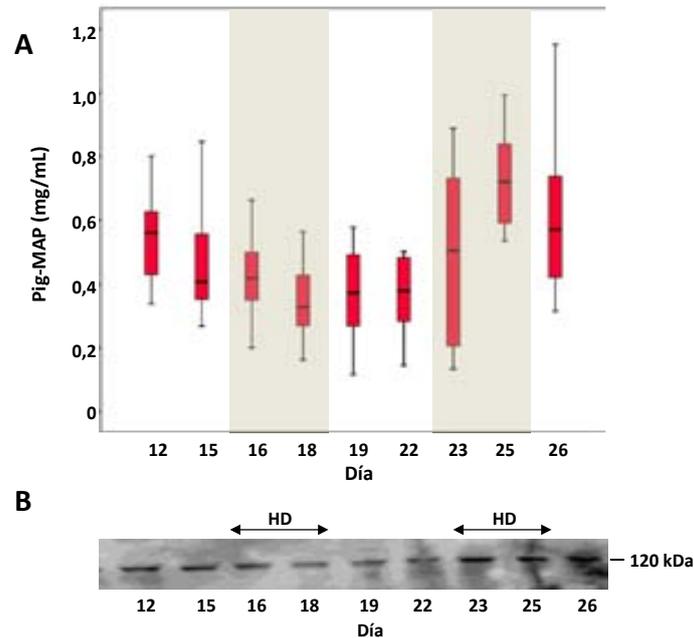
Periodo	Hp	Pig-MAP	CRP	Apo A-I
Periodo días 12 - 18 (LD → HD)	NS	NS	NS	-
Periodo días 16 - 22 (HD → LD)	NS	NS	NS	-
Periodo días 19 - 25 (LD → HD)	NS	**	NS	NS
Periodo días 23 - 26 (HD → LD)	NS	NS	NS	-

**Tabla 20.** Evaluación del comportamiento de algunas APPs en varios periodos del experimento en los que se llevó a cabo un cambio de de densidad. Abreviaturas: NS; no significativo ( $P > 0,05$ ).

Nomenclatura: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

La Pig-MAP fue la única APP que varió significativamente a causa de la HD en el corral. Ésta aumentó durante el segundo periodo de HD, momento en que los animales eran más mayores y el espacio más

reducido, y tendió a disminuir al volver a condiciones de LD. Este incremento de la Pig-MAP fue confirmado por *western blot*.



**Gráfico 4 y figura 16.** A) Evolución de los niveles de la Pig-MAP a lo largo del experimento. En blanco se señalan los periodos de LD y en gris los de HD. B) *Western blot* monodimensional de la Pig-MAP en el suero de uno de los animales.

La concentración de la Hp presentó una elevada variabilidad entre los animales a lo largo del experimento pero no resultó modificada significativamente a causa de los cambios de densidad de estabulación.

La CRP no varió de manera significativa a causa de los cambios de densidad en el corral. Sin embargo, sus niveles fueron superiores en el día posterior a cada cambio de densidad, momento en el que se sumarían los estresores aplicados, es decir, la nueva densidad y la extracción de la muestra.

Por su parte, la Apo A-I presentó una disminución de sus niveles en el segundo periodo de HD, aunque no de manera significativa.

### 1.5 Marcadores de estrés oxidativo

Se midió en el analizador automático Olympus AU400 la actividad en el suero de dos enzimas que forman parte de la defensa antioxidante de la célula, la glutatión peroxidasa (GPx) y la glutatión reductasa (GR). Además, se analizó por *western blot* el grado de oxidación de las proteínas plasmáticas (*oxyblot*). Para ello se empleó la molécula 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), que reacciona con los grupos carbonilos (CO) de las proteínas oxidadas. El DNPH fue posteriormente detectado con un anticuerpo contra la región dinitrofenil (DNP) de la molécula y cuantificado por densitometría. Posteriormente, se calculó la ratio de variación de cada día respecto a los valores obtenidos el día 15, debido a que todas las muestras plasmáticas pertenecientes al mismo animal fueron separadas en el mismo gel e inmunodetectadas simultáneamente. Todas las determinaciones se realizaron en el suero.

Día	GPx (U/mL)	GR (U/L)	CO (ratio)	Periodo densidad
12	4,14 ± 0,70	151 ± 10	-	LD
15	4,15 ± 0,66	134 ± 12	1,00 ± 0,00	
16	3,62 ± 0,75	137 ± 13	0,97 ± 0,23	HD
18	3,82 ± 0,83	135 ± 14	1,16 ± 0,26	
19	3,74 ± 0,64	125 ± 13	1,12 ± 0,31	LD
22	4,03 ± 0,73	121 ± 12	1,26 ± 0,41	
23	3,72 ± 0,64	124 ± 13	1,48 ± 0,47	HD
25	4,16 ± 0,64	118 ± 12	1,93 ± 0,45	
26	3,89 ± 0,59	116 ± 10	2,25 ± 0,49	LD

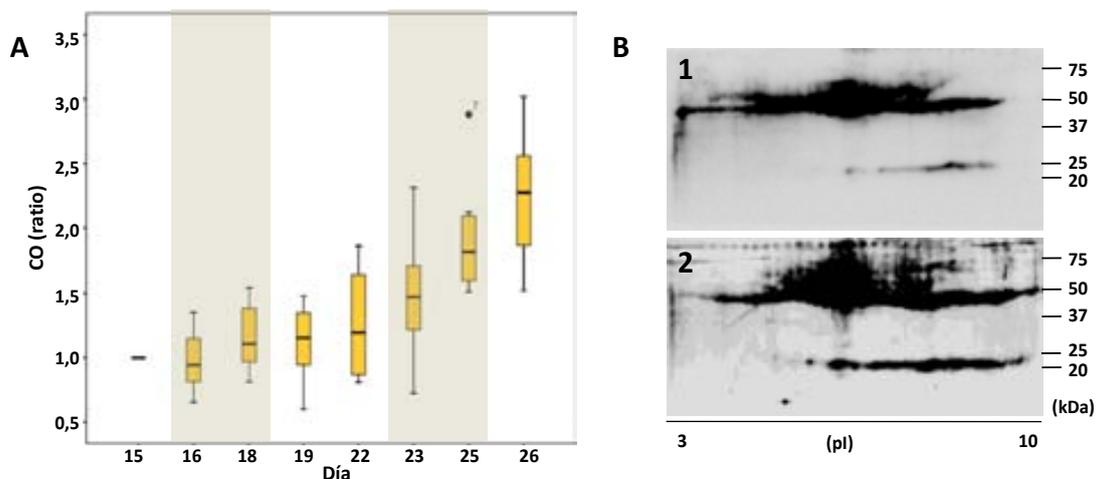
**Tabla 21.** Evolución de la actividad de algunos marcadores de estrés oxidativo a lo largo del experimento (n=8; media ± desviación estándar).

Periodo	GPx	GR	CO
Periodo días 12 - 18 (LD → HD)	NS	NS	NS
Periodo días 16 - 22 (HD → LD)	NS	NS	NS
Periodo días 19 - 25 (LD → HD)	NS	NS	***
Periodo días 23 - 26 (HD → LD)	NS	NS	**

**Tabla 22.** Evaluación del comportamiento de algunos marcadores de estrés oxidativo en varios periodos del experimento en los que se llevó a cabo un cambio de de densidad. Abreviaturas: NS; no significativo ( $P > 0,005$ ). Nomenclatura: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

La actividad de las enzimas GPx y GR no varió significativamente a causa de la HD de estabulación. No obstante, la GPx presentó una leve disminución después de cada cambio de densidad.

Por su parte, el nivel de grupos CO en las proteínas plasmáticas aumentó a lo largo del primer experimento, a medida que los cerdos crecían y requerían más espacio para cubrir sus necesidades. Este resultado fue confirmado mediante *oxyblots* bidimensionales, con los que se comparó el proteoma plasmático oxidado del día 19, muestra representativa del periodo de LD en el corral, y el día 25, muestra correspondiente al segundo periodo HD.



**Gráfico 5 y figura 17.** A) Evolución de los niveles de los grupos CO a lo largo del experimento. En blanco se señalan los periodos de LD y en gris los de HD. B) Inmunodetección bidimensional de los grupos CO en las proteínas plasmáticas. Muestras pertenecientes al (B1) día 19 (condiciones LD) y (B2) al día 25 (condiciones HD) del estudio.

## 2. Aproximación proteómica 2-DE DIGE

Con el objetivo de descubrir nuevos biomarcadores de bienestar porcino, se recurrió a la aproximación proteómica 2-DE DIGE, en la que se emplearon geles bidimensionales para separar y comparar los proteomas de interés, marcados con fluorocromos diferentes. Para ello, se escogieron cuatro cerdos al azar, los animales #0, #1, #2 y #5, de los que se seleccionaron los sueros correspondientes al día 19 y al día 25 del experimento, como muestras representativas de los períodos LD y HD de estabulación, respectivamente. El día 25 correspondió a las 72h después del segundo cambio de densidad en el corral, momento en el que la maquinaria celular habría ya activado los mecanismos fisiológicos para combatir el estresor y los animales serían más grandes y, por lo tanto, requerirían más espacio para llevar a cabo sus necesidades básicas.

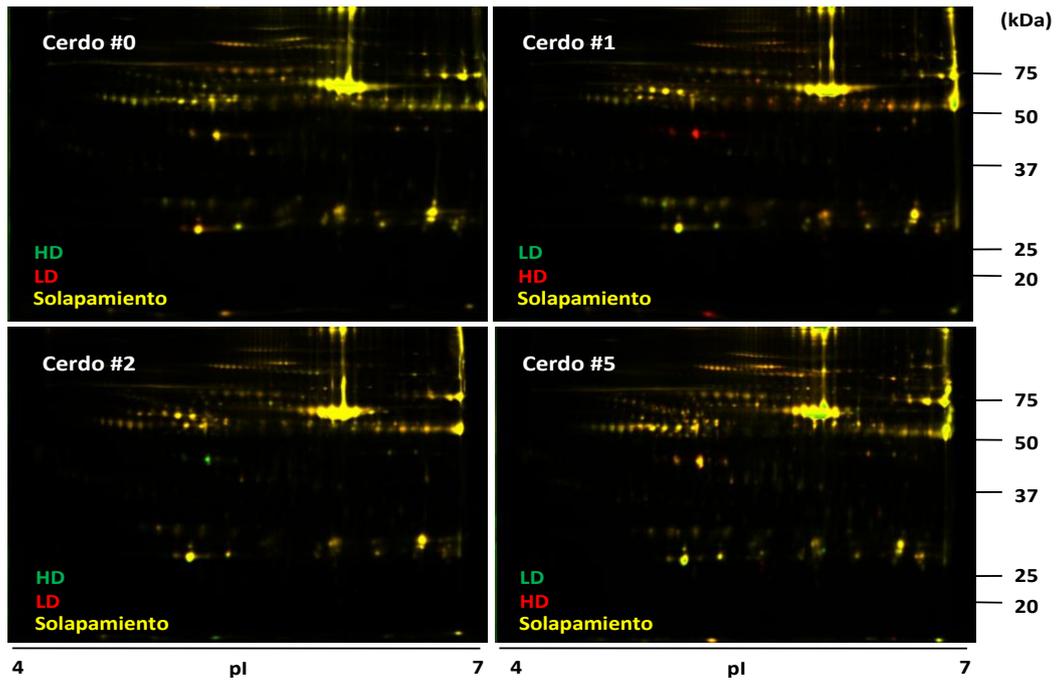
Las muestras de suero fueron marcadas con fluorocromos comerciales, tal como se muestra a continuación. A pesar de trabajar solamente con la mitad de los individuos del experimento, se formó un *pool* con los sueros de los ocho animales correspondientes a los dos días de interés, para el caso de que necesitara más información experimental en el futuro.

	Cy2	Cy3	Cy5
Gel 1	<i>Pool</i>	Cerdo 0 HD	Cerdo 0 LD
Gel 2	<i>Pool</i>	Cerdo 1 LD	Cerdo 1 HD
Gel 3	<i>Pool</i>	Cerdo 2 HD	Cerdo 2 LD
Gel 4	<i>Pool</i>	Cerdo 5 LD	Cerdo 5 HD

**Tabla 23.** Distribución y marcaje fluorescente de las muestras en los geles 2-DE DIGE. Las muestras del día 19 representan el periodo LD y las del día 25, el HD de estabulación.

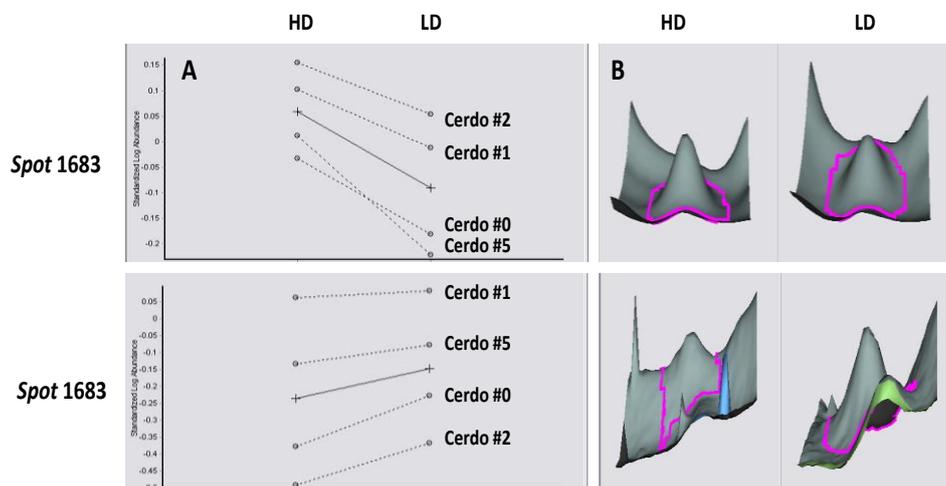
El marcaje de las muestras se hizo de manera cruzada entre grupos para evitar el posible sesgo introducido por la naturaleza intrínseca de los fluorocromos.

Los mapas bidimensionales fueron visualizados mediante un escáner de fluorescencia. Como resultado se obtuvieron los siguientes mapas:



**Figura 18.** Mapas bidimensionales correspondientes a los proteomas plasmáticos de los animales #0, #1, #2 y #8 en ambas condiciones de establecimiento.

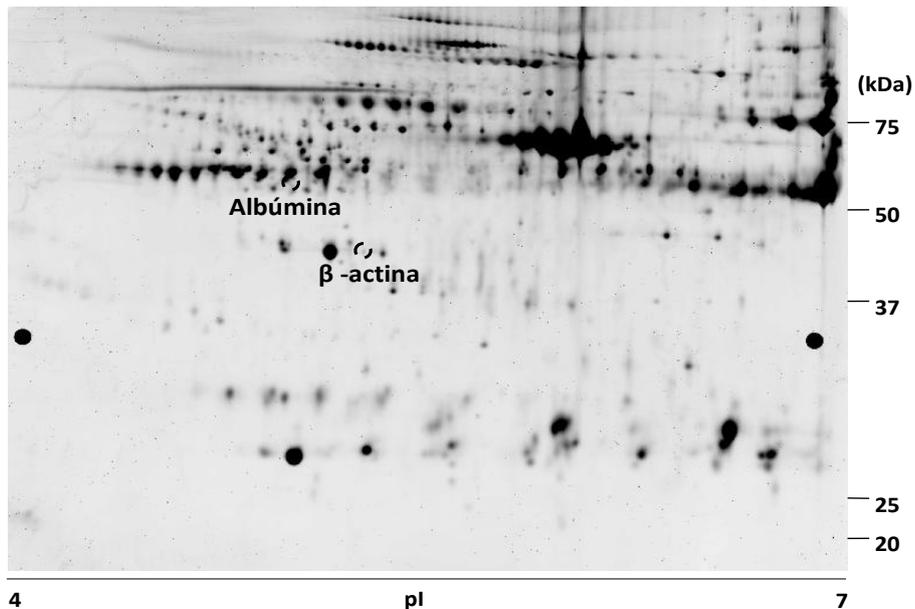
Se seleccionaron mediante el uso del *software* DeCyder los *spots* que se ajustaron a los filtros  $P \leq 0,05$  y  $fold \geq \pm 1,2$  en cada gel, para cada pareja de muestras. Posteriormente, se descartaron los *spots* cuya intensidad fue débil. Se eligieron cuatro *spots* diferenciales, que fueron analizados mediante MALDI-TOF. Sin embargo, solamente dos de ellos pudieron ser caracterizados y su identidad fue confirmada por MS en tándem:



**Figura 19.** Análisis de los mapas bidimensionales mediante el *software* DeCyder. A) Cuantificación relativa de los dos *spots* diferenciales identificados, B) Representación tridimensional de estos dos *spots*.

Spot	Identificación	Acceso UniProt	P	Fold LD vs HD
1660	Albúmina sérica	P08835 [ALBU_PIG]	0,050	-1,21
1683	$\beta$ -actina	Q6QAQ1 [ACTB_PIG]	0,015	1,42

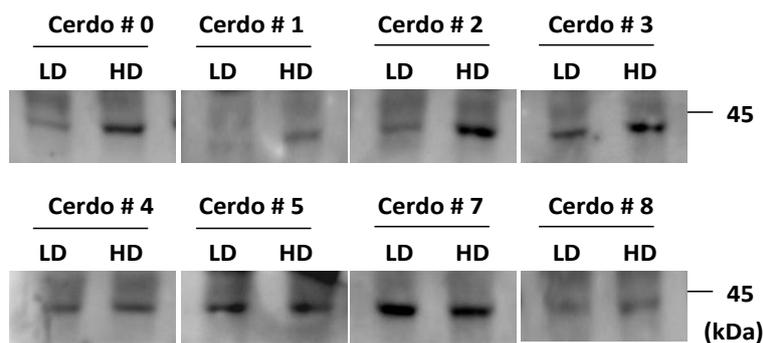
**Tabla 24.** Identificación por MALDI-TOF de los *spots* diferenciales.  
Fold positivo = incremento en HD; fold negativo = disminución en HD.



**Figura 20.** Localización de los dos spots identificados en uno de los geles bidimensionales.

La albúmina es una proteína de fase aguda negativa (APP) en el cerdo. Esta proteína no fue validada posteriormente en todos los individuos del experimento debido a que con anterioridad ya se habían analizado los niveles de otras APPs porcinas, mucho más sensibles en el cerdo que la albúmina (Petersen et al., 2004).

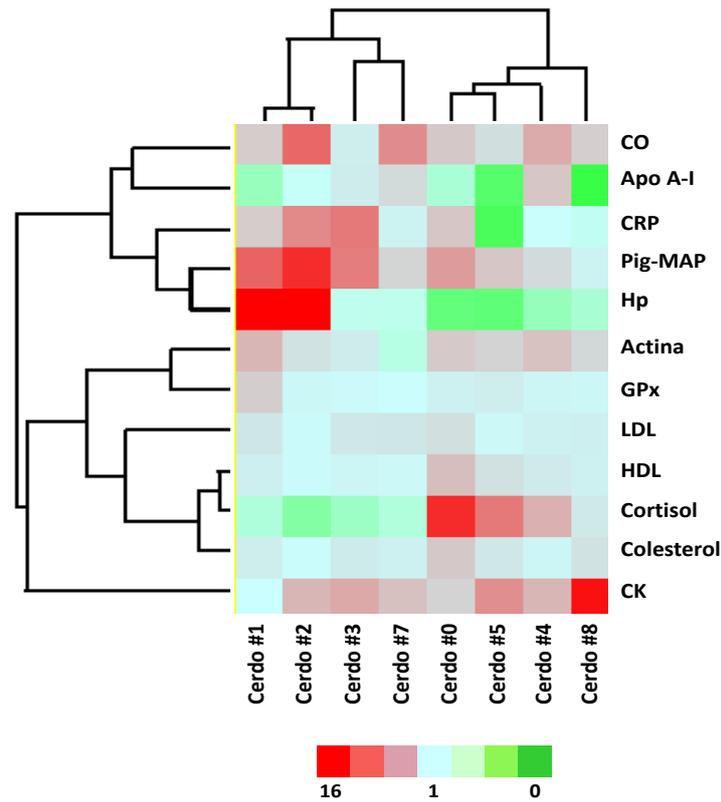
La segunda proteína diferencial fue la proteína citoplasmática  $\beta$ -actina. La validación de esta proteína como posible marcador de bienestar se realizó por *western blot* monodimensional en el suero de todos los animales del estudio en los días 19 (LD) y 25 (HD) del experimento. La densitometría de las bandas proteicas reveló que los niveles de la  $\beta$ -actina aumentaron durante la HD de estabulación ( $P = 0,032$ ) en siete de los ocho cerdos.



**Figura 21.** Validación mediante *western blot* monodimensional de la  $\beta$ -actina en el suero de todos los cerdos del estudio.

### 3. Estudio de la variabilidad individual

La variabilidad interindividual en la respuesta de estrés desencadenada por el estresor se valoró con el *software* Cluster, diseñado para el *data clustering* de datos genómicos. Para ello, se emplearon los valores relativos al día 19 y al día 25 de los ocho animales del estudio. Los resultados se visualizaron con el *software* TreeView:



**Figura 22.** *Data clustering* de la variación de los niveles de todos los parámetros bioquímicos de los ocho animales estabulados a alta densidad. El dendograma superior muestra el grado de similitud los individuos y el dendograma de la izquierda representa el grado de similitud entre los marcadores. En rojo están representados los valores que aumentan y en verde los que disminuyen.

El dendograma resultante mostró la segregación de los ocho animales en dos grandes grupos. Por un lado, los animales #1, #2 y de manera menos marcada el individuo #3 y #7, presentaron un patrón fisiológico similar a una respuesta de fase aguda, en la que aumentaron las APPs y los marcadores de estrés oxidativo, y se detectaron bajos niveles de cortisol. Por otra parte, los animales #0, #4, #5 y de manera menos marcada el #8, mostraron una respuesta fisiológica basada en el aumento de los niveles de cortisol y una respuesta de fase aguda casi inexistente.



## CAPÍTULO 2: CERDAS PRIMERIZAS ESTABULADAS EN JAULAS DE GESTACIÓN

Durante muchos años, la estabulación de las cerdas en jaulas individuales de gestación ha sido el sistema de alojamiento más usado entre los ganaderos de la Unión Europea, debido a que facilitan el manejo de los animales, eliminan el estrés social y las peleas que pueden surgir durante la estabulación en grupo, y permiten la alimentación adecuada e individual de las cerdas (Scientific Veterinary Committee, 1997).

Sin embargo, los animales alojados en estas jaulas no poseen espacio suficiente para estar de pie ni para estirarse en el suelo sin tocar las barras de las jaulas (Curtis and Hurst, 1989), principalmente durante las últimas semanas de gestación (McGlone *et al.*, 2004). Se ha descrito un menor y más lento cambio de posición asociado a la limitación de espacio que presentan estas jaulas (Taylor *et al.*, 1988), que puede ser un marcador de un pobre bienestar (Clough, 1984), y se han observado abrasiones en la piel de las cerdas y problemas en la locomoción (Karlen and Hemsworth, 2007), a causa de la pérdida de masa muscular y de la resistencia del hueso (Marchant and Broom, 1996).

También se han descrito trastornos reproductivos en las cerdas mantenidas en jaulas individuales. Por un lado, England and Spurr (1969) describieron una mayor dificultad de estas cerdas para volver al celo y mayores problemas durante la gestación que las cerdas gestantes alojadas en grupo. Por otro lado, Schmidt *et al.* (1985) observaron más complicaciones durante el parto.

La presencia de estereotipias orales es común (Karlen and Hemsworth, 2007), pudiendo estar causadas por el racionamiento de la comida (Bergeron *et al.*, 2000), o por la limitación de movimientos (Vieuille-Thomas *et al.*, 1995).

En la actualidad, esta práctica está prohibida en muchos países. En España, el Real Decreto 1392/2012 penaliza, desde el 1 de enero de 2013, el alojamiento de las cerdas en jaulas individuales durante el período que comprende las cuatro semanas después de la cubrición y los siete días antes del parto, y obliga a los ganaderos a mantener los animales estabulados en grupo.

El objetivo de este capítulo es valorar la respuesta de estrés aguda de un grupo de cerdas primerizas cuando son alojadas por primera vez en una jaula de gestación y encontrar nuevos marcadores de bienestar porcino.

### Diseño experimental

El experimento se realizó en una explotación productora de lechones situada en Ponts (Lleida), de la empresa Seponts S.L., con la colaboración del Dr. L. Fraile, del departamento de Producción Animal de la Universitat de Lleida.

El estudio se basó en el funcionamiento rutinario de esta granja, en el que las cerdas primerizas, Landrace x Large White x Duroc, fueron mantenidas durante un mes en la nave de cuarentena antes de

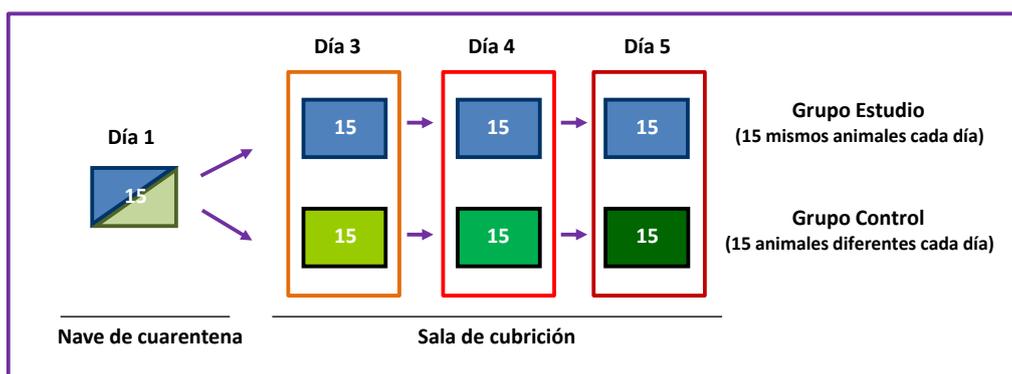
ser trasladadas a la sala de cubrición. Este período inicial permitió a las cerdas adaptarse a su nuevo alojamiento y establecer una jerarquía social. Durante la cuarentena los animales fueron también vacunados y mantenidos bajo vigilancia para comprobar que estaban sanos y no eran portadores de patógenos. Cada corral estaba formado por 10 - 15 cerdas y dispusieron de agua y pienso *ad libitum*.

La situación de estrés fue la estabulación de las cerdas primerizas en las salas de cubrición, en las que fueron alojadas en jaulas individuales, cuyas dimensiones dificultaban su movilidad pero facilitaban su manejo. En este período, los animales recibieron el agua y el pienso de manera conjunta y racionada. El pienso recibido durante esta segunda etapa fue "pienso de gestante", que era rico en grasas.

En el experimento, que duró cinco días, se emplearon cerdas primerizas. El primer día del estudio se denominó situación basal debido a que los animales se encontraban en la nave de cuarentena, en la que llevaban alojados 4 semanas. El segundo día del experimento, las cerdas fueron trasladadas a las salas de cubrición y estabuladas en jaulas individuales, en las que permanecerían hasta la semana antes del parto. Se obtuvieron muestras de sangre y saliva correspondientes a la situación control y los tres días posteriores al cambio de nave de cerdas primerizas, pero no del día después del cambio para evitar la acumulación de estresores en el mismo día. Se formaron dos grupos de animales:

- *Grupo estudio.* Estuvo formado por 15 cerdas, de las que se extrajo muestras todos los días.
- *Grupo control.* Estuvo formado por 15 animales diferentes cada día, sometidos también al cambio de nave, de las que se extrajo muestra solamente uno de los días de estudio. Sirvió como control del estrés asociado a la obtención de las muestras, que podría interferir con los resultados experimentales (Moberg and Mench, 2000)

El diagrama y las fotografías siguientes resumen el diseño experimental:



**Figura 23.** Diseño experimental de este experimento de bienestar, en el que un grupo de cerdas primerizas fueron alojadas en jaulas individuales con fines reproductivos.



**Imágenes 3 y 4.** Fotografías de las dos situaciones experimentales. Izquierda: condición basal, en la nave de cuarentena. Derecha: alojamiento de jaulas individuales en la nave de cubrición.



**Imágenes 5 y 6.** Fotografías tomadas durante la extracción de las muestras. Izquierda: en el interior del corral de la nave de cuarentena. Derecha: en el pasillo de la nave de cubrición.

Se obtuvo sangre en tubos para suero y plasma, y saliva de todos los animales. Cabe destacar que la extracción de las muestras fue particularmente difícil debido a que los animales poseían una considerable capa de grasa en el cuello. Al tratarse de animales tan grandes, la extracción de sangre se realizó con los animales de pie e inmovilizados con un lazo. Los animales estuvieron intranquilos durante la extracción de las muestras. De algunos animales no se pudo extraer muestra todos los días del experimento debido a su nerviosismo durante la toma de muestras y se descartaron dos animales del estudio a causa del considerable grosor de la capa de grasa en el cuello.

Ninguno de los animales presentó signos clínicos de patología a lo largo del estudio. Tras el cambio de alojamiento algunos animales mostraron un elevado nerviosismo durante la obtención de las muestras.

### **1. Perfil bioquímico**

Se realizó un perfil bioquímico de todas las muestras que conforman el experimento, basado en la bibliografía y en los resultados obtenidos en el estudio de elevada densidad de estabulación, así como en los datos publicados por nuestro grupo anteriormente (Marco-Ramell et al., 2012; Saco et al., 2008, 2003).

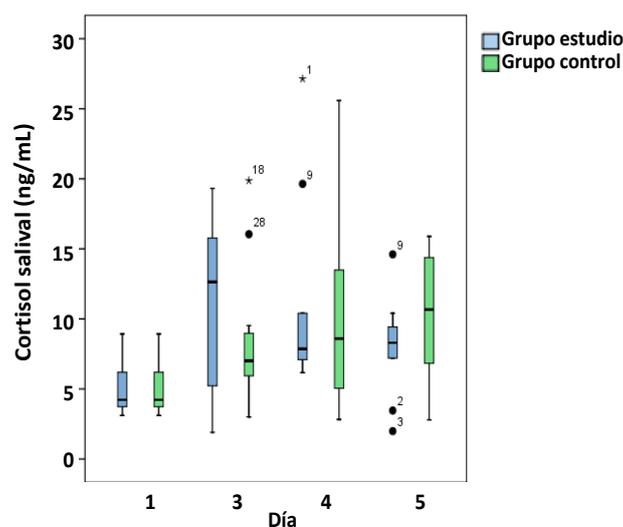
### 1.1 Hormonas de estrés

Se determinaron mediante ELISA los niveles del cortisol en el suero y la saliva de todas las cerdas como marcadores de la actividad del eje neuroendocrino hipotálamo – hipófisis – corteza adrenal (HPA). En cambio, la valoración del grado de activación del eje neuroendocrino simpático – adrenomedular (SAM) se realizó a partir de la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa salival (sAA), como marcador indirecto de la liberación de las catecolaminas durante la respuesta de estrés.

Parámetro	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5	Grupo
Cortisol (suero) ( $\mu\text{g}/\text{dL}$ )	8,47 $\pm$ 4,92	5,57 $\pm$ 2,78	6,32 $\pm$ 4,79	5,14 $\pm$ 2,14a	Estudio
		5,57 $\pm$ 2,86	7,02 $\pm$ 4,93	4,28 $\pm$ 2,91*	Control
Cortisol (saliva) (ng/mL)	5,19 $\pm$ 2,13	11,06 $\pm$ 6,39*	11,28 $\pm$ 7,23*	8,40 $\pm$ 3,72	Estudio
		8,46 $\pm$ 5,16	9,80 $\pm$ 6,01*	10,07 $\pm$ 4,53**	Control
sAA (U/mL)	0,80 $\pm$ 0,89	0,92 $\pm$ 1,87	0,34 $\pm$ 0,72	0,51 $\pm$ 0,67	Estudio
		1,19 $\pm$ 1,36	0,42 $\pm$ 0,10	0,55 $\pm$ 0,79	Control

**Tabla 25.** Evolución del cortisol sérico y salival y la sAA a lo largo del experimento (grupo estudio, n=13; grupo control, n=15; media  $\pm$  desviación estándar). Evaluación del comportamiento de los parámetros respecto a la situación basal. Nomenclatura: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ .

El cortisol plasmático no varió de manera significativa a lo largo del experimento, si bien se obtuvo una enorme variabilidad entre individuos. Asimismo, el primer día del estudio se obtuvieron valores de este parámetro más elevados que en el resto de las extracciones de la muestra. Por su parte, los niveles del cortisol salival se incrementaron de manera significativa en los días posteriores al cambio de nave en ambos grupos de animales, de manera más pronunciada en el grupo estudio. Por último, a pesar de que los valores de la sAA no variaron significativamente tras el cambio de alojamiento, se detectó un ligero aumento el día posterior a la percepción del estresor en los dos grupos de animales. La desviación estándar de la sAA fue muy elevada todos los días del experimento.



**Gráfico 5.** Evolución del cortisol salival a lo largo del experimento. La numeración de los *outliers* corresponde a la identificación del cerdo.

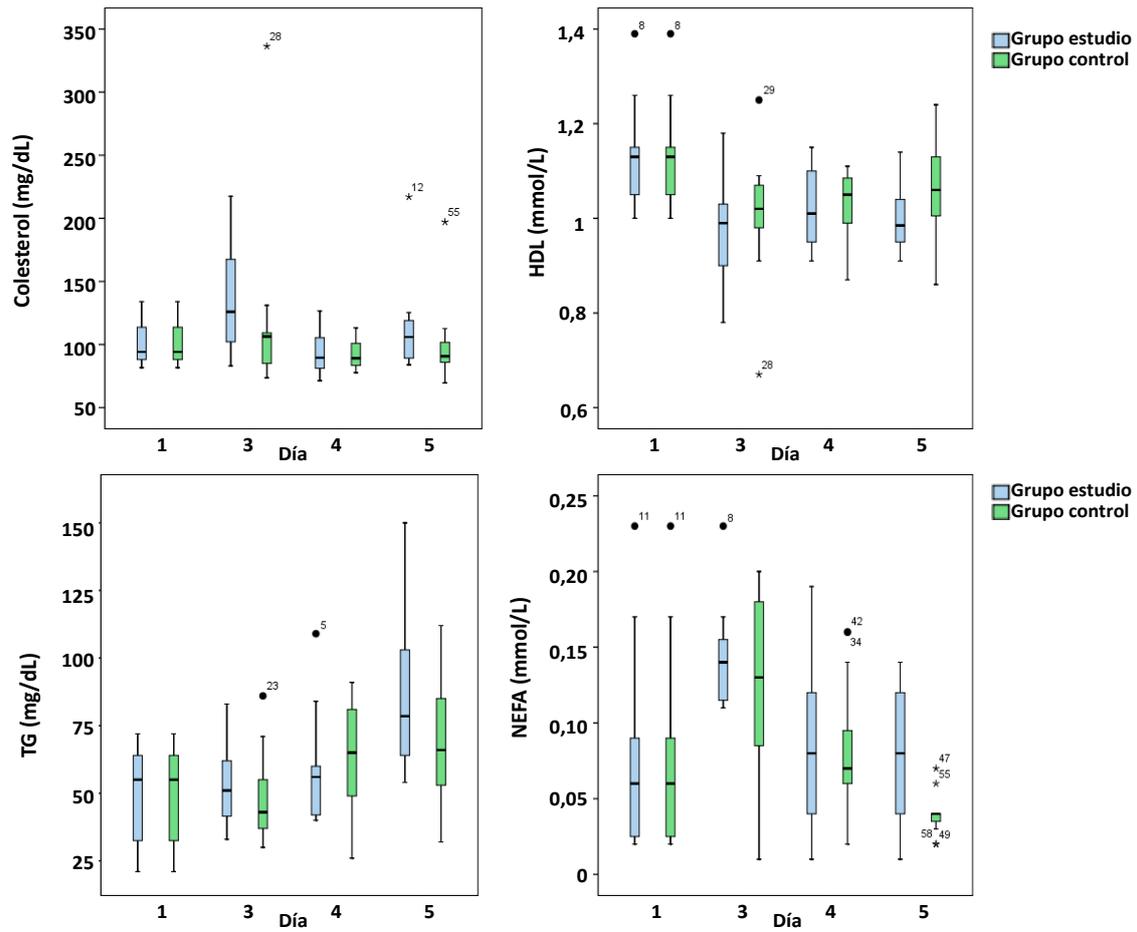
## 1.2 Marcadores de metabolismo lipídico

Se determinó en el analizador Olympus AU400 la concentración de los mismos marcadores de metabolismo lipídico estudiados en el capítulo anterior: el colesterol total, las HDLs, las LDLs, los TGs y los NEFAs. Además se determinó un marcador de anorexia, el 3 $\beta$ -hidroxibutirato (3-BHB):

Parámetro	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5	Grupo
Colesterol (mg/dL)	101 $\pm$ 18	138 $\pm$ 46**	94 $\pm$ 17	114 $\pm$ 39	Estudio
		116 $\pm$ 63	93 $\pm$ 11	99 $\pm$ 29	Control
HDLs (mmol/L)	1,14 $\pm$ 0,11	0,98 $\pm$ 0,12**	1,02 $\pm$ 0,08**	1,00 $\pm$ 0,08**	Estudio
		1,01 $\pm$ 0,12**	1,03 $\pm$ 0,07**	1,06 $\pm$ 0,10*	Control
LDLs (mmol/L)	1,30 $\pm$ 0,18	1,43 $\pm$ 0,22	1,19 $\pm$ 0,19	1,21 $\pm$ 0,12	Estudio
		1,39 $\pm$ 0,23	1,16 $\pm$ 0,27	1,11 $\pm$ 0,17**	Control
TGs (mg/dL)	48 $\pm$ 18	53 $\pm$ 16	58 $\pm$ 21	85 $\pm$ 29**	Estudio
		48 $\pm$ 15	64 $\pm$ 20*	70 $\pm$ 23**	Control
3-BHB ( $\mu$ mol/L)	12,9 $\pm$ 3,7	9,4 $\pm$ 9,8	9,8 $\pm$ 5,3	8,4 $\pm$ 5,1**	Estudio
		13,0 $\pm$ 5,2	12,4 $\pm$ 5,5	10,2 $\pm$ 5,4	Control
NEFAs (mmol/L)	0,08 $\pm$ 0,06	0,14 $\pm$ 0,04**	0,09 $\pm$ 0,06	0,08 $\pm$ 0,04	Estudio
		0,13 $\pm$ 0,58*	0,08 $\pm$ 0,04	0,04 $\pm$ 0,01*	Control

**Tabla 26.** Evolución de varios marcadores de metabolismo lipídico a lo largo del experimento (grupo estudio, n=13; grupo control, n=15; media  $\pm$  desviación estándar). Evaluación del comportamiento de los parámetros respecto a la situación basal. Nomenclatura: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ .

No se observaron cambios en la concentración del 3-BHB respecto a la situación control tras el cambio de alojamiento en ninguno de los dos grupos. En cambio, los niveles de las HDLs fueron menores que los de la situación basal los días posteriores al cambio. Por su parte, los TGs aumentaron paulatinamente a lo largo del experimento en ambos grupos de animales. Los NEFAs incrementaron de manera significativa tras el cambio de alojamiento en los dos grupos de cerdas, mientras que el colesterol lo hizo solamente en los animales del grupo estudio. Ambos parámetros se recuperaron rápidamente. Los niveles de las LDLs no variaron significativamente, aunque presentaron un comportamiento similar del colesterol total.



**Gráficos 7-10.** Evolución de los marcadores de metabolismo lipídico a lo largo del experimento. La numeración de los *outliers* corresponde a la identificación del cerdo.

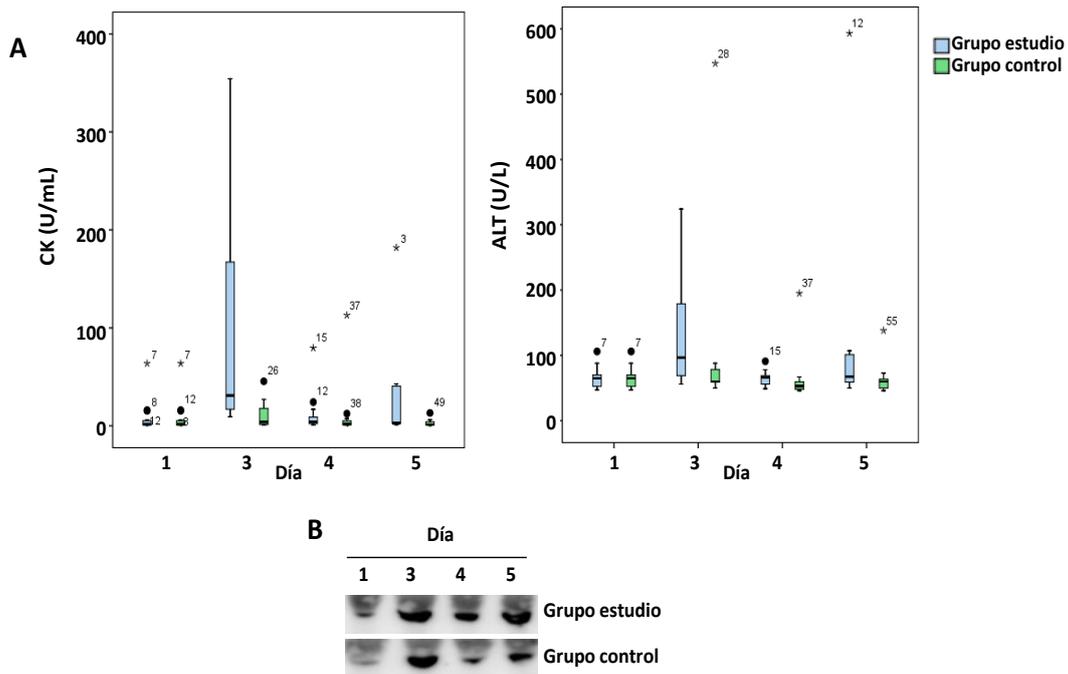
### 1.3 Marcadores relacionados con el estado de salud

Se determinó en el analizador automático Olympus AU400 la actividad enzimática de la CK, como marcador de daño muscular, de la alanina aminotransferasa (ALT) y la fosfatasa alcalina (ALP), como indicadores de alteraciones hepáticas, la concentración de la urea y la creatinina plasmáticas, como índice de la función renal y del metabolismo de proteínas, y los niveles de proteínas totales, como indicador general de deshidratación y/o de un proceso patológico. Además, se cuantificaron por ELISA las inmunoglobulinas G (IgG) y A (IgA), como marcadores de la activación del sistema inmune adquirido.

Parámetro	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5	Grupo
CK (U/mL)	7,85 ± 16,25	90,15 ± 125,14*	11,96 ± 21,39	38,90 ± 65,58	Estudio
		10,22 ± 13,32	10,66 ± 28,46	2,98 ± 3,58	Control
ALT (U/L)	65,4 ± 126,6	125,6 ± 95,6*	65,1 ± 11,5	124,9 ± 165,5*	Estudio
		97,1 ± 125,0	63,3 ± 37,1	62,4 ± 22,4	Control
ALP (U/L)	104,7 ± 31,2	107,6 ± 42,8	105,4 ± 32,3	98,3 ± 31,3	Estudio
		134,9 ± 60,3	100,3 ± 22,3	116,6 ± 26,2	Control
Urea (mg/dL)	31,4 ± 5,5	32,3 ± 10,3*	22,5 ± 3,6***	22,7 ± 4,1***	Estudio
		36,4 ± 5,2*	25,1 ± 4,7**	24,0 ± 3,4***	Control
Creatinina (mg/dL)	1,66 ± 0,22	1,93 ± 0,29*	1,64 ± 0,19	1,82 ± 0,43	Estudio
		1,99 ± 0,31**	1,84 ± 0,20*	1,90 ± 0,25*	Control
Proteína total (g/dL)	7,66 ± 0,32	7,86 ± 0,38	7,85 ± 0,36	7,75 ± 0,42	Estudio
		8,11 ± 0,58*	8,18 ± 0,44**	7,97 ± 0,31*	Control
IgG (mg/mL)	32,49 ± 11,88	33,28 ± 13,79	37,45 ± 13,68	30,02 ± 8,63	Estudio
		-	-	-	Control
IgA (mg/mL)	1,25 ± 0,17	1,30 ± 0,13	1,26 ± 0,21	1,11 ± 0,15	Estudio
		-	-	-	Control

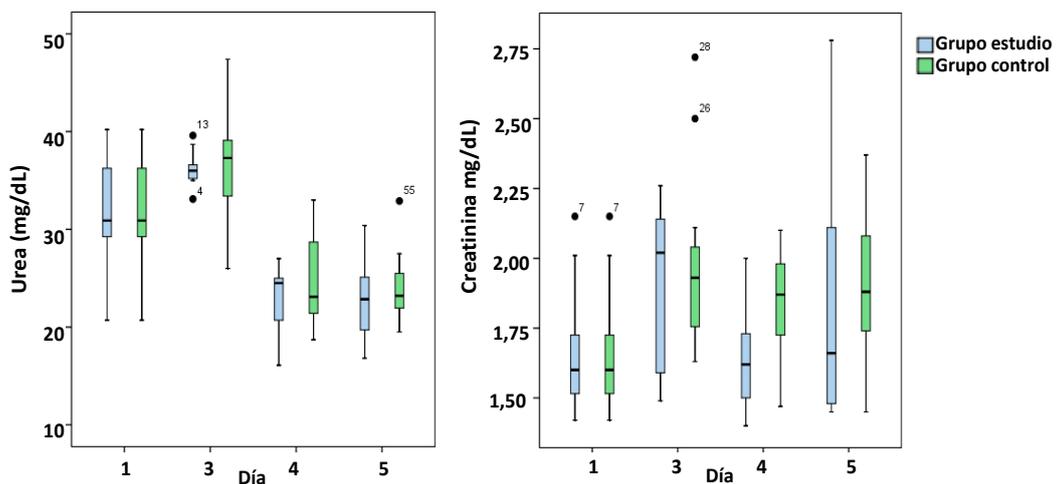
**Tabla 27.** Evolución de varios marcadores relacionados con el estado de salud del animal a lo largo del experimento (grupo estudio, n=13; grupo control, n=15; media ± desviación estándar). Evaluación del comportamiento de los parámetros respecto a la situación basal. Nomenclatura: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

La actividad de las enzimas CK y ALT aumentó significativamente en las cerdas del grupo estudio los días en que la obtención de la muestra fue más complicada, es decir, el día 3 y el día 5. La ALP, en cambio, no varió a lo largo del experimento, por lo que el incremento de la ALT fue debido a su isoforma muscular. Paralelamente se valoró la presencia de la  $\beta$ -actina en el suero mediante un *western blot* monodimensional. A pesar de que las bandas proteicas más intensas coincidieron con los días en los que la extracción de las muestras fue más dificultosa, se detectó un aumento de la  $\beta$ -actina en sueros *pool* los días después del cambio de alojamiento en ambos grupos de animales respecto a la situación basal.



**Gráficos 11-12 y figura 24.** Evolución de los marcadores de daño muscular a lo largo del experimento. La numeración de los *outliers* corresponde a la identificación del cerdo. A) Actividad de las enzimas CK y ALT. B) *Western blot* monodimensional de la β-actina en el suero de un solo cerdo del grupo control y de tres animales distintos del grupo control escogidos al azar.

Los niveles de la urea plasmática aumentaron de manera significativa en los dos grupos de animales tras el cambio de alojamiento y se normalizaron rápidamente, incluso por debajo de los valores iniciales. Por su parte, la creatinina aumentó en ambos grupos de animales tras el cambio de alojamiento: en el grupo estudio solamente se incrementó el día posterior a la percepción del estresor, mientras que en el grupo control se mantuvo elevada durante varios días.



**Gráficos 13-14.** Evolución de los marcadores de la urea y la creatinina a lo largo del experimento. La numeración de los *outliers* corresponde a la identificación del cerdo.

Las proteínas totales, a su vez, aumentaron tras el cambio de alojamiento, aunque solamente de manera significativa en el grupo control, y se normalizaron paulatinamente. Por último, los niveles de las IgG y las IgA no variaron significativamente a lo largo del experimento.

### 1.4 Proteínas de fase aguda

También se midieron los niveles de varias APPs. La Hp se determinó mediante un ensayo colorimétrico, la Pig-MAP por ELISA, la CRP a partir de un ensayo inmunturbidimétrico y la Apo A-I por *western blot*, en el que se empleó un control interno que se separó, transfirió e inmunodetectó conjuntamente con las muestras de interés, lo que permitió comparar posteriormente los valores obtenidos por densitometría de Apo A-I entre las diferentes membranas.

Parámetro	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5	Grupo
Hp (mg/mL)	1,50 ± 0,61	2,33 ± 1,05*	1,73 ± 0,73	1,54 ± 0,64	Estudio
		2,06 ± 0,91	2,15 ± 0,72*	1,58 ± 0,56	Control
Pig-MAP (mg/mL)	2,46 ± 1,12	2,84 ± 1,20	2,28 ± 0,96	1,82 ± 1,04	Estudio
		1,43 ± 0,59**	1,66 ± 0,66***	0,93 ± 0,21***	Control
CRP (µg/mL)	10,0 ± 6,3	21,3 ± 9,3**	21,7 ± 6,9***	23,6 ± 8,5***	Estudio
		13,8 ± 8,2	13,1 ± 7,9	11,9 ± 7,9	Control
Apo A-I (ratio)	2,01 ± 0,37	1,45 ± 0,23***	1,68 ± 0,37*	1,71 ± 0,30*	Estudio
		1,78 ± 0,49	1,63 ± 0,31*	1,68 ± 0,53	Control

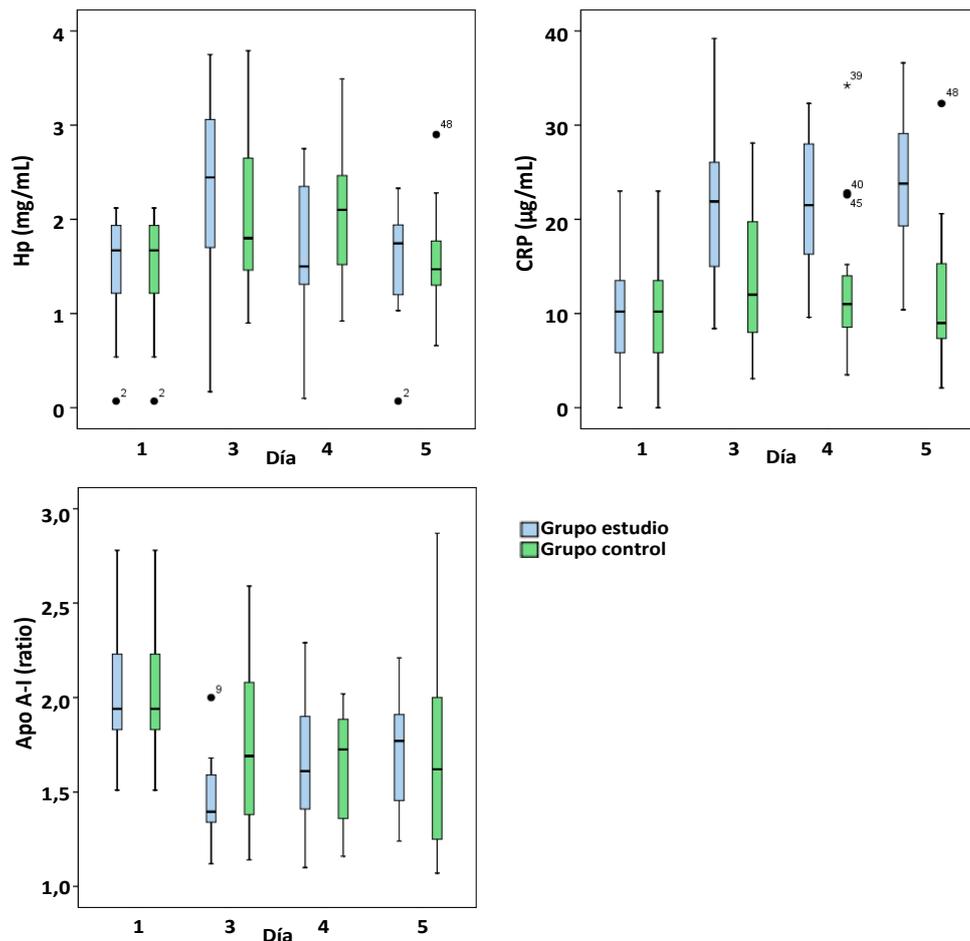
**Tabla 28.** Evolución de las APPs a lo largo del experimento (grupo estudio, n=13; grupo control, n=15; media ± desviación estándar). Evaluación del comportamiento de los parámetros respecto a la situación basal. Nomenclatura: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

La concentración de la Hp varió de manera significativa en los dos grupos de animales, haciéndolo de manera más acentuada en el grupo estudio, que había estado manipulado previamente. Esta proteína aumentó tras el cambio de alojamiento y poco después sus niveles disminuyeron hasta obtener valores similares a los iniciales.

La Pig-MAP presentó un comportamiento diferente entre los dos grupos de animales. Por un lado, su concentración media disminuyó tras el cambio de alojamiento en los animales del grupo control, mientras que en las cerdas del grupo estudio tendió a aumentar, aunque no de manera significativa, y se normalizó rápidamente.

Los valores de la CRP difirieron significativamente entre ambos grupos de animales. Las cerdas del grupo estudio presentaron una concentración más elevada de esta proteína que las del grupo control.

La densitometría de las bandas proteicas de la Apo A-I evidenció una disminución significativa de los niveles de esta proteína tras el cambio de alojamiento en ambos grupos de animales. Sus valores se mantuvieron inferiores a los de la situación control a lo largo de todo el experimento.



**Gráficos 15-17.** Evolución de las APPs Hp, CRP y Apo A-I a lo largo del experimento. La numeración de los *outliers* corresponde a la identificación del cerdo. Los niveles de la Apo A-I se refieren a la ratio de la intensidad de la banda proteica de la muestra en relación con la intensidad de un control interno.

### 1.5 Marcadores de estrés oxidativo

Se determinó en el analizador automático Olympus AU400 la actividad enzimática y la concentración de varios mecanismos de defensa antioxidante que posee el organismo: la GPx, la superóxido dismutasa (SOD) y el glutatión total (tGSH). La actividad de las enzimas GPx y SOD se midió en lisado de eritrocitos, debido a que esta célula es una diana preferencial de las especies reactivas de oxígeno (ROS), ya que contienen grandes cantidades de hierro y oxígeno en su interior (Lee et al., 2003). El tGSH, en cambio, se analizó en sangre entera y los grupos CO en el suero. Se evaluó el grado de oxidación de las proteínas plasmáticas mediante un *slot blot*, en el que también se empleó la molécula 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) y un control interno que se transfirió e inmunodetectó conjuntamente con las muestras de interés, lo que permitió comparar posteriormente los valores obtenidos por densitometría de los grupos CO entre las diferentes membranas.

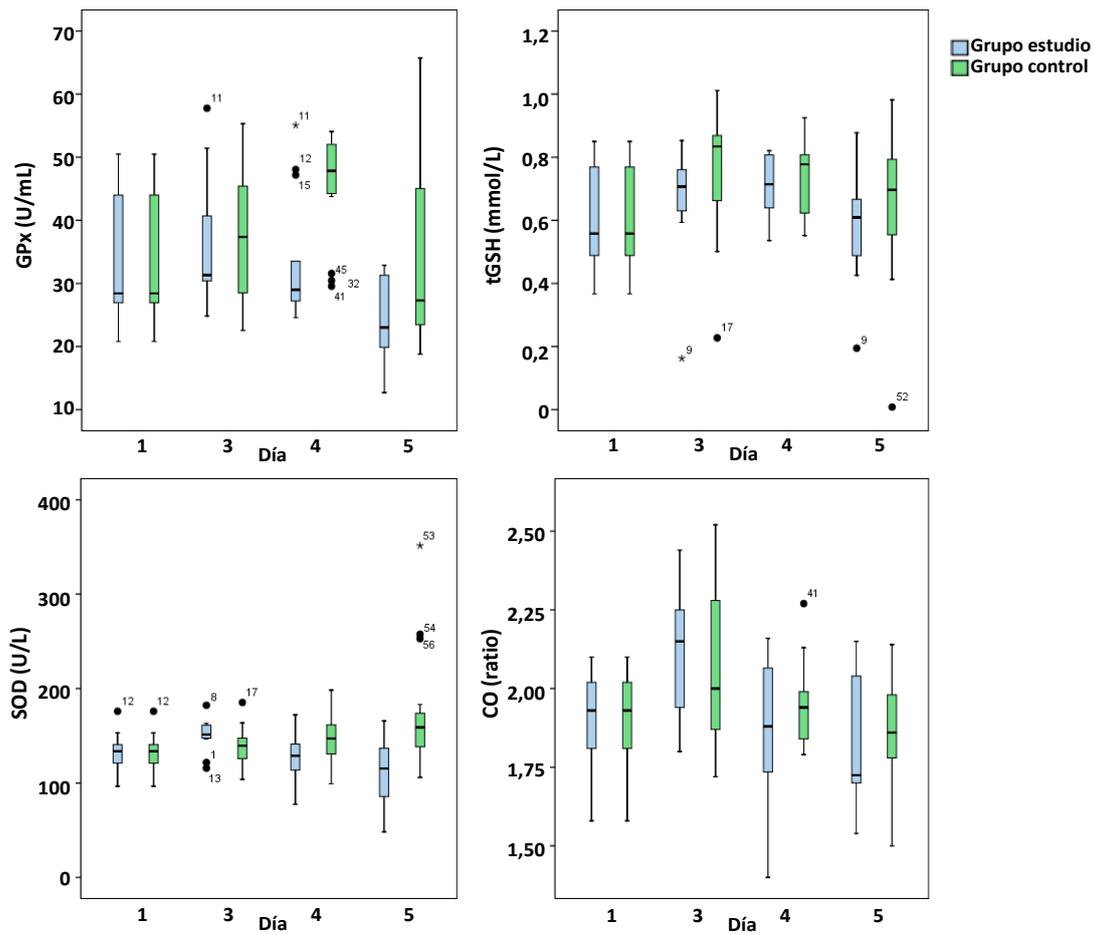
Parámetro	Día 1	Día 3	Día 4	Día 5	Grupo
GPx (U/mL)	33,24 ± 10,41	35,70 ± 10,65	33,27 ± 10,12	24,01 ± 6,81*	Estudio
		38,13 ± 10,94	45,55 ± 8,34**	34,72 ± 15,97	Control
tGSH (mmol/L)	0,60 ± 0,17	0,66 ± 0,18	0,70 ± 0,10	0,58 ± 0,17	Estudio
		0,75 ± 0,19*	0,74 ± 0,11*	0,66 ± 0,24	Control
SOD (U/L)	133 ± 20	151 ± 18*	125 ± 27	113 ± 35	Estudio
		139 ± 21	146 ± 29	174 ± 66*	Control
CO (ratio)	1,89 ± 0,16	2,10 ± 0,21*	1,87 ± 0,23	1,84 ± 0,21	Estudio
		2,06 ± 0,25	1,95 ± 0,13	1,86 ± 0,18	Control

**Tabla 29.** Evolución de los marcadores de estrés oxidativo a lo largo del experimento (grupo estudio, n=13; grupo control, n=15; media ± desviación estándar). Evaluación del comportamiento de los parámetros respecto a la situación basal. Nomenclatura: \*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,01$ ; \*\*\*,  $P < 0,001$ .

La actividad de la GPx y la concentración del glutatión total (tGSH) aumentaron tras el cambio de alojamiento en los dos grupos de animales, aunque solamente de manera significativa en el grupo control, y disminuyó progresivamente.

La enzima SOD mostró un comportamiento diferente entre los dos grupos de animales. En el grupo de animales estudio se incrementó tras el cambio de alojamiento, aunque posteriormente disminuyó, mientras que su actividad en el grupo control aumentó gradualmente a lo largo del experimento.

Por su parte, los grupos CO aumentaron tras el cambio de alojamiento, aunque solamente de manera significativa en el grupo estudio, y disminuyeron progresivamente.



**Gráficos 18-21.** Evolución de los marcadores de estrés oxidativo a lo largo del experimento. La numeración de los outliers corresponde a la identificación del cerdo. Los niveles de los grupos CO se refieren a la ratio de la intensidad de la banda proteica de la muestra en relación con la intensidad de un control interno.

## 2. Aproximación proteómica

Con el objetivo de descubrir nuevos biomarcadores de bienestar porcino, se recurrió a dos aproximaciones proteómicas cuantitativas diferentes. En primer lugar se emplearon geles bidimensionales 2-DE DIGE, en los que los proteomas de interés fueron marcados con fluorocromos diferentes. Posteriormente se recurrió al marcaje isobárico diferencial de los péptidos procedentes de la digestión de los proteomas a comparar (iTRAQ).

### 2.1 2-DE DIGE

En este experimento también se trabajó con suero sin deplecionar con el objetivo de verificar si existían grandes cambios en el proteoma plasmático más abundante. A pesar de haber validado el uso del kit comercial ProteoMiner (Bio-Rad) para enriquecer el proteoma del suero menos abundante en estudios proteómicos (Marco-Ramell and Bassols, 2010; Marco-Ramell et al., 2012), se consideró oportuno iniciar el análisis proteómico de las muestras sin tratarlas previamente.

Se seleccionaron las muestras de suero correspondientes a los días 1, 3 y 5 del experimento con el fin de representar los 3 puntos más importantes del estudio: la situación control, el primer día después del

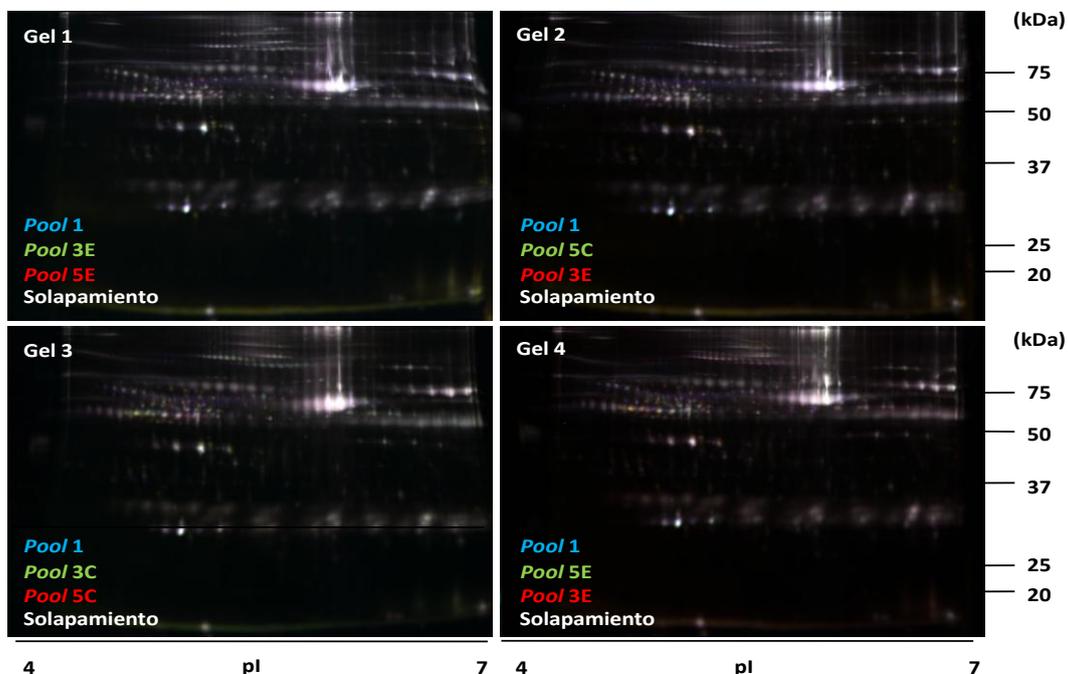
cambio de alojamiento y la adaptación al nuevo hábitat, respectivamente. Se formó un *pool* con el suero de todos los cerdos de cada grupo de animales (grupo estudio, n=13; grupo control, n=15). En total se obtuvieron cinco *pools* de muestras: *pool* 1E/C (primer día del experimento, pertenece al grupo estudio y al control), *pool* 3E (día 3, grupo estudio), *pool* 3C (día 3, grupo control), *pool* 5E (día 5, grupo estudio) y *pool* 5C (día 5, grupo control).

Las muestras se repartieron en cuatro geles y no se usó un *pool* interno de todos los sueros ya que el *pool* 1E/C fue marcado con el fluorocromo Cy2 y estuvo representado en todos los geles. En el resto de los geles se distribuyeron las muestras de los días 3 y 5 por duplicado de manera alterna, es decir, cada gel contenía parejas de muestras diferentes. Asimismo, el marcaje de las muestras se hizo de manera cruzada entre grupos para evitar el posible sesgo introducido por la naturaleza intrínseca de los fluorocromos. La siguiente tabla muestra el marcaje de las muestras y su distribución en los geles:

	Cy2	Cy3	Cy5
Gel 1	<i>Pool</i> 1E/C	<i>Pool</i> 3E	<i>Pool</i> 5E
Gel 2	<i>Pool</i> 1E/C	<i>Pool</i> 5C	<i>Pool</i> 3E
Gel 3	<i>Pool</i> 1E/C	<i>Pool</i> 3C	<i>Pool</i> 5C
Gel 4	<i>Pool</i> 1E/C	<i>Pool</i> 5E	<i>Pool</i> 3C

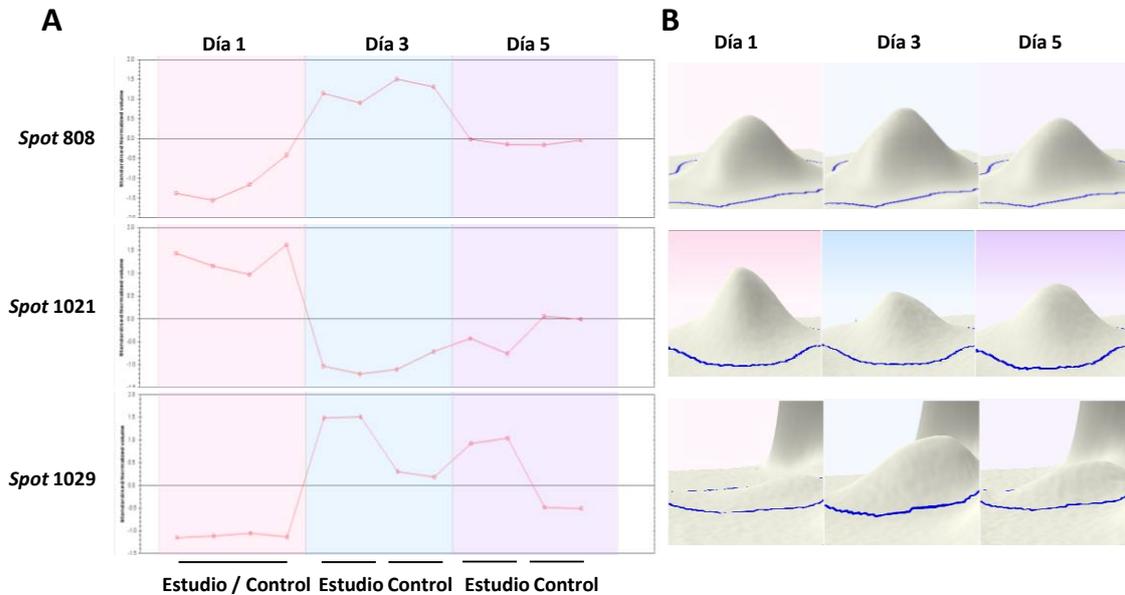
**Tabla 30.** Distribución y marcaje fluorescente de las muestras en los geles 2-DE DIGE.

Las muestras se separaron bidimensionalmente y los geles fueron digitalizados en un escáner de fluorescencia:



**Figura 25.** Mapas bidimensionales correspondientes a los proteomas plasmáticos de los *pools* de sueros de los días 1, 3 y 5 del experimento. Abreviaciones: C, grupo control; E, grupo estudio.

Los mapas resultantes fueron analizados con el *software* SameSpots. Después de eliminar los *spots* más pequeños, de área inferior a 500, se detectaron 819 *spots* comunes en los cuatro geles, de los que solamente 38 se ajustaron a los filtros  $P \leq 0,05$  y  $fold \geq \pm 1,2$  durante los tres días comparados y en los dos grupos de animales. Se seleccionaron 10 *spots* diferenciales para su caracterización, de los cuales solamente se pudieron identificar cuatro por MALDI-TOF. Posteriormente se verificó su identidad mediante MS en tándem:

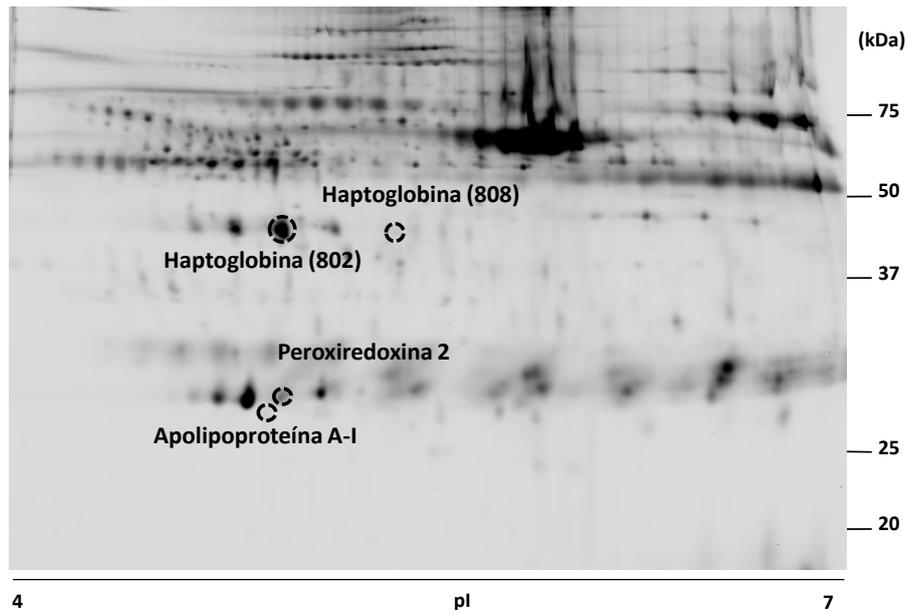


**Figura 26.** Análisis de los mapas bidimensionales mediante el *software* SameSpots. A) Cuantificación relativa de algunos de los *spots* diferenciales identificados, B) Representación tridimensional de estos tres *spots*.

Spot	Identificación	Acceso UniProt	P	Fold día 3 vs día 1	Fold día 5 vs día 1	Grupo
802	Haptoglobina	Q8SPS7 [HPT_PIG]	7,66E-04	1,73	1,34	Estudio
			1,65E-02	1,48	1,29	Control
808	Haptoglobina	Q8SPS7 [HPT_PIG]	6,06E-05	2,19	1,63	Estudio
			0,022	3,24	1,71	Control
1021	Apolipoproteína A-I	P18648 [APOA1_PIG]	0,016	-1,70	-1,53	Estudio
			2,43E-03	-1,38	-1,26	Control
1029	Peroxiredoxina 2	P52552 [PRDX2_PIG]	8,76E-03	5,78	4,86	Estudio
			2,91E-05	3,73	2,09	Control

**Tabla 31.** Resumen de las identificaciones por MALDI-TOF de los *spots* diferenciales.

*Fold* positivo = incremento respecto a la situación basal; *fold* negativo = disminución respecto a la situación basal.



**Figura 27.** Localización de los cuatro *spots* identificados en uno de los gels bidimensionales.

Los cuatro *spots* diferenciales correspondieron a tres proteínas diferentes: la Hp, la Apo A-I y la peroxiredoxina 2 (PRDX2). Los dos *spots* correspondientes a la Hp y la PRDX2 se comportaron de manera similar: aumentaron tras el cambio de alojamiento, de manera más acentuada en el grupo estudio, y posteriormente disminuyeron de manera progresiva. A su vez, la Apo A-I disminuyó, de manera más pronunciada en el grupo estudio, después de alojar las cerdas en las celdas individuales y días más tarde, ésta tendió a aumentar sus niveles.

## 2.2 iTRAQ

La segunda aproximación proteómica empleada fue el iTRAQ. Para ello, se emplearon los mismos cinco *pools* de muestras que se usaron en el 2-DE DIGE y se formaron tres nuevos *pools* de muestras con los sueros del día 4, el *pool 4E* (día 4, grupo estudio) y el *pool 4C* (día 4, grupo control), y un *pool* formado por todas las muestras del estudio (*pool interno*). Posteriormente todos los *pools* fueron tratados en paralelo con el kit comercial ProteoMiner® con el objetivo de reducir el elevado rango dinámico del proteoma plasmático.

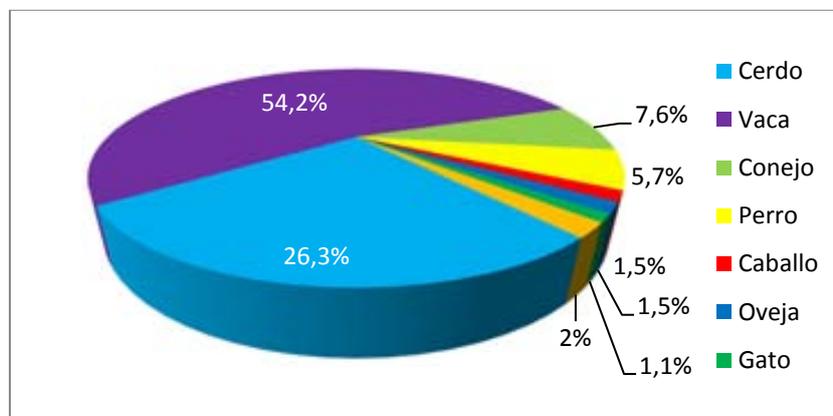
Se utilizó el kit comercial iTRAQ Reagents - 8plex (AB Sciex) que permite la comparación de ocho muestras a la vez. Las proteínas plasmáticas de las muestras de suero enriquecidas con el kit ProteoMiner® fueron digeridas con tripsina y los péptidos resultantes fueron marcados de manera diferencial con etiquetas (*tags*) isobáricas, de la siguiente manera:

Marcaje iTRAQ	Muestras	Marcaje iTRAQ	Muestras
113 (Da)	<i>Pool 1E/C</i>	117 (Da)	<i>Pool 3C</i>
114 (Da)	<i>Pool 3E</i>	118 (Da)	<i>Pool 4C</i>
115 (Da)	<i>Pool 4E</i>	119 (Da)	<i>Pool 5C</i>
116 (Da)	<i>Pool 5E</i>	121 (Da)	<i>Pool interno</i>

**Tabla 32.** Resumen del marcaje isobárico diferencial de los *pools* de muestras para su análisis por iTRAQ.

Una vez finalizado el marcaje se combinaron todas las muestras, que fueron separadas por punto isoeléctrico en un fraccionador IPG *off-gel*. Como resultado, se obtuvieron 12 fracciones peptídicas. Las fracciones fueron inyectadas en un espectrómetro de masas de tipo trampa iónica con el objetivo de evaluar de manera cualitativa y cuantitativa el contenido peptídico de cada fracción. Se combinaron las fracciones que contenían un menor número de péptidos. Las 7 fracciones peptídicas resultantes fueron caracterizadas por MS en tándem, en el analizador Orbitrap.

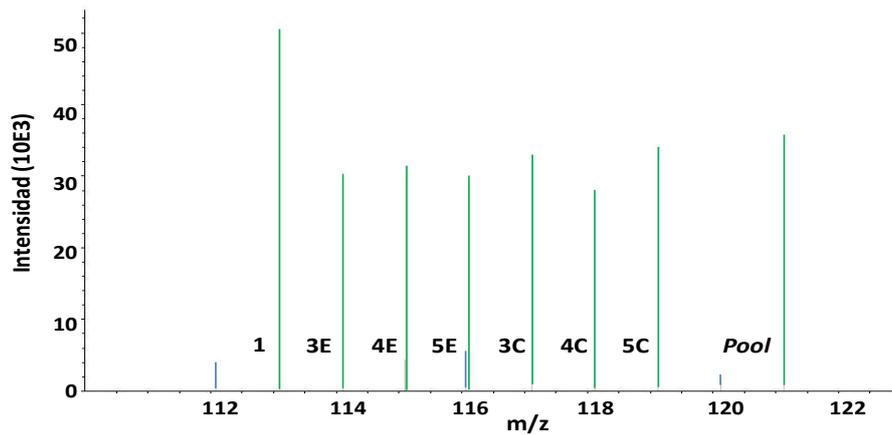
Se obtuvieron 69209 patrones de fragmentación peptídica diferentes, de los que solamente 10520 (15,2%) coincidieron con los patrones incluidos en la taxonomía "otros mamíferos" de la base de datos SwissProt, que excluyó de la búsqueda los datos relativos a los primates y los roedores. Como resultado se caracterizaron 262 proteínas, de las que solamente 69 fueron identificadas en la especie porcina (26,3%), tal como muestra el siguiente gráfico:



**Gráfico 22.** Taxonomía y número de proteínas que se identificaron de cada especie en el experimento iTRAQ.

De entre todas las identificaciones, 21 fueron redundantes, como por ejemplo la Apo A-I, que fue identificada en cerdo, vaca y perro; la apolipoproteína A-II, en vaca y caballo; la miocilina en vaca y perro; la albúmina en cerdo, vaca, conejo y gato; etc. Además, cuatro proteínas fueron únicamente identificadas en la especie bovina, a pesar de encontrarse su homólogo porcino presente en la base de datos SwissProt.

A continuación se muestra un ejemplo de la visualización de los 8 marcajes isobáricos en el espectro de masas, necesarios para la cuantificación relativa de los péptidos:



**Figura 28.** Visualización de los 8 marcajes isobáricos de la apolipoproteína M en el espectro de masas. La intensidad de los picos no está normalizada.

La intensidad del marcaje de cada péptido fue normalizada de la manera como se describe en el apartado Material y Métodos. Asimismo, se calculó la ratio de la intensidad de cada péptido respecto a la intensidad que presentó en la condición control y el promedio del *fold* de todos los péptidos de la misma proteína.

Se descartaron las proteínas que no presentaron la misma tendencia de cambio (aumento o disminución) para todos los días y en ambos grupos de animales. Asimismo, se excluyeron las proteínas que presentaron un *fold*  $\leq \pm 1,2$ . Después de aplicar ambos filtros, se obtuvieron 20 proteínas diferenciales: 5 proteínas disminuyeron mientras que el resto aumentó tras el cambio de alojamiento. Los resultados se han agrupado en función de su tendencia de cambio.

Identificación	Acceso UniProt	<i>Fold</i> día 3 vs día 1	<i>Fold</i> día 4 vs día 1	<i>Fold</i> día 5 vs día 1	Grupo
Apolipoproteína E	P18650 [APOE_PIG]	-1,96	-1,31	-1,60	Estudio
		-1,89	-1,24	-1,47	Control
Apolipoproteína M	Q2LE37 [APOM_PIG]	-1,80	-1,47	-2,02	Estudio
		-1,49	-1,21	-1,26	Control
ATP sintasa, subunidad $\beta$ mitocondrial	P00829 [ATPB_BOVIN]	-1,52	-1,74	-1,77	Estudio
		-1,83	-1,53	-1,40	Control
Miocilina	Q9XTA3 [MYOC_BOVIN]	-2,50	-2,21	-3,15	Estudio
		-2,54	-2,24	-1,61	Control
	Q866N2 [MYOC_RABIT]	-2,36	-1,49	-2,51	Estudio
		-1,87	-1,37	-1,34	Control
Proteína de 78 kDa regulada por glucosa	Q0VCX2 [GRP78_BOVIN]	-1,54	-1,22	-1,48	Estudio
		-1,46	-1,20	-1,31	Control

**Tabla 33.** Lista de proteínas diferenciales analizadas por iTRAQ que disminuyeron respecto a la situación basal.

Identificación	Acceso UniProt	<i>Fold</i> día 3 vs día 1	<i>Fold</i> día 4 vs día 1	<i>Fold</i> día 5 vs día 1	Grupo
Cofilina 1	Q5E9F7 [COF1_BOVIN]	1,69	1,53	1,80	Estudio
		1,41	1,28	1,26	Control
Factor barrera para la autointegración	P61283 [BAF_BOVIN]	2,15	1,40	2,20	Estudio
		1,51	1,81	1,44	Control
Factor estimulante 1 del osteoclasto	Q8MJ49 [OSTF1_PIG]	2,05	1,85	2,00	Estudio
		1,49	1,33	1,27	Control
Galectina 1	Q49I35 [LEG1_PIG]	2,31	1,49	2,56	Estudio
		1,64	1,38	1,57	Control
Glutamato--cisteína ligasa, subunidad reguladora	Q2T9Y6 [GSH0_BOVIN]	2,33	1,28	1,81	Estudio
		1,43	1,22	1,63	Control
Lactotransferrina	P14632 [TRFL_PIG]	1,38	1,41	1,35	Estudio
		1,21	1,89	1,54	Control
Peroxiredoxina 2	P52552 [PRDX2_PIG]	2,31	1,37	2,17	Estudio
		1,99	1,29	1,80	Control
Proteasa 26S subunidad 10B reguladora	Q2KIW6 [PRS10_BOVIN]	1,74	1,30	1,53	Estudio
		2,00	1,22	2,00	Control
Proteasa 26S subunidad 7 reguladora	Q5E9F9 [PRS7_BOVIN]	1,39	1,19	1,36	Estudio
		1,68	1,33	1,59	Control
Proteasoma 26S subunidad 11 reguladora no ATPasa	Q2KI42 [PSD11_BOVIN]	2,41	1,31	1,33	Estudio
		3,09	1,40	2,67	Control
Protegrina 3	P32196 [PG3_PIG]	1,75	1,49	1,69	Estudio
		1,45	1,33	1,46	Control
Proteína 2 con dominio LIM y similar al antígeno de senescencia	Q2KJ33 [LIMS2_BOVIN]	2,46	1,43	2,25	Estudio
		2,37	1,61	1,46	Control
Proteína de choque térmico de 75 kDa	Q2TBI4 [TRAP1_BOVIN]	3,68	2,22	3,92	Estudio
		1,53	1,23	1,34	Control
Secernina 3	Q17QS0 [SCRN3_BOVIN]	7,93	1,70	7,78	Estudio
		3,42	1,69	2,06	Control
Tropomiosina, cadena β	Q5KR48 [TPM2_BOVIN]	3,35	1,62	3,42	Estudio
		2,58	1,91	1,56	Control

**Tabla 34.** Lista de proteínas diferenciales analizadas por iTRAQ que aumentaron respecto a la situación basal.

Las proteínas diferenciales seleccionadas poseían diferentes funciones biológicas como por ejemplo el transporte de los lípidos, la respuesta inmune innata, la defensa antioxidante de la célula, el plegamiento y/o degradación de las proteínas mal plegadas o dañadas y el mantenimiento de la estructura celular, entre otras.

### CAPÍTULO 3: EFECTO DE LA INFECCIÓN POR EL CIRCOVIRUS PORCINO 2 SOBRE LA EXPRESIÓN Y LAS MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE

El síndrome del desmedro multisistémico después del destete (PMWS) es una enfermedad causada principalmente por el circovirus porcino de tipo 2 (PCV2) que está ampliamente distribuida en todos los países productores de porcino. Esta enfermedad afecta a cerdos jóvenes y se caracteriza por la pérdida progresiva de peso, trastornos respiratorios y una depleción inmunitaria asociada a procesos inflamatorios en los tejidos linfoides. Sin embargo, también se han descrito infiltraciones granulomatosas en algunos tejidos no linfoides, ictericia, anemia, palidez, retraso en el crecimiento y mortalidad (Segalés *et al.*, 1997, 2004).

Los signos clínicos de la enfermedad no son útiles para su diagnóstico debido a que los síntomas respiratorios y las alteraciones en los nódulos linfáticos también pueden asociarse al síndrome reproductivo y respiratorio (PRRS) y a la salmonelosis sistémica. En cambio, las tinciones histológicas de las lesiones causadas por el virus, que son características de este síndrome, y la detección del virus en las lesiones mediante hibridación *in situ*, PCR o serología son marcadores útiles de la enfermedad (Sorden, 2000). Estudios recientes han confirmado el incremento de los niveles de las principales APPs porcinas durante el curso de una infección por PCV2 (Grau-Roma *et al.*, 2009; Pallarés *et al.*, 2005).

Las modificaciones postraduccionales (PTMs) son mecanismos moleculares que posee la célula para regular la función, la actividad, la localización y/o la vida media de las proteínas, un recurso mucho más económico energéticamente que la producción de nuevas proteínas o la destrucción de las ya existentes (Krishna and World, 1993). Se han descrito alrededor de unas 200 PTMs diferentes en las proteínas. La glicosilación es una de las PTMs más frecuentes; se estima que más de la mitad del proteoma la contiene (Apweiler *et al.*, 1999). Por ejemplo, algunas APPs y las Igs son glicoproteínas, es decir, poseen carbohidratos anclados a las cadenas laterales de alguno de sus aminoácidos (Shetlar, 1961), a través de la unión a un grupo nitrógeno de la asparagina (N-glicanos) o a un grupo oxígeno (O-glicanos) de la serina y/o treonina (Durand and Seta, 2000).

Una proteína puede presentar diversas subpoblaciones proteicas (isoformas, isoespecies o isoproteínas), que difieren en la estructura de la PTM que contienen. Por ejemplo, las glicoproteínas suelen poseer varias isoformas cuyos componentes glucídicos son diferentes (glicofomas). Esta heterogeneidad confiere a cada isoforma una carga y/o una masa característica, por lo que su movilidad electroforética difiere de la del resto de isoformas (Pieper *et al.*, 2003). Además, la composición de las PTMs puede variar en función de la especie, el tipo de célula o tejido, el estado de desarrollo y de diferenciación (Brockhausen *et al.*, 1998), así como durante un proceso patológico (Ohtsubo and Marth, 2006).

La caracterización de las isoformas proteicas y/o las PTMs podría resultar una buena alternativa a las aproximaciones clásicas en las que se evalúa el proteoma entero durante la búsqueda de nuevos biomarcadores (McDonald and Yates, 2002).

### Diseño experimental

Este experimento se realizó con las muestras proporcionadas por el Dr. J. Segalés, del Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA; UAB-IRTA) y del departamento de Sanidad y Anatomía Animal de la Facultad de Veterinaria (UAB), procedentes del trabajo publicado por Grau-Roma et al. (2009).

El estudio de Grau-Roma et al. (2009) analizó la evolución de la expresión de dos APPs porcinas, la Hp y la Pig-MAP, en varios lotes de cerdos infectados por el circovirus porcino (PCV2). El experimento duró 13 semanas y se obtuvieron varias muestras de sangre, frotis nasales y rectales a lo largo del experimento. Asimismo, se extrajeron los tejidos linfoides durante la necropsia. El grupo del Dr. J. Segalés nos proporcionó las muestras de suero pertenecientes a seis animales control y a cinco animales infectados por el virus correspondientes a todas las extracciones de muestra que se realizaron. No obstante, se trabajó casi exclusivamente con las muestras de suero referentes al momento previo a la necropsia y de manera puntual se emplearon dos muestras obtenidas al inicio del experimento.

Este experimento se realizó en colaboración con Ingrid Miller y el Prof. M. Gemeiner, del departamento de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena (Austria), con el Dr. E. Razzazi-Fazeli, la Mag. K. Nöbauer y la Dra. K. Hummel, del Servicio de Proteómica VetCore de la Universidad de Medicina Veterinaria de Viena (Austria). El análisis glicoproteómico se realizó en colaboración con el Dr. D. Kolarich y el Mag. U. Möglinger, del departamento de Sistemas Biomoleculares del Instituto Max Planck de Coloides e Interfases, en Potsdam (Alemania). Estas colaboraciones se establecieron en el marco de la Acción Integrada AT 2009-0007.

### Objetivos

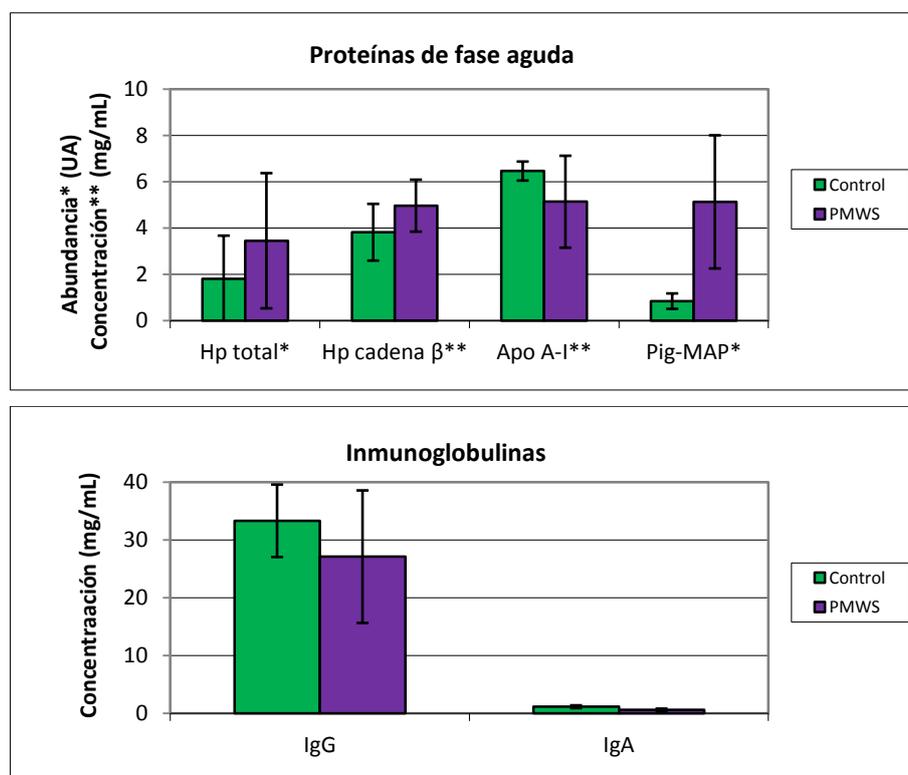
Inicialmente se fijaron tres objetivos para llevar a cabo con las muestras de suero pertenecientes a un experimento en el que un grupo de animales habían sufrido una infección vírica por el virus PCV2:

- Análisis bioquímico de las muestras para evaluar los niveles de las APPs y el grado de afectación del sistema inmune de los animales infectados por el virus PCV2.
- Caracterización estructural de las isoformas de las proteínas Hp y Apo A-I.
- Estudio del efecto de la infección del virus sobre la expresión y las PTMs de las isoformas de estas dos proteínas.

## 1. Análisis bioquímico y proteómico general de las muestras

### 1.1 Perfil bioquímico acerca el estado del sistema inmune de los animales

La primera aproximación realizada fue la cuantificación de diferentes proteínas relacionadas con la respuesta inmune para evaluar el grado de afectación de los animales infectados con el virus PCV2 y el estado de salud de los cerdos sanos antes de su sacrificio. Se midió por densitometría la intensidad de las bandas proteicas de la cadena  $\beta$  de la Hp y la Apo A-I en un gel monodimensional, y mediante ELISA los niveles de las IgG e IgA. Los valores relativos a la concentración de Pig-MAP y de la Hp total fueron aportados por el grupo del Dr. J. Segalés; éstos fueron obtenidos también por ELISA. A continuación se muestra los cambios de concentración de estas proteínas en los dos grupos de animales:



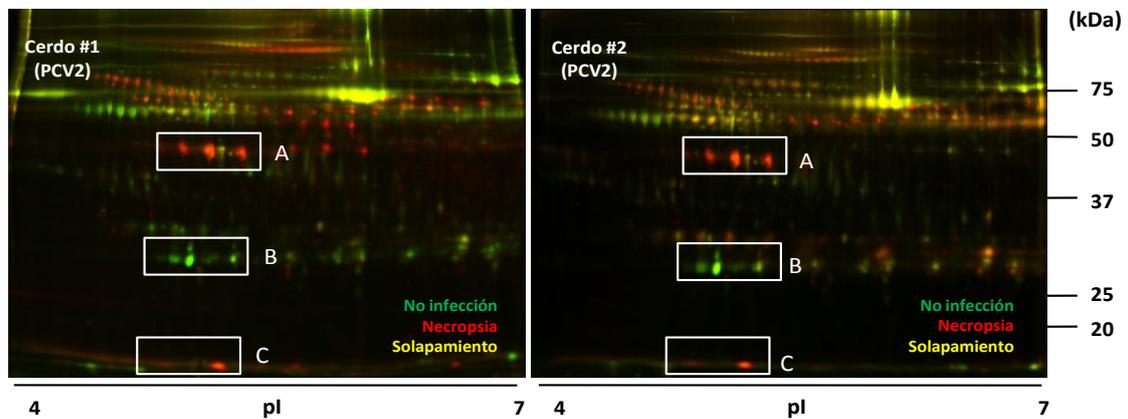
**Gráficos 23-24.** Respuesta de varias proteínas de fase aguda y las inmunoglobulinas G y A en animales sanos e infectados por PCV2 (control, n=6; PMWS, n=5).

Los niveles de la IgA ( $P = 0,003$ ) y la Pig-MAP ( $P = 0,005$ ) disminuyeron y aumentaron, respectivamente, de manera significativa en los animales infectados por el virus. Por su parte, el resto de las proteínas también presentaron variaciones en su concentración, aunque no de manera significativa. Asimismo, se detectó una elevada desviación estándar en todos los parámetros examinados, especialmente en los animales infectados, lo que señalaría que el virus no afectó por igual a todos los animales.

### 1.2 Análisis de las muestras de suero por 2-DE DIGE

Se realizó una electroforesis bidimensional con marcaje fluorescente (2-DE DIGE) para verificar la presencia de proteínas diferenciales a causa de la infección. Para ello, se emplearon muestras de suero

de los dos cerdos que presentaron los títulos víricos más elevados del estudio. Por un lado, la primera muestra correspondió a la semana 3 del estudio, en la que los animales ya se habían adaptado al nuevo hábitat pero aún no habían sido infectados por el virus. Por otro lado, la segunda muestra de suero perteneció al momento previo al sacrificio, en el que los animales presentaron un elevado título virus. Los mapas bidimensionales resultantes se muestran en la siguiente figura:



**Figura 29.** Mapas bidimensionales fluorescentes del proteoma sérico de dos cerdos con un elevado título vírico antes (en verde) y durante la infección por PCV2 (en rojo). En amarillo están representadas las proteínas cuya concentración no varió. Nomenclatura: A) Hp, cadena  $\beta$ ; B) Apo A-I; C) Hp, cadena  $\alpha$ .

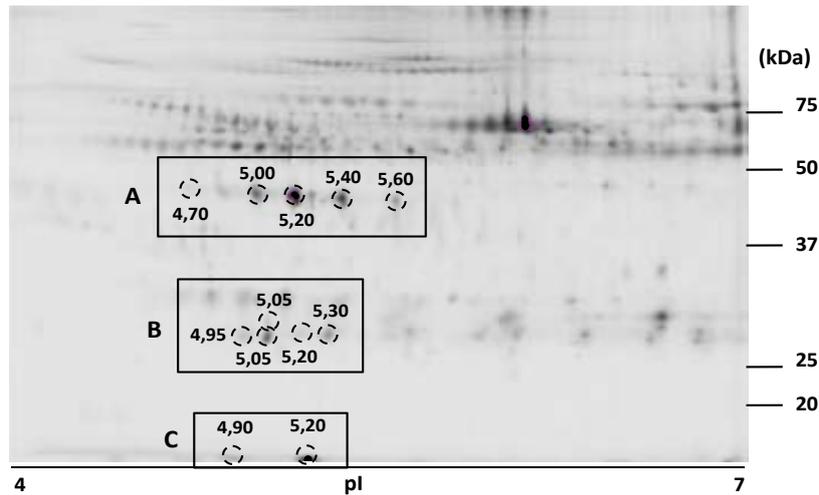
El solapamiento de las imágenes relativas a cada fluorocromo indicó que los dos proteomas comparados presentaron diferencias entre ellos, tanto en composición como en concentración. Asimismo, se detectó en ambos geles un aumento de las dos cadenas proteicas de la Hp y un descenso de la Apo A-I a causa de la infección por el virus.

Debido a que se observó el mismo patrón diferencial de estas dos proteínas en los dos animales analizados, que éstas poseen un número reducido de isoformas y que se encuentran en un área del gel con pocas proteínas alrededor, se decidió caracterizar estructuralmente sus isoformas.

## 2. Caracterización estructural de la Hp y la Apo A-I

### 2.1 Puesta a punto de los geles *zoom* bidimensionales

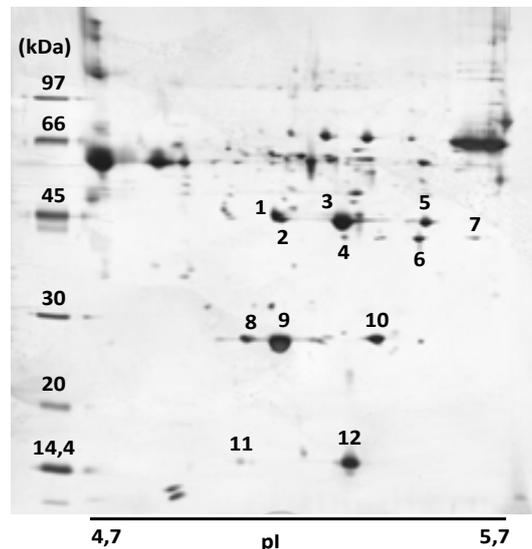
Con el objetivo de analizar las isoformas de estas dos APPs se decidió emplear geles *zoom* bidimensionales. Para ello, se calculó sobre uno de los mapas bidimensionales anteriores, con una regla y la ayuda de la bibliografía existente, el punto isoeléctrico (pI) y el peso molecular (MW) aproximado de todas las posibles isoformas.



**Figura 30.** pI y MW aproximados de las isoformas proteicas de la Hp y la Apo A-I tras su separación bidimensional. Nomenclatura: A) Hp, cadena  $\beta$ ; B) Apo A-I; C) Hp, cadena  $\alpha$ .

La distribución de todas las isoformas proteicas de ambas proteínas se acotó al rango de pI 4,7 - 5,7 y al rango de MW 10 - 50 kDa.

Se polimerizaron tiras de IEF "caseras" (tiras IPG *zoom*) con un gradiente de pH entre 4,7 y 5,7, que se emplearon del mismo modo que las tiras IPG comerciales. Se pusieron a punto los geles *zoom* para estas dos APPs en cuanto a cantidad de proteína y punto de aplicación de la muestra. Su optimización permitió la separación bidimensional de las dos proteínas en el mismo gel y una buena separación por pI de todas sus isoformas proteicas, gracias al estrecho rango de pH de la tira IPG *zoom*. Se seleccionaron 12 *spots* para su identificación por MALDI-TOF:



**Figura 31.** Gel *zoom* bidimensional resultante de la puesta a punto para el análisis de las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la Hp y la Apo A-I. Los números indican los *spots* escogidos para su caracterización por MALDI-TOF. Esta numeración se ha mantenido a lo largo del manuscrito.

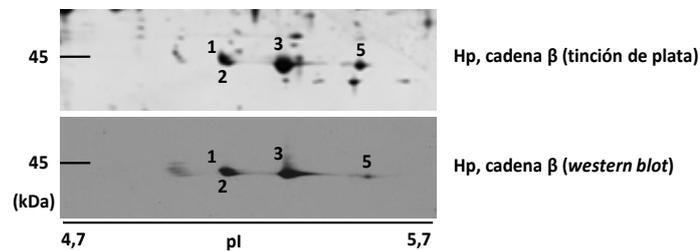
Se identificaron 10 de los *spots* seleccionados, que correspondieron a la Hp, la apolipoproteína A-IV y la Apo A-I. Los dos *spots* no identificados presentaron una intensidad muy débil.

Spot	Identificación	Acceso UniProt	Observaciones
1	Haptoglobina	Q8SPS7 [HPT_PIG]	Cadena $\beta$
2	Haptoglobina	Q8SPS7 [HPT_PIG]	Cadena $\beta$
3	Haptoglobina	Q8SPS7 [HPT_PIG]	Cadena $\beta$
4	-	-	-
5	Haptoglobina	Q8SPS7 [HPT_PIG]	Cadena $\beta$
6	Apolipoproteína A-IV	O46409 [APOA4_PIG]	-
7	-	-	-
8	Apolipoproteína A-I	P18648 [APOA1_PIG]	-
9	Apolipoproteína A-I	P18648 [APOA1_PIG]	-
10	Apolipoproteína A-I	P18648 [APOA1_PIG]	-
11	Haptoglobina	Q8SPS7 [HPT_PIG]	Cadena $\alpha$
12	Haptoglobina	Q8SPS7 [HPT_PIG]	Cadena $\alpha$

**Tabla 35.** Identificación por MALDI-TOF de los *spots* seleccionados para la caracterización de las isoformas de la Hp y la Apo A-I.

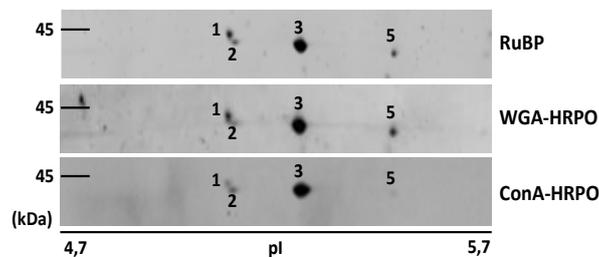
## 2.2 Caracterización de las isoformas de la Hp

Se confirmó con un *western blot* bidimensional la identidad de los *spots* caracterizados por MALDI-TOF correspondientes a la cadena  $\beta$  de la Hp (*spots* 1-3, 5). Sin embargo, el anticuerpo anti-Hp no presentó reactividad contra la cadena  $\alpha$ :



**Figura 32.** Validación por *western blot* bidimensional de las cuatro isoformas de la cadena  $\beta$  de la Hp identificadas previamente por MALDI-TOF.

Las proteínas del suero de un animal control del experimento fueron separadas bidimensionalmente en un gel *zoom*, transferidas a una membrana de nitrocelulosa e incubadas con las lectinas aglutinina del germen del trigo (WGA) y la concanavalina A (ConA), que unen los azúcares N-acetilglucosamina y D-manosil o D-glucosil, respectivamente:



**Figura 33.** Detección de los *spots* glicosilados de la cadena  $\beta$  de la Hp con las lectinas WGA y ConA tras la separación bidimensional de las proteínas del suero. Se visualizaron también todos los *spots* presentes en la membrana con Sypro Ruby (RuBP).

Las dos lectinas presentaron reactividad contra los cuatro *spots* caracterizados por MALDI-TOF de la cadena  $\beta$  de la Hp, pero no se unieron a ningún *spot* de la cadena  $\alpha$ , indicando que ésta no se encuentra glicosilada. Por lo tanto, el estudio de las PTMs de la Hp se centró en las cuatro isoformas glicosiladas de la cadena  $\beta$ .

Con el objetivo de caracterizar las isoformas de la cadena  $\beta$  de la Hp más a fondo, se purificó esta proteína a partir de una muestra de suero perteneciente a un animal sano mediante una cromatografía de afinidad en Sefarosa acoplada a hemoglobina porcina, aprovechando la afinidad de la Hp por la hemoglobina.

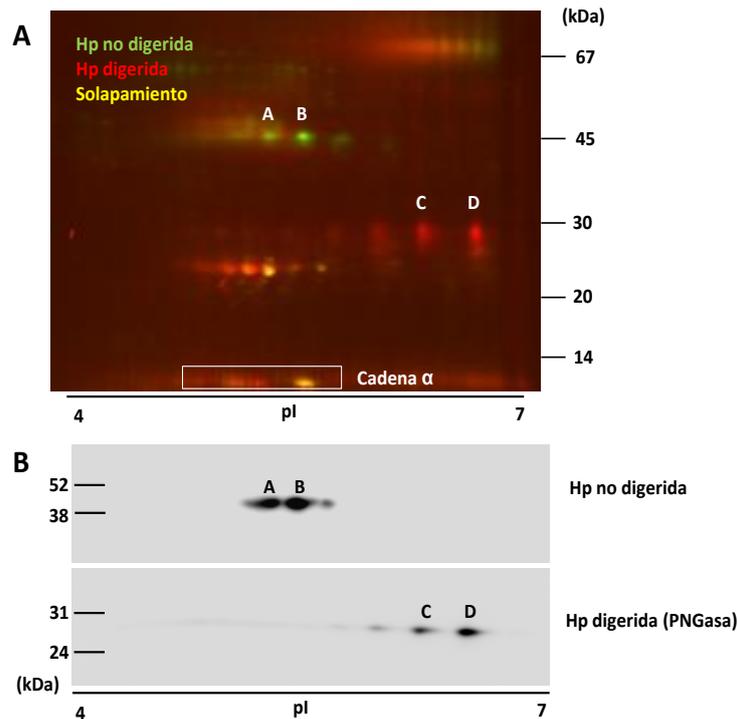
### 2.2.1 Aproximación proteómica clásica

La proteína pura fue digerida con una enzima N-glicosidasa (PNGasa) y se comparó mediante 2-DE DIGE el resultado de la digestión con el patrón de isoformas de la Hp intacta. Para ello, se marcaron las muestras de la siguiente manera:

	G-200		G-300	
Gel 2-DE DIGE	Hp pura sin digerir		Hp pura digerida con PNGasa	

**Tabla 36.** Marcaje fluorescente de las muestras para la evaluación del producto de la digestión de la Hp con PNGasa.

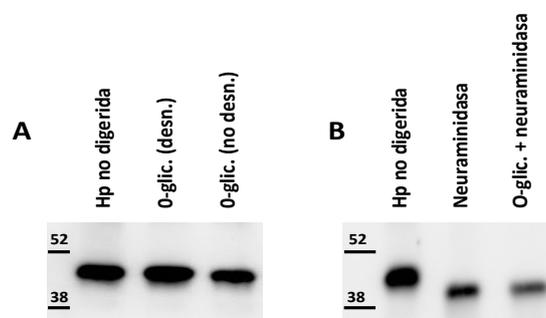
Una vez marcadas las muestras fueron combinadas, separadas bidimensionalmente en el mismo gel y digitalizadas mediante el escáner de fluorescencia Typhoon. Se evidenció que el producto de la digestión de la Hp con la PNGasa resultó en la aparición de dos *spots* muy intensos y otros más débiles, todos ellos de menor MW (25 - 30 kDa) y de pI más básico (pI 6-7) que los de la proteína intacta. Estos nuevos *spots* fueron confirmados por *western blot* como isoformas de la Hp. Asimismo, se verificó que las dos isoformas de la cadena  $\alpha$  de la Hp no poseen cadenas glucídicas.



**Figura 34.** Digestión de la Hp pura con una enzima PNGasa. A) Comparación mediante en un gel 2-DE DIGE de los productos de la digestión de la enzima (en rojo) con el patrón de isoformas de la Hp intacta (en verde). En amarillo están representadas las proteínas que no fueron digeridas por la enzima. (B) *Western blot* bidimensional de la proteína deglicosilada. La nomenclatura de los *spots* (A-D) se utilizará a lo largo del capítulo.

Se recortaron los dos *spots* deglicosilados más intensos (C y D) y éstos fueron analizados por MS en tándem. Esta aproximación permitió identificar dos de los cuatro puntos potenciales de unión de las cadenas de N-glúcidos a la proteína descritos en la bibliografía: la asparagina 183 y la 232.

Posteriormente se incubó la proteína pura con una enzima O-glicosidasa debido a que el tratamiento de la Hp con la enzima PNGasa no permitió explicar la heterogeneidad existente entre las glicofomas de la cadena  $\beta$  de la Hp, de la que se creía que solamente poseía cadenas de N-glicanos, ya que aparecieron varios *spots* tras la digestión. La digestión se ensayó con distintos protocolos, en condiciones nativas y desnaturalizantes, y también de manera combinada con la enzima neuraminidasa (sialidasa), que elimina los residuos de ácido siálico:



**Figura 35.** *Western blot* monodimensional de la Hp pura después de la digestión enzimática con las enzimas O-glicosidasa y neuraminidasa. A) Digestión con la O-glicosidasa empleando dos protocolos diferentes. B) Digestión enzimática con la O-glicosidasa y la neuraminidasa. Abreviaturas: desn., condiciones desnaturalizantes; no desn., condiciones no desnaturalizantes; O-glic, O-glicosidasa.

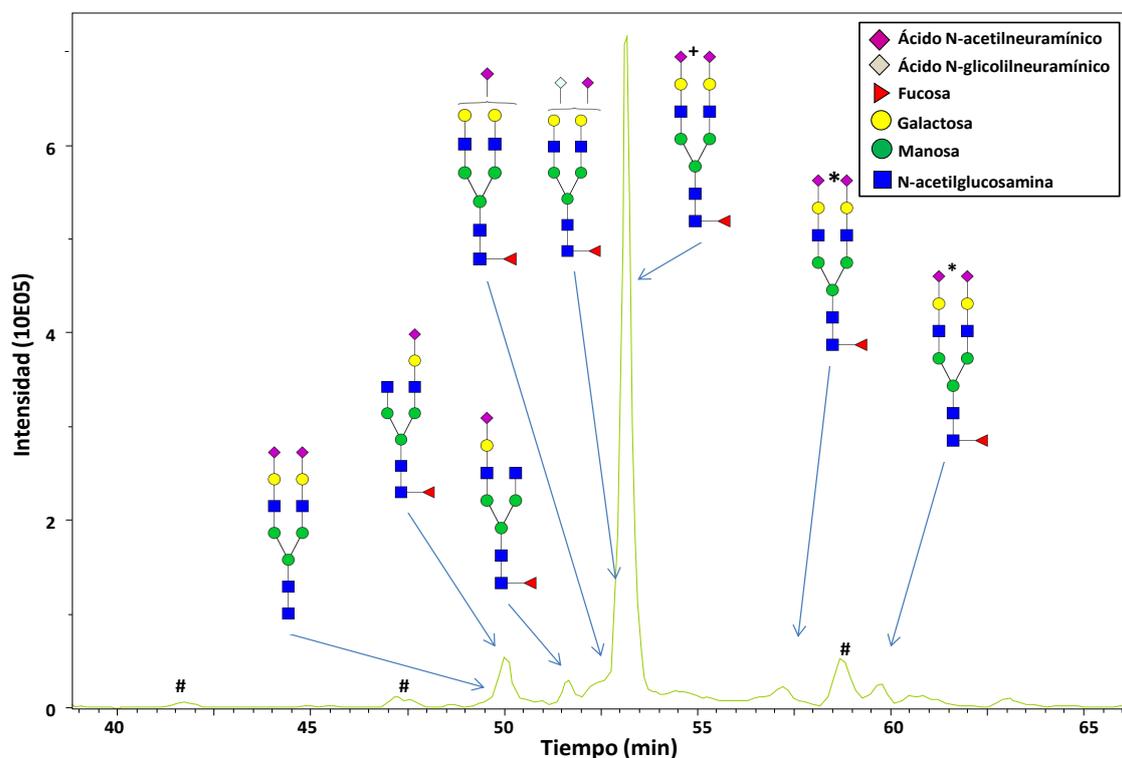
Solamente se detectaron cambios en el MW de la proteína después de la digestión con la enzima neuraminidasa pero no con la O-glicosidasa.

### 3.2.2 Aproximación glicoproteómica

Para profundizar en el estudio de la heterogeneidad de la cadena  $\beta$  de la Hp, se estableció una colaboración con el grupo del Dr. D. Kolarich, del departamento del Sistemas Biomoleculares del Instituto Max Planck de Coloides e Interfases (Potsdam, Alemania), que está especializado en el estudio por MS de las cadenas glucídicas de las proteínas.

Se separaron en un gel monodimensional las muestras pertenecientes a los animales sanos del experimento (n=6) y fueron transferidas a una membrana de PVDF. Ésta fue teñida con el colorante Direct Blue y se recortó la banda proteica correspondiente a la cadena  $\beta$  de la Hp. Las cadenas de N-glúcidos fueron escindidas de la membrana con la enzima PNGasa y se combinaron las fracciones glucídicas de cada banda, formando un *pool*. Posteriormente, el *pool* de N-glicanos fue separado por LC y caracterizado por MS en tándem.

El análisis de los N-glicanos por MS en tándem reveló que la cadena  $\beta$  de la Hp porcina poseía azúcares con el núcleo glucídico fucosilado y con azúcares disializados, mayoritariamente con ácido neuramínico (NeuAc), aunque también con ácido glicolilneuramínico (NeuGc):



**Figura 36.** Cromatograma de las cadenas N-glicosiladas de la Hp. Nomenclatura: #, contaminación con hexosas; \*, unión 2 x  $\alpha$  2-3 ácido siálico o una mezcla de  $\alpha$  2-3 y  $\alpha$  2-6 ácido siálico; +, unión  $\alpha$  2-6 ácido siálico.

El análisis de las cadenas de los N-glicanos por MS en tándem permitió explicar en parte la heterogeneidad existente entre las isoformas de la cadena  $\beta$  ya que se detectaron cadenas glucídicas

que poseían solamente uno o dos grupos NeuAc y otras con un grupo NeuAc y uno NeuGc, la combinación de las cuales, en diferente proporción, podría originar varias especies proteicas con distintos *pI* y/o MW.

Paralelamente se repitió la electroforesis bidimensional que contenía la Hp pura intacta y la Hp digerida con la enzima PNGasa, pero sin marcaje fluorescente. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF y visualizadas con la tinción Direct Blue. Los dos *spots* correspondientes a la proteína intacta (A y B) fueron liberados de la membrana mediante la enzima PNGasa. A continuación se trató la membrana con NaBH<sub>4</sub> para escindir los posibles O-glicanos presentes en los cuatro *spots* (A-D), mediante una  $\beta$ -eliminación en condiciones reductoras. Las cadenas de O-glicanos fueron separadas por LC y analizadas por MS en tándem. Se detectaron cadenas de O-glicanos en tres de los cuatro *spots*:

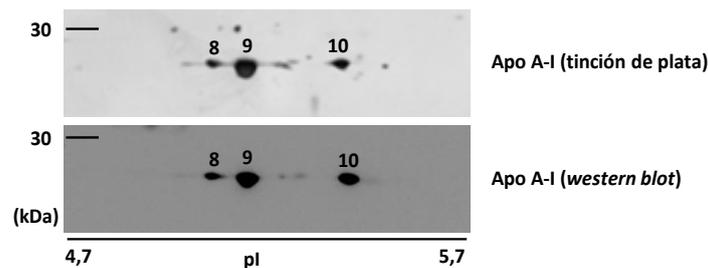
<i>Spot</i>	Oligosacáridos de tipo O-
A	Hex1 HexNAc1 NeuAc1, Hex1 HexNAc1 NeuAc2
B	-
C	Hex1 HexNAc1 NeuAc1*, HexNAc1 NeuAc1*
D	Hex1 HexNAc1 NeuAc2

**Tabla 37.** Identificación de los O-glicanos presentes en la cadena  $\beta$  de la Hp. Abreviaturas: Hex, hexosa; HexNAc, N-acetilhexosamina; NeuAc, Ácido neuramínico. \* No se pudieron confirmar por MS en tándem.

Estos resultados indicaron que la heterogeneidad de las glicofomas de la cadena  $\beta$  de la Hp se explicaría por la combinación en diferente proporción de las cadenas de N-glicanos y la presencia de O-glicanos.

### 2.3 Caracterización de las isoformas de la Apo A-I

Se confirmó mediante un *western blot* bidimensional la identidad de los tres *spots* caracterizados por MALDI-TOF correspondientes a la Apo A-I (*spots* 8-10):



**Figura 37.** Validación por *western blot* bidimensional de las tres isoformas de la Apo A-I identificadas previamente por MALDI-TOF.

Debido a que las lectinas no presentaron reactividad contra ninguna de las tres isoformas de la Apo A-I se optó por la caracterización de sus PTMs directamente por MS en tándem. El estudio de sus PTMs se inició con los dos *spots* más ácidos (8 y 9).

Una muestra de suero procedente de un animal sano fue separada bidimensionalmente en un gel *zoom*. Las proteínas fueron visualizadas mediante una tinción de plata y se recortaron los *spots* número 8 y 9,

que fueron digeridos con tripsina posteriormente. Los péptidos resultantes fueron separados mediante LC y analizados por MS en tándem.

Durante el análisis bioinformático de los patrones de fragmentación de los péptidos se observó que al cambiar dos de los aminoácidos de la secuencia porcina con la que se trabajaba por los de la secuencia bovina (H<sub>185</sub> por Q<sub>185</sub> y V<sub>186</sub> por L<sub>186</sub>), aumentó el número de péptidos coincidentes. Hasta el momento, el nivel de caracterización de la secuencia de la proteína es del 90%:

```
Spot 1  1  MKAVVLTLAVLFLTGSQARHFWQQDDPQSPWDRVKDFATVYVDAIKDSGRDYVAQFEASA  60
Spot 2  1  MKAVVLTLAVLFLTGSQARHFWQQDDPQSPWDRVKDFATVYVDAIKDSGRDYVAQFEASA  60
Spot 1  61  LGKHLNLKLLDNWDSLGSFTFKVREQLGPVTQEFWDNLEKETEARQEMSKDLEEVKKKV  120
Spot 2  61  LGKHLNLKLLDNWDSLGSFTFKVREQLGPVTQEFWDNLEKETEARQEMSKDLEEVKKKV  120
Spot 1  121  QPYLDDFQNKWQEEEMETYRQKMAPLGAEFREGARQKVQELQEKLSPLAEELRDRLRAHVE  180
Spot 2  121  QPYLDDFQNKWQEEEMETYRQKMAPLGAEFREGARQKVQELQEKLSPLAEELRDRLRAHVE  180
Spot 1  181  ALRQQLAPYSDDLRQRMAARFEALKEGGGSLAEYQAKAQEQLKALGEKAKPALEDLRQGL  240
Spot 2  181  ALRQQLAPYSDDLRQRMAARFEALKEGGGSLAEYQAKAQEQLKALGEKAKPALEDLRQGL  240
Spot 1  241  LPVLENLKVSILAAIDEASKKLNAQ  265
Spot 2  241  LPVLENLKVSILAAIDEASKKLNAQ  265
```

**Figura 38.** Caracterización de la secuencia de la proteína Apo A-I porcina mediante MS en tándem. En rojo, los aminoácidos confirmados por MS en tándem. En subrayado, el péptido señal (no identificado en ninguno de los spots). En negro, los aminoácidos no detectados solamente en uno de los spots. En gris, los aminoácidos no detectados en ninguno de los spots. En amarillo, los aminoácidos adquiridos de la secuencia bovina.

El análisis de los espectros de masas se realizó de acuerdo con la información existente en las bases de datos proteicas y la bibliografía acerca de las posibles PTMs de la Apo A-I porcina. En ninguno de los dos spots se detectaron los extremos N- ni C-terminal ni 3 regiones de la proteína (aminoácidos 64-68, 197-200 y 218-228), que podrían contener PTMs aún desconocidas. El péptido que contiene los aminoácidos 175-181 fue identificado en la isoforma 9, pero no en la 8. En este fragmento podría encontrarse la PTM que causaría la diferente movilidad electroforética de las dos isoformas.

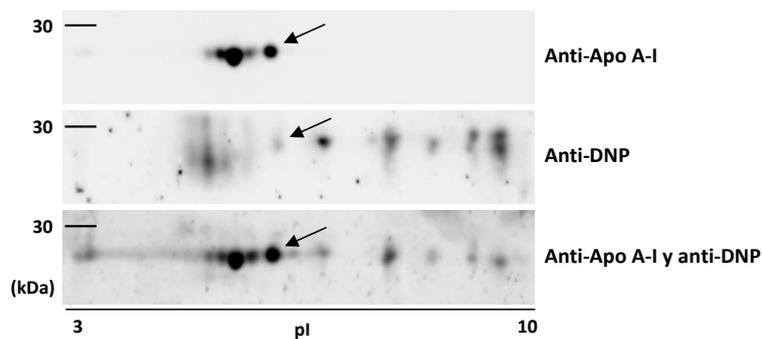
Por un lado, se detectaron modificaciones oxidativas en las metioninas 109, 135 y 142, y en los triptófanos 31, 73, 95 y 131 de ambos spots. A continuación, se muestra un ejemplo de las PTMs identificadas en los cuatro triptófanos de la proteína evaluados:

Amino-ácido	Secuencia	Spot 8	Spot 9
		W oxidado	W oxidado
W31	Q.DDPQSP <u>W</u> DR.V	Oxidación	Formilquinurenina
W73	K.LLDN <u>W</u> DSLGSFTK.V	Oxidación Formilquinurenina Quinurenina	Oxidación Formilquinurenina
W95	K.VREQLGPVTQEF <u>W</u> DNLEK.E	Oxidación Quinurenina	Oxidación Quinurenina
W131	K.VQPYLDDFQNK <u>W</u> QEEMETYSR.Q	Formilquinurenina	Formilquinurenina

**Tabla 38.** Ejemplo de la detección por MS de las PTMs oxidativas en los cuatro triptófanos que posee la Apo A-I.

Tras el análisis bioinformático de los espectros de fragmentación de los dos *spots* más ácidos se descartaron algunas de las PTMs descritas en la bibliografía que podría poseer la Apo A-I como la fosforilación, la palmitolación y la unión del 4-hidroxinonal.

Paralelamente se realizó un *western blot* bidimensional para detectar la presencia de grupos carbonilo en la proteína. A pesar de que la intensidad de los *spots* cercanos a la Apo A-I fue bastante débil, el *spot* 10 presentó una ligera reactividad ante el anticuerpo anti-DNP.



**Figura 39.** Detección de grupos carbonilo en la Apo A-I mediante un *western blot* bidimensional.

#### 2.4 Caracterización de las PTMs de las inmunoglobulinas

Aprovechando la colaboración establecida con el grupo del Dr. D. Kolarich, también se caracterizaron los componentes glucídicos de la cadena pesada de las IgG y la IgA con un procedimiento similar al empleado durante el estudio de la cadena  $\beta$  de la Hp. Para ello, se utilizó la misma membrana de PVDF obtenida después de la separación monodimensional de las muestras de todos los animales sanos del experimento (n=6). Las bandas proteicas de interés fueron recortadas y tratadas con la enzima PNGasa. Todas las cadenas de N-glicanos fueron combinadas y el *pool* resultante fue separado por LC y analizado por MS en tándem. Posteriormente se aplicó  $\text{NaBH}_4$  sobre las bandas proteicas para escindir los O-glicanos, que también fueron combinados, separados por LC y caracterizados por MS en tándem. Los espectros de fragmentación resultantes fueron analizados manualmente y las identificaciones fueron confrontadas con la información presente en las bases de datos:

Residuos glucídicos		
IgG	N-glicanos (núcleo Man3 GICNAc2)	Hex1 HexNAc1 , HexNAc2, Hex2 HexNAc1 Fuc1, Hex1 HexNAc2, Hex2 HexNAc2, HexNAc2 Fuc, HexNAc2 Hex1 Fuc, Hex2 HexNAc2 NeuAc2, Hex1 HexNAc2 Fuc1, Hex2 HexNAc2 NeuAc1, Hex2 HexNAc2 NeuGc1, Hex1 HexNAc2 NeuAc1 Fuc1 , Hex2 HexNAc2 NeuAc1 Fuc1, Hex2 HexNAc2 NeuGc1 Fuc1, Hex2 HexNAc2 NeuAc2 Fuc1, Hex2 HexNAc2 NeuAc1 NeuGc1 Fuc1, Hex2 HexNAc2 NeuGc2 Fuc1, Hex1 HexNAc1 NeuAc2 Fuc1, Hex3 HexNAc3 NeuAc3 Fuc1, Hex3 HexNAc3 NeuAc1 Fuc1, Hex3 HexNAc3 NeuAc2 Fuc1
	O-glicanos	Hex1 HexNAc1 NeuAc1, Hex1 HexNAc1 NeuAc1, Hex1 HexNAc1 NeuAc2
IgA	N-glicanos (núcleo Man3 GICNAc2)	Hex2 HexNAc2 NeuAc1, Hex2 HexNAc2 NeuAc2, Hex2 HexNAc2 NeuAc2 Fuc1, Hex2 HexNAc2 NeuAc1 NeuGc1 Fuc1, Hex1 HexNAc2 NeuAc1 Fuc1, Hex2 HexNAc2 NeuAc1 Fuc1, Hex3 HexNAc3 NeuAc1 Fuc1, Hex2 HexNAc2 NeuGc1 Fuc1, Hex3 HexNAc3 NeuAc2Fuc1, Hex3 HexNAc3 NeuAc3Fuc1
	O-glicanos	Hex1 HexNAc1 NeuAc1, Hex1 HexNAc1 NeuAc1, Hex1 HexNAc1 NeuAc2

**Tabla 39.** Cadenas N- y O-glucídicas conjugadas a la IgG e IgA.  
Abreviaturas: Fuc, fucosa; GlcNAc, N-acetilglucosamina; Hex, hexosa; HexNAc, N-acetilhexosamina; Man, manosa; NeuAc, ácido neuramínico; NeuGc, ácido glicolilneuramínico.

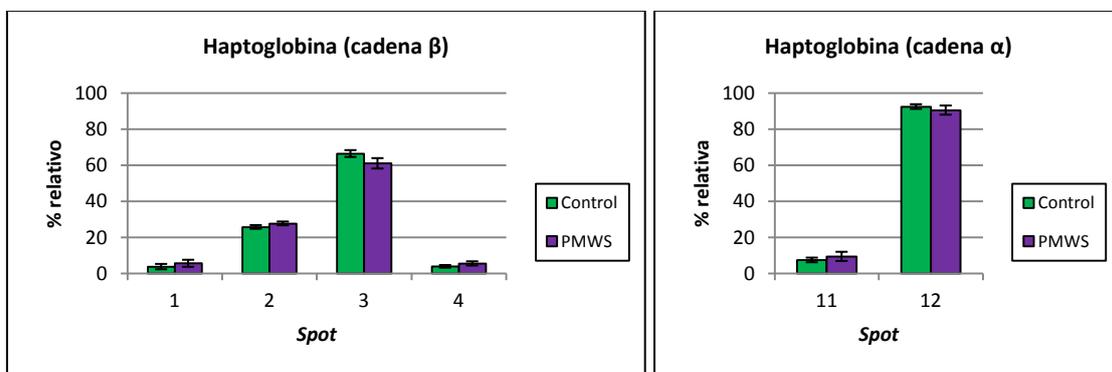
La cadena pesada de las IgG y las IgA presentó una gran diversidad de subpoblaciones glucídicas. Por una parte, la IgG solamente poseía cadenas N-glicosiladas, mientras que las IgA componentes glucosídicos de tipo N- y O-.

### 3. Efecto de la infección por PCV2 sobre el patrón de isoformas y las PTMs de varias proteínas

#### 3.1 Hp

Para estudiar el comportamiento de las isoformas proteicas de la Hp durante la infección por el virus PCV2 se separaron bidimensionalmente en geles *zoom* independientes todas las muestras de suero correspondientes al momento previo a la necropsia de los 11 animales del estudio (animales control, n=6; animales infectados, n=5). Los geles *zoom* fueron teñidos con azul brillante Coomassie G-250, se midió por densitometría la intensidad de todos los *spots* de interés y se calculó la frecuencia relativa de cada isoforma.

La densitometría de las cuatro isoformas de la cadena β proteicas y las dos de la cadena α de la Hp reveló que éstas se comportaron de manera similar en los animales enfermos y en los sanos, es decir la relación entre ellas fue la misma en ambas situaciones experimentales:

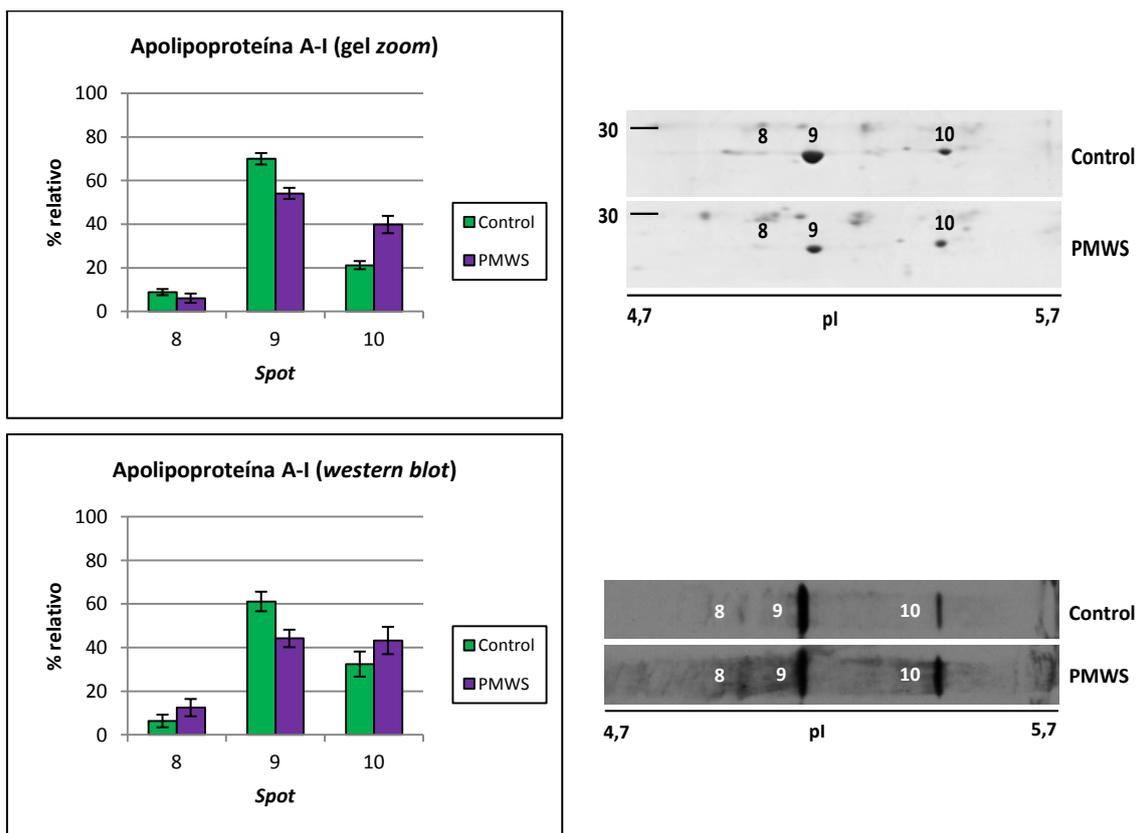


**Gráficos 25-26.** Expresión relativa de las isoformas de la cadena α y β de la Hp en los animales sanos (n=6) e infectados por el PCV2 (n=5).

Asimismo, se separaron las muestras pertenecientes a los animales enfermos del experimento (n=5) en un gel monodimensional y fueron transferidas a una membrana de PVDF. La membrana y las cadenas N-glucídicas escindidas fueron tratadas del mismo modo que se ha descrito durante la caracterización de los componentes glucídicos de tipo N- en los animales sanos. La caracterización de los glúcidos por MS en tándem evidenció que tampoco existieron cambios en el patrón de glicosilación de las isoformas de la cadena  $\beta$ .

### 3.2 Apo A-I

Para estudiar el comportamiento de las tres isoformas proteicas de la Apo A-I durante la infección por el virus PCV2 se utilizaron los geles *zoom* generados para la cuantificación de las isoformas de la Hp. se densitómetró la intensidad de los tres *spots* y se calculó su frecuencia relativa. Paralelamente las muestras de los 11 animales relativas al momento previo a la necropsia fueron separadas según su pI en tiras IPG *zoom* y transferidas directamente a una membrana de nitrocelulosa, sobre la cual se realizó la inmunodetección de las tres isoformas de la Apo A-I. Éstas fueron cuantificadas también por densitometría y se calculó la frecuencia relativa de cada isoforma:



**Gráficos 27-28** (izquierda) Expresión relativa de las isoformas de la Apo A-I en los animales sanos (control, n=6) e infectados (PMWS, n=5) por el virus PCV2 obtenida mediante dos técnicas diferentes, geles *zoom* bidimensionales (superior) y *western blot* (inferior) de proteínas separadas únicamente por pI.

**Figura 40** (derecha) Ejemplo de la expresión relativa de las isoformas de la Apo A-I en un animal sano (control) y un infectado (PMWS) mediante el uso de dos técnicas diferentes: geles *zoom* bidimensionales (superior) y *western blot* (inferior) de proteínas separadas únicamente por pI. Para el gel *zoom* se empleó el mismo volumen de muestra, mientras que para el *western blot* una cantidad similar de Apo A-I (la muestra del cerdo infectado contiene más volumen de suero y de proteína total, por eso el *background* es mayor).

La densitometría de los *spots*/bandas proteicas generados por ambas técnicas reveló que:

- *Geles zoom bidimensionales*: la frecuencia relativa de cada isoforma de la Apo A-I difirió entre las dos condiciones experimentales ( $P < 0,001$ , para todas las isoformas).
- *Inmunodetección de proteínas separadas por pI*: la isoforma más ácida (*spot* 8) varió de manera significativa en ambos grupos de animales ( $P = 0,023$ ) mientras que la variación de la isoforma más básica (*spot* 10) entre los dos grupos experimentales fue casi significativa ( $P = 0,064$ ).

Asimismo, ambas técnicas evidenciaron que la isoforma más básica, correspondiente a la forma inmadura de la proteína (Li et al., 1988), aumentó su frecuencia durante la infección por el virus, mientras que las otras dos isoformas disminuyeron..

### 3.3 Inmunoglobulinas

Para analizar los componentes glucídicos de la cadena pesada de las inmunoglobulinas en los animales enfermos se utilizó la misma membrana de PVDF empleada para el estudio de las PTMs de la cadena  $\beta$  de la Hp en los cerdos infectados (n=5). Se recortaron las bandas proteicas relativas a la cadena pesada de las inmunoglobulinas de todas las muestras y se trataron tal como se ha descrito previamente para la caracterización de los N- y O-glicanos. La identificación de los glúcidos concluyó que no existieron cambios en el patrón de glicosilación de estas proteínas durante la infección por PCV2.



## CAPÍTULO 4: CUANTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE FASE AGUDA MEDIANTE SRM

Los ELISAs son considerados el método de referencia de los ensayos clínicos debido a que permiten la cuantificación de una molécula candidata en un elevado número de muestras. Sin embargo, se trata de una técnica con ciertas limitaciones debido a que solamente permite el análisis de una proteína, se requiere un cierto tiempo para obtener los resultados y suele ser un método bastante caro (Simpson *et al.*, 2008). Además, los anticuerpos comerciales no están disponibles para la mayoría de las proteínas (Anderson *et al.*, 2009; Whiteaker *et al.*, 2011), especialmente en las especies distantes de los humanos y los roedores, y no siempre son efectivos ni selectivos, ni ofrecen resultados reproducibles (Bordeaux *et al.*, 2010).

En los últimos años han emergido las técnicas proteómicas dirigidas (*targeted*) como alternativa a los métodos clásicos de cuantificación de las proteínas. Estos métodos, como la monitorización por reacción múltiple (MRM) o la monitorización por reacción selectiva (SRM), son capaces de cuantificar cualquier tipo de proteína, independientemente de su abundancia en la muestra (Lange *et al.*, 2008). Para ello, es necesario seleccionar buenos péptidos proteotípicos, es decir, péptidos digeridos con tripsina (trípticos) exclusivos de cada proteína.

Se han desarrollado repositorios de datos como Pride, PeptideAtlas o NCBI-peptidome que contienen información acerca de todos los péptidos que se han identificado por MS de cada proteína (Bendixen *et al.*, 2011), los cuales facilitan la selección de buenos péptidos proteotípicos de las proteínas diana y, por lo tanto, agilizan la puesta a punto de los métodos de cuantificación basados en MRM o SRM. No obstante, estos repositorios poseen pocos datos sobre los péptidos de animales modelo no clásicos (Bislev *et al.*, 2012).

### Diseño experimental

El análisis bioquímico que se realizó en el segundo capítulo reveló que las cerdas poseían niveles elevados de APPs, por lo que se consideraron muestras adecuadas para la puesta a punto y optimización de un método basado en MS para la cuantificación de algunas APPs porcinas, mediante SRM.

Este proyecto forma parte de una colaboración que ha establecido recientemente nuestro grupo con la Dra. E. Bendixen y el Dr. J. Enghild del departamento de Biología Molecular de la Universidad de Aarhus (Dinamarca), en el marco de una *Short Term Scientific Mission* otorgada por la COST Action Farm Animal Proteomics.

#### 1. Puesta a punto y optimización del método de SRM

Se seleccionaron seis APPs porcinas de acuerdo con su importancia en esta especie y la disponibilidad de reactivos comerciales para su determinación. Las proteínas escogidas originalmente fueron la Hp, la Pig-MAP, la Apo A-I, la CRP, el amiloide sérico A (SAA) y la AHSG.

Inicialmente, se digirió con tripsina una muestra de suero que poseía elevados niveles de APPs y un extracto hepático, cuyos péptidos fueron caracterizados posteriormente por MS. El motor de búsqueda Mascot generó un listado de los péptidos identificados, que se denominó biblioteca.

Paralelamente, se obtuvieron las secuencias proteicas de las seis APPs en la base de datos UniProt. Todas las proteínas, excepto el SAA, estaban revisadas y por lo tanto estaban incluidas en la base de datos Swiss-Prot. UniProt presentó tres entradas no revisadas para el SAA4, la única isoforma que no está implicada en la respuesta de fase aguda en el cerdo (Soler *et al.*, 2011), pero ninguna entrada para las isoformas SAA1, SAA2 y SAA3. Por lo tanto, el SAA fue excluido del experimento.

Las secuencias proteicas fueron añadidas en el *software* Skyline en formato .fasta. Se fijaron ciertos filtros, tal como se detalla en el apartado Material y Métodos, con el fin de obtener la lista de péptidos proteotípicos de cada proteína. El número de péptidos proteotípicos sugeridos por el *software* dependió del tamaño de la proteína:

Proteína	Nº aminoácidos	Nº péptidos proteotípicos
Hp	347	11
Pig-MAP	921	33
Apo A-I	265	13
CRP	222	5*
AHSG	362	7*

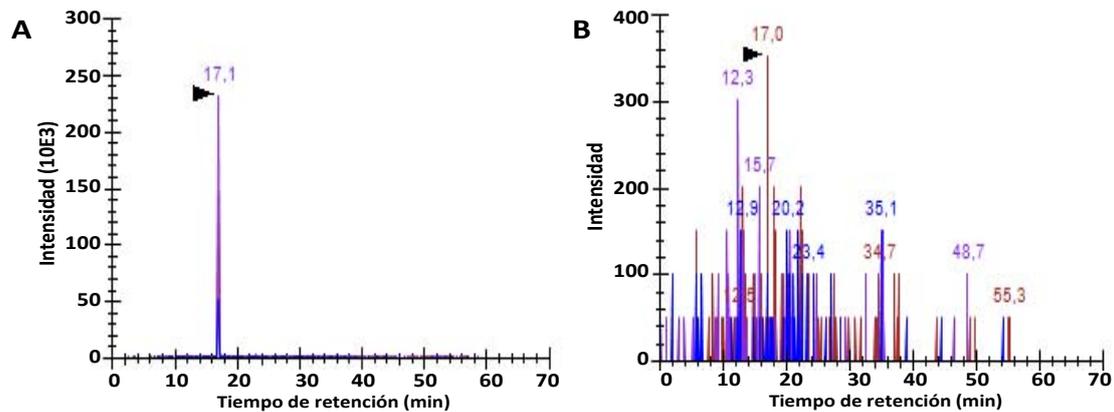
**Tabla 40.** Número de péptidos proteotípicos obtenidos para cada proteína. \*En el caso de la CRP y la AHSG, las restricciones aminoacídicas durante la evaluación de todos los péptidos proteotípicos fueron menos severas y se permitió la presencia de cisteínas en su secuencia.

La Pig-MAP, la proteína más grande de todas, poseía el mayor número de péptidos proteotípicos.

Se seleccionaron seis péptidos proteotípicos de cada proteína, entre los que se incluyeron tanto péptidos incluidos en la biblioteca como péptidos predichos *in silico*. Se priorizaron las secuencias de longitud media, de 10 a 16 aminoácidos. Asimismo, se escogieron cuatro de los iones resultantes de la fragmentación de los péptidos proteotípicos (transiciones) para su cuantificación por MS.

Las proteínas de las muestras con una mayor concentración de APPs fueron digeridas con tripsina y los péptidos resultantes fueron separados mediante una cromatografía líquida (LC), que constó de dos etapas, e inyectados en el espectrómetro de masas. Los datos obtenidos de la trampa iónica fueron importados y visualizados en el *software* Skyline. El *software* agrupó los cromatogramas de las cuatro transiciones de cada péptido, procedentes de la LC, para facilitar su evaluación. Se descartaron aquellas transiciones y/o péptidos cuyos picos cromatográficos presentaron una altura inferior a las mil unidades de absorbancia (UA). Posteriormente, se escogieron nuevos péptidos proteotípicos de cada proteína y se repitió el proceso hasta que se obtuvieron cuatro péptidos para cada proteína, cuyas transiciones presentaron picos cromatográficos muy intensos, superiores a las veinte mil UA.

Se descartaron todos los péptidos de la CRP debido a que sus transiciones presentaron intensidades muy débiles, similares al nivel del ruido de la técnica. En el caso de la AHSg, solamente se seleccionó un péptido. En cambio, no existieron problemas para encontrar péptidos intensos con las transiciones adecuadas para las proteínas Hp, Pig-MAP y Apo A-I. La figura X refleja la puesta a punto del método, mientras que la tabla X cita los péptidos y las transiciones escogidos. En el apartado Anexos del manuscrito se detalla la posición de los péptidos seleccionados dentro de la secuencia proteica.



**Figura 41.** Cromatograma representativo de la puesta a punto del método de SRM para la cuantificación de las APPs porcinas. El pico cromatográfico representa el péptido proteotípico de interés. A) Péptido proteotípico seleccionado, cuyas transiciones presentaron una elevada intensidad; B) Péptido proteotípico descartado, cuyas transiciones presentaron una intensidad similar al nivel del ruido.

	Hp	Pig-MAP	Apo A-I	AHSg
Pépt. 1	<b>TAGDGVYTLDSNK</b>	<b>ILGDLGSR</b>	<b>VQPYLDDFQNK</b>	<b>CNLLVEK</b>
	Transición y11: <sup>+</sup> GDGVYTLDSNK	Transición y7: <sup>+</sup> LGDLSGR	Transición y9: <sup>+</sup> PYLDDFQNK	Transición y6: <sup>+</sup> NLLVEK
	Transición y7: <sup>+</sup> YTLDSNK	Transición y6: <sup>+</sup> GDLGSR	Transición y8: <sup>+</sup> LDDFQNK	Transición y5: <sup>+</sup> LLVEK
	Transición y6: <sup>+</sup> TLDSNK	Transición y4: <sup>+</sup> LGSR	Transición y7: <sup>+</sup> DDFQNK	Transición y4: <sup>+</sup> LVEK
Pépt. 2	<b>GSPWQAK</b>	<b>GSELVVAGK</b>	<b>LSPLAEELR</b>	-
	Transición y6: <sup>+</sup> FPWQAK	Transición y6: <sup>+</sup> LVVAGK	Transición y7: <sup>+</sup> PLAEELR	
	Transición y5: <sup>+</sup> PWQAK	Transición y5: <sup>+</sup> VVAGL	Transición y6: <sup>+</sup> LAEELR	
	Transición y4: <sup>+</sup> WQAK	Transición y4: <sup>+</sup> VAGL	Transición y5: <sup>+</sup> AELR	
Pépt. 3	<b>DIAPTLR</b>	<b>DQSPDVLSAK</b>	<b>QGLLPVLENLK</b>	-
	Transición y5: <sup>+</sup> APTLR	Transición y8: <sup>+</sup> SPDVLSAK	Transición y7: <sup>+</sup> PVLENLK	
	Transición y4: <sup>+</sup> PTLR	Transición y7: <sup>+</sup> PDVLSAK	Transición y6: <sup>+</sup> VLENLK	
	Transición y3: <sup>+</sup> TLR	Transición y4: <sup>+</sup> LSAK	Transición y5: <sup>+</sup> LENLK	
Pépt. 4	<b>TAEYGVYVR</b>	<b>VAEQEAEFLSPK</b>	<b>VSILAAIDEASK</b>	-
	Transición y7: <sup>+</sup> EYGVYVR	Transición y9: <sup>+</sup> QAEFLSPK	Transición y8: <sup>+</sup> AAIDEASK	
	Transición y6: <sup>+</sup> YGVYVR	Transición y8: <sup>+</sup> EAEFLSPK	Transición y7: <sup>+</sup> AIDEASK	
	Transición y5: <sup>+</sup> GVYVR	Transición y7: <sup>+</sup> AEFLSPK	Transición y6: <sup>+</sup> IDEASK	

**Tabla 41.** Péptidos proteotípicos y transiciones seleccionadas tras la puesta a punto de un método basado en SRM para la cuantificación de varias APPs.

Por último, se optimizó el tiempo de análisis de cada muestra en el espectrómetro de masas, reduciéndolo de 60 a 23 minutos, y la energía de colisión para la óptima fragmentación de los péptidos.

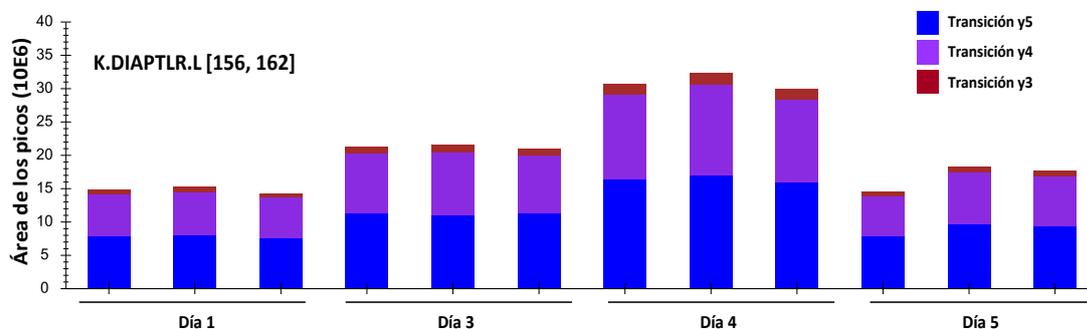
## 2. Cuantificación de las APPs porcinas

Para comprobar la idoneidad de los péptidos proteotípicos escogidos durante la puesta a punto, se consideraron ideales las muestras de suero de las 13 cerdas del grupo estudio del segundo capítulo ya que poseían diferentes concentraciones de APPs. Para ello, se digirieron con tripsina las muestras relativas a los cuatro días experimentales. Los péptidos resultantes fueron separados por LC y analizados por MS. Los datos obtenidos de la trampa iónica fueron importados al *software* Skyline, que integró los cromatogramas de cada transición. El área de cada transición, proporcional a la concentración de la proteína en la muestra, fue exportada en hojas de cálculo de formato Excel.

Se calculó el área para cada péptido, la concentración de la proteína en UA y la ratio de variación de los niveles cada proteína respecto a la situación basal (día 1) ya que al tratarse del primer experimento que se realizaba con estos péptidos no se dispuso de péptidos AQUA ni QconCAT para cuantificar de manera absoluta las proteínas.

### 2.1 Hp

La determinación de los niveles de la Hp por SRM reveló que esta proteína aumentó paulatinamente tras el cambio de alojamiento y disminuyó posteriormente, alcanzando niveles similares a los iniciales. A continuación se muestra un ejemplo de la cuantificación de uno de los péptidos proteotípicos seleccionados para la Hp:



**Figura 42.** Ejemplo de la cuantificación relativa de un péptido proteotípico de la Hp por SRM. Se midieron los niveles de este péptido de cada día y de cada animal por triplicado. Cada color representa el área de cada una de las transiciones, la suma de las cuales es un reflejo de la concentración de la proteína (UA).

Se correlacionaron los valores obtenidos por los cuatro péptidos proteotípicos seleccionados para el análisis cuantitativo de la Hp:

	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3	Péptido 4
Péptido 1	-	<b>0,568</b>	<b>0,436</b>	-0,117
Péptido 2	-	-	<b>0,553</b>	0,236
Péptido 3	-	-	-	<b>0,636</b>
Péptido 4	-	-	-	-

**Tabla 42.** Correlación de los resultados obtenidos por los cuatro péptidos proteotípicos de la Hp. En negrita se señalan aquellas correlaciones cuya *P* fue inferior a 0,05.

Los péptidos 1, 2 y 3 presentaron una moderada correlación, mientras que el cuarto péptido solamente correlacionó con el tercero.

Por otra parte, también se calcularon los ratios de los valores obtenidos mediante el ensayo colorimétrico de cada día y de cada animal respecto a la situación basal y se compararon con los ratios relativos al SRM:

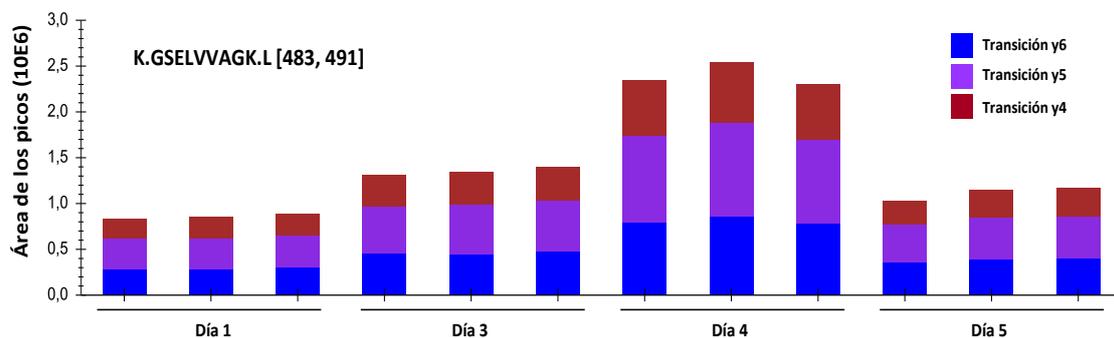
Comparación	R
Ensayo colorimétrico - Péptido 1	<b>0,441</b>
Ensayo colorimétrico - Péptido 2	0,137
Ensayo colorimétrico - Péptido 3	0,184
Ensayo colorimétrico - Péptido 4	0,096
Ensayo colorimétrico - Todos los péptidos	<b>0,397</b>

**Tabla 43.** Comparación de los ratios respecto a la situación basal de la Hp obtenidas a partir de un ensayo colorimétrico y por SRM. En negrita se señalan aquellas correlaciones cuya *P* fue inferior a 0,05.

La comparación de los ratios de ambas técnicas de análisis presentó una baja correlación de los resultados: correlacionaron solamente y de manera moderada los ratios obtenidos por uno de los cuatro péptidos proteotípicos con los del ensayo colorimétrico. Asimismo, el uso de los cuatro péptidos de manera conjunta durante la cuantificación de la proteína también evidenció una moderada correlación con los ratios relativos al kit comercial.

## 2.2 Pig-MAP

La cuantificación de los cuatro péptidos proteotípicos por SRM mostró que la Pig-MAP presentó un comportamiento similar al de la Hp, es decir, que sus niveles se incrementaron progresivamente tras el cambio de alojamiento y posteriormente decrecieron. En la siguiente figura se muestra un ejemplo de los resultados obtenidos después de la integración de los picos cromatográficos de las tres transiciones de uno de los péptidos examinados.



**Figura 43.** Ejemplo de la cuantificación relativa de un péptido proteotípico de la Pig-MAP por SRM. Se midieron los niveles de este péptido de cada día y de cada animal por triplicado. Cada color representa el área de cada una de las transiciones, la suma de las cuales es un reflejo de la concentración de la proteína (UA).

Se compararon también los valores obtenidos por los cuatro péptidos proteotípicos durante la cuantificación de los niveles de la Pig-MAP:

	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3	Péptido 4
Péptido 1	-	<b>0,913</b>	<b>0,849</b>	<b>0,869</b>
Péptido 2	-	-	<b>0,703</b>	<b>0,725</b>
Péptido 3	-	-	-	<b>0,904</b>
Péptido 4	-	-	-	-

**Tabla 44.** Correlación de los resultados obtenidos por los cuatro péptidos proteotípicos de la Pig-MAP. En negrita se señalan aquellas correlaciones cuya *P* fue inferior a 0,05.

Los resultados cuantitativos obtenidos con los cuatro péptidos proteotípicos presentaron una elevada correlación entre ellos, en todo momento superior a 0,700.

Por otra parte, también se calcularon las ratios de los valores obtenidos por ELISA de cada día y de cada animal respecto a la situación basal y se compararon con las ratios relativas al SRM:

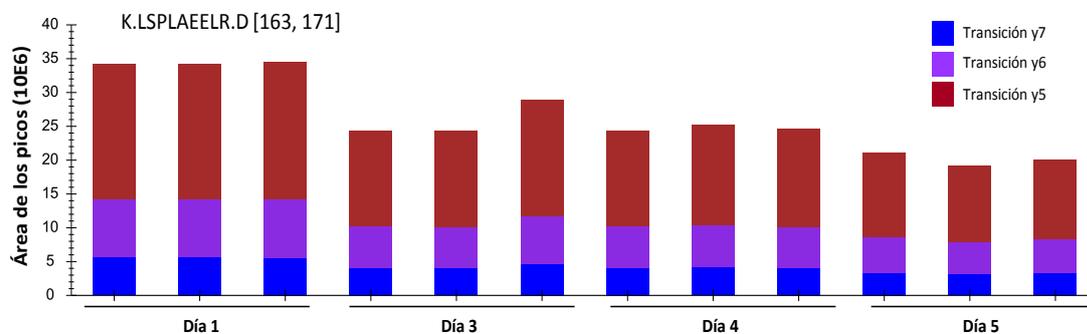
Comparación	R
ELISA - Péptido 1	<b>0,836</b>
ELISA - Péptido 2	<b>0,729</b>
ELISA - Péptido 3	<b>0,700</b>
ELISA - Péptido 4	<b>0,856</b>
ELISA - Todos los péptidos	<b>0,847</b>

**Tabla 45.** Comparación de las ratios respecto a la situación basal de la Pig-MAP obtenidas mediante un ELISA y por SRM. En negrita se señalan aquellas correlaciones cuya *P* fue inferior a 0,05.

La comparación de las ratios de la Pig-MAP obtenidas por dos técnicas diferentes evidenció una elevada correlación entre ambas, tanto al emplear los cuatro péptidos de manera conjunta como individualmente.

### 2.3 Apo A-I

El análisis cuantitativo de los cuatro péptidos proteotípicos por SRM reflejó que la Apo A-I se mantuvo disminuida todos los días después del cambio de alojamiento respecto a la situación inicial. A continuación se muestra un ejemplo de la cuantificación de uno de los péptidos proteotípicos seleccionados de la Apo A-I:



**Figura 44.** Ejemplo de la cuantificación relativa de un péptido proteotípico de la Apo A-I por SRM. Se midieron los niveles de este péptido de cada día y de cada animal por triplicado. Cada color representa el área de cada una de las transiciones, la suma de las cuales es un reflejo de la concentración de la proteína (UA).

En el caso de la Apo A-I también compararon los valores obtenidos por los cuatro péptidos proteotípicos durante su cuantificación por SRM:

	<i>Péptido 1</i>	<i>Péptido 2</i>	<i>Péptido 3</i>	<i>Péptido 4</i>
<i>Péptido 1</i>	-	<b>0,794</b>	<b>0,786</b>	<b>0,818</b>
<i>Péptido 2</i>	-	-	<b>0,939</b>	<b>0,798</b>
<i>Péptido 3</i>	-	-	-	<b>0,821</b>
<i>Péptido 4</i>	-	-	-	-

**Tabla 46.** Correlación de los resultados obtenidos por los cuatro péptidos proteotípicos de la Apo A-I. En negrita se señalan aquellas correlaciones cuya *P* fue inferior a 0,05.

De manera similar a los resultados obtenidos para la Pig-MAP, los valores resultantes de la cuantificación de los cuatro péptidos proteotípicos de la Apo A-I presentaron una elevada correlación entre ellos, en todo momento superior a 0,785.

Por último, se compararon las ratios de los datos generados a partir de la densitometría de las bandas proteicas de la Apo A-I (*western blot*) de cada día y de cada animal respecto a la situación basal con las ratios relativas al SRM. Además, también se confrontaron los datos referentes a la variación de las HDLs, determinadas en el analizador automático Olympus AU400, y a la cuantificación de la Apo A-I mediante dos ELISAs de casas comerciales diferentes, de USCN y Cusabio.

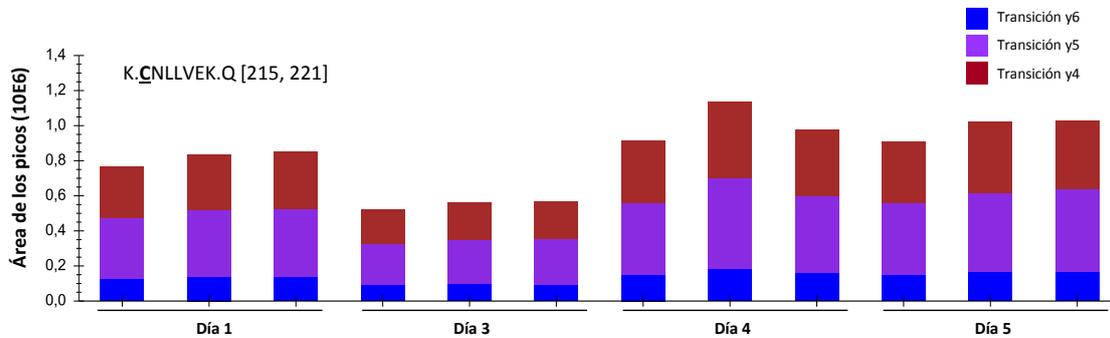
<b>Comparación</b>	<b>R</b>
<i>Western blot</i> - Péptido 1	<b>0,433</b>
<i>Western blot</i> - Péptido 2	<b>0,488</b>
<i>Western blot</i> - Péptido 3	<b>0,454</b>
<i>Western blot</i> - Péptido 4	0,221
<i>Western blot</i> - Todos los péptidos	<b>0,461</b>
HDL - Péptido 1	0,380
HDL - Péptido 2	<b>0,450</b>
HDL - Péptido 3	<b>0,497</b>
HDL - Péptido 4	0,256
HDL - Todos los péptidos	<b>0,448</b>
ELISA USCN - Todos los péptidos	0,090
ELISA Cusabio - Todos los péptidos	- 0,116

**Tabla 47.** Comparación de las ratios de la Apo A-I obtenidas mediante varias técnicas y por SRM. En negrita se señalan aquellas correlaciones cuya *P* fue inferior a 0,05.

La moderada correlación de los valores obtenidos por *western blot* y SRM fue muy similar a la calculada para las HDLs. Por su parte, los ratios relativas a los dos ELISAs comerciales evidenciaron una mala correlación con las ratios referentes a la cuantificación de los cuatro péptidos proteotípicos. Asimismo, las ratios referentes a los dos ELISAs comerciales presentaron un comportamiento distinto frente a los niveles obtenidos por SRM.

## 2.4 AHSG

La determinación del único péptido proteotípico seleccionado para la cuantificación de la AHSG por SRM evidenció un descenso de sus niveles tras el cambio de alojamiento, que aumentaron rápidamente y alcanzaron valores superiores a la situación basal. A continuación se muestra un ejemplo del comportamiento de este único péptido a lo largo del experimento:



**Figura 45.** Ejemplo de la cuantificación relativa del único péptido proteotípico de la AHSG por SRM. Se midieron los niveles de este péptido de cada día y de cada animal por triplicado. Cada color representa el área de cada una de las transiciones, la suma de las cuales es un reflejo de la concentración de la proteína (UA).

Se calcularon los ratios de los valores obtenidos mediante dos ELISAs de casas comerciales diferentes, de USCN y SunRed Bio, de cada día y de cada animal respecto a la situación basal y se compararon con los ratios relativos al SRM:

Comparación	R
ELISA USCN - Péptido 1	0,040
ELISA SunRed Bio - Péptido 1	- 0,269

**Tabla 48.** Comparación de los ratios de la AHSG obtenidos mediante dos ELISAs comerciales y por SRM.

Los ratios de la AHSG relativos a la cuantificación del único péptido proteotípico por SRM no presentaron una buena correlación con los ratios de los dos ELISAs que se emplearon, tal como ocurrió durante la determinación de la Apo A-I. Asimismo, los ratios referentes a los dos ELISAs exhibieron un comportamiento distinto frente a los del SRM.

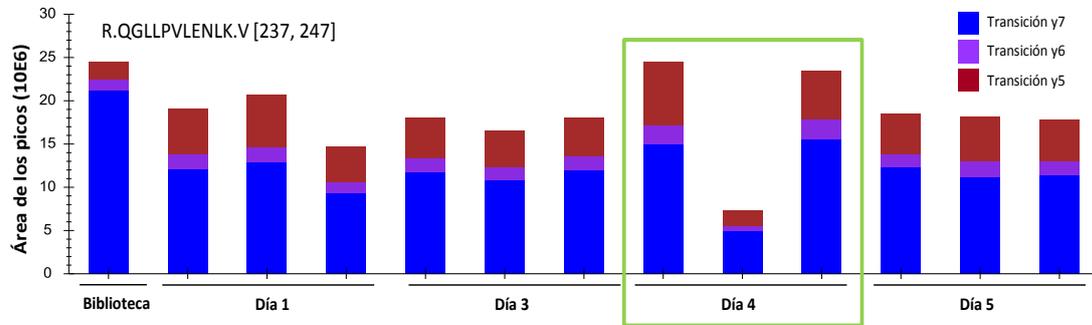
## 3. Reproducibilidad de la técnica

Por último, se calculó la desviación estándar (SD) de los triplicados técnicos de los cuatro péptidos proteotípicos de cada proteína para cada día, que fueron cuantificados de manera consecutiva en la trampa iónica. En la siguiente tabla se muestran las medianas de la SD (%) de cada péptido:

	Péptido 1	Péptido 2	Péptido 3	Péptido 4
<b>Hp</b>	9,62	10,62	8,93	10,21
<b>Pig-MAP</b>	9,70	9,74	7,99	10,01
<b>Apo A-I</b>	10,76	9,75	19,27	22,05
<b>AHSG</b>	9,45	-	-	-

**Tabla 49.** Mediana de la SD (%) obtenida durante la cuantificación de las réplicas técnicas.

Todos los péptidos presentaron una SD inferior al 11% excepto el péptido 3 y 4 de la Apo A-I. Según nuestro criterio, las SD alrededor del 10% pueden considerarse adecuadas. En el caso de la Apo A-I, se observó que la SD de estos dos péptidos se duplicó. No obstante, al revisar los resultados cuantitativos en el *software* Skyline se evidenció que la elevada SD correspondió solamente a una de las réplicas técnicas, tal como se muestra en la siguiente figura:



**Figura 46.** Representación de la cuantificación del tercer péptido proteotípico de la Apo A-I. Enmarcado en verde se muestra un ejemplo de las réplicas que aportaron una elevada desviación estándar.

Este valor cuantitativo erróneo podría corregirse con la revisión manual de los resultados.



## DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

En las últimas décadas, el consumo de carne de cerdo ha aumentado considerablemente en Europa, Norteamérica y China. En la actualidad, se producen alrededor de mil millones de cerdos al año en el mundo (Den Hartog, 2004). La industria porcina tiende hacia la reducción de costes y simplificación de los aspectos de manejo con el objetivo de aumentar la productividad por área (Gonyou and Stricklin, 1998). Este enfoque comercial conlleva un pobre bienestar debido a que el espacio destinado para cada cerdo puede ser insuficiente a medida que éste crece y sus necesidades cambian (Scientific Veterinary Committee, 1997). Asimismo, la masificación de animales en las granjas ha provocado que nuevas enfermedades infecciosas porcinas se hayan vuelto endémicas (Jensen et al., 2012).

Se ha trabajado con muestras de suero de animales sometidos a tres situaciones habituales en la industria porcina que modifican negativamente el bienestar de los animales: la elevada densidad de estabulación, el alojamiento en jaulas individuales de gestación y la infección por el circovirus porcino 2 (PCV2), causante del síndrome del desmedro multisistémico después del destete (PMWS). La búsqueda de nuevos marcadores de bienestar se ha realizado mediante diferentes aproximaciones proteómicas. Asimismo, se han confirmado algunos de los marcadores descritos en la bibliografía y los obtenidos previamente por nuestro grupo.

### 1. Perfil de laboratorio para la evaluación del bienestar animal

Los criterios actuales para evaluar el grado de bienestar de un animal no son lo suficientemente objetivos ni específicos. En la actualidad, se dispone de una batería de marcadores que aportan información directa e indirecta acerca del estado de salud del animal, así como sobre la posibilidad del inicio de una respuesta fisiológica y/o conductual en respuesta a un estresor. La sangre es el fluido más representativo del estado fisiopatológico de un animal (Miller et al., 2009) por lo que el primer objetivo de la tesis ha sido el establecimiento de un perfil bioquímico plasmático para la evaluación del bienestar porcino.

#### 1.1 Hormonas de estrés

El cortisol plasmático es actualmente el parámetro más utilizado para valorar la magnitud de la respuesta fisiológica de estrés debido a que éste es la molécula central en la respuesta fisiológica de estrés en el cerdo (Moberg, 2000). No obstante, sus niveles no variaron significativamente en ninguno de los dos primeros capítulos, si bien se obtuvo una enorme variabilidad entre individuos. La extracción de la sangre se realizó cada día a la misma hora con el objetivo de minimizar las variaciones que presenta este parámetro ya que su secreción depende del ritmo circadiano (Mormède et al., 2007). Vale la pena remarcar que en el primer día del segundo experimento se obtuvieron valores de cortisol plasmático más elevados que en las siguientes extracciones. Este aumento pudo ser causado por las características del lugar en el que realizó la primera obtención de sangre. Se trataba del interior de la

celda de cuarentena, donde todas las cerdas tenían acceso visual a lo que sucedía y estaban en contacto físico con el animal inmovilizado (fotografía X), y como consecuencia podría haberse desencadenado una respuesta de estrés aguda. En cambio, en el resto de los días la extracción de las muestras se materializó en el pasillo que separaba las jaulas individuales, situado detrás de los animales, por lo que éstos no podían ver la manipulación que sufrían sus compañeras por parte del veterinario (fotografía X).

En el segundo capítulo también se determinó el cortisol en la saliva. Éste aumentó los días posteriores al cambio de alojamiento en ambos grupos de animales, de manera más pronunciada en el grupo estudio, el cual había sido manipulado previamente. La suma de estresores como el cambio de condiciones de estabulación, la extracción continua de las muestras, el poco espacio disponible para cubrir las necesidades básicas o el aislamiento social habría intensificado la respuesta de estrés.

Estos resultados sugerirían que el cortisol plasmático sería un reflejo del estrés puntual asociado a la extracción de las muestras de sangre mientras que el cortisol salival señalaría un estrés más duradero, es decir, indicaría la hiperactivación del eje HPA a causa del cambio de alojamiento.

El cortisol presente en la saliva no está unido a su proteína transportadora, la globulina de unión a corticosteroides (CBG), mientras que en el suero se encuentra tanto libre como unido a proteína (Umeda et al., 1981). Se considera que la cuantificación de los niveles del cortisol libre sería suficiente para reflejar la hiperactivación del eje HPA debido a que durante una respuesta de estrés éste saturaría rápidamente la proteína CBG y, como consecuencia aumentaría drásticamente la concentración de cortisol no unido. El cortisol libre representaría el que es biológicamente activo (Cook et al., 1996), que accedería a la saliva por difusión pasiva, independientemente del flujo secretado por las glándulas salivales (Riad-Fahmy et al., 1982). Este hecho, así como la fácil obtención del fluido (Lamy and Mau, 2012), hacen del cortisol salival un parámetro aconsejable para determinar la actividad del eje HPA.

En dos estudios realizados por nuestro grupo con anterioridad la cuantificación de la corticosterona en las heces mostró ser un buen marcador de estrés crónico en la especie bovina (Marco-Ramell et al., 2012; Saco et al., 2008). Sin embargo, es poco habitual medirla en la especie porcina debido a la lenta y mínima excreción de los glucocorticoides (GC) en las heces del cerdo (Möstl and Palme, 2002). Éstos son excretados mayoritariamente a través de la orina (Palme et al., 1996).

Debido a la dificultad para medir los niveles plasmáticos de las catecolaminas, moléculas centrales en la respuesta mediada por el eje simpático-adrenomedular (SAM), en los estudios de campo (Broom, 2006) se suelen utilizar marcadores indirectos de la actividad de este eje, como la actividad de la enzima  $\alpha$ -amilasa en saliva (sAA). Se ha descrito que las catecolaminas estimularían su producción y secreción debido a que la glándula salival contiene  $\beta$ -adrenoreceptores (Van Stegeren et al., 2006).

Se midieron los niveles de la sAA en el segundo capítulo. La sAA aumentó tras el cambio de alojamiento en ambos grupos; no obstante este incremento no fue significativo debido a la elevada variabilidad existente entre individuos, que fue mayor a la obtenida con el cortisol. Este resultado sugeriría que las

cerdas habrían respondido fisiológicamente al estresor mediante la hiperactivación del eje neuroendocrino SAM en diferente grado de magnitud.

## 1.2 Marcadores de metabolismo lipídico

Durante la respuesta de estrés, el metabolismo de los lípidos resulta alterado y como consecuencia de ello el perfil lipídico obtenido es similar al aterogénico debido a la elevada movilización de éstos. Los GC sensibilizan el tejido adiposo al efecto de las catecolaminas, las cuales promueven la liberación de ácidos grasos y colesterol del tejido adiposo, la síntesis de los triglicéridos (TGs) y del colesterol en el hígado y su secreción al torrente sanguíneo (Black, 2002). Además, el metabolismo lipídico puede ser modificado por la acción de las citoquinas proinflamatorias (Hardardóttir et al., 1994).

En los dos primeros capítulos, se observó que el metabolismo del colesterol resultó modificado tras la percepción del estresor. En el primer estudio, los niveles del colesterol total y de su partícula transportadora LDL incrementaron cuando los animales fueron sometidos a condiciones de elevada densidad (HD) de estabulación, pero se normalizaron rápidamente. En cambio, en el segundo capítulo, el colesterol total aumentó tras el cambio de alojamiento en el grupo estudio, mientras que las LDLs no variaron significativamente. No obstante, sus niveles tendieron a comportarse de manera similar a los del colesterol total. Por su parte, los niveles de la partícula transportadora HDL disminuyeron a lo largo del experimento realizado con las cerdas primerizas, mientras que éstas no variaron en el estudio de los cerdos jóvenes estabulados en condiciones de HD.

Las situaciones de estrés a las que fueron sometidos los cerdos provocarían un incremento de la síntesis y la secreción de las hormonas de estrés, tal como se ha discutido previamente, las cuales promoverían la liberación del colesterol al torrente sanguíneo. La concentración de colesterol total fue superior en el segundo experimento que en el primero; sin embargo, éste solamente incrementó en los animales que habían sido manipulados previamente durante la extracción de las muestras, por lo que se deduciría que la suma de los estresores habría intensificado la liberación del colesterol. Asimismo, las hormonas de estrés también participarían en la disminución de los receptores de las LDLs de la superficie celular de los hepatocitos, por lo que estas partículas no podrían ser captadas por el hígado y su concentración plasmática incrementaría (Black, 2002). Paralelamente, estas hormonas también inhibirían la actividad de la enzima lipasa hepática y, consecuentemente, disminuiría la formación de las HDL (Day et al., 1982).

Por último, vale la pena remarcar que las muestras de suero que presentaron un mayor grado de hemólisis fueron aquellas que poseían una concentración de colesterol total más elevada. Este fenómeno apoyaría la hipótesis anterior que relacionaba los niveles de colesterol con el estrés asociado a la extracción de sangre, que fue mayor al esperado. La obtención de muestras sanguíneas suele ser un procedimiento estresante para el cerdo, especialmente cuando se realiza de manera continua, y puede modificar los resultados experimentales (Kaiser et al., 2006). Ésta suele estar asociada a la inmovilización

y/o el aislamiento del animal, los cuales generan por si mismos una respuesta de estrés (Rozen et al., 1995).

En humanos también se ha evidenciado el aumento de los niveles del colesterol total en situaciones de estrés agudo (Day et al., 1982; Steptoe and Brydon, 2005).

Durante la respuesta de estrés el comportamiento alimentario puede verse modificado (Iio et al., 2012). Sin embargo, en el primer experimento, no se detectaron variaciones en la concentración de los TGs ni de sus productos originados por su lipólisis, los ácidos grasos no esterificados (NEFAs), por lo que se deduciría que el patrón alimentario de los animales no resultó modificado a causa del alojamiento en condiciones de HD.

En el segundo capítulo, en cambio, se observó un aumento progresivo de los niveles de los TGs a lo largo del experimento en ambos grupos, mientras que los NEFAs incrementaron tras el cambio de alojamiento en los dos grupos de animales y poco después disminuyeron. El aumento progresivo de los TGs reflejaría la ingesta paulatina del nuevo pienso, rico en grasas. Por su parte, el incremento de los NEFAs se debería a su liberación del tejido adiposo por parte de las hormonas de estrés para compensar la menor ingesta de fuentes de energía a través de la dieta. Los resultados aportados por estos dos marcadores indicarían que los animales alojados en jaulas individuales habrían reducido la ingesta de alimento tras la percepción del estresor.

### 1.3 Marcadores relacionados con el estado de salud

El estado de salud del animal es un factor determinante para el tipo de respuesta de estrés que se llevará a cabo y las consecuencias que el estresor provocará sobre el individuo (Manteca, 2009). Por ello, se analizaron también varios indicadores relacionados con el estado físico de los animales.

La actividad de la creatina quinasa (CK), un marcador de daño muscular, no varió a causa de los cambios de densidad de la celda, a pesar de que se detectó una elevada variación interindividual en los periodos de HD y en el día 26, momento en que los animales eran más grandes. La actividad de las enzimas CK y alanina aminotransferasa (ALT) aumentó solamente en las cerdas del grupo estudio, pertenecientes al segundo experimento, los días en que la obtención de la muestra fue más complicada. La ALT, utilizada habitualmente como marcador de daño hepático, es una enzima ubicua cuyos niveles correlacionaron con los de la CK ( $r = 0,704$ ), pero no con los de la fosfatasa alcalina (ALP), otro marcador de daño hepático, por lo que se deduciría que las variaciones de su actividad serían debidas a su isoforma muscular. Asimismo, las muestras de suero que poseían un mayor grado de hemólisis presentaron una mayor actividad de estas dos enzimas. Este resultado sugeriría que la CK y la ALT serían buenos indicadores de las dificultades encontradas durante la extracción de la muestra, en la que se habría producido algún tipo de daño muscular.

Los niveles de la urea plasmática aumentaron en los dos grupos de animales tras el cambio de alojamiento y se normalizaron rápidamente, incluso por debajo de los valores iniciales. La urea se suele emplear como un indicador de daño renal; no obstante, ésta presentó un comportamiento similar al de los NEFAs pero diferente al de la creatinina, otro marcador habitual de daño renal. Este resultado sugeriría que los animales no padecieron ninguna alteración renal. Asimismo, estos dos parámetros se mantuvieron durante todo el experimento dentro del rango de referencia establecido en el trabajo de Friendship et al. (1984) para las cerdas jóvenes. El incremento de la urea, producto de degradación de las proteínas, y los NEFAs, procedentes del tejido adiposo, los cuales pueden funcionar como fuentes de energía alternativas a la glucosa, compensaría la baja incorporación de ésta a través de la dieta en los días posteriores al cambio de alojamiento (Sticker et al., 1995). El descenso de la urea y los NEFAs coincidió con el incremento de los TGs plasmáticos, los cuales serían una fuente energética preferente para el organismo. La urea fue en todo momento más elevada en el grupo control, que presentó niveles inferiores de TGs a lo largo del experimento.

La creatinina aumentó en ambos grupos de animales tras el cambio de alojamiento. En el grupo estudio solamente incrementó el día posterior a la percepción del estresor, mientras que en el grupo control se mantuvo elevada durante varios días. Además de ser un marcador de daño renal, la creatinina plasmática podría ser un reflejo del catabolismo proteico en el músculo (Hart et al., 2000). La proteólisis de la creatina, el precursor de la creatinina, es una reacción catabólica habitual en el músculo con el fin de obtener rápidamente energía, en forma de ATP (Volek and Kraemer, 1996). Por lo tanto, los niveles de la creatinina, de manera similar a los de la urea, indicarían que las cerdas del grupo control requerirían un mayor uso de las fuentes energéticas de origen proteico para compensar la menor incorporación de TGs a través de la dieta.

Las proteínas totales presentaron un comportamiento similar al de la creatinina, es decir, aumentaron tras el cambio de alojamiento, aunque solamente de manera significativa en el grupo control, y se normalizaron paulatinamente. Este incremento podría estar relacionado con la deshidratación de algunos animales y/o con la activación del sistema inmune, que induciría la sobreexpresión proteica. Sin embargo, la concentración total de proteína no correlacionó con la de las proteínas de fase aguda (APPs) ni con los de las inmunoglobulinas, por lo que la primera hipótesis sería la más factible.

Las inmunoglobulinas, por su parte, no variaron en el segundo capítulo, mientras que la inmunoglobulina A (IgA) disminuyó en el tercer capítulo, resultado que confirmaría el efecto inmunosupresor del virus PCV2 sobre el huésped (Darwich et al., 2002). Además, en el tercer experimento los niveles de la IgA correlacionaron con los de la apolipoproteína A-I (Apo A-I) ( $r = 0,638$ ) y con la valoración del grado patológico de los tejidos linfoides realizada por el grupo del dr. J. Segalés ( $r = 0,772$ ). Estos resultados sugerirían que la IgA sería un mejor marcador que la inmunoglobulina G (IgG) en casos de PMWS debido a que la reducción de sus niveles sería más drástica y uniforme entre animales.

## 1.4 APPs y péptidos antimicrobianos

Durante la respuesta de estrés, el sistema nervioso central estimula o inhibe la síntesis de moléculas proinflamatorias según la naturaleza y la duración del estresor (Elenkov and Chrousos, 2002; Elenkov, 2004). Durante una respuesta de estrés aguda, los GC y las catecolaminas inducen la producción de varias citoquinas proinflamatorias como el TNF- $\alpha$ , la IL-1 y la IL-6, estimulan la sobreexpresión de sus receptores celulares y como consecuencia se produce un aumento de la síntesis de moléculas pertenecientes al sistema inmune innato (Black, 2002; Yang et al., 2001).

En los tres primeros capítulos, se detectaron cambios en la concentración de algunas APPs y otras moléculas pertenecientes al sistema inmune innato, como los péptidos antimicrobianos. Estas variaciones sugerirían que en los dos primeros experimentos el estresor habría inducido una leve y una moderada respuesta de fase aguda, respectivamente, mientras que en el tercero el sistema inmune innato habría sufrido cambios más importantes a causa de la infección por parte del virus PCV2.

### 1.4.1 APPs

En el cerdo, las APPs positivas más importantes son la proteína inter- $\alpha$ -inhibidor cadena pesada 4 (ITIH4, también conocida como *Major Acute Phase* porcina o Pig-MAP), la proteína C-reactiva (CRP), el amiloide A sérico (SAA) y la haptoglobina (Hp), cuyos niveles incrementan más de dos veces durante la respuesta de fase aguda. En cambio, la albúmina y la Apo A-I son APPs negativas, cuya concentración puede decrecer hasta el 50% durante la activación del sistema inmune innato (Gruys et al., 2005; Petersen et al., 2004).

En el primer capítulo, la Pig-MAP aumentó en el segundo periodo de HD, momento en que los animales eran más mayores y el espacio más reducido, y tendió a disminuir al volver a condiciones de baja densidad de estabulación (LD). Este aumento transitorio sugeriría que los animales no padecieron ningún proceso patológico subclínico. Los valores de Pig-MAP se mantuvieron en todo momento dentro de los valores de referencia descritos en el trabajo de Piñeiro et al. (2009) para los cerdos jóvenes (0,76-1,58 mg/mL).

Por su parte, en el segundo experimento la Pig-MAP presentó un comportamiento diferente entre los dos grupos de animales. Por un lado, su concentración media disminuyó tras el cambio de alojamiento en los animales del grupo control, mientras que en las cerdas del grupo estudio tendió a aumentar, aunque no de manera significativa, y se normalizó rápidamente. Cabe destacar que algunos animales pertenecientes al grupo estudio presentaron todos los días del experimento valores superiores al rango de referencia establecido en el trabajo de Piñeiro et al. (2009) para las cerdas adultas (0,41-1,94 mg/mL), por lo que se podría deducir que la concentración media de la Pig-MAP obtenida el primer día no sería útil para su comparación con los niveles de esta proteína en las cerdas del grupo control. A pesar de que un aumento de esta proteína podría sugerir la presencia de un proceso infeccioso o inflamatorio subclínico (Sorensen *et al.*, 2006), ningún animal presentó signos clínicos de enfermedad.

Asimismo, ningún otro parámetro bioquímico analizado confirmó esta hipótesis. Tampoco se trataría de un problema técnico surgido durante su determinación ya que se obtuvo una buena correlación entre las ratios (cada día respecto a la situación control) determinadas mediante ELISA y SRM ( $r = 0,847$ ). Por lo tanto, el leve aumento de la Pig-MAP tras el cambio de alojamiento en los animales del grupo estudio, aunque no significativo, sería debido al estresor, resultado que concordaría con el obtenido en el primer capítulo.

En el tercer capítulo, la Pig-MAP aumentó de manera significativa en los animales infectados por el virus PCV2, cuyos valores fueron muy superiores al intervalo de referencia establecido para los cerdos jóvenes en el trabajo de Piñeiro et al. (2009). Asimismo, correlacionó con la valoración del grado patológico de los tejidos linfoides realizada por el grupo del dr. J. Segalés ( $r = 0,772$ ).

En resumen, la Pig-MAP incrementaría sus niveles en función de la magnitud del estresor, es decir, se mantendría dentro de los valores de referencia en condiciones de estrés muy leve, como la aplicada en el primer capítulo, mientras que su concentración sería superior ante un estresor más intenso, o suma de estresores, como la situación experimentada en el segundo trabajo. En un estudio previo realizado por nuestro grupo, también se concluyó que la Pig-MAP podría ser un buen marcador de un proceso estresante en el cerdo como el transporte por carretera (Saco et al., 2003). En cambio, en condiciones de infección sus niveles aumentarían de manera considerable. Se considera a la Pig-MAP como la APP con más poder predictivo ante una infección en el cerdo. Sin embargo, se recomienda su uso combinado con otras APPs, como la Apo A-I o la CRP, para aumentar su sensibilidad (Heegaard et al., 2011).

En el primer capítulo, la concentración de la Hp presentó una elevada variabilidad entre los animales a lo largo del experimento pero no resultó modificada significativamente a causa de los cambios de densidad de estabulación. Sus valores se mantuvieron dentro del rango de referencia establecido en el trabajo de Piñeiro et al. (2009) para los cerdos jóvenes (0,43-1,17 mg/mL).

En cambio, en el segundo experimento la concentración de la Hp varió de manera significativa en los dos grupos de animales, haciéndolo de manera más acentuada en el grupo estudio, que había estado manipulado previamente. La Hp aumentó tras el cambio de alojamiento y poco después los niveles disminuyeron hasta obtener valores similares a los iniciales. La concentración de la Hp se encontró en todo momento dentro del intervalo de referencia fijado en el trabajo de Piñeiro et al. (2009) para las cerdas adultas (0,08-2,88 mg/mL). Asimismo, mediante la técnica proteómica 2-DE DIGE se identificaron 2 *spots* diferenciales como isoformas proteicas de la Hp, cuyas variaciones respecto a la situación control confirmaron los resultados obtenidos por el ensayo colorimétrico.

Sin embargo, en el tercer capítulo no variaron de manera significativa los niveles de la Hp total ni de su cadena  $\beta$ , a pesar de que se obtuvo un ligero incremento en la concentración media de estos dos parámetros. Tampoco correlacionaron los niveles de la Hp total con los de otras APP, aunque sí que se obtuvo una buena correlación entre la intensidad de la banda proteica correspondiente a la cadena  $\beta$  de

la Hp y la de la Apo A-I ( $r = -0,682$ ), obtenidas por densitometría. Paralelamente, se determinó la expresión relativa de las cuatro isoformas proteicas principales de su cadena  $\beta$  en ambas situaciones experimentales. Sin embargo, no se detectaron cambios en su expresión, los 4 *spots* cuantificados aumentaron de manera similar durante la infección por PCV2.

En resumen, la concentración de la Hp aumentó en el segundo experimento a causa del estresor, de manera más pronunciada en el grupo de animales que habían sido manipulados previamente, resultado que señalaría que la suma de estresores habría intensificado la producción de la Hp. En un estudio previo realizado por nuestro grupo, también se concluyó que la Hp podría ser un buen marcador de un proceso estresante en el cerdo como el transporte por carretera (Saco et al., 2003). Por su parte, en el tercer experimento no varió la Hp a pesar de que se considera esta proteína un buen marcador de un proceso infeccioso (Chen et al., 2003), aunque menos sensible que la Pig-MAP (Heegaard et al., 2005).

En el primer capítulo, la CRP no varió de manera significativa a causa de los cambios de densidad en la celda. Sin embargo, sus niveles fueron superiores en el día posterior a cada cambio de densidad, momento en el que se sumarían los estresores aplicados, es decir, la nueva densidad y la extracción de la muestra. Su concentración fue similar al rango de referencia fijado en el trabajo de Sorensen *et al.* (2006) (0,55-12,33  $\mu\text{g/mL}$ ).

Asimismo, en el segundo capítulo los valores de la CRP difirieron significativamente entre ambos grupos de animales. Las cerdas del grupo estudio presentaron una concentración más elevada de esta proteína que las del grupo control, las cuales habían sido manipuladas previamente. Sin embargo, sus niveles fueron similares al rango de referencia propuesto en el trabajo de Sorensen *et al.* (2006).

A pesar de que en los dos experimentos los valores de la CRP fueron ligeramente superiores al intervalo de referencia citado previamente, se podría descartar que algún animal sufriese una infección subclínica debido a que esta proteína puede incrementar su concentración hasta mil veces durante la respuesta de fase aguda (Sorensen et al., 2006). La CRP presentó un comportamiento diferente a las otras dos APPs descritas previamente debido a que ésta se sobreexpresa de manera más rápida y transitoria durante un proceso infeccioso, inflamatorio o estresante (Bürger et al., 1992; Heegaard et al., 1998).

En resumen, estos resultados reflejarían que la CRP sería un buen marcador de la manipulación continua de los cerdos, cuya concentración aumentaría ante la suma de estresores pero no resultaría afectada a causa de los cambios aplicados a las condiciones de alojamiento de los animales.

En el primer estudio, los niveles de la Apo A-I se valoraron mediante *western blot*. Esta proteína presentó una disminución de sus niveles en el segundo periodo de HD, aunque no de manera significativa.

Por su parte, en el segundo experimento la cuantificación de la Apo A-I fue problemática. Se emplearon dos ELISAs comerciales diferentes, de las casas comerciales USCN y Cusabio, que indicaron que su

concentración aumentó de manera significativa tras el cambio de alojamiento. Sin embargo, en la literatura se ha descrito a esta proteína como una APP negativa en el cerdo (Carpintero et al., 2005; Piñeiro, Piñeiro, Morales, et al., 2007). Paralelamente se determinaron sus niveles por *western blot*. Como resultado se observó una disminución significativa de sus niveles tras el cambio de alojamiento en ambos grupos de animales. Asimismo, los valores fueron inferiores a los de la situación control a lo largo de todo el experimento. Tanto el 2-DE DIGE como el SRM confirmaron el descenso de los niveles de la Apo A-I en este trabajo.

Por último, en el tercer trabajo se detectó una disminución de la intensidad de la banda proteica correspondiente a la Apo A-I, obtenida por densitometría, durante la infección por el virus PCV2. Sin embargo, este descenso no fue significativo. Paralelamente, se determinó la expresión relativa de sus tres isoformas proteicas principales en ambas situaciones experimentales mediante dos técnicas diferentes, geles 2-DE y *western blot*. Mediante ambas técnicas se observó una expresión diferencial en los cerdos enfermos con respecto a los sanos: la isoforma más básica de la Apo A-I aumentó significativamente sus niveles mientras que las otras isoformas disminuyeron, también de manera significativa entre los dos grupos de animales. La isoforma más básica de la Apo A-I corresponde a la forma inmadura de la proteína que contiene el péptido señal, eliminado extracelularmente mediante proteólisis (Li et al., 1988). Se ha descrito que la proporción de preApo A-I convertida en proteína madura vendría determinada por el estado hormonal del organismo (Banerjee et al., 1986).

Posteriormente, se revisaron los 2-DE DIGEs realizados en el primero y en el segundo capítulo para comprobar la expresión diferencial de las 3 isoformas proteicas de la Apo A-I. No obstante, no se detectaron diferencias en la expresión relativa de sus isoformas. Este resultado sugeriría que una situación de estrés no induciría el estado hormonal necesario para modificar la conducta de las isoformas de esta proteína, mientras que una infección vírica sí que lo haría.

En resumen, las variaciones en la concentración de la Apo A-I podrían ser un buen marcador de un proceso estresante en el cerdo, hipótesis que coincidiría con los resultados obtenidos en el trabajo de Piñeiro, Piñeiro, Carpintero, et al. (2007), en el que la proteína disminuyó durante el transporte por carretera. A pesar de que la Apo A-I no varió significativamente en el tercer estudio, se considera un buen marcador de un proceso infeccioso en el cerdo (Carpintero et al., 2005), aunque menos sensible que la Pig-MAP (Heegaard et al., 2011). La variación de la expresión diferencial de sus isoformas proteicas también sería un buen marcador de un proceso infeccioso por el virus PCV2. No obstante, la determinación de la concentración de cada isoforma proteica no es viable en la rutina clínica veterinaria ni en la práctica debido a que las técnicas disponibles en la actualidad para su cuantificación son lentas y laboriosas. Se desconoce si el comportamiento de sus isoformas también varía en procesos infecciosos causados por otros virus debido a que no existe bibliografía al respecto.

A pesar de que la glicoproteína  $\alpha 2$ -Heremans Schmid ( $\alpha 2$ -HS-glicoproteína, AHSG o fetuína A) no es una APP determinada habitualmente en los animales de granja, se midieron sus niveles en el suero de los

animales del segundo capítulo debido a que fue identificada como proteína diferencial y validada como biomarcador de bienestar bovino en un experimento proteómico realizado por nuestro grupo (Marco-Ramell et al., 2012). Inicialmente, se empleó un ELISA de la casa comercial USCN, el mismo que se utilizó en nuestro estudio previo en vacas. Como resultado, se detectó un aumento significativo de la proteína tras el cambio de alojamiento. En la literatura se ha descrito la AHSB como una APP negativa (Jersmann et al., 2003; Ombrellino et al., 2001; Roncada et al., 2007), tal como se evidenció en nuestro trabajo previo. El segundo ELISA comercial usado fue de SunRed Bio; no obstante, tampoco se obtuvieron los resultados esperados ya que mediante este kit no se obtuvo ningún cambio en la concentración de la AHSB a lo largo del experimento. Paralelamente, la cuantificación del único péptido de la AHSB seleccionado para su análisis por SRM sugirió que esta proteína se comportaría como una APP negativa, que disminuiría tras el cambio de alojamiento y rápidamente normalizaría sus niveles. Sin embargo, el estudio de un solo péptido proteotípico por SRM no sería una determinación suficiente para concluir su comportamiento. Desafortunadamente, en la actualidad no se dispone de técnicas suficientes ni fiables para valorar la concentración de la AHSB porcina.

Se detectaron también cambios en la expresión de otras tres APPs negativas en los dos primeros capítulos. Por un lado, en el primer experimento se evidenció mediante 2-DE DIGE una disminución de los niveles de la albúmina en condiciones de HD de estabulación. Por otra parte, la técnica iTRAQ reveló que las apolipoproteínas E (Apo E) y M (Apo M) disminuyeron en ambos grupos de animales tras el cambio de alojamiento respecto a la situación control en el segundo trabajo. A pesar de que estas dos proteínas no están incluidas en la clasificación habitual de las APPs, algunos autores las denominan como tales (Mackiewicz et al., 1993). Ambas proteínas forman parte de las moléculas transportadoras de lípidos a través del torrente sanguíneo (Cabana et al., 1989; Feingold et al., 2008) y son reemplazadas por la proteína SAA, que posee características proinflamatorias, en el transcurso de la respuesta de fase aguda (Cabana et al., 1989; Steel and Whitehead, 1994). La disminución de la albúmina estaría relacionada con el aumento de la disponibilidad de las hormonas que transporta, mientras que el descenso de las dos apolipoproteínas con la inhibición de las moléculas antiinflamatorias. Ninguna de las tres proteínas fue validada en todos los animales mediante otras técnicas cuantitativas debido a que no están consideradas las APPs más importantes en el cerdo y porque ya se validaron a lo largo de los dos primeros estudios otras moléculas con características similares. Sin embargo, sus variaciones refuerzan la hipótesis acerca de la presencia de una respuesta fisiológica de estrés similar a una respuesta de fase aguda en los dos primeros capítulos.

En el segundo experimento el iTRAQ también reveló el aumento de la lactotransferrina (Ltf o lactoferrina, Lf) respecto a la situación control en los dos grupos de animales. La Ltf es una glicoproteína que forma parte del sistema inmune innato, cuya concentración aumenta durante la respuesta de fase aguda (Legrand et al., 2005). La Ltf posee actividad antioxidante, antimicrobiana, antivírica y antifúngica (Ahmad et al., 2011). En un futuro próximo se procederá a su cuantificación mediante SRM. No

obstante, su incremento relativo en los sueros *pool* está en consonancia con los resultados obtenidos hasta el momento.

#### 1.4.2 Péptidos antimicrobianos

Las protegrinas son moléculas presentes únicamente en la especie porcina, producidas y secretadas por los leucocitos, y presentan similitudes en su secuencia proteica con otros péptidos antimicrobianos (Kokryakov et al., 1993). Los péptidos antimicrobianos forman parte del sistema inmune innato de todos los organismos y ya se han descrito más de 500 péptidos diferentes; un individuo puede producir hasta tres docenas de péptidos durante la respuesta de fase aguda (Yan and Hancock, 2001). Los péptidos antimicrobianos exhiben actividad microbicida, antifúngica y antivírica (Steinberg et al., 1997), pueden bloquear la acción inmunosupresora de los GC en condiciones de estrés crónico (Ganz and Lehrer, 1995), modular el aumento de la temperatura en el organismo (Korneva et al., 1997), etc. En el segundo capítulo se detectó mediante iTRAQ el aumento relativo de la protegrina 3 en los sueros *pool*. Este incremento podría ser causado por el estresor (Wang et al., 2006), que comportaría la activación del sistema inmune innato a causa de la cascada hormonal del eje HPA o por algún tipo de lesión originado en el nuevo alojamiento. En un futuro próximo se procederá a su cuantificación mediante SRM. De manera similar a la Ltf, el incremento de la protegrina 3 concuerda con el resto de datos relativos a la activación del sistema inmune innato durante la respuesta fisiológica de estrés.

Mediante iTRAQ también se detectaron otras proteínas implicadas en la respuesta inmune. Sin embargo, al no tratarse de proteínas plasmáticas o de naturaleza secretable, su presencia en el suero podría deberse al goteo o daño celular. En el apartado Anexos se describe su función biológica.

#### 1.5 Marcadores de estrés oxidativo

El estrés oxidativo ha cobrado mucha importancia en el mundo de la veterinaria debido a las numerosas evidencias experimentales que apoyan la idea de que un pobre bienestar puede alterar el equilibrio oxidativo presente en la célula (Chirase et al., 2004; Lin et al., 2006; Sauerwein et al., 2005). El estrés oxidativo juega un papel importante en el inicio y/o progresión de ciertos estados patológicos (Valko et al., 2007) y puede modificar el desarrollo (Takahashi, 2012), el bienestar (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007) y la capacidad productiva (Pedrera et al., 2010) y reproductora (Rizzo et al., 2012) de los animales.

Se han formulado dos posibles hipótesis que explicarían el papel prooxidante de los GC durante la respuesta de estrés. Por un lado, el aumento de la tasa metabólica para conseguir energía incrementaría la producción de las especies reactiva de oxígeno (ROS). Por otro lado, la interrupción de la síntesis de moléculas antioxidantes durante la respuesta de estrés, debido a la priorización de ciertas funciones biológicas, aumentaría la susceptibilidad de las macromoléculas a ser modificadas por las ROS o por sus productos de oxidación (Costantini et al., 2011). Asimismo, la activación del sistema inmune innato daría lugar a una sobreproducción de las ROS por parte de las células fagocíticas (Dahlgren et al., 2007).

En los dos primeros capítulos se confirmó el desarrollo de una leve situación de estrés oxidativo mediante el análisis de varias moléculas, que reflejaron el estado antioxidante de la célula, o bien, las consecuencias de las ROS sobre las proteínas plasmáticas.

El glutatión es el antioxidante más importante de la célula debido a que es el cofactor de varias enzimas antioxidantes por ejemplo, la glutatión peroxidasa (GPx). También participa en la detoxificación de los radicales formados durante la oxidación de las macromoléculas y es capaz de retornar las moléculas antioxidantes a su forma activa a través de la oxidación de su forma reducida (GSH). La enzima glutatión reductasa (GR) revierte su forma oxidada (GSSG) a GSH (Valko et al., 2007).

En el primer estudio la actividad de las enzimas GPx y GR no varió significativamente a causa de la HD de estabulación. No obstante, la GPx presentó una leve disminución después de cada cambio de densidad, de LD a HD y viceversa. A pesar de que este descenso no fue significativo, sugeriría que la síntesis de esta enzima resultaría ligeramente alterada por la suma de estresores (el cambio en las condiciones de alojamiento y la continua extracción de sangre) y tendería a aumentar posteriormente, al adaptarse el animal a las nuevas condiciones de estabulación. El resultado obtenido para la GR no fue del todo inesperado ya que esta enzima no suele utilizarse como marcador de estrés oxidativo ya que su actividad depende principalmente de la disponibilidad de NADPH (Rahman et al., 1999).

En el segundo experimento la actividad de la GPx y la concentración del glutatión total (tGSH) aumentaron tras el cambio de alojamiento en los dos grupos de animales, aunque solamente de manera significativa en el grupo control, y disminuyeron progresivamente. Estos resultados señalarían que la continua obtención de las muestras de sangre, conjuntamente con el cambio del alojamiento, comprometería el metabolismo del glutatión. Por desgracia, no se pudo determinar la ratio entre el GSH y el GSSG, que es considerada un buen marcador de estrés oxidativo (Jones, 2006), a causa de la oxidación espontánea del GSH (Rossi et al., 2002). Para evitarla, se tendrían que haber bloqueado sus grupos tiol con agentes alquilantes durante la extracción de la muestra (Dalle-Donne *et al.*, 2006).

En resumen, la modificación de las condiciones de estabulación de los animales así como la obtención periódica de sangre comprometería el principal mecanismo antioxidante de la célula, y como consecuencia aumentaría la susceptibilidad del organismo a sufrir las consecuencias del estrés oxidativo.

En el segundo capítulo, la enzima superóxido dismutasa (SOD) mostró un comportamiento diferente entre los dos grupos de animales. En el grupo de animales estudio la SOD se incrementó tras el cambio de alojamiento, aunque posteriormente disminuyó, mientras que su actividad en el grupo control aumentó gradualmente a lo largo del experimento. Por lo tanto, la actividad de la SOD respondería rápidamente a la acumulación de estresores y más lentamente a una situación prolongada de estrés.

Por su parte, el aumento de la APP Hp también podría estar relacionado con su actividad antioxidante (Asleh et al., 2005) ya que presentó una conducta similar a la actividad de la GPx.

Por último, se detectó el aumento de la peroxiredoxina 2 (PRDX2) en el suero *pool* de los animales, mediante 2-DE DIGE e iTRAQ, tras el cambio de alojamiento en el segundo experimento en los dos grupos de cerdas. Ambas técnicas proteómicas sugirieron que este incremento fue de mayor magnitud en los animales del grupo estudio, los cuales habían sido manipulados previamente. La PRDX2 es una enzima que participa en la reducción del peróxido de hidrógeno y de los hidroperóxidos alquilos (Rhee *et al.*, 2001). A pesar de ser una proteína intracelular, en varios estudios se ha detectado su presencia en el suero (Chen *et al.*, 2004; Lu *et al.*, 2010).

La determinación de varias moléculas con características antioxidantes reveló que existiría un desequilibrio oxidativo en la célula y en el organismo causado por las situaciones de estrés a las que fueron sometidos los animales. Asimismo, los resultados obtenidos sugerirían que los animales manipulados continuamente presentarían una menor activación del ciclo del GSH que los animales menos manipulados, que estaría compensada por el rápido aumento de la actividad de las enzimas SOD y PRDX2. No obstante, existen críticas acerca del uso exclusivo de los antioxidantes como marcadores, ya que se considera una aproximación incompleta para conocer la extensión del daño oxidativo, por lo que se recomienda su cuantificación conjunta con el grado de oxidación de alguna de las macromoléculas biológicas (Costantini & Verhulst, 2009).

La oxidación proteica puede ser reversible o irreversible. Las modificaciones reversibles modulan la función proteica, mientras que las segundas están asociadas con la pérdida de función permanente debido a que las proteínas dañadas se entrecruzan, se fragmentan, se acumulan dentro de la célula o adquieren aminoácidos modificados que poseen grupos tiol, halógeno o carbonilo (CO), entre otros (Dalle-Donne *et al.*, 2005). La carbonilación de las proteínas, causada por la unión de aldehídos y cetonas a las cadenas laterales de los aminoácidos prolina, arginina, lisina o treonina, comporta la disfunción de la proteína (Dalle-Donne *et al.*, 2003).

El nivel de grupos CO en las proteínas plasmáticas aumentó a lo largo del primer experimento. La HD de estabulación habría inducido una ligera situación de estrés oxidativo, que no habría inducido la sobreexpresión de los mecanismos celulares que eliminarían las proteínas oxidadas del torrente sanguíneo que se irían formando a medida que los cerdos crecían y requerían más espacio para cubrir sus necesidades.

En el segundo capítulo, los grupos CO aumentaron tras el cambio de alojamiento, aunque solamente de manera significativa en el grupo estudio, y disminuyeron progresivamente. Este descenso sería causado posiblemente por la acción de las enzimas antioxidantes que captarían las ROS que se irían formando, y por los mecanismos celulares que eliminarían rápidamente las proteínas oxidadas del suero. Por su parte, el grado de oxidación de las proteínas plasmáticas de los animales del grupo control sería menor que la oxidación de las proteínas del otro grupo de animales debido a que presentaron una mayor actividad metabólica de los componentes del ciclo del glutatión.

La cuantificación de los grupos CO de las proteínas del suero mediante densitometría reflejó la mayor actividad oxidativa de las ROS sobre las proteínas en los animales que habían sido manipulados previamente, que presentaron una menor activación de las defensas antioxidantes relacionadas con el ciclo del glutatión que el resto de los animales del segundo experimento. Este resultado fue confirmado por las ligeras modificaciones detectadas en la actividad de la GPx durante el primer estudio tras los cambios de densidad en la celda. Esta enzima habría sido incapaz de contrarrestar las ROS generadas durante la leve situación de estrés, que oxidarían paulatinamente las proteínas del suero.

### 1.6 Proteínas de origen celular

Algunas de las proteínas diferenciales identificadas en los estudios proteómicos eran de origen celular, es decir, transmembranal, citoplasmático, mitocondrial y nuclear.

El incremento de las proteínas celulares en el suero podría deberse al daño muscular y/o vascular provocado durante la obtención de las muestras sanguíneas. Ésta generaría por sí misma una respuesta de estrés, tal como se ha comentado previamente, y por lo tanto podría resultar en cambios conductuales como el aumento de la agresividad, factor que dificultaría y prolongaría la extracción. Por ello, en el segundo estudio se empleó un grupo de animales, el grupo control, como indicador del estrés asociado a la extracción de las muestras con el fin de identificar aquellos parámetros asociados a esta respuesta de estrés. Sin embargo, el estrés resultante en este experimento fue mayor al esperado debido a que se trabajó con animales bastante grandes y pesados que opusieron más resistencia que los cerdos jóvenes, a pesar de que éstos últimos fueron manipulados con mayor frecuencia. Además, el abundante tejido adiposo presente en el cuello de las cerdas primerizas dificultó el acceso a la vena yugular y podría haber contribuido a incrementar el daño causado por la extracción de la sangre.

Asimismo, la presencia de estas proteínas también podría ser debida al propio estresor. El reducido espacio de la celda en condiciones de HD y de las jaulas individuales provocaría el impacto de los animales contra las barras laterales de éstas y contra sus compañeros.

Por último, la hemólisis de los eritrocitos originada por la difícil extracción de la sangre o por la oxidación de los lípidos de su membrana en condiciones de estrés oxidativo también contribuiría a aumentar las proteínas celulares en el suero (Chen et al., 2004).

En el primer trabajo se detectó mediante 2-DE DIGE y se confirmó por *western blot* un aumento de la  $\beta$ -actina en el suero provocado por la HD. La actina es una proteína citosquelética muy conservada, que está implicada en la motilidad celular y es esencial para mantener la estructura y las propiedades mecánicas de la matriz citoplasmática (Pollard and Cooper, 1986). Los niveles de la  $\beta$ -actina y de la actividad de la CK no correlacionaron en el primer estudio, por lo que se deduciría que su presencia en el suero no estaría asociada específicamente con daño en el músculo esquelético. La presencia de filamentos de actina en el suero podría ser perjudicial para el individuo ya que éstos podrían modificar la

viscosidad de la sangre (Janmey and Lind, 1987), interferir en la formación del coágulo de fibrina y formar microcoágulos que dañarían el tejido vascular (White and Cooke, 2000).

En el segundo experimento se observó también mediante *western blot* un incremento de la  $\beta$ -actina en el suero los días posteriores al cambio de nave en ambos grupos de animales, por lo que su presencia estaría relacionada con el daño celular causado por las nuevas condiciones de alojamiento. Sin embargo, no se evidenció la misma intensidad de la banda proteica todos los días, sino que ésta fue proporcional a las dificultades encontradas durante la extracción de las muestras. Por lo tanto, se podría concluir que los niveles de la actina en el suero estarían relacionados tanto con la situación de estrés como con la manipulación de las cerdas. A pesar de que esta proteína no fue detectada durante el análisis del suero por iTRAQ, mediante esta técnica se identificó un aumento de la cofilina 1 y la tropomiosina, dos proteínas de unión a la actina (Stossel et al., 1985), que podrían haber migrado al suero conjuntamente con la  $\beta$ -actina.

La presencia de proteínas estructurales de citosqueleto, como la  $\beta$ -actina, y de proteínas de unión a éstas sería un buen marcador de daño celular en aquellas situaciones en las que el estresor está relacionado con las condiciones de alojamiento de los animales.

El resto de proteínas celulares detectadas por iTRAQ son descritas en los Apéndices del manuscrito.

En condiciones fisiológicas, la isoforma constitutiva de las proteínas de choque térmico (cHsp) y el proteasoma actúan conjuntamente con el fin de mantener la homeostasis proteica en el interior de la célula (Leidhold and Voos, 2007). Las Hsp son proteínas que actúan como chaperonas moleculares y por lo tanto, facilitan el plegamiento proteico, previenen la agregación de las proteínas y conducen las proteínas mal plegadas a su degradación (Kalmar and Greensmith, 2009). El proteasoma, en cambio, está formado por un conjunto de proteasas que actúan en cascada con el fin de eliminar las proteínas dañadas del interior de la célula y las moléculas que las cHsp no han podido plegar (Mathew and Morimoto, 1998).

En condiciones de estrés, los GC inician una cascada de señalización en el interior de la célula que estimula la síntesis de la isoforma inducible de las Hsp (iHsp) (Basu et al., 2001) de manera proporcional a la intensidad del estresor y al estado fisiológico celular (Buchanan, 2000). Paralelamente, los niveles del proteasoma pueden aumentar o disminuir según la naturaleza del estresor (Hanna et al., 2007). Por ejemplo, una situación de estrés oxidativo leve o puntual induciría un aumento de la actividad del proteasoma, mientras que un desequilibrio oxidativo severo o crónico conllevaría su inactivación (Shang and Taylor, 2011) y consecuentemente, se sobreexpresarían las iHsp (Kawazoe *et al.*, 1998). Las Hsp se han denominado a menudo como proteínas de estrés (Benjamin and McMillan, 1998; Samali and Orrenius, 1998).

En el capítulo dos, se detectó mediante la técnica iTRAQ un aumento respecto al día 1 de varias subunidades de la proteasa 26S del proteasoma (subunidad 7, 10B y 11) y de la Hsp de 75 kDa (Hsp75,

que forma parte de la familia de las Hsp70), y la disminución de la Hsp de 78 kDa regulada por glucosa (GRP78). A pesar de que estas moléculas son intracelulares, también se ha detectado su presencia en el suero. Varios estudios han sugerido que estas proteínas alcanzarían el torrente sanguíneo a causa del goteo celular y que sus niveles plasmáticos reflejarían la homeostasis proteica en el interior de la célula (Abe et al., 2004; Dutaud et al., 2002). Asimismo, se ha descrito que en condiciones de estrés varios tipos de células como los monocitos, los macrófagos y los adipocitos, entre otros, podrían liberar las isoformas extracelulares de las Hsp (eHsp) y las GRP (eGRP) con el fin de modular la respuesta iniciada por el sistema inmune innato (Calderwood et al., 2007; Campisi et al., 2003).

El aumento de la Hsp75 y de algunas subunidades del proteasoma en el suero tras el cambio de alojamiento podría ser un indicador de dos fenómenos. Por un lado, se sobreexpresarían las isoformas iHsp y los componentes del proteasoma en el interior de la célula para reparar los efectos del estrés oxidativo sobre las proteínas celulares. Consecuentemente, una mayor cantidad de estas proteínas migraría al torrente sanguíneo a causa del goteo celular. Por otro lado, la isoforma eHsp70 sería secretada al suero con el objetivo de promover una respuesta fisiológica similar a una respuesta de fase aguda.

Por su parte, la GRP78 estaría regulada por un mecanismo diferente al de las otras Hsp. Varios trabajos han propuesto que la concentración de esta proteína dependería principalmente de la ingesta de glucosa a través de la dieta (David et al., 2002; Mote et al., 1998). Este resultado concordaría con la hipótesis previa postulada acerca de la modificación del comportamiento alimentario de las cerdas después del cambio de alojamiento. Asimismo, esta proteína posee características antiinflamatorias (Calderwood et al., 2007), por lo que su disminución también podría estar relacionada con la inhibición de esta función.

## 2. Modificaciones postraduccionales

Las modificaciones postraduccionales (PTMs) permiten regular la función, la actividad, la localización y/o la vida media de las proteínas (Krishna and World, 1993). Además, la composición de las PTMs puede variar en función de la especie, el tipo de célula o tejido, el estado de desarrollo y de diferenciación, y durante un proceso patológico (Brockhausen et al., 1998; Ohtsubo and Marth, 2006).

### 2.1 Caracterización estructural de la Hp y las inmunoglobulinas A y G

La proporción relativa y la pérdida o la adición de nuevos componentes glucídicos puede ser utilizada como una herramienta pronóstica y diagnóstica durante un proceso inflamatorio (Durand and Seta, 2000) debido a que las citoquinas proinflamatorias liberadas durante la respuesta de fase aguda pueden modificar la expresión o la actividad de las enzimas implicadas en la glicosilación de otras proteínas de manera independiente a la tasa de síntesis de éstas (Mackiewicz *et al.*, 1987; Lampreave *et al.*, 1995). Por ejemplo, en el gato se han observado alteraciones en el grado de ramificación y un aumento de la

fucosilación de las cadenas glucídicas de la APP glicoproteína ácida  $\alpha$ -1 durante la respuesta de fase aguda (Cecilianí and Pocacqua, 2007).

Son frecuentes los estudios que examinan las glicosilaciones de la Hp y las inmunoglobulinas humanas durante un proceso patológico (Ang et al., 2006; Gornik and Lauc, 2008; Yoon et al., 2010; Zhang et al., 2011). Sin embargo, en el cerdo aún no se ha publicado trabajos de esta índole.

Con el objetivo de comprobar qué isoformas de la Hp porcina poseían cadenas glucídicas se emplearon las lectinas aglutinina del germen del trigo (WGA) y concanavalina A (ConA), que reconocen los azúcares más frecuentes en las cadenas glucídicas (Durand and Seta, 2000). Éstas presentaron reactividad solamente contra las cuatro isoformas más importantes de la cadena  $\beta$  de la Hp, pero no contra las dos isoformas de la cadena  $\alpha$ . Por su parte, el análisis por MS de las cadenas glucídicas de la cadena  $\beta$  de la Hp reveló que la diferente movilidad electroforética de las cuatro glicofomas estudiadas de la proteína vendría determinada por la combinación de distintos componentes glucídicos de tipo N- y O-. La identificación de cadenas glucídicas de tipo O- en la Hp fue una sorpresa debido a que en la Hp humana únicamente se han descrito enlaces O- en estudios relacionados con cáncer (Fujimura et al., 2008). El hecho de no haber detectado cambios en la movilidad electroforética de la Hp pura después de ser digerida con una O-glicosidasa comercial podría deberse a que no existe ninguna enzima O-glicosidasa tan eficiente como las N-glicosidasas (PGNasas) (Chen et al., 2010).

Por su parte, se detectó una elevada heterogeneidad en los componentes glucídicos de la cadena pesada de la IgG y la IgA, resultado que confirma los trabajos realizados por Hamako et al. (1993) y por Raju et al. (2000). Se detectaron cadenas glucídicas con enlaces de tipo N- en las IgG y de tipo N- y O- en las IgA.

Vale la pena destacar que la Hp, la IgG y la IgA contienen el glicano ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc), que procede de la hidroxilación del ácido N-acetilneuramínico (NeuAc) por parte de la enzima CMP-NeuAc hidroxilasa. Esta enzima se expresa en todos los organismos excepto en la especie humana, cuyo gen está inactivo a causa de una delección (Irie and Suzuki, 1998).

Una vez caracterizadas las PTMs de estas tres glicoproteínas, se compararon de manera cualitativa sus cadenas glucídicas en condiciones de salud y en animales infectados por el virus PCV2. Curiosamente, no se detectaron cambios en el patrón de glicosilación de ninguna de las tres proteínas. No obstante, podrían existir cambios en la proporción relativa de las diferentes estructuras.

En un futuro próximo, se prevé proceder a la cuantificación de los componentes glucídicos de estas tres proteínas en las dos situaciones experimentales.

## 2.2 Caracterización estructural de la Apo A-I

A diferencia de la gran cantidad de información bibliográfica acerca de las glicoproteínas, es mucho menor el número de datos existentes sobre las PTMs de las apolipoproteínas y los cambios que éstas

sufren durante la respuesta de fase aguda. Se ha descrito que todas ellas poseerían PTMs similares (Li et al., 1988).

Hasta el momento, se ha caracterizado alrededor del 90% de la secuencia proteica de sus dos isoformas más ácidas. El 10% restante comprendería el péptido señal, algunos péptidos muy pequeños que serían difícilmente detectados a causa de su bajo peso molecular y a PTMs aún no identificadas. Las PTMs conferirían una masa superior a los péptidos por lo que, desconociendo la modificación que contienen, el *software* empleado sería incapaz de asignarles un pico del espectro de masas. La diferente movilidad electroforética entre los dos *spots* más ácidos podría estar causada por una PTM existente en la región que comprende los aminoácidos 175-181 de la secuencia proteica, que le conferiría un pI más ácido.

Se realizó el análisis de los espectros de masas de acuerdo con la información presente en las bases de datos proteicas y la bibliografía existente acerca de las PTMs de la Apo A-I en humanos. Se descartó la fosforilación (Beg et al., 1989), la palmitolación (Hoeg et al., 1986) y la unión del 4-hidroxinonenal (Keeney et al., 2013) en los dos *spots* porcinos evaluados. En cambio, las metioninas y los triptófanos de ambos *spots* presentaron tanto su forma oxidada como su forma reducida, resultado que concordaría con los datos descritos en el trabajo de Fernández-Irigoyen et al. (2005). No obstante, estas modificaciones podrían ser debidas a la oxidación de estos aminoácidos durante la preparación de la muestra. La inmunodetección bidimensional de los grupos carbonilos no presentó reactividad contra estos dos *spots* o fue demasiado débil para su visualización.

Asimismo, en la bibliografía se ha sugerido que la diferencia de estas dos isoformas podría deberse a una deamidación de la asparagina o la glutamina (Bojanovski et al., 1985). No obstante, no fue posible analizar esta PTM debido a que la deamidación de un aminoácido conlleva la pérdida de 0,98 Da, masa inferior a los filtros restrictivos aplicados durante el análisis de los espectros de masas. Asimismo, las proteínas pueden desamidarse durante la preparación de la muestra. Se han propuesto también otras posibles PTMs en la Apo A-I, como la glicosilación (Brewer, 1981; Menzel et al., 1982). Sin embargo, se trata de trabajos de hace más de 30 años, cuya hipótesis no ha sido demostrada con posterioridad en humanos. Además, ninguna de las tres isoformas de la Apo A-I presentó reactividad durante la tinción con las lectinas WGA y ConA.

A continuación, se prevé comenzar con la caracterización de la isoforma más básica de la Apo A-I porcina, que contiene el péptido señal (Li et al., 1988). Esta isoforma, a diferencia de las otras dos, presentó reactividad contra el anticuerpo DNP, resultado que sugeriría que poseería aminoácidos más oxidados que las isoformas más ácidas. Este fenómeno ya ha sido descrito en el trabajo de Yang et al., (2010). Una vez identificadas las modificaciones de las tres isoformas de esta proteína se procederá con la comparación cualitativa y cuantitativa de las PTMs de éstas en los animales sanos y los infectados con el virus PCV2.

### 3. Uso de técnicas proteómicas en suero porcino

Además de su importancia comercial, el cerdo se ha convertido recientemente en un organismo modelo relevante ya que anatómicamente, genéticamente y fisiológicamente está más relacionado con la biología humana que los clásicos animales de laboratorio (Bendixen et al., 2010). El elevado interés productivo y biomédico que posee la especie porcina ha conllevado la caracterización de su genoma. Hace unos pocos meses, el *Swine Genome Sequencing Consortium* confirmó la finalización del proyecto de secuenciación del genoma porcino (Groenen et al., 2012), el cual se inició hace más de diez años. A medida que se fueron publicando datos acerca del progreso del proyecto (Archibald et al., 2010; Ursing and Arnason, 1998; Wernersson et al., 2005), se desarrollaron las bases de datos que contenían información sobre las proteínas de la especie porcina (Apweiler, Bairoch, and Wu, 2004).

En los cuatro estudios realizados se utilizó la base de datos Swiss-Prot, cuya información es de alta calidad debido a que están anotados y revisados manualmente (Apweiler, Bairoch, Wu, et al., 2004). Ésta incluye (en abril de 2013) 3516 proteínas de la especie porcina, cifra muy inferior a la de las proteínas anotadas en *Homo sapiens* (26109), en *Mus musculus* (17022) o en *Bos taurus* (6847). Por ello, no es habitual trabajar solamente con la taxonomía porcina cuando se buscan coincidencias entre los espectros de masas y las proteínas presentes en las bases de datos, si bien se ha de complementar la búsqueda con los datos pertenecientes a otras especies animales.

Al combinar la búsqueda con otras taxonomías el número de identificaciones proteicas se incrementa de manera considerable, tal como se observó en los datos obtenidos por iTRAQ: de las 262 identificaciones proteicas, solamente una cuarta parte perteneció a la especie porcina. Asimismo, mediante esta aproximación proteómica solamente el 15% de los espectros de masas generados por el analizador Orbitrap concordó con los datos introducidos en las bases de datos. Por otra parte, durante el análisis de las PTMs de la Apo A-I porcina se detectó que la secuencia proteica que contiene Swiss-Prot no coincidió exactamente con la que se caracterizó por MS: esta última contenía dos aminoácidos diferentes. Los resultados reflejarían que las bases de datos proteicas para las especies que no son organismos modelo clásicos, como es el cerdo, están aún poco desarrolladas. Asimismo, este inconveniente podría haber interferido en la búsqueda de buenos péptidos proteotípicos para su cuantificación por SRM.

En los cuatro trabajos que se han realizado se utilizaron varias técnicas proteómicas con finalidades diferentes. A continuación se detallan brevemente los resultados obtenidos para cada una de ellas, así como las ventajas e inconvenientes encontrados.

#### 3.1 2-DE DIGE

Mediante el uso de geles 2-DE DIGE en muestras de suero sin tratar se obtuvo un número reducido de *spots* diferenciales en los dos primeros capítulos, de los que solamente se identificaron 2 y 4 proteínas por MS, respectivamente. Diversos factores pudieron conducir a este escaso número de proteínas diferenciales como el hecho de que los animales respondieron de manera diversa a la situación de

estrés y, por lo tanto, los parámetros aplicados para filtrar los *spots* pudieron ser demasiado restrictivos. En cambio, cuando se empleó la tecnología 2-DE DIGE con muestras plasmáticas de algunos animales infectados por el virus PCV2, el número de *spots* diferenciales fue superior a los obtenidos anteriormente incluso a simple vista, a pesar de que no se analizaron los mapas bidimensionales con un *software* especializado ni se identificaron los *spots* mediante MS. Este resultado indicaría que un proceso infeccioso comporta mayores cambios en el suero que una situación de estrés psicológico y/o físico. Las ligeras alteraciones que sufriría el proteoma de este fluido ante una situación estresante serían difícilmente detectables mediante geles 2-DE DIGE.

La naturaleza intrínseca del suero y la presencia de algunas proteínas muy abundantes sería otra de las principales causas del bajo número de proteínas candidatas identificadas. Se recomienda el fraccionamiento del suero durante la búsqueda de biomarcadores con el fin de reducir su elevado rango dinámico (Millioni *et al.*, 2011). No obstante, pocos kits comerciales existentes presentan afinidad por las proteínas plasmáticas de especies diferentes a la humana. El kit ProteoMiner®, por su parte, ecualiza el proteoma más abundante y enriquece el menos abundante de cualquier fluido biológico, independientemente de la especie estudiada (Boschetti and Righetti, 2008). Nuestro grupo validó la eficiencia y la reproducibilidad de este kit en muestras plasmáticas de cerdo y de vaca (Marco-Ramell and Bassols, 2010) y lo empleó en la búsqueda de biomarcadores de bienestar en la especie bovina (Marco-Ramell *et al.*, 2012).

### 3.2 Geles zoom

A pesar de que el trabajo con geles bidimensionales es muy laborioso (Righetti *et al.*, 2004), se considera una aproximación ideal para el estudio de las isoformas de las proteínas (Rabilloud *et al.*, 2010). Los geles *zoom* son geles "caseros" que permiten una óptima separación bidimensional de las proteínas de interés por punto isoeléctrico (pI) y peso molecular (MW) (Wildgruber *et al.*, 2000). Estos geles aportaron una buena resolución a la separación electroforética a partir de suero no fraccionado de las isoformas proteicas de la Hp y la Apo A-I, las cuales poseen pI muy similares entre ellas. Al utilizar rangos de pH muy específicos, fue posible estudiar el subproteoma del suero que comprende los pI 4,7-5,7 sin la presencia de la albúmina, la proteína más abundante del suero, que posee un pI alrededor de 5,9.

Las proteínas plasmáticas de cada animal fueron separadas bidimensionalmente en geles individuales y visualizadas con el colorante azul de Coomassie. A pesar de que los geles 2-DE DIGE permiten la separación bidimensional de hasta tres muestras de manera simultánea en el mismo gel y, por lo tanto, su uso comporta la reducción del número de geles a emplear (Viswanathan *et al.*, 2006), se trata de una técnica cara para evaluar la expresión diferencial de los proteomas. El azul de Coomassie es un colorante muy económico que permite teñir las proteínas de un gel de manera reproducible y lineal, pero es menos sensible que otros métodos (Miller *et al.*, 2006).

### 3.3 iTRAQ

A diferencia de otras técnicas cuantitativas, no es aconsejable el uso de la tecnología iTRAQ en muestras muy complejas debido a su naturaleza intrínseca. Por ello, se recomienda reducir la complejidad de manera previa a su análisis (Wiese et al., 2007). Debido a los buenos resultados obtenidos en los dos trabajos anteriores, se empleó el kit ProteoMiner® para enriquecer el proteoma medio y poco abundante de varios sueros *pool* de las cerdas del segundo trabajo.

Tras la identificación de los péptidos tripticos y la cuantificación de sus marcajes isobáricos 20 proteínas fueron consideradas como candidatas, de las que solamente una, la PRDX2, coincidió con los resultados obtenidos por 2-DE DIGE. Este resultado confirma el carácter complementario que poseen estas dos técnicas semicuantitativas (Wu et al., 2006). El bajo número de identificaciones diferenciales obtenido mediante iTRAQ sería causado por el hecho de que los animales respondieron de manera diversa a la situación de estrés, tal como se ha comentado previamente. Asimismo, la técnica iTRAQ suele ofrecer *fold*s inferiores a otras técnicas cuantitativas (Ow et al., 2009). Otro factor que habría reducido el número de identificaciones diferenciales por iTRAQ sería el sesgo introducido por las dificultades encontradas durante la extracción de la muestra (Ransohoff, 2005). Los datos cuantitativos de las muestras pertenecientes a los días 3 y 5 presentaron un importante incremento de proteínas de origen celular y unos valores inferiores de las proteínas plasmáticas con respecto a los días en que la obtención de las muestras fue más fácil. La normalización de estas muestras por cantidad de proteína para su enriquecimiento y análisis por MS podría haber desviado la cuantificación relativa de las muestras. Por lo tanto, los resultados numéricos relativos a la cuantificación de los péptidos señalarían la magnitud del cambio, pero no aportarían información cuantitativa real.

### 3.4 Identificación de las PTMs por MS

El estudio de las PTMs puede ser particularmente difícil si se desconoce la modificación que posee la proteína de interés. Las PTM confieren una masa superior a los péptidos que unen, por lo que si no se conoce la modificación que contienen, el *software* utilizado es incapaz de asignar un pico del espectro de masas al péptido. En general, en los laboratorios se usa el motor de búsqueda Mascot, en el cual se fijan las modificaciones que puede haber sufrido la muestra durante su manipulación y las que se cree que la proteína puede poseer, en combinación con la base de datos Swiss-Prot o con bases de datos especializadas en PTMs como PhosphoSite o GlycoSite.

El estudio de las cadenas glucídicas con enlaces de tipo N- y O- por MS es más complicado que el estudio de otras PTMs ya que la combinación de varios azúcares puede llegar a formar estructuras de oligosacáridos o polisacáridos muy complejas (Durand and Seta, 2000). Además, éstos pueden estar modificados, como por ejemplo sializados, acetilados, fucosilados, etc. (Li et al., 2013). Para ello, se requiere el uso de equipos muy potentes (Lazar et al., 2013) y de buenas bases de datos. Sin embargo,

no existe una base de datos de carbohidratos análoga a Swiss-Prot, sino otras menos anotadas como GlycoSuite o UniCarb (Aoki-Kinoshita, 2013).

Estas técnicas son poco aplicables a la rutina clínica veterinaria y en la práctica ganadera debido a que se trata de equipos muy potentes y caros, accesibles a pocos laboratorios.

### 3.5 SRM

Por último, se puso a punto un método basado en MS para la cuantificación de cuatro APPs mediante la técnica SRM. A pesar de que es habitual el uso de ELISAs para validar los marcadores candidatos, pocos inmunoensayos comerciales presentan reactividad contra las proteínas de cerdo y los disponibles no siempre aportan información precisa, como fue el caso de los ELISAs empleados en el segundo capítulo para la determinación de la Apo A-I y la AHSG.

La mejor correlación de los resultados obtenidos por ELISA y SRM la presentó la Pig-MAP, la proteína más larga de las cuatro evaluadas. Al contrario de lo que sugeriría este resultado, el tamaño de la proteína no sería el factor limitante para obtener unos valores cuantitativos precisos, ya que el grupo de la Dra. Bendixen ha aplicado esta tecnología en la detección de proteínas pequeñas como las interleuquinas (Bislev et al., 2012). Por lo tanto, la cuantificación de las proteínas mediante SRM dependería de la selección de buenos péptidos proteotípicos y no del tamaño de la proteína.

El SRM es una técnica barata, veloz y precisa que permite el análisis de varias proteínas de manera simultánea. No obstante, se requiere una elevada inversión de capital inicial y personal técnico encargado del equipo, por lo que su uso en la práctica veterinaria habitual aún no es viable.

## **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1) A partir de los dos estudios de estrés en el alojamiento realizados proponemos que el perfil metabólico de la respuesta fisiológica de estrés en el cerdo está caracterizado por el incremento del cortisol salival, la elevada movilización de los lípidos, especialmente del colesterol, el aumento de las enzimas musculares en el suero, las variaciones en la concentración de las proteínas de fase aguda haptoglobina, Pig-MAP y apolipoproteína A-I, el desequilibrio oxidativo en el organismo y la presencia de proteínas intracelulares en el torrente sanguíneo.

2) El 2-DE DIGE reveló cambios en la concentración plasmática de distintas proteínas de fase aguda, de la peroxiredoxina 2 y de la  $\beta$ -actina tras someter los animales a un estresor.

3) La aproximación proteómica iTRAQ reflejó durante la respuesta fisiológica de estrés la activación de la respuesta de fase aguda, la existencia de estrés oxidativo en el organismo, una mayor producción de las proteínas implicadas en el plegamiento y/o la eliminación de las proteínas defectuosas y el incremento de las proteínas intracelulares en el suero.

4) Se han caracterizado mediante espectrometría de masas en tándem las cadenas glucídicas de tipo N- y O- presentes en las cuatro isoformas principales de la cadena  $\beta$  de la haptoglobina y en la cadena pesada de las inmunoglobulinas A y G. También se han analizado las isoformas de la apolipoproteína A-I, en las que se detectó la oxidación de las metioninas y los triptófanos de sus dos isoformas más ácidas y la presencia de grupos carbonilo en su isoforma más básica.

5) Durante la infección por el virus PCV2 no existieron diferencias en la expresión relativa de las cuatro isoformas de la cadena  $\beta$  ni en las dos de la cadena  $\alpha$  de la haptoglobina. Tampoco se evidenciaron cambios en el patrón de glicosilación de la haptoglobina ni de las inmunoglobulinas A y G. En cambio, se detectó mediante dos técnicas experimentales distintas un comportamiento diferente de las tres isoformas de la apolipoproteína A-I, las dos isoformas más ácidas disminuyeron mientras que la más básica, que corresponde a la preproteína, aumentó.

6) Se ha puesto a punto un método basado en SRM para la cuantificación relativa de las proteínas de fase aguda haptoglobina, Pig-MAP, apolipoproteína A-I y glicoproteína  $\alpha$ 2-Heremans Schmid. La comparación de los resultados obtenidos por SRM y mediante kits comerciales señaló que la determinación de la Pig-MAP por espectrometría de masas fue bastante precisa y que los ELISAs comerciales existentes para la valoración de la apolipoproteína A-I y la glicoproteína  $\alpha$ 2-Heremans Schmid no son útiles. El SRM puede ser una buena alternativa a la cuantificación de las proteínas porcinas mediante kits comerciales.



## REFERENCIAS



## REFERENCIAS

- Abe, M., Manola, J.B., Oh, W.K., Parslow, D.L., George, D.J., Austin, C.L., Kantoff, P.W., 2004. Plasma levels of heat shock protein 70 in patients with prostate cancer: a potential biomarker for prostate cancer. *Clin Prostate Cancer*. 3, 49–53.
- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 422, 198–207.
- Ahmad, G., Sial, G.Z.K., Ramadori, P., Dudas, J., Batusic, D.S., Ramadori, G., 2011. Changes of hepatic lactoferrin gene expression in two mouse models of the acute phase reaction. *Int J Biochem Cell Biol*. 43, 1822–32.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G., 2002. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol Cell Proteomics*. 1, 845–67.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G., Pearson, T.W., Borchers, C.H., Paulovich, A.G., Patterson, S.D., Gillette, M.A., Aebersold, R., Carr, S.A., 2009. A human proteome detection and quantitation project. *Mol Cell Proteomics*. 8, 883–6.
- Ang, I.L., Poon, T.C.W., Lai, P.B.S., Chan, A.T.C., Ngai, S.M., Hui, A.Y., Johnson, P.J., Sung, J.J.Y., 2006. Study of serum haptoglobin and its glycoforms in the diagnosis of hepatocellular carcinoma: a glycoproteomic approach. *J Proteome Res*. 5, 2691–700.
- Aoki-Kinoshita, K.F., 2013. Using databases and web resources for glycomics research. *Mol Cell Proteomics*. 12, 1036–45.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., 2004. Protein sequence databases. *Curr Opin Chem Biol*. 8, 76–80.
- Apweiler, R., Bairoch, A., Wu, C.H., Barker, W.C., Boeckmann, B., Ferro, S., Gasteiger, E., Huang, H., Lopez, R., Magrane, M., Martin, M.J., Natale, D.A., O'Donovan, C., Redaschi, N., Yeh, L.S.L., 2004. UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*. 32, D115–9.
- Apweiler, R., Hermjakob, H., Sharon, N., 1999. On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database. *Biochim Biophys Acta*. 1473, 4–8.
- Archibald, A.L., Bolund, L., Churcher, C., Fredholm, M., Groenen, M.A.M., Harlizius, B., Lee, K.T., Milan, D., Rogers, J., Rothschild, M.F., Uenishi, H., Wang, J., Schook, L.B., 2010. Pig genome sequence--analysis and publication strategy. *BMC Genomics*. 11, 438.
- Aronson, J.K., 2005. Biomarkers and surrogate endpoints. *Br J Clin Pharmacol*. 59, 491–4.
- Asleh, R., Guetta, J., Kalet-Litman, S., Miller-Lotan, R., Levy, A.P., 2005. Haptoglobin genotype- and diabetes-dependent differences in iron-mediated oxidative stress in vitro and in vivo. *Circu Res*. 96, 435–41.
- Axelrod, J., Reisine, T.D., 1984. Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*. 224, 452–9.
- Bach, A., Iglesias, C., Devant, M., Manteca, X., Calsamiglia, S., Ferret, A., Giménez, M., Saco, Y., Bassols, A., 2005. Evaluation of acute phase proteins as potential indicators of social stress in dairy cows. In: 5th International Colloquium on Animal Acute Phase Proteins. Dublin.
- Banerjee, D., Grieneringer, G., Parkes, J.L., Mukherjee, T.K., Redman, C.M., 1986. Regulation of apo-A-I processing in cultured hepatocytes. *J Biol Chem*. 261, 9844–9.

- Basu, N., Nakano, T., Grau, E.G., Iwama, G.K., 2001. The effects of cortisol on heat shock protein 70 levels in two fish species. *Gen Comp Endocrinol.* 124, 97–105.
- Beg, Z.H., Stonik, J.A., Hoeg, J.M., Demosky, S.J., Fairwell, T., Brewer, H.B., 1989. Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by covalent phosphorylation. *J Biol Chem.* 264, 6913–21.
- Bendixen, E., Danielsen, M., Hollung, K., Gianazza, E., Miller, I., 2011. Farm animal proteomics--a review. *J Proteomics.* 74, 282–93.
- Bendixen, E., Danielsen, M., Larsen, K., Bendixen, C., 2010. Advances in porcine genomics and proteomics - a toolbox for developing the pig as a model organism for molecular biomedical research. *Briefi Funct Genomics.* 9, 208–19.
- Benjamin, I.J., McMillan, D.R., 1998. Stress (heat shock) proteins: molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circ Res.* 83, 117–32.
- Bergeron, R., Bolduc, J., Ramonet, Y., Meunier-Salaun, M.C., Robert, S., 2000. Feeding motivation and stereotypies in pregnant sows fed increasing levels of fibre and/or food. *Appl Anim Behav Sci.* 70, 27–40.
- Berndt, P., Hobohm, U., Langen, H., 1999. Reliable automatic protein identification from matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric peptide fingerprints. *Electrophoresis.* 20, 3521–6.
- Bislev, S.L., Deutsch, E.W., Sun, Z., Farrah, T., Aebersold, R., Moritz, R.L., Bendixen, E., Codrea, M.C., 2012. A Bovine PeptideAtlas of milk and mammary gland proteomes. *Proteomics.* 12, 2895–9.
- Bislev, S.L., Kusebauch, U., Codrea, M.C., Beynon, R.J., Harman, V.M., Røntved, C.M., Aebersold, R., Moritz, R.L., Bendixen, E., 2012. Quantotypic properties of QconCAT peptides targeting bovine host response to *Streptococcus uberis*. *J Proteome Res.* 11, 1832–43.
- Black, P.H., 2002. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. *Brain Behav Immun.* 16, 622–53.
- Boehmer, J.L., Degrasse, J.A., Lancaster, V.A., McFarland, M.A., Callahan, J.H., Ward, J.L., 2011. Evaluation of protein expression in bovine bronchoalveolar fluid following challenge with *Mannheimia haemolytica*. *Proteomics.* 11, 3685–97.
- Boehmer, J.L., Ward, J.L., Peters, R.R., Shefcheck, K.J., McFarland, M.A., Bannerman, D.D., 2010. Proteomic analysis of the temporal expression of bovine milk proteins during coliform mastitis and label-free relative quantification. *J Dairy Sci.* 93, 593–603.
- Bojanovski, D., Gregg, R.E., Ghiselli, G., Schaefer, E.J., Light, J.A., Brewer, H.B., 1985. Human apolipoprotein A-I isoprotein metabolism: proapoA-I conversion to mature apoA-I. *J Lipid Res.* 26, 185–93.
- Bordeaux, J., Welsh, A., Agarwal, S., Killiam, E., Baquero, M., Hanna, J., Anagnostou, V., Rimm, D., 2010. Antibody validation. *BioTechniques.* 48, 197–209.
- Bornett, H.L., Morgan, C.A., Lawrence, A.B., Mann, J., 2000. The effect of group housing on feeding patterns and social behaviour of previously individually housed growing pigs. *Appl Anim Behav Sci.* 70, 127–41.
- Boschetti, E., Righetti, P.G., 2008. The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species. *J Proteomics.* 71, 255–64.

- Brewer, H.B., 1981. Current concepts of the molecular structure and metabolism of human apolipoproteins and lipoproteins. *Klin Wochenschr.* 59, 1023–35.
- Brockhausen, I., Schutzbach, J., Kuhns, W., 1998. Glycoproteins and their relationship to human disease. *Acta Anat.* 161, 36–78.
- Broom, D.M., 1986. Indicators of poor welfare. *Br Vet J.* 142, 524–6.
- Broom, D.M., 1991. Animal welfare: concepts and measurement. *J Anim Sci.* 69, 4167–75.
- Broom, D.M., 2006. Behaviour and welfare in relation to pathology. *Appl Anim Behav Sci.* 97, 73–83.
- Broom, D.M., Johnson, K.G., 1993. Stress and animal welfare., *Stress and Animal Welfare.* Springer.
- Buchanan, K.L., 2000. Stress and the evolution of condition-dependent signals. *Trends Ecol Evol.* 15, 156–60.
- Bürger, W., Fennert, E.M., Pohle, M., Wesemeier, H., 1992. C-reactive protein. A characteristic feature of health control in swine. *Zentralbl Veterinarmed A.* 39, 635–8.
- Cabana, V.G., Siegel, J.N., Sabesin, S.M., 1989. Effects of the acute phase response on the concentration and density distribution of plasma lipids and apolipoproteins. *J Lipid Res.* 30, 39–49.
- Calderwood, S.K., Mambula, S.S., Gray, P.J., Theriault, J.R., 2007. Extracellular heat shock proteins in cell signaling. *FEBS Lett.* 581, 3689–94.
- Calligaris, D., Villard, C., Lafitte, D., 2011. Advances in top-down proteomics for disease biomarker discovery. *J Proteomics.* 74, 920–34.
- Campisi, J., Leem, T.H., Fleshner, M., 2003. Stress-induced extracellular Hsp72 is a functionally significant danger signal to the immune system. *Cell Stress Chaperones.* 8, 272–86.
- Caroprese, M., Albenzio, M., Marzano, A., 2010. Relationship between cortisol response to stress and behavior, immune profile, and production performance of dairy ewes. *J Dairy Sci.*
- Carpintero, R., Piñeiro, M., Andrés, M., Iturralde, M., Alava, M.A., Heegaard, P.M.H., Jobert, J.L., Madec, F., Lampreave, F., 2005. The concentration of apolipoprotein A-I decreases during experimentally induced acute-phase processes in pigs. *Infect Immun.* 73, 3184–7.
- Ceciliani, F., Pocacqua, V., 2007. The acute phase protein alpha1-acid glycoprotein: a model for altered glycosylation during diseases. *Curr Protein Pept Sci.* 8, 91–108.
- Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Martinez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol.* 34, 85–99.
- Chait, B.T., 2006. Chemistry. Mass spectrometry: bottom-up or top-down? *Science.* 314, 65–6.
- Chen, H.H., Lin, J.H., Fung, H.P., Ho, L.L., Yang, P.C., Lee, W.C., Lee, Y.P., Chu, R.M., 2003. Serum acute phase proteins and swine health status. *Can J Vet Res.* 67, 283–90.
- Chen, J.H., Chang, Y.W., Yao, C.W., Chiueh, T.S., Huang, S.C., Chien, K.Y., Chen, A., Chang, F.Y., Wong, C.H., Chen, Y.J., 2004. Plasma proteome of severe acute respiratory syndrome analyzed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 17039–44.

- Chen, Y., Zhang, Y., Yang, P., 2010. Glycosite analysis in glycoproteomics by mass spectrometry. *Curr Proteomics*. 7, 158–67.
- Chen, Y.Y., Lin, S.Y., Yeh, Y.Y., Hsiao, H.H., Wu, C.Y., Chen, S.T., Wang, A.H.J., 2005. A modified protein precipitation procedure for efficient removal of albumin from serum. *Electrophoresis*. 26, 2117–27.
- Chilliard, Y., Bonnet, M., 2001. Leptin in ruminants. Gene expression in adipose tissue and mammary gland, and regulation of plasma concentration. *Domest Anim Endocrinol*. 21, 271–95.
- Chirase, N.K., Greene, L.W., Purdy, C.W., Loan, R.W., Auvermann, B.W., Parker, D.B., Walborg, E.F., Stevenson, D.E., Xu, Y., Klaunig, J.E., 2004. Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am J Vet Res*. 65, 860–4.
- Choudhury, S.D., Allsop, T., Passman, A., Norris, G.E., 2006. Use of a proteomics approach to identify favourable conditions for production of good quality lambskin leather. *Anal Bioanal Chem*. 384, 723–35.
- Clough, C.E., 1984. An evaluation of the farrowing crate. *Farm Build Progr*. 76, 21–6.
- Clutterbuck, A.L., Smith, J.R., Allaway, D., Harris, P., Liddell, S., Mobasher, A., 2011. High throughput proteomic analysis of the secretome in an explant model of articular cartilage inflammation. *J Proteomics*. 74, 704–15.
- Cook, N.J., Schaefer, A.L., Lepage, P., Jones, S.M., 1996. Salivary vs. serum cortisol for the assessment of adrenal activity in swine. *Can J Anim Sci*. 76, 329–335.
- Costantini, D., Marasco, V., Møller, A.P., 2011. A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *J Comp Physiol B*. 181, 447–56.
- Costantini, D., Verhulst, S., 2009. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology* 23, 506–509.
- Cottrell, J.S., 2011. Protein identification using MS/MS data. *J Proteomics*. 74, 1842–51.
- Cray, C., Zaias, J., Altman, N.H., 2009. Acute phase response in animals: a review. *Comp Med*. 59, 517–26.
- Cremschi, G.A., Gorelik, G., Klecha, A.J., Lysionek, A.E., Genaro, A.M., 2000. Chronic stress influences the immune system through the thyroid axis. *Life Sci*. 67, 3171–9.
- Curtis, S.E., 1985. What constitutes animal well-being. In: Moberg, G.P. (Ed.), *Animal Stress*. American Physiological Society, Maryland, pp. 1–14.
- Curtis, S.E., Hurst, R.J., 1989. The physical space requirement of the sow. *J Anim Sci*. 67, 1242–8.
- Dahlgren, C., Karlsson, A., Bylund, J., 2007. Measurement of respiratory burst products generated by professional phagocytes. *Methods Mol Biol*. 412, 349–63.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Colombo, R., Giustarini, D., Milzani, A., 2006. Biomarkers of oxidative damage in human disease. *Clin Chem*. 52, 601–23.

- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clin Chim Acta.* 329, 23–38.
- Dalle-Donne, I., Scaloni, A., Giustarini, D., Cavarra, E., Tell, G., Lungarella, G., Colombo, R., Rossi, R., Milzani, A., 2005. Proteins as biomarkers of oxidative/nitrosative stress in diseases: the contribution of redox proteomics. *Mass Spectrom Rev.* 24, 55–99.
- Dantzer, R., Mormède, P., 1983. Stress in farm animals: a need for reevaluation. *J Anim Sci.* 57, 6–18.
- Darwich, L., Segalés, J., Domingo, M., Mateu, E., 2002. Changes in CD4(+), CD8(+), CD4(+) CD8(+), and immunoglobulin M-positive peripheral blood mononuclear cells of postweaning multisystemic wasting syndrome-affected pigs and age-matched uninfected wasted and healthy pigs correlate with lesions and porcine ci. *Clin Diagn Lab Immunol.* 9, 236–42.
- David, J.C., Grongnet, J.F., Lalles, J.P., 2002. Weaning affects the expression of heat shock proteins in different regions of the gastrointestinal tract of piglets. *J Nutr.* 132, 2551–61.
- Day, J.L., Metcalfe, J., Simpson, C.N., 1982. Adrenergic mechanisms in control of plasma lipid concentrations. *Br Med J (Clin Res Ed.)* 284, 1145–8.
- Den Hartog, L., 2004. Developments in global pig production. *Adv Pork Prod.* 15, 17–24.
- Deussing, J.M., Würst, W., 2005. Dissecting the genetic effect of the CRH system on anxiety and stress-related behaviour. *C R Biol.* 328, 199–212.
- Dhabhar, F.S., 2009. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation.* 16, 300–17.
- Dobson, H., Smith, R.F., 2000. What is stress, and how does it affect reproduction? *Anim Reprod Sci.* 60-61, 743–52.
- Domon, B., Aebersold, R., 2006. Mass spectrometry and protein analysis. *Science.* 312, 212–7.
- Douglas, C., Bateson, M., Walsh, C., 2012. Environmental enrichment induces optimistic cognitive biases in pigs. *Appl Anim Behav Sci.* 139, 65–73.
- Duncan, I.J.H., 1981. Animal rights–animal welfare: a scientist’s assessment. *Poult Sci.* 60, 489–99.
- Durand, G., Seta, N., 2000. Protein glycosylation and diseases: blood and urinary oligosaccharides as markers for diagnosis and therapeutic monitoring. *Clin Chem.* 46, 795–805.
- Dutaud, D., Aubry, L., Henry, L., Levieux, D., Hendil, K.B., Kuehn, L., Bureau, J.P., Ouali, A., 2002. Development and evaluation of a sandwich ELISA for quantification of the 20S proteasome in human plasma. *J Immunol Methods.* 260, 183–93.
- Eckersall, P.D., Bell, R., 2010. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *Vet J.* 185, 23–7.
- Einarsson, S., Madej, A., Tsuma, V., 1996. The influence of stress on early pregnancy in the pig. *Anim Reprod Sci.* 42, 165–72.
- El-Aneed, A., Cohen, A., Banoub, J., 2009. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. *Appl Spectr Rev.* 44, 210–30.

- Elenkov, I.J., 2004. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci.* 1024, 135–46.
- Elenkov, I.J., Chrousos, G.P., 2002. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci.* 966, 290–303.
- Elliott, M.H., Smith, D.S., Parker, E., Borchers, C.H., 2009. Current trends in quantitative proteomics. *J Mass Spectrom.* 44, 1637–60.
- Emack, J., Kostaki, A., Walker, C.D., Matthews, S.G., 2008. Chronic maternal stress affects growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal function in juvenile offspring. *Horm Behav.* 54, 514–20.
- England, D.C., Spurr, D.T., 1969. Litter size of swine confined during gestation. *J Anim Sci.* 28, 220–3.
- Esteso, G., Mora, M.I., Garrido, J.J., Corrales, F., Moreno, A., 2008. Proteomic analysis of the porcine platelet proteome and alterations induced by thrombin activation. *J Proteomics.* 71, 547–60.
- European Commission, 2007. Special Eurobarometer. Attitudes of EU citizens towards animal welfare. Brussels.
- European Food Safety Authority, 2007. Scientific Opinion of the AHAW Panel: Opinion of the Scientific Panel on Animal Health and Welfare on a request from the Commission related to animal health and welfare in fattening pigs in relation to housing and husbandry. *EFSA J.* 564, 1–14.
- Evers, A.W.M., Verhoeven, E.W., Kraaijaak, F.W., De Jong, E.M., De Brouwer, S.J., Schalkwijk, J., Sweep, F.C., Van de Kerkhof, P.C., 2010. How stress gets under the skin: cortisol and stress reactivity in psoriasis. *Br J Dermatol.* 163, 986–91.
- Fang, X., Zhang, W.W., 2008. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *J Proteomics.* 71, 284–303.
- Farm Animal Welfare Council, 1979. Five Freedoms. First Press Notice. 5/12MAFF.
- Farm Animal Welfare Council, 1992. Updates the five freedoms. *Vet Rec.* 131, 357.
- Feingold, K.R., Shigenaga, J.K., Chui, L.G., Moser, A.H., Khovidhunkit, W., Grunfeld, C., 2008. Infection and inflammation decrease apolipoprotein M expression. *Atherosclerosis.* 199, 19–26.
- Femenía, T., Gómez-Galán, M., Lindskog, M., Magara, S., 2012. Dysfunctional hippocampal activity affects emotion and cognition in mood disorders. *Brain Res.* 1476, 58–70.
- Fenn, J.B., Mann, M., Meng, C.K., Wong, S.F., Whitehouse, C.M., 1989. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 246, 64–71.
- Ferguson, D.M., Warner, R.D., 2008. Have we underestimated the impact of pre-slaughter stress on meat quality in ruminants? *Meat Sci.* 80, 12–9.
- Fernández-Irigoyen, J., Santamaría, E., Sesma, L., Muñoz, J., Riezu, J.I., Caballería, J., Lu, S.C., Prieto, J., Mato, J.M., Avila, M.A., Corrales, F.J., 2005. Oxidation of specific methionine and tryptophan residues of apolipoprotein A-I in hepatocarcinogenesis. *Proteomics.* 5, 4964–72.
- Fraser, D., 2008. Understanding animal welfare. *Acta Vet Scand.* 50, S1.

- Friendship, R.M., Lumsden, J.H., McMillan, I., Wilson, M.R., 1984. Hematology and biochemistry reference values for Ontario swine. *Can J Comp Med.* 48, 390–3.
- Fuchs, E., Flügge, G., 2003. Chronic social stress: effects on limbic brain structures. *Physiol Behav.* 79, 417–27.
- Fujimura, T., Shinohara, Y., Tissot, B., Pang, P.C., Kuroguchi, M., Saito, S., Arai, Y., Sadilek, M., Murayama, K., Dell, A., Nishimura, S.I., Hakomori, S.I., 2008. Glycosylation status of haptoglobin in sera of patients with prostate cancer vs. benign prostate disease or normal subjects. *Int J Cancer.* 122, 39–49.
- Ganz, T., Lehrer, R.I., 1995. Defensins. *Pharmacol Ther.* 66, 191–205.
- Garcia, B.A., Siuti, N., Thomas, C.E., Mizzen, C.A., Kelleher, N.L., 2007. Characterization of neurohistone variants and post-translational modifications by electron capture dissociation mass spectrometry. *Int J Mass Spectr.* 259, 184–196.
- Gerber, S.A., Rush, J., Stemman, O., Kirschner, M.W., Gygi, S.P., 2003. Absolute quantification of proteins and phosphoproteins from cell lysates by tandem MS. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100, 6940–5.
- Gevaert, K., Impens, F., Ghesquière, B., Van Damme, P., Lambrechts, A., Vandekerckhove, J., 2008. Stable isotopic labeling in proteomics. *Proteomics.* 8, 4873–85.
- Gharahdaghi, F., Weinberg, C.R., Meagher, D.A., Imai, B.S., Mische, S.M., 1999. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis.* 20, 601–5.
- Ghazali, M.F., Jonsson, N., Burchmore, R.J.S., Eckersall, P.D., 2012. Biochemical and proteomic investigation of bovine nasal secretion. In: Rodrigues, P., Eckersall, P.D., Almeida, A.M. (Eds.), *Farm Animal Proteomics. Proceedings of the 3rd Managing Committee Meeting and 2nd Meeting of Working Group 1, 2 & 3 of Cost Action FA 1002.* Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands, pp. 63–6.
- Giannetto, C., Fazio, F., Casella, S., Marafioti, S., Giudice, E., Piccione, G., 2011. Acute phase protein response during road transportation and lairage at a slaughterhouse in feedlot beef cattle. *J Vet Med Sci.* 73, 1531–4.
- Gonyou, H.W., Stricklin, W.R., 1998. Effects of floor area allowance and group size on the productivity of growing/finishing pigs. *J Anim Sci.* 76, 1326–30.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R., Weiss, W., 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis.* 21, 1037–53.
- Gornik, O., Lauc, G., 2008. Glycosylation of serum proteins in inflammatory diseases. *Dis Markers.* 25, 267–78.
- Grau-Roma, L., Heegaard, P.M.H., Hjulsgaard, C.K., Sibila, M., Kristensen, C.S., Allepuz, A., Piñeiro, M., Larsen, L.E., Segalés, J., Fraile, L., 2009. Pig-major acute phase protein and haptoglobin serum concentrations correlate with PCV2 viremia and the clinical course of postweaning multisystemic wasting syndrome. *Vet Microbiol.* 138, 53–61.
- Griffin, J.F., 1989. Stress and immunity: a unifying concept. *Vet Immunol Immunopathol.* 20, 263–312.

- Groenen, M.A.M., Archibald, A.L., Uenishi, H., Tuggle, C.K., Takeuchi, Y., et al., 2012. Analyses of pig genomes provide insight into porcine demography and evolution. *Nature*. 491, 393–8.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M., Niewold, T.A., Koopmans, S.J., 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ Sci B*. 6, 1045–56.
- Gutiérrez, A.M., Nöbauer, K., Soler, L., Razzazi-Fazeli, E., Gemeiner, M., Cerón, J.J., Miller, I., 2013. Detection of potential markers for systemic disease in saliva of pigs by proteomics: a pilot study. *Vet Immunol Immunopathol*. 151, 73–82.
- Guy, P.A., Fenaille, F., 2006. Contribution of mass spectrometry to assess quality of milk-based products. *Mass Spectrom Rev*. 25, 290–326.
- Gygi, S.P., Rist, B., Gerber, S.A., Turecek, F., Gelb, M.H., Aebersold, R., 1999. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat Biotechnol*. 17, 994–9.
- Hamako, J., Matsui, T., Ozeki, Y., Mizuochi, T., Titani, K., 1993. Comparative studies of asparagine-linked sugar chains of immunoglobulin G from eleven mammalian species. *Comp Biochem Physiol B*. 106, 949–54.
- Hamdan, M.H., Righetti, P.G., 2005. *Proteomics today: protein assessment and biomarkers using mass spectrometry, 2D electrophoresis and microarray technology*, 1st Editio. ed, John Wiley & Sons. John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey.
- Han, X., Aslanian, A., Yates, J.R., 2008. Mass spectrometry for proteomics. *Curr Opin Chem Biol*. 12, 483–90.
- Hanna, J., Meides, A., Zhang, D.P., Finley, D., 2007. A ubiquitin stress response induces altered proteasome composition. *Cell*. 129, 747–59.
- Hardardóttir, I., Grünfeld, C., Feingold, K.R., 1994. Effects of endotoxin and cytokines on lipid metabolism. *Curr Opin Lipidol*. 5, 207–15.
- Hart, D.W., Wolf, S.E., Chinkes, D.L., Gore, D.C., Mlcak, R.P., Beauford, R.B., Obeng, M.K., Lal, S., Gold, W.F., Wolfe, R.R., Herndon, D.N., 2000. Determinants of skeletal muscle catabolism after severe burn. *Ann Surg*. 232, 455–65.
- Heck, A.J.R., Van den Heuvel, R.H.H., 2004. Investigation of intact protein complexes by mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev*. 23, 368–89.
- Heegaard, P.M.H., Klausen, J., Nielsen, J.P., González-Ramón, N., Piñeiro, M., Lampreave, F., Alava, M.A., 1998. The porcine acute phase response to infection with *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Haptoglobin, C-reactive protein, major acute phase protein and serum amyloid A protein are sensitive indicators of infection. *Comp Biochem Physiol B*. 119, 365–73.
- Heegaard, P.M.H., Stockmarr, A., Piñeiro, M., Carpintero, R., Lampreave, F., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Gruys, E., Sorensen, N.S., 2011. Optimal combinations of acute phase proteins for detecting infectious disease in pigs. *Vet Res*. 42, 50.
- Heegaard, P.M.H., Stockmarr, A., Sorensen, N.S., 2005. Porcine acute phase proteins in experimental models of infectious diseases. In: *Proceedings of the 5th International Colloquium on Animal Acute Phase Proteins*. p. 5.
- Hellhammer, D.H., Wüst, S., Kudielka, B.M., 2009. Salivary cortisol as a biomarker in stress research. *Psychoneuroendocrinology*. 34, 163–71.

- Hemsworth, P.H., Barnett, J.L., 1991. The effects of aversively handling pigs, either individually or in groups, on their behaviour, growth and corticosteroids. *Appl Anim Behav Sci.* 30, 61–72.
- Hirabayashi, J., 2004. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconj J.* 21, 35–40.
- Hoeg, J.M., Meng, M.S., Ronan, R., Fairwell, T., Brewer, H.B., 1986. Human apolipoprotein A-I. Post-translational modification by fatty acid acylation. *J Biol Chem.* 261, 3911–4.
- Horadagoda, N.U., Knox, K.M., Gibbs, H.A., Reid, S.W., Horadagoda, A., Edwards, S.E., Eckersall, P.D., 1999. Acute phase proteins in cattle: discrimination between acute and chronic inflammation. *Vet Rec.* 144, 437–41.
- Hortin, G.L., Sviridov, D., Anderson, N.L., 2008. High-abundance polypeptides of the human plasma proteome comprising the top 4 logs of polypeptide abundance. *Clin Chem.* 54, 1608–16.
- Hughes, B.O., Duncan, I.J.H., 1988. The notion of ethological “need”, models of motivation and animal welfare. *Anim Behav.* 36, 1696–707.
- Iio, W., Tokutake, Y., Matsukawa, N., Tsukahara, T., Chohnan, S., Toyoda, A., 2012. Anorexic behavior and elevation of hypothalamic malonyl-CoA in socially defeated rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 421, 301–4.
- Ilyin, S.E., Belkowski, S.M., Plata-Salamán, C.R., 2004. Biomarker discovery and validation: technologies and integrative approaches. *Trends Biotechnol.* 22, 411–6.
- International Human Genome Sequencing Consortium, 2004. Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature.* 431, 931–45.
- Irie, A., Suzuki, A., 1998. CMP-N-Acetylneuraminic acid hydroxylase is exclusively inactive in humans. *Biochem Biophys Res Commun.* 248, 330–3.
- Issaq, H.J., Chan, K.C., Janini, G.M., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., 2005. Multidimensional separation of peptides for effective proteomic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 817, 35–47.
- Issaq, H.J., Conrads, T.P., Janini, G.M., Veenstra, T.D., 2002. Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides. *Electrophoresis.* 23, 3048–61.
- Jain, N.C., 1993. *Essentials of Veterinary Hematology.* Williams & Wilkins, Media, PA, USA.
- Janeway Jr., C.A., Travers, P., Walport, M., Shlomchick, M.J., 2003. *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad,* 2nd ed. Masson, Barcelona, Spain.
- Janmey, P.A., Lind, S.E., 1987. Capacity of human serum to depolymerize actin filaments. *Blood.* 70, 524–30.
- Jensen, P.H., Karlsson, N.G., Kolarich, D., Packer, N.H., 2012. Structural analysis of N- and O-glycans released from glycoproteins. *Nat Protoc.* 7, 1299–310.
- Jensen, T.B., Kristenssens, A.R., Toft, N., Baadsgaard, N.P., Østergaard, S., Houe, H., 2009. An object-oriented Bayesian network modeling the causes of leg disorders in finisher herds. *Prev Vet Med.* 89, 237–48.

- Jensen, T.B., Nielsen, C.K., Vinther, J., D'Eath, R.B., 2012. The effect of space allowance for finishing pigs on productivity and pen hygiene. *Livest Sci.* 149, 33–40.
- Jersmann, H.P.A., Dransfield, I., Hart, S.P., 2003. Fetuin/alpha2-HS glycoprotein enhances phagocytosis of apoptotic cells and macropinocytosis by human macrophages. *Clin Sci.* 105, 273–8.
- Jiménez, C.R., Huang, L., Qiu, Y., Burlingame, A.L., 2001. In-gel digestion of proteins for MALDI-MS fingerprint mapping. *Curr Protoc Protein Sci.* Chapter 16, Unit 16.4.
- Joëls, M., Baram, T.Z., 2009. The neuro-symphony of stress. *Nat Rev Neurosci.* 10, 459–66.
- Joëls, M., Fernandez, G., Roozendaal, B., 2011. Stress and emotional memory: a matter of timing. *Trends Cogn Sci.* 15, 280–6.
- Johnson, R.S., Martin, S.A., Biemann, K., Stults, J.T., Watson, J.T., 1987. Novel fragmentation process of peptides by collision-induced decomposition in a tandem mass spectrometer: differentiation of leucine and isoleucine. *Anal Chem.* 59, 2621–5.
- Jones, D.P., n.d. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 8, 1865–79.
- Kaiser, G.M., Heuer, M.M., Frühauf, N.R., Kühne, C.A., Broelsch, C.E., 2006. General handling and anesthesia for experimental surgery in pigs. *J Surg Res.* 130, 73–9.
- Kalmar, B., Greensmith, L., 2009. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. *Adv Drug Deliv Rev.* 61, 310–8.
- Kaneko, J.J., Harvey, J.W., Bruss, M., 2008. *Clinical biochemistry of domestic animals.*
- Karas, M., Hillenkamp, F., 1988. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 60, 2299–301.
- Karlen, G.A.M., Hemsworth, P.H., 2007. The welfare of gestating sows in conventional stalls and large groups on deep litter. *Appl Anim Behav Sci.* 105, 87–101.
- Kawazoe, Y., Nakai, A., Tanabe, M., Nagata, K., 1998. Proteasome inhibition leads to the activation of all members of the heat-shock-factor family. *Eur J Biochem.* 255, 356–62.
- Keeney, J.T.R., Swomley, A.M., Förster, S., Harris, J.L., Sultana, R., Butterfield, D.A., 2013. Apolipoprotein A-I: Insights from redox proteomics for its role in neurodegeneration. *Proteomics Clin Appl.* 7, 109–22.
- Kelleher, N.L., 2004. Peer Reviewed: Top-Down Proteomics. *Anal Chem.* 76, 196A–203A.
- Knights, M., Smith, G.W., 2007. Decreased ACTH secretion during prolonged transportation stress is associated with reduced pituitary responsiveness to tropic hormone stimulation in cattle. *Domest Anim Endocrinol.* 33, 442–50.
- Knowles, T.G., Warriss, P.D., 2000. Stress physiology of animals during transport. In: *Livestock Handling and Transport.* pp. 312–328.
- Koch, J.M., Ramadoss, J., Magness, R.R., 2010. Proteomic profile of uterine luminal fluid from early pregnant ewes. *J Proteome Res.* 9, 3878–85.

- Kokryakov, V.N., Harwig, S.S., Panyutich, E.A., Shevchenko, A.A., Aleshina, G.M., Shamova, O. V, Korneva, H.A., Lehrer, R.I., 1993. Protegrins: leukocyte antimicrobial peptides that combine features of corticostatic defensins and tachyplesins. *FEBS Lett.* 327, 231–6.
- Kolarich, D., Jensen, P.H., Altmann, F., Packer, N.H., 2012. Determination of site-specific glycan heterogeneity on glycoproteins. *Nat Protoc.* 7, 1285–98.
- Koolhaas, J.M., 2008. Coping style and immunity in animals: making sense of individual variation. *Brain Behav Immun.* 22, 662–7.
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neurosci Biobehav Rev.* 23, 925–35.
- Korneva, E.A., Rybakina, E.G., Orlov, D.S., Shamova, O. V, Shanin, S.N., Kokryakov, V.N., 1997. Interleukin-1 and defensins in thermoregulation, stress, and immunity. *Ann N Y Acad Sci.* 813, 465–73.
- Krishna, R., World, F., 1993. Post-translational modification of proteins. In: Meister, A. (Ed.), *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology.* John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, pp. 265–298.
- Kudielka, B., Kirschbaum, C., 2007. *Biological Bases of the Stress. Stress and Addiction: Biological ....*
- Kumar, B., Manuja, A., Aich, P., 2012. Stress and its impact on farm animals. *Front Biosci (Elite Ed.)*. 4, 1759–67.
- Lambert, E.A., Lambert, G.W., 2011. Stress and its role in sympathetic nervous system activation in hypertension and the metabolic syndrome. *Curr Hypertens Rep.* 13, 244–8.
- Lampreave, F., Alava, M.A., Piñeiro, A., 1995. Lectin affinity immunoelectrophoresis of serum glycoproteins. *J Chromatogr A.* 698, 107–22.
- Lamy, E., Mau, M., 2012. Saliva proteomics as an emerging, non-invasive tool to study livestock physiology, nutrition and diseases. *J Proteomics.* 75, 4251–8.
- Lange, V., Picotti, P., Domon, B., Aebersold, R., 2008. Selected reaction monitoring for quantitative proteomics: a tutorial. *Mol Syst Biol.* 4, 222.
- Lazar, I.M., Lee, W., Lazar, A.C., 2013. Glycoproteomics on the rise: established methods, advanced techniques, sophisticated biological applications. *Electrophoresis.* 34, 113–25.
- Leach, L.M., Ellis, M., Sutton, D.S., McKeith, F.K., Wilson, E.R., 1996. The growth performance, carcass characteristics, and meat quality of halothane carrier and negative pigs. *J Anim Sci.* 74, 934–43.
- Lee, T.H., Kim, S.U., Yu, S.L., Kim, S.H., Park, D.S., Moon, H.B., Dho, S.H., Kwon, K.S., Kwon, H.J., Han, Y.H., Jeong, S., Kang, S.W., Shin, H.S., Lee, K.K., Rhee, S.G., Yu, D.Y., 2003. Peroxiredoxin II is essential for sustaining life span of erythrocytes in mice. *Blood.* 101, 5033–8.
- Leek, A.B., Sweeney, B.T., Duffy, P., Beattie, V.E., O’Doherty, J. V, 2004. The effect of stocking density and social regrouping stressors on growth performance, carcass characteristics, nutrients digestibility and physiological stress responses in. *Anim Sci.* 79, 109–120.
- Legrand, D., Ellass, E., Carpentier, M., Mazurier, J., 2005. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell Mol Life Sci.* 62, 2549–59.

- Leidhold, C., Voos, W., 2007. Chaperones and proteases--guardians of protein integrity in eukaryotic organelles. *Ann N Y Acad Sci.* 1113, 72–86.
- Li, F., Glinskii, O. V., Glinsky, V. V., 2013. Glycobioinformatics: current strategies and tools for data mining in MS-based glycoproteomics. *Proteomics.* 13, 341–54.
- Li, W.H., Tanimura, M., Luo, C.C., Datta, S., Chan, L., 1988. The apolipoprotein multigene family: biosynthesis, structure, structure-function relationships, and evolution. *J Lipid Res.* 29, 245–71.
- Liau, C.Y., Chang, T.M., Pan, J.P., Chen, W.L., Mao, S.J.T., 2003. Purification of human plasma haptoglobin by hemoglobin-affinity column chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 790, 209–16.
- Lin, H., Decuyper, E., Buyse, J., 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 144, 11–7.
- Liotta, L.A., Ferrari, M., Petricoin, E., 2003. Clinical proteomics: written in blood. *Nature.* 425, 905.
- Lu, Y., Liu, J., Lin, C., Wang, H., Jiang, Y., Wang, J., Yang, P., He, F., 2010. Peroxiredoxin 2: a potential biomarker for early diagnosis of hepatitis B virus related liver fibrosis identified by proteomic analysis of the plasma. *BMC Gastroenterol.* 10, 115.
- Lupien, S.J., McEwen, B.S., Gunnar, M.R., Heim, C., 2009. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 10, 434–45.
- Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J.* 173, 502–11.
- Mackiewicz, A., Ganapathi, M.K., Schultz, D., Kushner, I., 1987. Monokines regulate glycosylation of acute-phase proteins. *J Exp Med.* 166, 253–8.
- Mackiewicz, A., Kushner, I., Baumann, H., 1993. *Acute Phase Proteins: Molecular Biology, Biochemistry and Clinical Applications.* CRC Press INC, Boca Raton, Florida, USA.
- Mann, M., Hendrickson, R.C., Pandey, A., 2001. Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem.* 70, 437–73.
- Manteca, X., 2009. *Etología veterinaria.* Multimédica Ediciones Veterinarias.
- Manteca, X., Deag, J.M., 1993. Use of physiological measures to assess individual differences in reactivity. *Appl Anim Behav Sci.* 37, 265–70.
- Marchant, J.N., Broom, D.M., 1996. Effects of dry sow housing conditions on muscle weight and bone strength. *Anim Sci.* 62, 105–13.
- Marco-Ramell, A., Arroyo, L., Saco, Y., García-Heredia, A., Camps, J., Fina, M., Piedrafita, J., Bassols, A., 2012. Proteomic analysis reveals oxidative stress response as the main adaptative physiological mechanism in cows under different production systems. *J Proteomics.* 75, 4399–411.
- Marco-Ramell, A., Bassols, A., 2010. Enrichment of low-abundance proteins from bovine and porcine serum samples for proteomic studies. *Res Vet Sci.* 89, 340–3.

- Marco-Ramell, A., Pato, R., Peña, R., Saco, Y., Manteca, X., Ruiz de la Torre, J.L., Bassols, A., 2011. Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities. *Vet J.* 190, e66–71.
- Marin, M.F., Lord, C., Andrews, J., Juster, R.P., Sindi, S., Arsenault-Lapierre, G., Fiocco, A.J., Lupien, S.J., 2011. Chronic stress, cognitive functioning and mental health. *Neurobiol Learn Mem.* 96, 583–95.
- Maruvada, P., Wang, W., Wagner, P.D., Srivastava, S., 2005. Biomarkers in molecular medicine: cancer detection and diagnosis. *BioTechniques. Suppl.* 9–15.
- Mason, G.J., 1991. Stereotypies: a critical review. *Anim Behav.* 41, 1015–37.
- Mason, G.J., Rushen, J., 2007. *Stereotypic animal behaviour: fundamentals and applications to welfare.*, 2nd ed. CAB International, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Mathew, A., Morimoto, R.I., 1998. Role of the heat-shock response in the life and death of proteins. *Ann N Y Acad Sci.* 851, 99–111.
- McCann, S.M., Antunes-Rodrigues, J., Franci, C.R., Anselmo-Franci, J.A., Karanth, S., Rettori, V., 2000. Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Braz J Med Biol Res.* 33, 1121–31.
- McDonald, W.H., Yates, J.R., 2002. Shotgun proteomics and biomarker discovery. *Dis Markers.* 18, 99–105.
- McEwen, B.S., 2006. Stress, adaptation, and disease: Allostasis and allostatic load. *Ann N Y Acad Sci.* 840, 33–44.
- McGlone, J.J., Salak, J.L., 1993. Shipping stress and social status effects on pig performance, plasma cortisol, natural killer cell activity, and leukocyte numbers. *J Anim Sci.* 71, 888–96.
- McGlone, J.J., Vines, B., Rudine, A.C., DuBois, P., 2004. The physical size of gestating sows. *J Anim Sci.* 82, 2421–7.
- Meerlo, P., Sgoifo, A., Suchecki, D., 2008. Restricted and disrupted sleep: effects on autonomic function, neuroendocrine stress systems and stress responsivity. *Sleep Med Rev.* 12, 197–210.
- Menzel, H.J., Kladezky, R.G., Assmann, G., 1982. One-step screening method for the polymorphism of apolipoproteins A-I, A-II, and A-IV. *J Lipid Res.* 23, 915–22.
- Meunier-Salaun, M.C., Vantrimonte, M.N., Raab, A., Dantzer, R., 1987. Effect of floor area restriction upon performance, behavior and physiology of growing-finishing pigs. *J Anim Sci.* 64, 1371–7.
- Miller, I., Crawford, J., Gianazza, E., 2006. Protein stains for proteomic applications: which, when, why? *Proteomics.* 6, 5385–408.
- Miller, I., Wait, R., Sipos, W., Gemeiner, M., 2009. A proteomic reference map for pig serum proteins as a prerequisite for diagnostic applications. *Res Vet Sci.* 86, 362–7.
- Millioni, R., Tolin, S., Puricelli, L., Sbrignadello, S., Fadini, G.P., Tessari, P., Arrigoni, G., 2011. High abundance proteins depletion vs low abundance proteins enrichment: comparison of methods to reduce the plasma proteome complexity. *PLoS One.* 6, e19603.

- Miranker, A., Robinson, C. V., Radford, S.E., Dobson, C.M., 1996. Investigation of protein folding by mass spectrometry. *FASEB J.* 10, 93–101.
- Mitchell, G., Hattingh, J., Ganhao, M., 1988. Stress in cattle assessed after handling, after transport and after slaughter. *Vet Rec.* 123, 201–5.
- Moberg, G.P., 1985. *Animal stress*. American Physiological Society.
- Moberg, G.P., 2000. Biological response to stress: implications for animal welfare. In: *The Biology of Animal Stress*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, pp. 1–21.
- Moberg, G.P., Mench, J.A., 2000. *The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare*. CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, UK.
- Moore, R.E., Kirwan, J., Doherty, M.K., Whitfield, P.D., 2007. Biomarker discovery in animal health and disease: the application of post-genomic technologies. *Biomark Insights.* 2, 185–96.
- Mormède, P., Andanson, S., Aupérin, B., Beerda, B., Guémené, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Manteuffel, G., Prunet, P., Van Reenen, C.G., Richard, S., Veissier, I., 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiol Behav.* 92, 317–39.
- Möstl, E., Maggs, J.L., Schrötter, G., Besenfelder, U., Palme, R., 2002. Measurement of cortisol metabolites in faeces of ruminants. *Vet Res Commun.* 26, 127–39.
- Möstl, E., Messmann, S., Bagu, E., Robia, C., Palme, R., 1999. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Zentralbl Veterinarmed A.* 46, 621–31.
- Möstl, E., Palme, R., 2002. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol.* 23, 67–74.
- Mote, P.L., Tillman, J.B., Spindler, S.R., 1998. Glucose regulation of GRP78 gene expression. *Mech Ageing Dev.* 104, 149–58.
- Müller-Lindenlauf, M., Deittert, C., Köpke, U., 2010. Assessment of environmental effects, animal welfare and milk quality among organic dairy farms. *Livest Sci.* 128, 140–8.
- Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J.* 168, 28–40.
- Newton, R., 2000. Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax.* 55, 603–13.
- Novak, S., Smith, T.A., Paradis, F., Burwash, L., Dyck, M.K., Foxcroft, G.R., Dixon, W.T., 2010. Biomarkers of in vivo fertility in sperm and seminal plasma of fertile stallions. *Theriogenology.* 74, 956–67.
- O'Connor, T.M., O'Halloran, D.J., Shanahan, F., 2000. The stress response and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: from molecule to melancholia. *QJM.* 93, 323–33.
- Ochi, M., Tominaga, K., Tanaka, F., Tanigawa, T., Shiba, M., Watanabe, T., Fujiwara, Y., Oshitani, N., Higuchi, K., Arakawa, T., 2008. Effect of chronic stress on gastric emptying and plasma ghrelin levels in rats. *Life Sci.* 82, 862–8.
- Ohtsubo, K., Marth, J.D., 2006. Glycosylation in cellular mechanisms of health and disease. *Cell.* 126, 855–67.

- Omana, D.A., Liang, Y., Kav, N.N. V, Wu, J., 2011. Proteomic analysis of egg white proteins during storage. *Proteomics*. 11, 144–53.
- Ombrellino, M., Wang, H., Yang, H., Zhang, M., Vishnubhakat, J., Frazier, A., Scher, L.A., Friedman, S.G., Tracey, K.J., 2001. Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock*. 15, 181–5.
- Ong, S.E., Blagojev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M., 2002. Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics*. 1, 376–86.
- Ong, S.E., Mann, M., 2005. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. *Nat Chem Biol*. 1, 252–62.
- Ong, S.E., Pandey, A., 2001. An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol Eng*. 18, 195–205.
- Ow, S.Y., Salim, M., Noirel, J., Evans, C., Rehman, I., Wright, P.C., 2009. iTRAQ underestimation in simple and complex mixtures: “the good, the bad and the ugly”. *J Proteome Res*. 8, 5347–55.
- Pabst, M., Bondili, J.S., Stadlmann, J., Mach, L., Altmann, F., 2007. Mass + retention time = structure: a strategy for the analysis of N-glycans by carbon LC-ESI-MS and its application to fibrin N-glycans. *Anal Chem*. 79, 5051–7.
- Pacak, K., McCarty, R., 2009. Acute Stress Response. In: *Stress Science: Neuroendocrinology*. Academic Press, pp. 367–74.
- Pallarés, F.J., Gómez, S., Cerón, J.J., Seva, J., Ramis, M.G., Martínez-Subiela, S., Parra, M.D., Tecles, F., Martínez, J.S., Gómez, M.A., Bernabé, A., Muñoz, A., 2005. Detección de proteínas de fase aguda en cerdos afectados clínicamente por el síndrome de adelgazamiento multisistémico post-destete. *An Vet Murcia*. 159–64.
- Palme, R., Fischer, P., Schildorfer, H., Ismail, M.N., 1996. Excretion of infused <sup>14</sup>C-steroid hormones via faeces and urine in domestic livestock. *Anim Reprod Sci*. 43, 43–63.
- Parra, M.D., Fuentes, P., Tecles, F., Martínez-Subiela, S., Martínez, J.S., Muñoz, A., Cerón, J.J., 2006. Porcine acute phase protein concentrations in different diseases in field conditions. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. 53, 488–93.
- Pedernera, M., Celi, P., García, S.C., Salvin, H.E., Barchia, I., Fulkerson, W.J., 2010. Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture. *Vet J*. 186, 352–7.
- Pervanidou, P., Chrousos, G.P., 2011. Stress and obesity/metabolic syndrome in childhood and adolescence. *Int J Pediatr Obes*. 6 Suppl 1, 21–8.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*. 35, 163–87.
- Picard, B., Berri, C., Lefaucheur, L., Molette, C., Sayd, T., Terlouw, C., 2010. Skeletal muscle proteomics in livestock production. *Briefi Funct Genomics*. 9, 259–78.
- Pieper, R., Gatlin, C.L., Makusky, A.J., Russo, P.S., Schatz, C.R., Miller, S.S., Su, Q., McGrath, A.M., Estock, M.A., Parmar, P.P., Zhao, M., Huang, S.T., Zhou, J., Wang, F., Esquer-Blasco, R., Anderson, N.L., Taylor, J., Steiner, S., 2003. The human serum proteome: display of nearly 3700

- chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins. *Proteomics*. 3, 1345–64.
- Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Andrés, M., Lorenzo, E., Del Pozo, M., Alava, M.A., Lampreave, F., 2009. Pig-MAP and haptoglobin concentration reference values in swine from commercial farms. *Vet J*. 179, 78–84.
- Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Carpintero, R., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Alava, M.A., Lampreave, F., 2007. Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal*. 1, 133–9.
- Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Lampreave, F., 2007. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet J*. 173, 669–74.
- Pollard, T.D., Cooper, J.A., 1986. Actin and actin-binding proteins. A critical evaluation of mechanisms and functions. *Annu Rev Biochem*. 55, 987–1035.
- Pratt, J.M., Simpson, D.M., Doherty, M.K., Rivers, J., Gaskell, S.J., Beynon, R.J., 2006. Multiplexed absolute quantification for proteomics using concatenated signature peptides encoded by QconCAT genes. *Nat Protoc*. 1, 1029–43.
- Rabilloud, T., Chevallet, M., Luche, S., Lelong, C., 2010. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Past, present and future. *J Proteomics*. 73, 2064–77.
- Rahman, Q., Abidi, P., Afaq, F., Schiffmann, D., Mossman, B.T., Kamp, D.W., Athar, M., 1999. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit Rev Toxicol*. 29, 543–68.
- Raju, T.S., Briggs, J.B., Borge, S.M., Jones, A.J., 2000. Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*. 10, 477–86.
- Ramírez-Boo, M., Núñez, E., Jorge, I., Navarro, P., Fernandes, L.T., Segalés, J., Garrido, J.J., Vázquez, J., Moreno, A., 2011. Quantitative proteomics by 2-DE, 16O/18O labelling and linear ion trap mass spectrometry analysis of lymph nodes from piglets inoculated by porcine circovirus type 2. *Proteomics*. 11, 3452–69.
- Ransohoff, D.F., 2005. Bias as a threat to the validity of cancer molecular-marker research. *Nat Rev Cancer*. 5, 142–9.
- Rappsilber, J., Mann, M., 2002. What does it mean to identify a protein in proteomics? *Trends Biochem Sci*. 27, 74–8.
- Reiche, E.M. V, Nunes, S.O. V, Morimoto, H.K., 2004. Stress, depression, the immune system, and cancer. *Lancet Oncol*.
- Reichel, C., 2011. OMICS-strategies and methods in the fight against doping. *Forensic Sci Int*. 213, 20–34.
- Remesar, X., Fernández-López, J.A., Alemany, M., 1993. Steroid hormones and the control of body weight. *Med Res Rev*. 13, 623–631.
- Ren, D., Pipes, G.D., Liu, D., Shih, L.Y., Nichols, A.C., Treuheit, M.J., Brems, D.N., Bondarenko, P. V, 2009. An improved trypsin digestion method minimizes digestion-induced modifications on proteins. *Anal Biochem*. 392, 12–21.

- Rhee, S.G., Kang, S.W., Chang, T.S., Jeong, W., Kim, K., 2001. Peroxiredoxin, a novel family of peroxidases. *IUBMB Life*. 52, 35–41.
- Riad-Fahmy, D., Read, G.F., Walker, R.F., Griffiths, K., 1982. Steroids in saliva for assessing endocrine function. *Endocr Rev*. 3, 367–95.
- Rifai, N., Gillette, M.A., Carr, S.A., 2006. Protein biomarker discovery and validation: the long and uncertain path to clinical utility. *Nat Biotechnol*. 24, 971–83.
- Righetti, P.G., Castagna, A., Antonucci, F., Piubelli, C., Cecconi, D., Campostrini, N., Antonioli, P., Astner, H., Hamdan, M.H., 2004. Critical survey of quantitative proteomics in two-dimensional electrophoretic approaches. *J Chromatogr A*. 1051, 3–17.
- Rizzo, A., Roscino, M.T., Binetti, F., Sciorsci, R.L., 2012. Roles of reactive oxygen species in female reproduction. *Reprod Domest Anim*. 47, 344–52.
- Robinson, C.E., Keshavarzian, A., Pasco, D.S., Frommel, T.O., Winship, D.H., Holmes, E.W., 1999. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem*. 266, 48–57.
- Romero, M.L., Butler, L.K., 2007. Endocrinology of stress. *Int J Comp Physicol*. 20, 89–95.
- Roncada, P., Begni, B., Amadori, M., Cristoni, S., Archetti, I.L., Boldetti, C., Fortin, R., Deriu, F., Greppi, G.F., 2007. Blood serum proteome for welfare evaluation in pigs. *Vet Res Commun*. 31 Suppl 1, 321–5.
- Rozen, A.W., Tsuma, V.T., Magnusson, U., 1995. Effects of short-term restraint stress on plasma concentrations of catecholamines, beta-endorphin, and cortisol in gilts. *Am J Vet Res*. 56, 1225–7.
- Rose, J.K.C., Bashir, S., Giovannoni, J.J., Jahn, M.M., Saravanan, R.S., 2004. Tackling the plant proteome: practical approaches, hurdles and experimental tools. *Plant J*. 39, 715–33.
- Ross, P.L., Huang, Y.N., Marchese, J.N., Williamson, B.L., Parker, K., Hattan, S., Khainovski, N., Pillai, S., Dey, S., Daniels, S., Purkayastha, S., Juhasz, P., Martin, S., Bartlet-Jones, M., He, F., Jacobson, A., Pappin, D.J., 2004. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics*. 3, 1154–69.
- Rossi, R., Milzani, A., Dalle-Donne, I., Giustarini, D., Lusini, L., Colombo, R., Di Simplicio, P., 2002. Blood glutathione disulfide: in vivo factor or in vitro artifact? *Clin Chem*. 48, 742–53.
- Russell, E., Koren, G., Rieder, M., Van Uum, S., 2012. Hair cortisol as a biological marker of chronic stress: Current status, future directions and unanswered questions. *Psychoneuroendocrinology*. 37, 589–601.
- Rygula, R., Abumaria, N., Flügge, G., Fuchs, E., Rütger, E., Havemann-Reinecke, U., 2005. Anhedonia and motivational deficits in rats: impact of chronic social stress. *Behav Brain Res*. 162, 127–34.
- Sabban, E.L., 2007. Catecholamines in stress: molecular mechanisms of gene expression. *Endocr Regul*. 41, 61–73.
- Saco, Y., Docampo, M.J., Fàbrega, E., Manteca, X., Diestre, A., Lampreave, F., Bassols, A., 2003. Effect of transport stress on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Anim Welfare*. 12, 403–9.
- Saco, Y., Fina, M., Giménez, M., Pato, R., Piedrafita, J., Bassols, A., 2008. Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows. *Vet J*. 177, 439–41.

- Samali, A., Orrenius, S., 1998. Heat shock proteins: regulators of stress response and apoptosis. *Cell Stress Chaperones*. 3, 228–36.
- Sauerwein, H., Schmitz, S., Hiss, S., 2005. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox Rep*. 10, 295–302.
- Schägger, H., Von Jagow, G., 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*. 199, 223–31.
- Schiess, R., Wollscheid, B., Aebersold, R., 2009. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Mol Oncol*. 3, 33–44.
- Schmidt, W.E., Stevenson, J.S., Davis, D.L., 1985. Reproductive traits of sows penned individually or in groups until 35 days after breeding. *J Anim Sci*. 60, 755–9.
- Schrøder-Petersen, D.L., Simonsen, H.B., 2001. Tail biting in pigs. *Vet J*. 162, 196–210.
- Scientific Veterinary Committee, 1997. The welfare of intensively kept pigs. Report of the Scientific Veterinary Committee. Brussels.
- Segalés, J., Piñeiro, C., Lampreave, F., Nofrarías, M., Mateu, E., Calsamiglia, M., Andrés, M., Morales, J., Piñeiro, M., Domingo, M., 2004. Haptoglobin and pig-major acute protein are increased in pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Vet Res*. 35, 275–82.
- Segalés, J., Sitjar, M., Domingo, M., Dee, S., Del Pozo, M., Noval, R., Sacristan, C., De las Heras, A., Ferro, A., Latimer, K.S., 1997. First report of post-weaning multisystemic wasting syndrome in pigs in Spain. *Vet Rec*. 141, 600–1.
- Selye, H., 1956. *The stress of life*. McGraw-Hill.
- Selye, H., n.d. A syndrome produced by diverse noxious agents.
- Seng, P.M., Laporte, R., 2005. Animal welfare: the role and perspectives of the meat and livestock sector. *Rev Sci Tech*. 24, 613–23.
- Shang, F., Taylor, A., 2011. Ubiquitin-proteasome pathway and cellular responses to oxidative stress. *Free Rad Biol Med*. 51, 5–16.
- Shetlar, M., 1961. Serum glycoproteins: Their origin and significance. *Ann N Y Acad Sci*. 94, 44–54.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 68, 850–8.
- Simon, S.L.R., Lamoureux, L., Plews, M., Stobart, M., LeMaistre, J., Ziegler, U., Graham, C., Czub, S., Groschup, M., Knox, J.D., 2008. The identification of disease-induced biomarkers in the urine of BSE infected cattle. *Proteome Sci*. 6, 23.
- Simpson, R.J., Bernhard, O.K., Greening, D.W., Moritz, R.L., 2008. Proteomics-driven cancer biomarker discovery: looking to the future. *Curr Opin Chem Biol*. 12, 72–7.
- Soares, R., Franco, C., Pires, E., Ventosa, M., Palhinas, R., Koci, K., De Almeida, A.M., Varela Coelho, A., 2012. Mass spectrometry and animal science: protein identification strategies and particularities of farm animal species. *J Proteomics*. 75, 4190–206.

- Soler, L., Luyten, T., Stinckens, A., Buys, N., Cerón, J.J., Niewold, T.A., 2011. Serum amyloid A3 (SAA3), not SAA1 appears to be the major acute phase SAA isoform in the pig. *Vet Immunol Immunopathol.* 141, 109–15.
- Somiari, R.I., Somiari, S., Russell, S., Shriver, C.D., 2005. Proteomics of breast carcinoma. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 815, 215–25.
- Sorden, S.D., 2000. Update on porcine circovirus and postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Swi Health Prod.* 8, 133–6.
- Sorensen, N.S., Tegtmeier, C., Andresen, L.O., Piñeiro, M., Toussaint, M.J.M., Campbell, F.M., Lampreave, F., Heegaard, P.M.H., 2006. The porcine acute phase protein response to acute clinical and subclinical experimental infection with *Streptococcus suis*. *Vet Immunol Immunopathol.* 113, 157–68.
- Steel, D.M., Whitehead, A.S., 1994. The major acute phase reactants: C-reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunol Today.* 15, 81–8.
- Steinberg, D.A., Hurst, M.A., Fujii, C.A., Kung, A.H., Ho, J.F., Cheng, F.C., Loury, D.J., Fiddes, J.C., 1997. Protegrin-1: a broad-spectrum, rapidly microbicidal peptide with in vivo activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 41, 1738–42.
- Stephoe, A., Brydon, L., 2005. Associations between acute lipid stress responses and fasting lipid levels 3 years later. *Health Psychol.* 24, 601–7.
- Sticker, L.S., Thompson, D.L., Bunting, L.D., Fernandez, J.M., DePew, C.L., 1995. Dietary protein and(or) energy restriction in mares: plasma glucose, insulin, nonesterified fatty acid, and urea nitrogen responses to feeding, glucose, and epinephrine. *J Anim Sci.* 73, 136–44.
- Stolba, A., Wood-Gush, D.G.M., 1989. The behaviour of pigs in a semi-natural environment. *Anim Prod.* 48, 419–25.
- Stossel, T.P., Chaponnier, C., Ezzell, R.M., Hartwig, J.H., Janmey, P.A., Kwiatkowski, D.J., Lind, S.E., Smith, D.B., Southwick, F.S., Yin, H.L., 1985. Nonmuscle actin-binding proteins. *Annu Rev Cell Biol.* 1, 353–402.
- Strosberg, A.D., 1993. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. *Protein Sci.* 2, 1198–209.
- Swanson, S.K., Washburn, M.P., 2005. The continuing evolution of shotgun proteomics. *Drug Discov Today.* 10, 719–25.
- Takahashi, M., 2012. Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos. *J Reprod Dev.* 58, 1–9.
- Taylor, L., Friend, T., Smith, L.A., 1988. Effect of housing on in situ postures of gestating gilts. *Appl Anim Behav Sci.* 19, 265–72.
- Thamsborg, S.M., Roepstorff, A., Larsen, M., 1999. Integrated and biological control of parasites in organic and conventional production systems. *Vet Parasitol.* 84, 169–86.
- Thiede, B., Höhenwarter, W., Krah, A., Mattow, J., Schmid, M., Schmidt, F., Jungblut, P.R., 2005. Peptide mass fingerprinting. *Methods.* 35, 237–47.

- Tirumalai, R.S., Chan, K.C., Prieto, D.A., Issaq, H.J., Conrads, T.P., Veenstra, T.D., 2003. Characterization of the low molecular weight human serum proteome. *Mol Cell Proteomics*. 2, 1096–103.
- Tsigos, C., Chrousos, G.P., 2002. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *J Psychosom Res*. 53, 865–71.
- Umeda, T., Hiramatsu, R., Iwaoka, T., Shimada, T., Miura, F., Sato, T., 1981. Use of saliva for monitoring unbound free cortisol levels in serum. *Clin Chim Acta*. 110, 245–53.
- Ursing, B.M., Arnason, U., 1998. The complete mitochondrial DNA sequence of the pig (*Sus scrofa*). *J Mol Evol*. 47, 302–6.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J., 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 39, 44–84.
- Van den Bergh, G., Clerens, S., 2003. Reversed-phase high-performance liquid chromatography prefractionation prior to two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry identifies. *Electrophoresis*. 24, 1471–81.
- Van Stegeren, A., Rohleder, N., Everaerd, W., Wolf, O.T., 2006. Salivary alpha amylase as marker for adrenergic activity during stress: effect of betablockade. *Psychoneuroendocrinology*. 31, 137–41.
- Verkerk, G.A., Phipps, A.M., Carragher, J.F., Matthews, L.R., Stelwagen, K., 1998. Characterization of milk cortisol concentrations as a measure of short-term stress responses in lactating dairy cows. *Anim Welfare*. 7, 77–86.
- Vieuille-Thomas, C., Le Pape, G., Signoret, J.P., 1995. Stereotypies in pregnant sows: indications of influence of the housing system on the patterns expressed by the animals. *Appl Anim Behav Sci*. 44, 19–27.
- Viswanathan, S., Unlü, M., Minden, J.S., 2006. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc*. 1, 1351–8.
- Volek, J.S., Kraemer, W.J., 1996. Creatine supplementation: its effect on human muscular performance and body composition. *J Strength Condit Res*. 10, 200–10.
- Von Borell, E.H., 2001. The biology of stress and its application to livestock housing and transportation assessment. *J Anim Sci*. 79, 260–7.
- Von Borell, E.H., Dobson, H., Prunier, A., 2007. Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs. *Horm Behav*. 52, 130–8.
- Von Keyserlingk, M.A.G., Rushen, J., De Passillé, A.M., Weary, D.M., 2009. Invited review: The welfare of dairy cattle--key concepts and the role of science. *J Dairy Sci*. 92, 4101–11.
- Wang, Y., Shan, T., Xu, Z., Liu, J., Feng, J., 2006. Effect of lactoferrin on the growth performance, intestinal morphology, and expression of PR-39 and protegrin-1 genes in weaned piglets. *J Anim Sci*. 84, 2636–41.
- Webster Marketon, J.I., Glaser, R., 2008. Stress hormones and immune function. *Cell Immunol*. 252, 16–26.
- Wernersson, R., Schierup, M.H., Jørgensen, F.G., Gorodkin, J., Panitz, F., Staerfeldt, H.H., Christensen, O.F., Mailund, T., Hornshøj, H., Klein, A., Wang, J., Liu, B., Hu, S., Dong, W., Li, W., Wong, G.K.S., Yu,

- J., Bendixen, C., Fredholm, M., Brunak, S., Yang, H., Bolund, L., 2005. Pigs in sequence space: a 0.66X coverage pig genome survey based on shotgun sequencing. *BMC Genomics*. 6, 70.
- Westermeier, R., 2005. IEF in Immobilized pH Gradients. In: *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations, Fourth Edition*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, FRG, p. 406.
- White, P., Cooke, N., 2000. The multifunctional properties and characteristics of vitamin D-binding protein. *Trends Endocrinol Metab*. 11, 320–7.
- Whiteaker, J.R., Lin, C., Kennedy, J., Hou, L., Trute, M., Sokal, I., Yan, P., Schoenherr, R.M., Zhao, L., Voytovich, U.J., Kelly-Spratt, K.S., Krasnoselsky, A., Gafken, P.R., Hogan, J.M., Jones, L.A., Wang, P., Amon, L., Chodosh, L.A., Nelson, P.S., McIntosh, M.W., Kemp, C.J., Paulovich, A.G., 2011. A targeted proteomics-based pipeline for verification of biomarkers in plasma. *Nat Biotechnol*. 29, 625–34.
- Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyer, H.E., Warscheid, B., 2007. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics*. 7, 340–50.
- Wildgruber, R., Harder, A., Obermaier, C., Boguth, G., Weiss, W., Fey, S.J., Larsen, P.M., Görg, A., 2000. Towards higher resolution: two-dimensional electrophoresis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins using overlapping narrow immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 21, 2610–6.
- Wilkins, M., 2009. Proteomics data mining. *Expert Rev Proteomics*. 6, 599–603.
- Wolters, D.A., Washburn, M.P., Yates, J.R., 2001. An automated multidimensional protein identification technology for shotgun proteomics. *Anal Chem*. 73, 5683–90.
- Wu, W.W., Wang, G., Baek, S.J., Shen, R.F., 2006. Comparative study of three proteomic quantitative methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, using 2D gel- or LC-MALDI TOF/TOF. *J Proteome Res*. 5, 651–8.
- Yan, H., Hancock, R.E., 2001. Synergistic interactions between mammalian antimicrobial defense peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 45, 1558–60.
- Yang, D., Chertov, O., Oppenheim, J.J., 2001. The role of mammalian antimicrobial peptides and proteins in awakening of innate host defenses and adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci*. 58, 978–89.
- Yang, F., Yin, Y., Wang, F., Zhang, L., Wang, Y., Sun, S., 2010. An altered pattern of liver apolipoprotein A-I isoforms is implicated in male chronic hepatitis B progression. *J Proteome Res*. 9, 134–43.
- Yates, J.R., 2000. Mass spectrometry. From genomics to proteomics. *Trends Genet*. 16, 5–8.
- Yates, J.R., Ruse, C.I., Nakorchevsky, A., 2009. Proteomics by mass spectrometry: approaches, advances, and applications. *Annu Rev Biomed Eng*. 11, 49–79.
- Yoon, S.J., Park, S.Y., Pang, P.C., Gallagher, J., Gottesman, J.E., Dell, A., Kim, J.H., Hakomori, S.I., 2010. N-glycosylation status of beta-haptoglobin in sera of patients with prostate cancer vs. benign prostate diseases. *Int J Oncol*. 36, 193–203.
- Zhang, S., Shu, H., Luo, K., Kang, X., Zhang, Y., Lu, H., Liu, Y., 2011. N-linked glycan changes of serum haptoglobin  $\beta$  chain in liver disease patients. *Mol Biosyst*. 7, 1621–8.
- Zhu, W., Smith, J.W., Huang, C.M., 2010. Mass spectrometry-based label-free quantitative proteomics. *J Biomed Biotechnol*. 2010, 840518.

Zimny-Arndt, U., Schmid, M., Ackermann, R., Jungblut, P.R., 2009. Classical proteomics: two-dimensional electrophoresis/MALDI mass spectrometry. In: *Methods in Molecular Biology*. pp. 65–91.

## APÉNDICES



## APÉNDICE 1

### Interpretación del resto de resultados obtenidos por iTRAQ

#### 1) Proteínas de unión a la actina

Se detectó en el suero el aumento de dos proteínas de unión a la actina los días posteriores al cambio de alojamiento, la cofilina y la tropomiosina. En condiciones fisiológicas la cofilina y la tropomiosina regulan sus niveles recíprocamente debido a que comparten la misma diana molecular (Kuhn and Bamburg, 2008), mientras que en procesos inflamatorios serían sobreexpresadas:

- El óxido nítrico induciría el incremento de los niveles de la cofilina y su migración desde el citoplasma hasta la membrana plasmática en los fagocitos, neutrófilos y macrófagos, donde promovería la fagocitosis y el estallido respiratorio (Adachi *et al.*, 2000).
- La concentración de la tropomiosina aumentaría en respuesta al TGF- $\beta$  con el objetivo de modular la motilidad celular (Bakin *et al.*, 2004).

#### 2) Respuesta inmune y estrés oxidativo

Se detectaron un aumento de varias proteínas implicadas en la respuesta inmune y en la defensa antioxidante del organismo:

- El factor de barrera para la autointegración es un mecanismo de defensa nuclear que impediría la replicación vírica en la célula huésped (Wiebe and Traktman, 2007).
- La galectina-1 es una proteína que se expresa en la membrana plasmática de los linfocitos T con capacidad de unión a los glicanos de la pared celular de los agentes patógenos (Rabinovich and Toscano, 2009).
- No existe bibliografía acerca la función biológica de la secernina 3. En cambio, otros miembros de la familia secernina están mejor caracterizados. Por ejemplo, la secernina 1 está implicada en la estimulación del proceso de exocitosis en los mastócitos (Way *et al.*, 2002).
- La enzima intracelular glutamato-cisteína participa en la síntesis del antioxidante glutatión (Chen *et al.*, 2005).

#### 3) Otras proteínas

Por último, estas proteínas también variaron sus niveles:

- La disminución de la ATP sintasa podría estar relacionada con su oxidación (Choksi *et al.*, 2004) debido a que las proteínas mitocondriales son dianas preferentes de las moléculas ROS y de sus productos de oxidación (Sweetlove *et al.*, 2002).

- Las citoquinas proinflamatorias rompen el equilibrio resorción-formación en el hueso, en favor de la resorción (Tanaka *et al.*, 2005), mediante la estimulación de varias moléculas, como por ejemplo el factor estimulante 1 del osteoclasto (Chu *et al.*, 2005). Como consecuencia, aumenta la susceptibilidad a sufrir alteraciones óseas (Teitelbaum, 2000).
- La miocilina (Myoc) es una proteína citoplasmática de función aún no confirmada. Se expresa principalmente en el ojo, aunque también en otros tejidos como músculo esquelético, timo o tiroides (Tamm *et al.*, 1999). En condiciones patológicas (Sohn *et al.*, 2002), oxidativas (Caballero *et al.*, 2003) o estresantes para la célula (Wang *et al.*, 2007), los niveles de la Myoc truncada o mal procesada aumentarían en el interior de la célula y su secreción sería menor.
- Poco se conoce sobre la proteína 2 con dominio LIM y similar al antígeno de senescencia (LIMS2), Se ha descrito que interaccionaría con la quinasa ligada a integrina participaría en la modulación de la adhesión de las células a la matriz extracelular (Zhang *et al.*, 2002).

## APÉNDICE 2

### Posición de los péptidos proteotípicos en la secuencia proteica

#### > Haptoglobina

1 MRALGAVVAL LLCGQLFAAE TGNEATDATD DSCPKEPEIP KGYVEHMVRY HCQTYYKLRT 60  
61 AGDGVYTLDS NKQWTNKVTG EKLPECEAVC GKPKNPVDQV QRIMGGSLDA KGSFPWQAKM 120  
121 ISHHNLTSGA TLINEQWLLT TAKNLRLGHK NDTKAKDIAP TLRLYVGKKQ EVEIEKVIFH 180  
181 PDNSTVDIGL IKLKQKVPVN ERVMPICLPS KDYVNVGLVG YVSGWGRNAN LNFTEHLKYV 240  
241 MLPVADQEK C VQYYEGSTVP EKKTPKSPVG VQPILNEHTF CAGLSKYQED TCYGDAGSAF 300  
301 AVHDKDDDTW YAAGILSFDK SCRTAEYGVY VRVTSILDWI QTTIADN 346

#### > Pig-MAP

1 MKTLSPGTGYG LLLVLPLLLA VLQSTTAHKN DINIYSLTVD SKVSSRFAHT VVTSRVVNGK 60  
61 SAVQEATFQM ELPKAFITN FSMIDGVTY PGNIEKAKAA QEQYSAVARG ESAGLVRATG 120  
121 RKTEQFQVAV SVAPAAKVTF ELVYEELLAR HLGVEYELLLK IQPQQLVKHL QMDIHIFEPQ 180  
181 GISFLETEST FMTNELAEAL TISQNKTKAH IRFKPTLSQQ QKSPEQOETV LDGNFIVRYD 240  
241 VNRTVTGGSI QIENGYFVHY FAPEVWSAIP KNVIFVIDTS GSMRGRKIQQ TREALIKILG 300  
301 DLGSRDQFNL VSFSGEAPRR RAVAASAENV EEAKSYAAEI HAQGGTNIND AMLMAVQLLE 360  
361 RANREELLPA RSVTFIILLT DGDPTVGETN PSKIQKNVRE AIDGQHSLFC LGFGFVDPYA 420  
421 FLEKMALENG GLARRIYEDS DSALQLEDFY QEVANPLLRL VAFEYPSNAV EEVTQDNFRL 480  
481 FFKGSELVVA GKLRDQSPDV LSAKVRGQLH MENVTFVMES RVAEQEAEFL SPKYIFHSFM 540  
541 ERLWAYLTIQ QLLAQTVSAS DAEKKALEAR ALSLSLNYSF VTPLTSMVIT KPEGQEQSQV 600  
601 AEKPVENGR QGNTHSGHSS FQFHSGVDRS SRLTGGSSVD PVFSHRRGWK GQAQGFQKMS 660  
661 YLPPRLGPPG PLQPTRFSHP FSRITLDRVL PEVLSVPDET SHDMDSRIIG ATIPPPPPARI 720  
721 QAPSVILPLP GQSVQQLCVD LKHSQGPVKL LSDPGQGVV TGHYEREKAR FSWIEVTFKH 780  
781 PPLQVRASLE HIVVIRNRQS SAYKWKETLY SVMPLKITM DKAGLLLLSS PNRVTIGLLS 840  
841 WDGPGKGLRL LLRDTDFHSS QISGTFGQFY QDVVWGPPAA ADDSKRTVTV QGHDHSATRE 900  
901 LKLDYQEGSP GKEISCWTVV L 921

#### > Apolipoproteína A-I

1 MKAVVLTAV LFLTGSQARH FWQQDDPQSP WDRVKDFATV YVDAIKDSGR DYVAQFEASA 60  
61 LGKHLNLKLL DNWDSLSTF TKVREQLGPV TQEFWDNLEK ETEALRQEMS KDLEEVKKKV 120  
121 OPYLDDFQNK WQEEMETYRQ KMAPLGAEFR EGARQKVQEL QEKLSPLAE LRDRLRAHVE 180  
181 ALRQHVAPYS DDLRQRMAAR FEALKEGGGS LAEYQAKAQE QLKALGEKAK PALEDLRQGL 240  
241 LPVLENLKVS ILAAIDEASK KLNAQ 265

> Glicoproteína  $\alpha$ -2-Heremans Schmid  
1 LILFFCLAQL WGCRAVPHGP ILGYREPACD DVETEQAALA AVDYINKHLP RGYKHTLNQV 60  
61 DSVKVVPRRP AGEVFDIEID TLETTCHVLD PTPLANCSVR QLTEHAVEGD CDFHVLKQDG 120  
121 QFSVLFKCD SSPDSAEDVH KVCPCPLLA PLNDSRVVHA AESALAAFNA QSNGSYLQLV 180  
181 EISRAQLVPL SASVSVEFAV AVTDCVAKA YSPTKCNLLV EKQYGFCKGT VTAKVNEEDV 240  
241 AVTCTVFQTQ PVVLQPQAG ADAGATPVVD AAATASPLAD VPAASLVVGP MVVAVPPGIP 300  
301 PVHRSHYDLR HSFSGVASVE SASGEAFHVG KTPKGAQPSI PAADGSVPVW RPCPGRIRHF 360  
361 KI 362

**Figura 47.** Posición de los péptidos proteotípicos en la secuencia de su proteína



## Enrichment of low-abundance proteins from bovine and porcine serum samples for proteomic studies

Anna Marco-Ramell, Anna Bassols\*

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 8 March 2010

#### Keywords:

Proteomics  
Bovine  
Porcine  
Serum  
Electrophoresis  
DIGE

### ABSTRACT

One of the main applications of serum proteomics is the identification of new biomarkers for animal disease or animal production. However, potential obstacles to these studies are the poor performance of affinity serum depletion methods based on human antigens when using animal samples, and loss of minor serum components bound to albumin and other proteins. In the present study, we have analyzed the efficiency and reproducibility of the ProteoMiner® beads with bovine and porcine serum samples, and compared to a traditional immunoaffinity-based albumin and IgG depletion system specific for human samples. The ProteoMiner kit is based on the use of a combinatorial peptide binding library and intends to enrich low-abundance proteins.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Proteomics is a rapidly emerging technology with a large range of applications, including veterinary sciences. The identification of new biomarkers for diagnosis or for monitoring the general status of an individual is one of the main potential applications for proteomics and already new potential markers have been identified in human medicine. In this kind of analysis, serum is potentially the most valuable biological sample, because it contains thousands of different proteins and peptides and it is the most easily accessible, noninvasive, and widely collected sample (Adkins et al., 2002). Unfortunately, the protein content of serum is dominated by a handful of high-abundance proteins, with their estimated concentration exceeding the low-abundance proteins highly by 10 orders of magnitude (Anderson and Anderson, 2002).

To detect these proteins present in low levels using currently available technologies, it is advisable to remove the most abundant proteins first. Many strategies have been developed for the selective removal of albumin and other high-abundance proteins to facilitate the analysis of other, less abundant proteins in serum (Fang and Zhang, 2008). Albumin and other major proteins can be removed by immunoaffinity approaches, IgY microbeads (Sepro®) or other commercial reagents (Fang and Zhang, 2008). Among the protein–ligand affinity-based approaches are the removal of IgG by using immobilized protein A or protein G (Fang and Zhang, 2008), the Affibody® ligands (Gronwall et al., 2007), the use of lectin affinity columns to capture or enrich serum glycoproteins (Hirabayashi, 2004) or the depletion of some plasma proteins by heparin chromatography (Lei et al., 2008).

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1042; fax: +34 93 581 2006.  
E-mail address: [anna.bassols@uab.cat](mailto:anna.bassols@uab.cat) (A. Bassols).

Furthermore, it is well known that albumin and other proteins may also act as transport proteins and thus are likely to bind many species of interest, such as peptide hormones, cytokines, and chemokines (Sahab et al., 2007). As such, the affinity-based depletion systems may also eliminate some other proteins bound to those highly-copied proteins simultaneously, in a process of co-depletion (Granger et al., 2005). Thus, it has been described that during human serum albumin depletion, another 815 species were co-depleted and that, when capturing IgGs, another 2091 species were co-depleted (Boschetti and Righetti, 2008). Recently, a new method for enriching low-abundance proteins has been commercially available. This technology is known under the trade name of ProteoMiner® and it is based on the use of a combinatorial peptide binding library, which affinity-captures and amplifies the low-abundance proteome (Boschetti and Righetti, 2008).

Proteomics constitutes an interesting approach to veterinary medicine and animal production (Doherty et al., 2008). In this sense, porcine and bovine livestock are the most interesting species due to their economical interest. Surprisingly, there are very few applications of serum proteomics to veterinary science. The bovine serum 2-DE map has been published (Wait et al., 2002; Talamo et al., 2003; D'Ambrosio et al., 2005) and some applications into the physiopathological changes described (Cairoli et al., 2006). The serum pig proteome has only been recently reported (Miller et al., 2008). Many of the most used methodologies for depletion of abundant proteins are based in an immunological approach and, thus, they have a high specificity for human or laboratory animal proteins (Echan et al., 2005). The ProteoMiner technology, since it is not based on an immunological approach, should be species independent, and thus of potential application

to samples of veterinary interest. Veterinary applications will thus benefit from a simple method to enrich for low-abundance proteins.

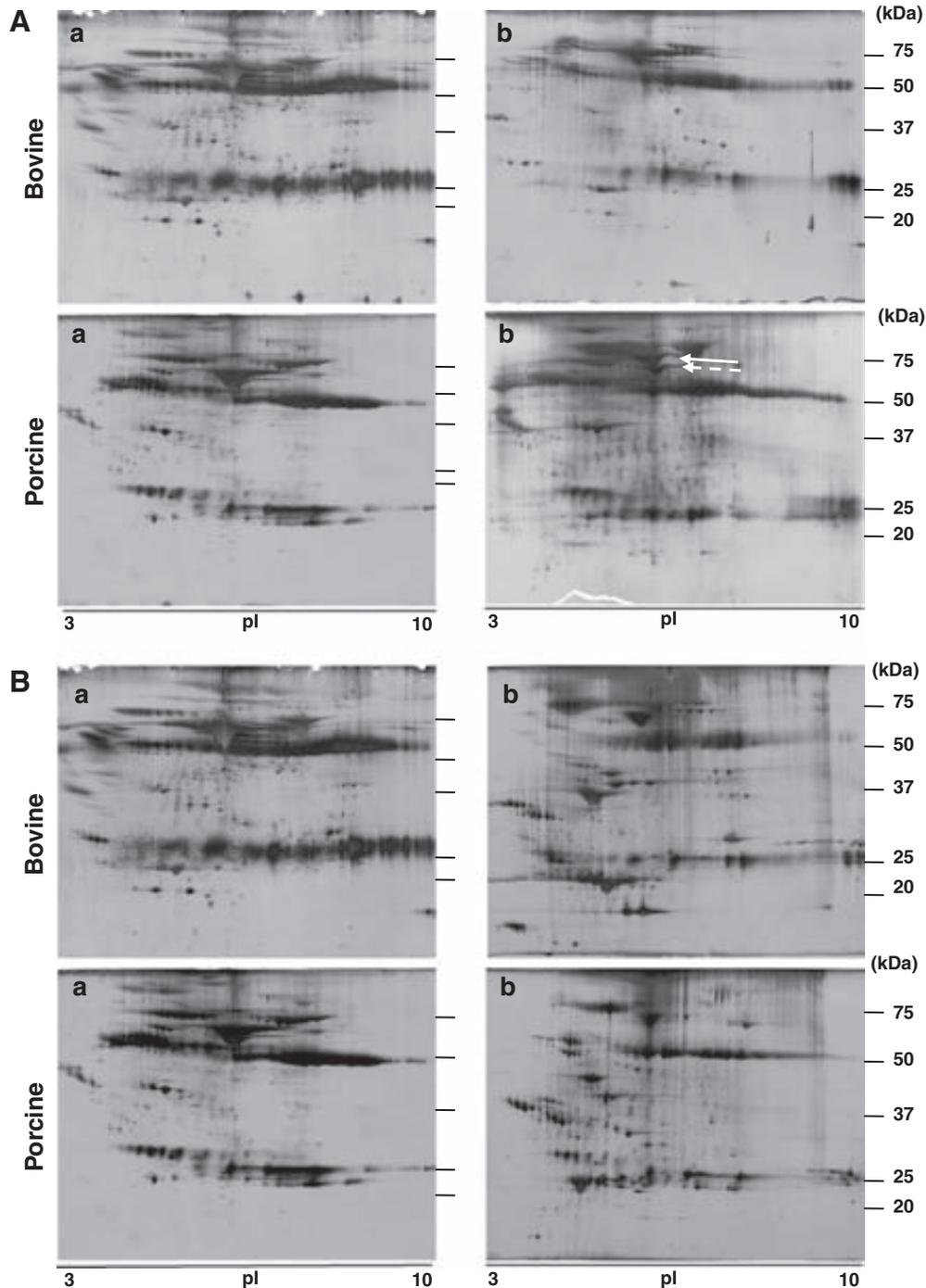
The objective of the present work was to analyze the efficiency and reproducibility of the ProteoMiner system with bovine and porcine serum samples.

Blood was collected from the coccygeal vein in a Holstein cow and from the cava vein in a Duroc × (Landrace × Large White) pig in a vacutainer tube with no added chemicals. Special care was taken to avoid any cause of hemolysis. After coagulation, ser-

um was separated by centrifugation at 2000 g for 10 min, pooled and maintained at –80 °C until analysis.

Serum samples were fractionated with two commercial kits: Albumin and IgG Removal kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and ProteoMiner beads (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). In both cases, the protocol suggested by the manufacturer was followed. In the case of ProteoMiner, a relationship 1:10 (mg protein:μl resin) was used to optimize the yield of the procedure.

After fractionation, serum samples were desalted using the 2-D Clean Up kit (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Samples were



**Fig. 1.** (A) Two-dimensional electrophoresis of bovine and porcine serum proteins after depletion with the albumin and IgG removal reagent: (a) control, non-depleted serum; (b) unbound fraction (depleted serum). Albumin (white arrow) and hemopexin (dashed arrow) are marked in porcine samples. (B) Two-dimensional electrophoresis of bovine and porcine serum after treatment with the ProteoMiner beads: (a) control, non-depleted serum and (b) bound fraction (*enriched* serum).

resuspended in 8 M urea, 2% CHAPS (w/v), 18 mM DTT, 1% ampholytes (v/v) and bromophenol blue (silver stained gels) or 30 mM Tris-HCl, 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (w/v), 1% DTT (w/v), 1% ampholytes (v/v) and bromophenol blue (DIGE gels), and sonicated to dissolve protein aggregates (15 s, 0.5 cycles/s, 40% amplitude). Protein concentration was determined by using the RC DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). For silver stained gels, 150 µg protein were diluted in 8 M urea, 2% CHAPS (w/v), 18 mM DTT, 1% ampholytes (v/v) and bromophenol blue until a final volume of 150 µL. For DIGE gels, 50 µg protein of each sample were labeled with Cy2, Cy3 and Cy5 fluorochromes (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA) and diluted with 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS (w/v), 1% DTT (w/v), 1% ampholytes (v/v) and bromophenol blue until a final volume of 150 µL. Isoelectrofocusing was performed on Immobiline DryStrips (pH 3–10, 24 cm length) in an Ettan IPGphor II Isoelectric Focusing System (both from GE Healthcare) under reducing and denaturing conditions: a step of 70 V for 7 h, a gradient of 500 V for 1 h, a gradient of 1000 V for 1 h, a gradient of 4000 V for 1 h, a gradient of 8000 V for 1 h and a step of 8000 V until reaching 60,000 Vhr (silver stained gels) or a step of 300 V for 5 h, a gradient of 1000 V for 6 h, a gradient of 8000 V for 3 h and a step of 8000 V for 5:40 h (DIGE gels). After the first dimension, strips were reduced and alkylated with 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol (v/v), 2% SDS (w/v) and bromophenol blue, in two steps of 15 min with 1% DTT (w/v) and 2.5% iodoacetamide (w/v), respectively. The second dimension was performed with home-made 12.5% polyacrylamide gels on the Ettan Dalt Six (GE Healthcare) at 3 W/gel for 30 min and 17.5 W/gel for 5 h. Protein staining was performed with silver (Berkelman and Stenstedt, 1998) and scanned with Image Scanner III (GE Healthcare). DIGE gels were scanned using a Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare): excitation/emission wavelengths for Cy2, Cy3, and Cy5 were 488/520, 532/580, and 633/670 nm, respectively. Relative protein quantification across all samples was performed using Progenesis SameSpots software (Nonlinear, Newcastle upon Tyne, UK).

1-DE was performed using 50 µg protein per lane with home-made 12.5% polyacrylamide gels and run at 3 W/gel for 30 min and 17 W/gel for 3 h. Gels were stained with silver and scanned as described above. Densitometry was performed with the Multi Gauge software (Fujifilm, Tokyo, Japan).

### 1. Efficiency of Albumin and IgG Removal kit and ProteoMiner

To assess the efficiency of the Albumin and IgG Removal kit, which is based on the immunoaffinity depletion using high affinity antibodies for the human proteins, bovine and porcine serum samples were incubated with this reagent. As seen in Fig. 1A, a large amount of these proteins remained in the serum sample, in contrast to a depletion efficiency reported for human samples higher than 95% for albumin and 90% for IgGs (GE data-sheet). Results were better in porcine than in bovine samples, specially regarding albumin, since in the case of porcine serum it was possible to visualize hemopexin, which is usually masked by albumin due to their similar molecular masses and isoelectric points (see Fig. 1A). Furthermore, despite its supposed specificity, many other proteins were also depleted by this immunoaffinity method, especially in bovine samples, probably because they may bind albumin, or bind non-specifically to the immunoaffinity-based resin.

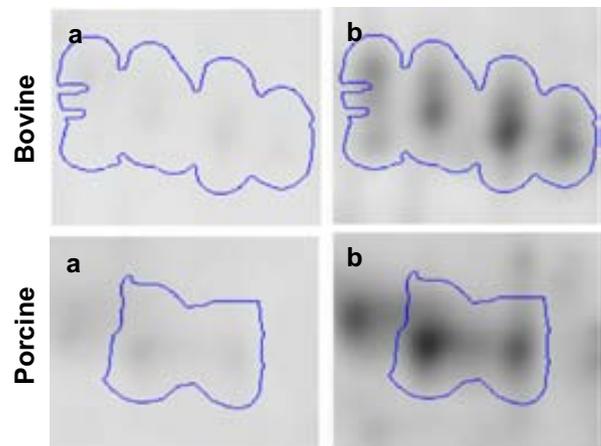
After treatment with the ProteoMiner system, based on a combinatorial ligand library, a substantial enrichment of the low-abundance proteins was achieved and new spots were detected, whereas albumin and the light and heavy chains of immunoglobulins were less represented (Fig. 1B). These reagents

are based on the affinity binding of all kind of proteins and thus they intend to capture and amplify the low-abundance proteome.

### 2. Enrichment of low-abundant proteins by using ProteoMiner

To better quantify the enrichment obtained with the ProteoMiner system, a DIGE labeling experiment was performed. Two technical serum replicates were used as control or treated with ProteoMiner, and labeled with Cy2 or Cy5 fluorophores, respectively. In the DIGE methodology, samples are run together in the same gel and, consequently, the different amount of protein present in a specific spot in both samples can be defined without ambiguity and quantified. Gels were analyzed with the Progenesis SameSpots image analysis software and the volumes of each spot were obtained. As shown in Fig. 2, low-abundance proteins were enriched after ProteoMiner treatment of the sample. For example,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein was increased 3.4-fold in bovine and 3.2-fold in porcine samples, whereas transthyretin was amplified 3.5-fold in bovine and 2.8-fold in porcine samples. In contrast, high-abundance proteins as albumin and immunoglobulins heavy chain were less represented (3.7 and 2.7-fold decrease in bovine and 3.9 and 2.8-fold in porcine samples, respectively) (not shown).

#### A $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein



#### B Transthyretin

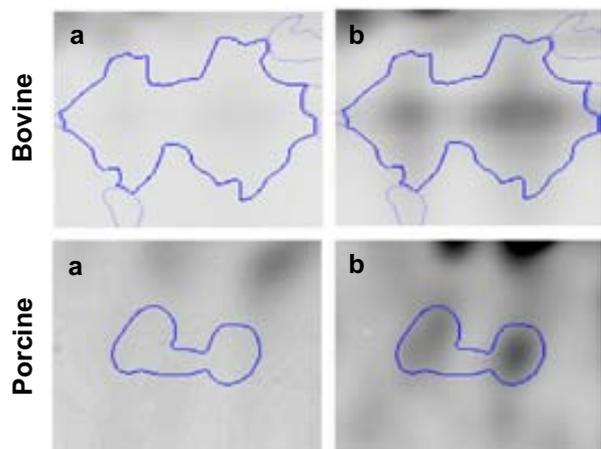
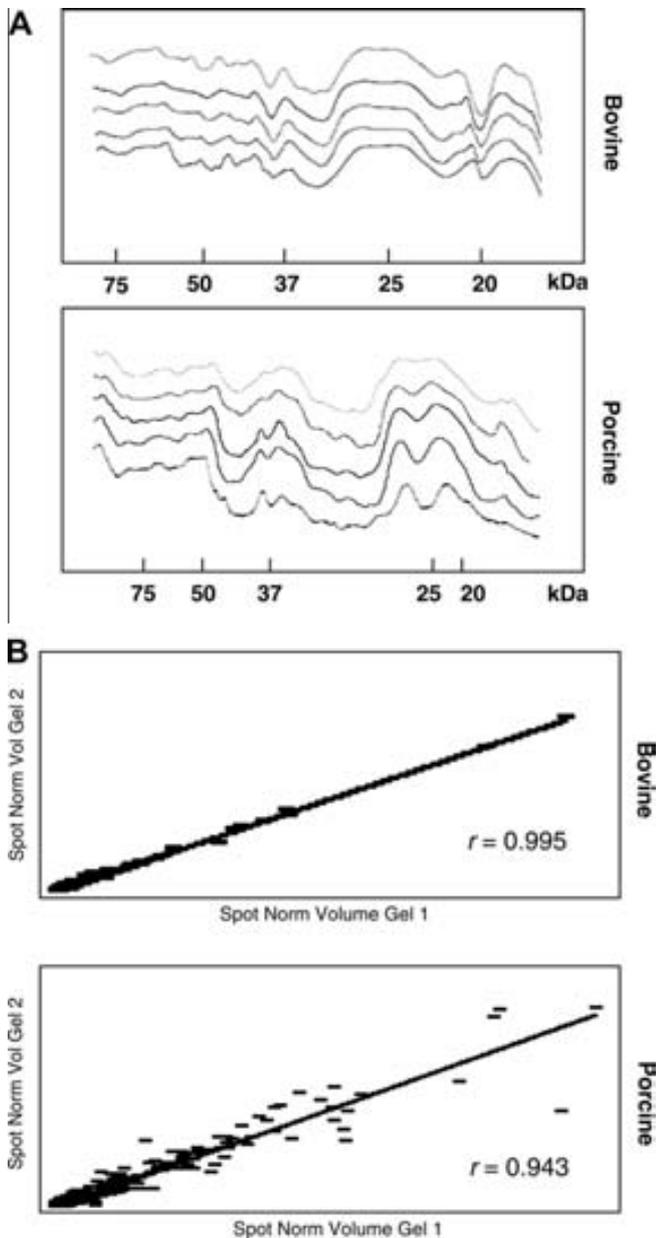


Fig. 2. Examples of the enrichment of low-abundant proteins with ProteoMiner beads in bovine and porcine serum samples: (a) control serum; (b) ProteoMiner-treated serum.



**Fig. 3.** Reproducibility analysis of protein enrichment achieved with the ProteoMiner beads on bovine and porcine samples. (A) Densitometry of five technical replicates after one-dimensional SDS-PAGE. (B) Correlation analysis of two technical replicates after DIGE. Normalized volumes for each spot were used.

### 3. Reproducibility of ProteoMiner

Reproducibility is necessary for accurate downstream analysis. To assess this characteristic in the ProteoMiner system, five technical serum replicates from bovine and porcine samples were prepared and run in monodimensional gels. Densitometry of each lane was performed with the Multi Gauge software. As seen in Fig. 3A, the ProteoMiner system presented good reproducibility.

A complementary approach to this issue was performed with DIGE gels. Two technical serum replicates were labeled with Cy3 and Cy5 fluorophores and run in the same bidimensional gel in order to avoid inter-gel and silver-staining variations. Gels were analyzed with the Progenesis SameSpots image analysis software and the normalized volumes for each spot were obtained and plotted.

Results showed a good correlation ( $r = 0.995$  for bovine and  $r = 0.943$  for porcine samples) (Fig. 3B).

These results clearly demonstrate that the ProteoMiner system is useful for bovine and porcine serum samples. While this is not a depletion method to remove high-abundance proteins, like others used for human biomarker identification, the ProteoMiner treatment would allow to detect more proteins that escape from detection when using non-treated samples. This kind of strategies should widen the number of applications in serum animal proteomics.

### Acknowledgements

We gratefully acknowledge Dr. I. Miller for critical comments on the manuscript. We thank A. Vilalta for her excellent technical assistance. We are extremely grateful to Dr. F. Canals, M. Monge and N. Colomé (Servei de Proteòmica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, Spain) and Dr. M. Carrascl (Servei de Proteòmica, CSIC-UAB). This work was funded by Grant AGL2006-02364/GAN from the Spanish "Ministerio de Educación y Ciencia" and Grant 2009SGR-1091 from the Generalitat de Catalunya. Part of the funding was financed by the FEDER program from the European Union. A.M.-R. is recipient of a fellowship from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia.

### References

- Adkins, J.N., Varnum, S.M., Auberry, K.J., Moore, R.J., Angell, N.H., Smith, R.D., Springer, D.L., Pounds, J.G., 2002. Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 947–955.
- Anderson, N.L., Anderson, N.G., 2002. The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 845–867.
- Berkelman, T., Stenstedt, T., 1998. 2-D Electrophoresis. Principles and Methods. GE Biosciences, Uppsala, Sweden.
- Boschetti, E., Righetti, P.G., 2008. The ProteoMiner in the proteomic arena: a non-depleting tool for discovering low-abundance species. *J. Proteomics* 71, 255–264.
- Cairolì, F., Battocchio, M., Veronesi, M.C., Brambilla, D., Conserva, F., Eberini, I., Wait, R., Gianazza, E., 2006. Serum protein pattern during cow pregnancy: acute-phase proteins increase in the peripartum period. *Electrophoresis* 27, 1617–1625.
- D'Ambrosio, C., Arena, S., Talamo, F., Ledda, L., Renzone, G., Ferrara, L., Scaloni, A., 2005. Comparative proteomic analysis of mammalian animal tissues and body fluids: bovine proteome database. *J. Chromatogr. B* 815, 157–168.
- Doherty, M.K., Beynon, R.J., Whitfield, P.D., 2008. Proteomics and naturally occurring animal diseases: opportunities for animal and human medicine. *Proteomics. Clin. Appl.* 2, 135–141.
- Echan, L.A., Tang, H.Y., Ali-Khan, N., Lee, K., Speicher, D.W., 2005. Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 5, 3292–3303.
- Fang, X., Zhang, W.W., 2008. Affinity separation and enrichment methods in proteomic analysis. *J. Proteomics* 71, 284–303.
- Granger, J., Siddiqui, J., Copeland, S., Remick, D., 2005. Albumin depletion of human plasma also removes low abundance proteins including the cytokines. *Proteomics* 5, 4713–4718.
- Gronwall, C., Sjöberg, A., Ramström, M., Høiden-Guthenberg, I., Hober, S., Jonasson, P., Stahl, S., 2007. Affibody-mediated transferrin depletion for proteomics applications. *Biotechnol. J.* 2, 1389–1398.
- Hirabayashi, J., 2004. Lectin-based structural glycomics: glycoproteomics and glycan profiling. *Glycoconjugate J.* 21, 35–40.
- Lei, T., He, Q.Y., Wang, Y.L., Si, L.S., Chiu, J.F., 2008. Heparin chromatography to deplete high-abundance proteins for serum proteomics. *Clin. Chim. Acta* 388, 173–178.
- Miller, I., Wait, R., Sipos, W., Gemeiner, M., 2008. A proteomic reference map for pig serum proteins as a prerequisite for diagnostic applications. *Res. Vet. Sci.* 86, 362–367.
- Sahab, Z.J., Iczkowski, K.A., Sang, Q.X., 2007. Anion exchange fractionation of serum proteins versus albumin elimination. *Anal. Biochem.* 368, 24–32.
- Talamo, F., D'Ambrosio, C., Arena, S., Del Vecchio, P., Ledda, L., Zehender, G., Ferrara, L., Scaloni, A., 2003. Proteins from bovine tissues and biological fluids: defining a reference electrophoresis map for liver, kidney, muscle, plasma and red blood cells. *Proteomics* 3, 440–460.
- Wait, R., Miller, I., Eberini, I., Cairolì, F., Veronesi, C., Battocchio, M., Gemeiner, M., Gianazza, E., 2002. Strategies for proteomics with incompletely characterized genomes: the proteome of *Bos taurus* serum. *Electrophoresis* 23, 3418–3427.



Contents lists available at ScienceDirect

The Veterinary Journal

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/tvj](http://www.elsevier.com/locate/tvj)

## Identification of serum stress biomarkers in pigs housed at different stocking densities <sup>☆</sup>

A. Marco-Ramell <sup>a</sup>, R. Pato <sup>a</sup>, R. Peña <sup>a</sup>, Y. Saco <sup>a</sup>, X. Manteca <sup>b</sup>, J.L. Ruiz de la Torre <sup>b</sup>, A. Bassols <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain*

<sup>b</sup> *Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Barcelona, Spain*

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Accepted 5 January 2011

#### Keywords:

Acute phase proteins  
Housing density  
Pig  
Proteomics  
Oxidative stress

### ABSTRACT

Eight Duroc × (Landrace × Large White) male pigs housed at a stocking rate of 0.50 m<sup>2</sup>/pig were subjected to a higher stocking rate of 0.25 m<sup>2</sup>/pig (higher density, HD) for two 4-day periods over 26 days. Using biochemical and proteomic techniques serum and plasma samples were examined to identify potential biomarkers for monitoring stress due to HD housing.

HD housed pigs showed significant differences ( $P < 0.001$ ) in total cholesterol and low density lipoprotein-associated cholesterol, as well as in concentrations of the pig-major acute phase protein (Pig-MAP) ( $P = 0.002$ ). No differences were observed in serum cortisol or other acute phase proteins such as haptoglobin, C-reactive protein or apolipoprotein A-I. HD-individuals also showed an imbalance in redox homeostasis, detected as an increase in the level of oxidized proteins measured as the total plasma carbonyl protein content ( $P < 0.001$ ) with a compensatory increase in the activity of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase ( $P = 0.012$ ).

Comparison of the serum proteome yielded a new potential stress biomarker, identified as actin by mass spectrometry. Cluster analysis of the results indicated that individuals segregated into two groups, with different response patterns, suggesting that the stress response depended on individual susceptibility.

© 2011 Elsevier Ltd. All rights reserved.

### Introduction

Animal welfare problems are ethically important and may also lead to considerable financial losses. Unfortunately, objective laboratory criteria to evaluate animal stress are lacking. Behavioural and physiological markers are commonly used, but these parameters may increase for reasons unrelated to stress (Levine, 1985) and are relatively difficult to employ with a large number of animals. Although a number of plasma components have been proposed as stress biomarkers, there are inherent problems in their practical use and interpretation as they lack specificity and there are an insufficient number of validation studies. For example, cortisol (which is commonly used) has an episodic release pattern leading to a high inter- and intra-individual variation (Mormede et al., 2007).

Acute phase proteins (APPs) are plasma proteins considered to be markers of inflammation that have been proposed as indicators for farm animal stress monitoring (Petersen et al., 2004; Murata,

2007). There are several reports on the validity of APPs as stress markers. In pigs, increased pig-major acute phase protein (Pig-MAP), haptoglobin and C-reactive protein (CRP) concentrations have been described after long distance transport (Saco et al., 2003; Piñeiro et al., 2007b; Salamano et al., 2008) and after changes in the pattern of food administration (Piñeiro et al., 2007a). In cattle, an increase in APPs has been described after road transport and in early weaning (Arthington et al., 2003, 2005; Qiu et al., 2007). Oxidative stress parameters have also been proposed as stress markers in goats, pigs, cattle and chickens (Chirase et al., 2004; Sauerwein et al., 2005; Lin et al., 2006; Burke et al., 2009; Celi et al., 2010), but data for pigs are scarce. Proteomic techniques have been widely used to identify new biomarkers as it is possible to obtain global information about the protein composition of a biological sample (Doherty et al., 2008; Penque, 2009).

The objective of the present study was to assess the validity of traditional stress biomarkers in pigs housed at different densities. Housing protects animals from adverse weather conditions, but insufficient space will induce a repeated state of stress that alters the activity of the pituitary–adrenal axis, behaviour and reproduction (Kornegay and Nolter, 1984; Kuhlert et al., 1985; Meunier-Salaun et al., 1987). We also wished to identify new potential stress biomarkers by using a proteomic approach.

<sup>☆</sup> This article is available only in the online version of this issue of *The Veterinary Journal* at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/10900233>

\* Corresponding author. Tel.: +34 93 581 1042; fax: +34 93 581 2006.

E-mail address: [anna.bassols@uab.cat](mailto:anna.bassols@uab.cat) (A. Bassols).

## Materials and methods

### Animal handling

Eight Duroc × (Landrace × Large White) male pigs (18–20 kg bodyweight) were housed in a pen with a slatted floor at a density of 0.50 m<sup>2</sup>/pig (100 kg/m<sup>2</sup>, lower density, LD) at day 1, and the density was changed to 0.25 m<sup>2</sup>/pig (200 kg/m<sup>2</sup>, higher density, HD) for two 4-day periods over 26 days by moving the fence (Fig. 1). The 15-day interval before the first space restriction was considered an appropriate period to reduce the psychological and physiological effects associated with transport and new housing (Aich et al., 2007).

The animals were housed at the Servei de Granges Experimentals on the UAB Campus, fed with standard feed according to INRA (Institut National de la Recherche Agronomique, France) recommendations and given free access to feed and water. They did not display any relevant clinical signs during the study and no visible signs of anomalous fighting or skin injuries were detected throughout the study.

The experiment received prior approval from the Local Ethical Committee for Animal Experimentation of the Institution. The treatment, housing and husbandry conditions conformed to European Union Guidelines (The Council of the European Communities, 1986).

### Collection and selection of samples

Blood samples were collected by cava venepuncture in 10 mL tubes (Eurotubo) without anticoagulant (for serum) or with EDTA-K<sub>3</sub> as anticoagulant (for plasma) on selected days (Fig. 1). Serum and plasma were obtained by centrifugation at 2000 g for 10 min at room temperature and frozen at –80 °C until assay.

For the proteomic and 2-D immunoblotting experiments, we selected two representative sampling days: the LD sample was taken on day 19, and the HD sample on day 25, when the animals had grown and the effects of crowding had become greater.

### Analytical parameters

Cholesterol (CHOP-PAP-method), high density lipoprotein (HDL)-cholesterol (Immunoinhibition method), low density lipoprotein (LDL)-cholesterol (Selective protection method), triglycerides (GPO-PAP method) and creatine kinase (CK, IFCC method) were determined using the Olympus System Reagents (Olympus Diagnostica). Methods for HDL- and LDL-cholesterol were previously adapted to porcine samples (Saco et al., 2000). Non-esterified fatty acids (NEFAs) were determined with NEFA-C reagent (Wako Chemicals), 3-hydroxybutyrate with Ranbut (Randox Laboratories) and glutathione peroxidase (GPx) activity with Ransel (Randox Laboratories). Haptoglobin was determined with the Phase Haptoglobin kit (Tridelta) and C-reactive protein (CRP) with a commercial immunoturbidimetric method (Olympus System Reagent, OSRG147) validated for porcine samples (Saco et al., 2010). All assays were performed in an Olympus AU400 analyser. Pig-MAP concentrations were assessed with an ELISA kit (PigChamp ProEuropa). Cortisol was analysed using a competitive ELISA assay (Cortisol ELISA SLV-2930, DRG Diagnostics). All parameters were analysed in duplicate.

### Immunoblotting

For Pig-MAP, apolipoprotein A-I (ApoA-I) and actin detection, 25 µg of serum proteins were resolved under reducing conditions (SDS-PAGE) and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore). Membranes were blotted with polyclonal antibody directed against Pig-MAP, ApoA-I and actin, washed and further probed with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated immunoglobulin (GE Healthcare). Antibody binding was visualized by chemiluminescence (ECL, GE Healthcare). Densitometry was performed with the Multi Gauge software (Fujifilm).

Anti-porcine Pig-MAP and anti-porcine ApoA-I were kindly provided by Dr. M. Piñeiro (PigChamp ProEuropa) and Dr. F. Lampreave (University of Zaragoza, Spain), and anti-actin was from Santa Cruz.

### Carbonyl detection by Western blot

For mono-dimensional carbonyl protein content detection, 80 µg of plasma protein were derivatized with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and resolved under reducing conditions (Levine et al., 2000). For bi-dimensional detection, 150 µg of plasma proteins were focused on 24 cm pH 3–10 strips, derivatized

with 2,4-DNPH, reduced with DTT (1,4-dithiothreitol, USB) and alkylated with IAA (iodoacetamide, Sigma) and resolved under reducing conditions (Dalle-Donne et al., 2003). Anti-DNP (dinitrophenol, Sigma) and HRP-conjugated immunoglobulin were used to reveal the blots. Visualization by chemiluminescence and densitometry were performed as described above.

### Differential gel electrophoresis (DIGE) and mass spectrometry (MS)

To characterize potential new serum biomarkers, a bi-dimensional electrophoresis was run to identify proteins which differentially expressed in serum samples from LD and HD pigs. The four pigs that showed the greatest analytical variation between days 19 and 25 (pigs 0, 1, 2 and 5) were chosen and gels were run individually. Serum samples were desalted with the 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare). Fifty micrograms of each sample were labelled with Cy2, Cy3 or Cy5 Dye DIGE Fluors (GE Healthcare). Dye-swapping was performed in order to avoid any possible bias introduced by labelling efficiency. The labelled protein samples were focused on 24 cm pH 4–7 strips and resolved under reducing conditions. Gels were scanned using a Typhoon 9400 Variable Mode Imager (GE Healthcare).

Relative protein quantitation was performed using DeCyder software (GE Healthcare) and Progenesis SameSpots (Nonlinear). Computer-aided image analysis was performed to normalize intensities and to define differentially expressed proteins between samples, with a paired *t* test. Protein spots of interest were excised from the gel using an automated Spot Picker (GE Healthcare). In-gel trypsin digestion was performed as described (Shevchenko et al., 1996). Tryptic digests were purified using ZipTip microtitre plates (Millipore). Matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS) analysis of tryptic peptides was performed on an Ultraflex TOF-TOF Instrument (Bruker). Proteins were identified by peptide mass fingerprint using the Mascot 2.2 program (Matrix Science Ltd.) and the Swiss-Prot 55.4 database. Proteins were also identified by ion trap mass spectrometry as described (Esseleens et al., 2008).

### Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS statistical package v 17.0. Normality of data was tested using the one-sample Kolmogorov–Smirnov test. Data were analysed by one-way ANOVA and differences between group means were evaluated with the Duncan test. Differences between groups (days 19 and 25) were analysed with a paired-samples *t* test. Pearson correlation coefficients were calculated between variables.

For cluster analysis, ratios between concentrations at days 25 and 19 were calculated for the specified parameters to normalize them for each individual and software tools developed for genomic expression analysis were used. Data were hierarchically clustered (average linkage clustering, centred correlation) by means of the Cluster (v3.0) software and visualized with TreeView (v1.60).

## Results

### General biochemical profile in high-density housed pigs

Data corresponding to days 15–26 were used for statistical analysis. Most parameters were not affected by changes in the density of housing. Serum cholesterol increased in the second period of HD housing ( $P < 0.001$ ), when the animals had grown and the density in kg/m<sup>2</sup> would have been higher (Fig. 2A). During this second period, LDL-cholesterol increased ( $P < 0.001$ ), whereas cholesterol associated with HDL-particles was not altered ( $P = 0.280$ ). Other markers of lipid metabolism, such as serum triglycerides, 3-hydroxybutyrate and NEFAs, were not altered by HD housing. CK, which is a marker for skeletal muscle damage, was not affected ( $P = 0.530$ ).

### Cortisol and acute phase proteins in high-density housed pigs

Serum cortisol was not altered in HD conditions ( $P = 0.456$ ), though there was significant individual variation. Pig-MAP increased in the second period of HD housing, whereas haptoglobin and CRP

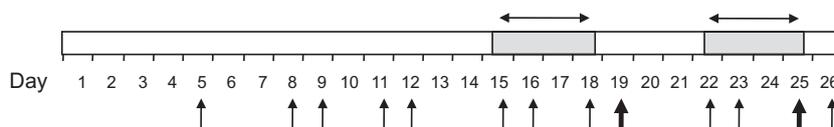
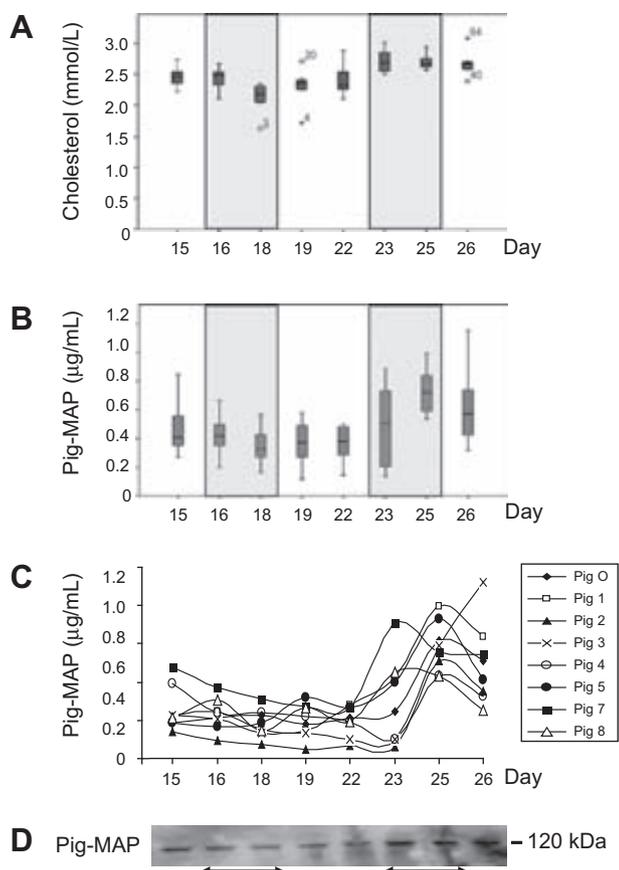


Fig. 1. Experimental design of the study: higher-density periods (grey bars) and blood sampling times (arrows) are indicated.



**Fig. 2.** Cholesterol and Pig major acute phase protein (Pig-MAP) levels in pigs subjected to increased housing density periods throughout the study. (A) Cholesterol concentrations. (B and C) Pig-MAP in the eight individuals of the study measured by ELISA. (D) Validation of Pig-MAP by Western blot (pig 1).

did not ( $P = 0.002$ ,  $P = 0.910$  and  $P = 0.839$ , respectively; Fig. 2B). Fig. 2C shows the individual values for Pig-MAP throughout the experiment. Pig-MAP concentration increased on days 23–25, and then decreased. These changes were confirmed by Western blot which resulted in a band running at  $\sim 120$  kDa equivalent to the molecular mass of Pig-MAP (Fig. 2D). There was considerable variation in ApoA-I lipoprotein but no differences between groups ( $P = 0.339$ ).

#### Carbonylated proteins and glutathione peroxidase in high-density housed pigs

The kinetics of the response are shown in Fig. 3A and B, which indicate that the degree of protein carbonylation increased in the last days of housing ( $P < 0.001$ ). As shown in Fig. 3C, the amounts of oxidized proteins were higher in the plasma on day 25, compared with day 19, indicating that the degree of oxidative stress was greater during the HD period. Mean serum activity of GPx was not altered ( $P = 0.693$ ).

#### Proteomic analysis

In examining potential biomarkers following bi-dimensional electrophoresis, we found several spots that did not correspond to proteins and were most probably due to contamination or gel impurities. After discarding these, four differential spots were found in all four animals. These spots were picked and analysed by MS, but only two of them were positively identified due to the low amount of protein present in the gels or because no

sequence homologies were found in the databases. One of the positively identified spots was albumin, which decreased in HD conditions, and the other one was actin, which increased with HD. Fig. 4A shows the relative quantitation of the spots corresponding to actin in all four gels. Changes in actin concentration between days 19 and 25 were validated by Western blot in all the individuals included in the study (Fig. 4B). Protein bands were quantified by densitometry and their intensity compared ( $P = 0.032$ ).

#### Differences between groups, correlation and cluster analysis

Since it became apparent that the second period of higher-density housing was the most stressful condition, two groups corresponding to days 19 (LD) and 25 (HD) were statistically compared (Table 1). When these two groups only were analysed, HDL-cholesterol, CK and GPx were increased during HD periods, in addition to the other parameters already identified in the ANOVA analysis.

Pearson correlation analysis of results at days 19 and 25 showed the expected correlations between cholesterol-related parameters and some APPs. CK was also correlated with cholesterol, and actin with carbonyl groups (Table 2). Most of these correlations were apparent in LD conditions (Table 2, day 19). Nevertheless, all significant correlations disappeared in HD conditions (Table 2, day 25), probably indicating the variable response of the individuals.

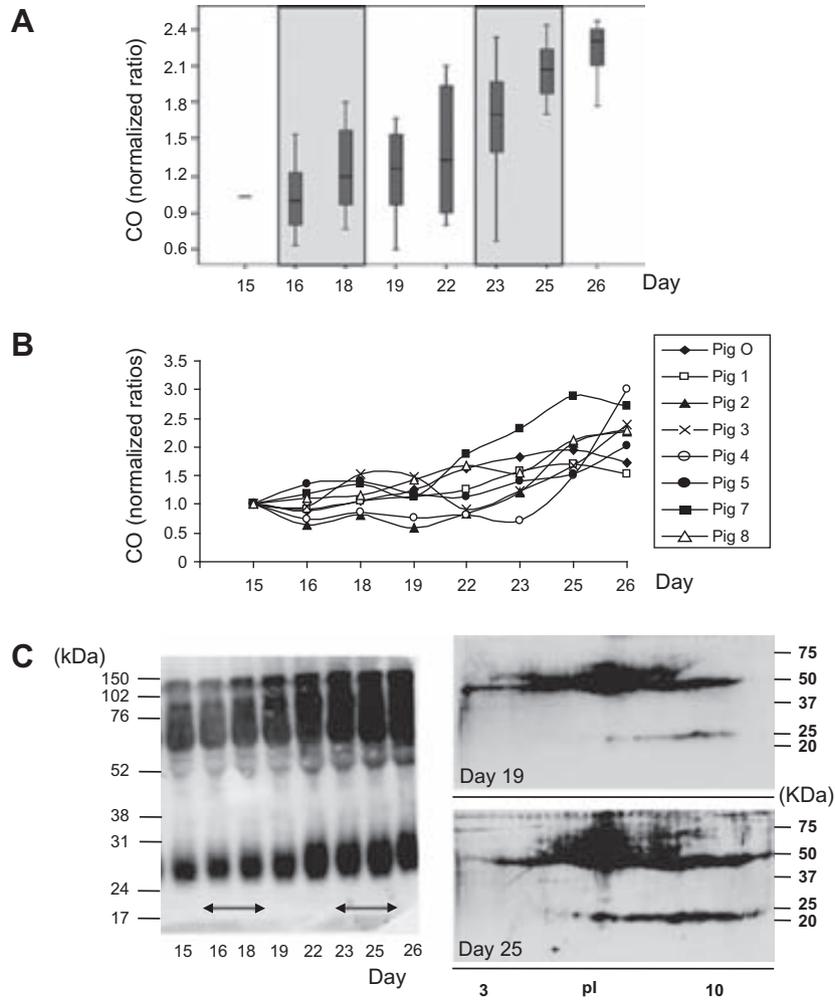
Data clustering was used to analyse whether the response depended on the individual. Animals segregated into two main groups (Fig. 5): those that responded with an acute phase-like reaction with increased APPs and oxidative stress markers, and decreased cortisol (pigs 1 and 2, and less markedly, pigs 3 and 7) and those that showed an increase in cortisol together with a lower acute phase response (pigs 0, 5 and 4, and less markedly, pig 8). As expected, all three APPs clustered in one branch tree, and the lipid-related markers in another (Fig. 5).

#### Discussion

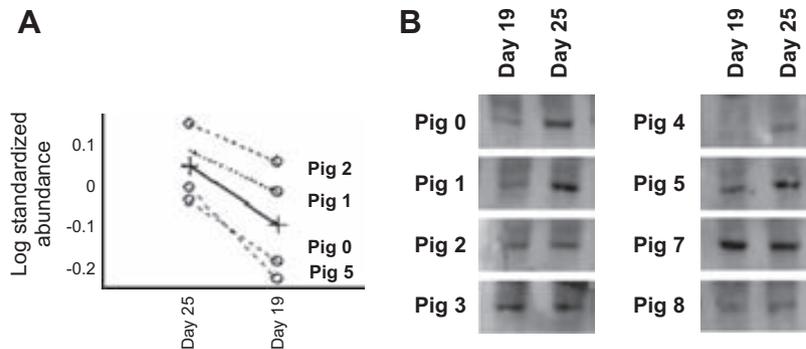
The purpose of the present study was to characterize changes in specific blood components in growing pigs subjected to changes in housing density with the aim of identifying the best biomarkers for the stress associated with this condition.

A clear increase in cholesterol and LDL-cholesterol was observed in animals under HD housing conditions. Since all animals were given a standard diet, these variations were unlikely to have been affected by nutritional factors. Other parameters related to lipid metabolism, such as serum triglycerides, 3-hydroxybutyrate or NEFAs were not altered by HD housing. The relationship between stress and either total cholesterol or LDL levels is not a new finding, since there are a number of human studies showing this positive correlation, as for example during work stress or examinations (van Doornen and van Blokland, 1987; McCann et al., 1990; Peter et al., 1998). Pigs may have similar metabolic responses to stress than humans, at least in some specific situations.

Although APPs have been proposed as stress biomarkers, the validity of specific APPs for each stress condition has yet to be fully evaluated. We analysed the serum concentrations of haptoglobin, CRP and Pig-MAP, the main APPs in pigs (Petersen et al., 2004). All results were within the reference ranges calculated for this species (Piñeiro et al., 2009). Pig-MAP was the only APP that increased in the second period of HD housing. This increase was transitory since it was followed by a decrease in the majority of individuals, suggesting that it was not due to a subclinical pathology. Unfortunately, no samples were taken beyond day 26 that could further support a return of altered parameters to normal values. It is also



**Fig. 3.** Plasma oxidative stress markers in pigs subjected to an increased housing density. (A and B) Kinetics of carbonylated groups concentrations (CO) throughout the study determined by Western blot and quantified by densitometry. Ratios of absorbance (arbitrary units) on the specified day vs. day 15 have been used to normalize for each individual. (C) Left: levels of oxidized carbonyl groups throughout the study corresponding to pig 1 visualized by Western blot; Right: bi-dimensional Western blot of plasma carbonylated proteins from pig 0 in lower (day 19) and higher (day 25) density conditions.



**Fig. 4.** Proteomic analysis of individual pigs subjected to an increased housing density (day 25 vs. day 19). (A) Relative quantification of the spots corresponding to actin in all four DIGE gels. (B) Validation of actin by Western blot in the eight pigs included in the study.

worth noting that Pig-MAP was not correlated with CK, indicating that it was not related to muscular damage.

An increase in oxidative stress markers was detected in the HD animals. Oxidative stress is defined as an imbalance between oxidants and antioxidants at cell or individual level and there is some evidence that stress may cause oxidative changes due to an increase in reactive oxygen species (ROS) or a decrease in the antioxidant status (Lykkesfeldt and Svendsen, 2007). As a

consequence of the oxidative modification of proteins, carbonyl groups are introduced into protein side chains. Accordingly, protein carbonyl contents are the hallmark of the oxidation status of proteins (Barelli et al., 2008). Our results indicate that plasma proteins in animals stressed by increased stocking density were more oxidized. The increased oxidation of plasma proteins was accompanied by higher GPx activity, which protects mammalian cells against oxidative damage (Mates et al., 1999; Lykkesfeldt

**Table 1**

Statistical differences between biochemical parameters found with values corresponding to days 19 (lower-density) and 25 (higher-density).

Parameter	Day 19	Day 25	P
	Mean ± SD	Mean ± SD	
Cholesterol, mmol/L	2.39 ± 0.29	2.80 ± 0.13	0.012
LDL-cholesterol, mmol/L	0.82 ± 0.15	0.99 ± 0.11	0.010
HDL-cholesterol, mmol/L	1.05 ± 0.10	1.38 ± 0.07	0.012
Triglycerides, mmol/L	58.00 ± 12.85	55.88 ± 15.74	0.777
3-Hydroxybutyrate, mmol/L	0.02 ± 0.01	0.01 ± 0.01	0.197
NEFAs, mmol/L	0.08 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.785
CK, U/L	462.58 ± 198.50	974.53 ± 520.31	0.017
Cortisol, ng/mL	16.26 ± 11.58	21.63 ± 15.36	0.239
Pig-MAP, mg/mL	0.37 ± 0.15	0.73 ± 0.16	0.012
HP, mg/mL	0.79 ± 0.52	0.74 ± 0.34	0.874
CRP, µg/mL	16.78 ± 12.14	17.59 ± 10.15	0.877
ApoA-I, UA × 10 <sup>6</sup>	18.60 ± 4.71	15.18 ± 8.25	0.339
CO groups, UA × 10 <sup>6</sup>	257.77 ± 101.35	366.02 ± 172.35	0.018
GPx, U/L	3743.00 ± 635.75	4158 ± 638.14	0.012
Actin, UA × 10 <sup>6</sup>	7.30 ± 2.90	9.39 ± 1.94	0.032

LDL, low density lipoprotein; HDL, high density lipoprotein; NEFA, non-esterified fatty acid; CK, creatine kinase; Pig-MAP, pig-major acute phase protein; HP, haptoglobin; CRP, C-reactive protein; ApoA-I, apolipoprotein A-I; CO, carbonyl; GPx, glutathione peroxidase; UA, absorbance (arbitrary units).

**Table 2**

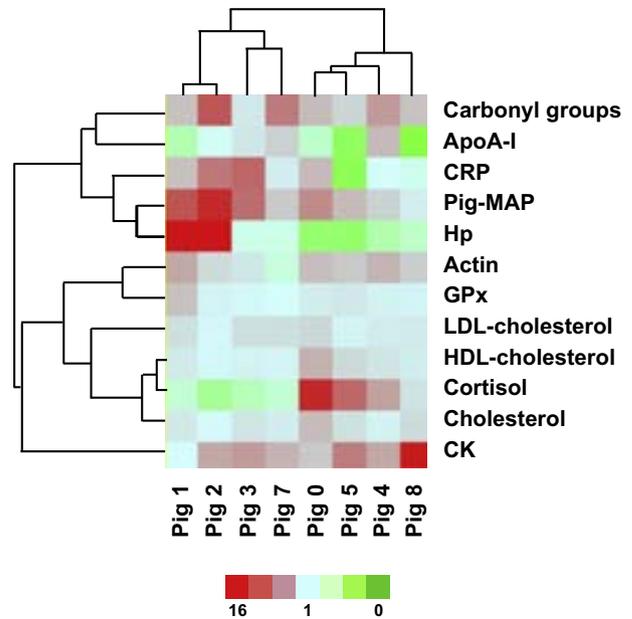
Statistical correlations between biochemical parameters found with values corresponding to days 19 (lower-density) and 25 (higher density), or with values corresponding only to individual days.

	Days 19 and 25		Day 19		Day 25	
	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P	R <sup>2</sup>	P
Cholesterol-HDL	0.669	<0.001	0.792	0.003	0.035	0.657
Cholesterol-LDL	0.632	<0.001	0.504	0.049	0.004	0.879
Cholesterol-NEFAs	0.132	0.167	0.664	0.014	0.002	0.927
HDL-LDL	0.254	0.047	0.145	0.352	0.050	0.595
NEFAs-HDL	0.196	0.086	0.498	0.050	0.042	0.626
NEFAs-LDL	0.129	0.172	0.671	0.013	0.020	0.737
CRP-HP	0.274	0.038	0.496	0.051	0.006	0.860
CRP-Pig-MAP	0.154	0.133	0.501	0.049	0.113	0.415
HP-Pig-MAP	0.082	0.281	0.707	0.009	0.008	0.832
CK-cholesterol	0.348	0.016	0.066	0.540	0.413	0.086
CO-actin	0.314	0.024	0.573	0.030	0.120	0.400
CK-actin	0.394	0.131	0.380	0.354	0.492	0.211

and Svendsen, 2007). Our results support that oxidative stress parameters may be used as stress-related biomarkers, as suggested by others (Chirase et al., 2004; Sauerwein et al., 2005; Lin et al., 2006; Burke et al., 2009; Celi et al., 2010).

Taking a proteomic approach to identify new biomarkers, we applied the DIGE methodology to serum proteins, taking as working samples those corresponding to day 19 (LD) and day 25 (HD). In the DIGE methodology, samples to be compared are labelled with different fluorophores, mixed in equal amounts and subjected to bi-dimensional electrophoretic separation (Timms and Cramer, 2008). Fluorescence scanning and image analysis allowed us to identify a new putative biomarker for stress, i.e. actin.

The presence of actin in serum samples was validated in all animals by Western blotting, which allowed us to identify the protein as a spot with an expected molecular mass of 42 kDa. Actin is a protein component of cell cytoskeleton. Its presence in serum samples from HD housing suggests that a certain degree of cellular damage existed. Actin has been frequently described as differentially expressed in proteomic studies, and proposed as a general marker for cell damage (Pettrak et al., 2008; Wang et al., 2009). In the present study, there was no correlation between actin and CK (Table 2), indicating that the presence of actin was not specifically related to skeletal muscle damage.



**Fig. 5.** Cluster analysis of pigs subjected to an increased housing density. Ratios between concentrations at day 25 vs. day 19 were calculated for the specified parameters to normalize for each individual. Differential ratios are coloured red (increased) and green (decreased) based on a log<sub>2</sub> scale. Dendrogram at the top represents the extent of similarity among individuals. Dendrogram at left represents the extent of similarity among analytical parameters.

Finally, it is clear from our study that the stress response depends on individual susceptibility, even in a mildly stressful situation like this one. Correlation between serum parameters that were apparent at LD disappeared in HD conditions, probably indicating the variable response of the individuals. Individuals may differ in psychological perception as well as in the physiological response of the organism to some degree of stress. Using a statistical approach widely used in genomics, i.e. data clustering using a software tool developed for this purpose, animals segregated into two main groups. A subset of animals responded with an acute phase-like reaction at several degrees with increased APPs and oxidative stress markers and decreased cortisol, with similarities to a pro-inflammatory situation. This may be similar to the aseptic pro-inflammatory state proposed in humans to link a stressful way of life, oxidative stress and cardiovascular disease (Yudkin et al., 2000). In other animals, the response appears to be mainly mediated by cortisol, with the subsequent lipid mobilization, and some signals of cell damage.

Our results are in agreement with previous research that has shown that animals adopt different behavioural strategies in order to cope with stress. So-called 'active copers' tend to adopt a fight-flight type of response when challenged, with low HPA-axis reactivity and high activation of the sympathetic-adrenomedullary system. In contrast, 'passive coping' involves immobility, higher activation of the HPA-axis and higher parasympathetic reactivity (Koolhaas et al., 1999).

## Conclusions

Biochemical and proteomic techniques have been applied to the identification of serum biomarkers associated with stress caused by HD in pigs. The simple design of the study has allowed us to undertake a detailed molecular analysis of potential biomarkers, which has enabled the identification of actin as a new potential stress marker. In conclusion, we propose a 'laboratory stress profile' that includes cholesterol, Pig-MAP, an oxidative stress marker, cortisol, CK and actin. This profile should be validated in studies with a larger number of animals and other stress conditions in pigs.

## Conflict of interest statement

None of the authors of this paper has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence or bias the content of the paper.

## Acknowledgements

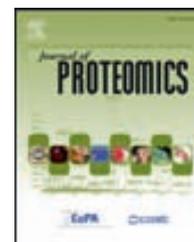
We thank Dr. M. Piñeiro (PigChamp ProEuropa, Segovia, Spain) and Dr. F. Lampreave (University of Zaragoza, Spain) for providing the anti-Pig-MAP and anti-ApoA-I antibodies, respectively, and Ms. A. Vilalta for her excellent technical assistance. We are extremely grateful to Dr. F. Canals, N. Colomé and Dr. M. Monge (Servei de Proteòmica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, Spain) and Dr. M. Carrascal (Servei de Proteòmica, CSIC-UAB) for their help with proteomic analysis. We thank Dr. J. Ariño for his valuable help with cluster analysis and Dr. M. Cortey for advice in the statistical analysis. This work was supported by Grant AGL2006-02365 from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, and Grant 2009 SGR-1091 from the Generalitat de Catalunya (to A.B.). A.M.-R. was supported by a fellowship from the Spanish Ministerio de Educación. Part of the funding was financed by the FEDER program from the European Union. We thank Mr. Phil Grayston for revision of the English language.

## References

- Aich, P., Jalal, S., Czuba, C., Schatte, G., Herzog, K., Olson, D.J., Ross, A.R., Potter, A.A., Babiuk, L.A., Griebel, P., 2007. Comparative approaches to the investigation of responses to stress and viral infection in cattle. *Omic: A Journal of Integrative Biology* 11, 413–434.
- Arthington, J.D., Eichert, S.D., Kunkle, W.E., Martin, F.G., 2003. Effect of transportation and commingling on the acute-phase protein response, growth, and feed intake of newly weaned beef calves. *Journal of Animal Science* 81, 1120–1125.
- Arthington, J.D., Spears, J.W., Miller, D.C., 2005. The effect of early weaning on feedlot performance and measures of stress in beef calves. *Journal of Animal Science* 83, 933–939.
- Barelli, S., Canellini, G., Thadikaran, L., Crettaz, D., Quadroni, M., Rossier, J.S., Tissot, J.D., Lion, N., 2008. Oxidation of proteins: basic principles and perspectives for blood proteomics. *Proteomics Clinical Applications* 2, 142–157.
- Burke, N.C., Scaglia, G., Boland, H.T., Swecker Jr., W.S., 2009. Influence of two-stage weaning with subsequent transport on body weight, plasma lipid peroxidation, plasma selenium, and on leukocyte glutathione peroxidase and glutathione reductase activity in beef calves. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127, 365–370.
- Celi, P., Di Trana, A., Claps, S., 2010. Effects of plane of nutrition on oxidative stress in goats during the peripartum period. *The Veterinary Journal* 184, 95–99.
- Chirase, N.K., Greene, L.W., Purdy, C.W., Loan, R.W., Auvermann, B.W., Parker, D.B., Walborg Jr., E.F., Stevenson, D.E., Xu, Y., Klaunig, J.E., 2004. Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *American Journal of Veterinary Research* 65, 860–864.
- Dalle-Donne, I., Rossi, R., Giustarini, D., Milzani, A., Colombo, R., 2003. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta* 329, 23–38.
- Doherty, M.K., Beynon, R.J., Whitfield, P.D., 2008. Proteomics and naturally occurring animal diseases: opportunities for animal and human medicine. *Proteomics Clinical Applications* 2, 135–141.
- Esselens, C.W., Malapeira, J., Colome, N., Moss, M., Canals, F., Arribas, J., 2008. Metastasis-associated C4.4A, a GPI-anchored protein cleaved by ADAM10 and ADAM17. *Biological Chemistry* 389, 1075–1084.
- Koolhaas, J.M., Korte, S.M., De Boer, S.F., Van Der Vegt, B.J., Van Reenen, C.G., Hopster, H., De Jong, I.C., Ruis, M.A., Blokhuis, H.J., 1999. Coping styles in animals: current status in behavior and stress-physiology. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 23, 925–935.
- Kornegay, E.T., Nolter, D.R., 1984. Effect of floor space and number of pigs per pen on performance. *Pig News and Information* 5, 23–33.
- Kuhlers, D.L., Jungst, S.B., Marple, D.N., Rahe, C.H., 1985. The effect of pen density during rearing on subsequent reproductive performance in gilts. *Journal of Animal Science* 61, 1066–1069.
- Levine, S., 1985. A definition of stress. In: Moberg, G.P. (Ed.), *Animal Stress*. Waverly Press, Baltimore, MA, USA, pp. 51–69.
- Levine, R.L., Wehr, N., Williams, J.A., Stadtman, E.R., Shacter, E., 2000. Determination of carbonyl groups in oxidized proteins. *Methods in Molecular Biology* 99, 15–24.
- Lin, H., Decuyper, E., Buyse, J., 2006. Acute heat stress induces oxidative stress in broiler chickens. *Comparative Biochemistry and Physiology* 144, 11–17.
- Lykkesfeldt, J., Svendsen, O., 2007. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *The Veterinary Journal* 173, 502–511.
- Mates, J.M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro, I., 1999. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clinical Biochemistry* 32, 595–603.
- McCann, B.S., Warnick, G.R., Knopp, R.H., 1990. Changes in plasma lipids and dietary intake accompanying shifts in perceived workload and stress. *Psychosomatic Medicine* 52, 97–108.
- Meunier-Salaun, M.C., Vantrimonte, M.N., Raab, A., Dantzer, R., 1987. Effect of floor area restriction upon performance, behavior and physiology of growing-finishing pigs. *Journal of Animal Science* 64, 1371–1377.
- Mormede, P., Andanson, S., Auperin, B., Beerda, B., Guemene, D., Malmkvist, J., Manteca, X., Mantuffel, G., Prunet, P., van Reenen, C.G., Richard, S., Veissier, I., 2007. Exploration of the hypothalamic-pituitary-adrenal function as a tool to evaluate animal welfare. *Physiology and Behavior* 92, 317–339.
- Murata, H., 2007. Stress and acute phase protein response: an inconspicuous but essential linkage. *The Veterinary Journal* 173, 473–474.
- Penque, D., 2009. Two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry for biomarker discovery. *Proteomics Clinical Applications* 3, 166–172.
- Peter, R., Alfredsson, L., Hammar, N., Siegrist, J., Theorell, T., Westerholm, P., 1998. High effort, low reward, and cardiovascular risk factors in employed Swedish men and women: baseline results from the WOLF Study. *Journal of Epidemiology and Community Health* 52, 540–547.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P., Heegaard, P.M., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research* 35, 163–187.
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., Vulpe, C.D., 2008. Déjà vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8, 1744–1749.
- Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Carpintero, R., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J.M., Alava, M.A., Lampreave, F., 2007a. Pig acute-phase protein levels after stress induced by changes in the pattern of food administration. *Animal* 1, 133–139.
- Piñeiro, M., Piñeiro, C., Carpintero, R., Morales, J., Campbell, F.M., Eckersall, P.D., Toussaint, M.J., Lampreave, F., 2007b. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *The Veterinary Journal* 173, 669–674.
- Piñeiro, C., Piñeiro, M., Morales, J., Andres, M., Lorenzo, E., Pozo, M.D., Alava, M.A., Lampreave, F., 2009. Pig-MAP and haptoglobin concentration reference values in swine from commercial farms. *The Veterinary Journal* 179, 78–84.
- Qiu, X., Arthington, J.D., Riley, D.G., Chase Jr., C.C., Phillips, W.A., Coleman, S.W., Olson, T.A., 2007. Genetic effects on acute phase protein response to the stresses of weaning and transportation in beef calves. *Journal of Animal Science* 85, 2367–2374.
- Saco, Y., Cuadrado, N., Bassols, A., 2000. Comparison of methods to determine cholesterol-HDL and cholesterol-LDL in porcine plasma and sera. *Revue de Médecine Vétérinaire* 7, 763.
- Saco, Y., Docampo, M.J., Fabrega, E., Manteca, X., Diestres, A., Lampreave, F., Bassols, A., 2003. Effect of stress transport on serum haptoglobin and Pig-MAP in pigs. *Animal Welfare* 12, 403–409.
- Saco, Y., Frailé, L., Giménez, M., Canalias, F., Bassols, A., 2010. Validation of an immunoturbidimetric method for determination of porcine serum C-reactive protein. *Research in Veterinary Science*, Research in Veterinary Science 89, 159–162.
- Salamano, G., Mellia, E., Candiani, D., Ingravalle, F., Bruno, R., Ru, G., Doglione, L., 2008. Changes in haptoglobin, C-reactive protein and pig-MAP during a housing period following long distance transport in swine. *The Veterinary Journal* 177, 110–115.
- Sauerwein, H., Schmitz, S., Hiss, S., 2005. The acute phase protein haptoglobin and its relation to oxidative status in piglets undergoing weaning-induced stress. *Redox Report* 10, 295–302.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., Mann, M., 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical Chemistry* 68, 850–858.
- Timms, J.F., Cramer, R., 2008. Difference gel electrophoresis. *Proteomics* 8, 4886–4897.
- van Doornen, L.J., van Blokland, R., 1987. Serum-cholesterol: sex specific psychological correlates during rest and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 31, 239–249.
- Wang, P., Bouwman, F.G., Mariman, E.C., 2009. Generally detected proteins in comparative proteomics – a matter of cellular stress response? *Proteomics* 9, 2955–2966.
- Yudkin, J.S., Kumari, M., Humphries, S.E., Mohamed-Ali, V., 2000. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148, 209–214.

Available online at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

SciVerse ScienceDirect

[www.elsevier.com/locate/jprot](http://www.elsevier.com/locate/jprot)

## Proteomic analysis reveals oxidative stress response as the main adaptative physiological mechanism in cows under different production systems<sup>☆</sup>

Anna Marco-Ramell<sup>a</sup>, Laura Arroyo<sup>a</sup>, Yolanda Saco<sup>a</sup>, Anabel García-Heredia<sup>b</sup>, Jordi Camps<sup>b</sup>, Marta Fina<sup>c</sup>, Jesús Piedrafita<sup>c</sup>, Anna Bassols<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

<sup>b</sup>Unitat de Recerca Biomèdica. Hospital Universitari de Sant Joan. Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili, Universitat Rovira i Virgili. 43201 Reus, Spain

<sup>c</sup>Unitat de Remugants-Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària. Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Cerdanyola del Vallès, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 2 January 2012

Accepted 2 April 2012

Available online 11 April 2012

#### Keywords:

Welfare

Biomarker

Cow

Oxidative stress

### ABSTRACT

Three groups of cows representing three ranges of welfare in the production system were included in the study: two groups of Bruna dels Pirineus beef cattle maintained under different management systems (good and semiferal conditions) and a group of Alberes cows, a breed that lives in the mountains (hardest conditions).

In order to identify new stress/welfare biomarkers, serum from Bruna cows living in both environments was subjected to DIGE labelling, two-dimensional electrophoresis and MALDI-MS or ion trap MS. Identification was achieved for 15 proteins, which mainly belonged to three biological functions, the oxidative stress pathway (glutathione peroxidase (GPx) and paraoxonase (PON-1)), the acute phase protein family (Heremans Schmid glycoprotein alpha2 ( $\alpha$ 2-HSG)) and the complement system.

Biological validation included the Alberes breed. GPx and PON-1 were validated by an enzymatic assay and found to be higher and lower, respectively, in cows living in hard conditions.  $\alpha$ 2-HSG was validated by ELISA and found to be reduced in hard conditions. Other biomarkers of the redox status were also altered by living conditions: protein carbonyl content, superoxide dismutase (SOD) and glutathione reductase (GR).

Our results show that changes in the redox system are the main adaptation of cows living in challenging environmental conditions.

This article is part of a Special Issue entitled: "Farm animal proteomics".

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Abbreviations:**  $\alpha$ 2-HSG,  $\alpha$ 2-Heremans Schmid glycoprotein; CO, Carbonyl groups; CV, Coefficient of variation; GPx, Glutathione peroxidase; GR, Glutathione reductase; HDL, High density lipoprotein; Hp, Haptoglobin; IgG, Immunoglobulin G; ITIH4, Inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4; LDL, Low density lipoprotein; NEFA, Non-esterified fatty acids; PON1, Paraoxonase 1; SAA, Serum amyloid A; SOD, Superoxide dismutase; TG, Triglycerides.

<sup>☆</sup> This article is part of a Special Issue entitled: "Farm animal proteomics".

\* Corresponding author. Tel.: +34 935811042; fax: +34 935812006.

E-mail address: [anna.bassols@uab.cat](mailto:anna.bassols@uab.cat) (A. Bassols).

1874-3919/\$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.jprot.2012.04.002

## 1. Introduction

There is increasing interest in the measurement of stress as an indicator of animal welfare, nutritional status and disease. Serum cortisol concentrations are often used to evaluate acute stress, whereas fecal corticosterone has been used to evaluate chronic stress [1,2]. Indicators of nutritional stress include mainly non-esterified fatty acids (NEFAs) and 3-hydroxybutyrate. Acute phase proteins (APPs), such as serum amyloid A (SAA) and haptoglobin, are recognized markers of inflammation [3] and have also been proposed as indicators of stress in cattle and pigs [4,5]. Nevertheless, a global approach to the whole organism adaptation response to stress conditions has not been carried out and it may yield information about new biomarkers that help to evaluate animal welfare in an objective manner.

The *Bruna dels Pirineus* breed is a beef type selected from the old Brown Swiss and used for extensive beef cattle production. Two groups of cows were maintained during the winter in different living conditions representing different degrees of challenging environments. One group was maintained on a diet of cultivated pastures in a valley in the pre-Pyrenean mountains with daily contact to humans (control/good conditions), whereas the other group was living in the Alberes massif (Eastern Pyrenees) in semiferal conditions (stress/hard conditions). The Alberes breed of cattle is a native Catalonian breed living in semiferal conditions in the Alberes massif mainly browsing shrubs and branches, thus providing a living situation that may be considered the most challenging one. In a previous work from our laboratory, three groups of cows living in conditions similar to those presented in the current study were already characterized regarding metabolic and traditional stress markers (serum cortisol and fecal corticosterone) [6].

In the present study, a proteomic approach using two-dimensional electrophoresis and DIGE labelling was used to compare protein expression in *Bruna* cows living in standard and hard conditions to obtain more information about the adaptation process of cattle to live in challenging environments, as well as to identify new potential biomarkers for stress and welfare. A group of Alberes cows was also included in the validation process to gain access to a more comprehensive view of the metabolic and physiological adaptation of cattle to challenging environments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animal handling

Two groups of *Bruna dels Pirineus* beef cattle were maintained under different management systems during the winter (December to April). The first group (*Bruna B*,  $n=31$ ) was fed on cultivated pastures with programmed grazing and daily contact with stockbreeders, while the second group (*Bruna at the Alberes BA*,  $n=31$ ) was fed on scarce natural pastures in the Alberes mountains with limited contact with humans (semiferal conditions). The group of Alberes cows (*A*,  $n=31$ ) were also living in semiferal conditions. This breed occupies the highest areas in the hills, living far from human contact and mainly browsing woody species.

### 2.2. Sample collection

Blood samples were collected in mid-April at the end of the winter period. Blood samples were collected by caudal venipuncture in 10 ml tubes (Eurotubo) without anticoagulant (for serum) or with EDTA-K<sub>3</sub> as anticoagulant (for plasma and erythrocyte lysate). Serum and plasma were obtained by centrifugation at 2000 g for 10 min at room temperature and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay. Erythrocyte lysate was prepared from the cell pellet after plasma centrifugation. The pellet was washed with 0.9% NaCl, lysated with cold deionized water and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assay.

Fecal samples were collected fresh and kept frozen until lyophilization [1]. Feces were lyophilized for 5 days at  $-20^{\circ}\text{C}$  in a Dura-Top Bulk Tray Freeze Dryer (FTS Systems, Stone Ridge, NY, USA) and kept frozen until assay.

When the analysis of a high number of samples was very complex (for western blot and proteomic experiments), serum pools of each group were used (see below).

### 2.3. Analytical parameters

The measurement of metabolic parameters was carried out with the analyzer Olympus AU400 with the following techniques: Cholesterol (CHOP-PAP-method), high density lipoprotein (HDL)-cholesterol (Immunoinhibition method), low density lipoprotein (LDL)-cholesterol (Selective protection method) and triglycerides (GPO-PAP method) were determined using the Olympus System Reagents (Olympus Diagnostica GmbH, Dublin, Ireland). NEFAs were determined with NEFA-C reagent (Wako Chemicals GmbH, Neuss, Germany), 3-hydroxybutyrate with Ranbut (Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK). Coefficients of variation (CV) were: cholesterol (0.62% at 1.09 mmol/L); HDL-cholesterol (0.62% at 1.09 mmol/L); LDL-cholesterol (2.26% at 1.57 mmol/L); triglycerides (0.72% at 4.28 mmol/L); NEFAs (0.5% at 0.30 mmol/L); 3-hydroxybutyrate (0.62% at 0.14 mmol/L).

Haptoglobin was determined with the Phase Haptoglobin kit (colorimetric assay based on binding of haptoglobin to haemoglobin, Tridelta Ltd, County Kildare, Ireland) adapted to the analyzer Olympus AU400 (CV: 0,8% and 3,2% at 0,31 mg/mL and 1.35 mg/mL). SAA levels were assessed with an ELISA kit (Tridelta Ltd, County Kildare, Ireland),  $\alpha$ 2-HS-Glycoprotein ( $\alpha$ 2-HSG) levels with the ELISA Kit for Bovine Heremans Schmid Glycoprotein Alpha 2 (USCN Life Science, Wuhan, China) and Immunoglobulin G levels with the IgG ELISA kit (Bethyl, Montgomery, TX, USA).

Cortisol was analyzed using a competitive ELISA assay (Cortisol ELISA SLV-2930, DRG Diagnostics, Marburg, Germany) (CV: 2.65% at 4.52 ng/mL). Corticosterone was extracted from lyophilized feces as described by Mostl et al. [7]. Briefly, 5 mL 80% methanol was added to 0.5 g of lyophilized feces and mixed for 45 minutes in an orbital shaker. Tubes were centrifuged at 500 g for 20 min. Supernatants were diluted 1:10, to avoid methanol interferences, and analyzed by radioimmunoassay ( $^{125}\text{I}$  Radioimmunoassay kit (Rats and Mice Corticosterone kit) ICN Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA).

Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined in serum following the oxidation of NADPH in presence of Cumene Hydroperoxide (Ransel Kits; Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK) (CV: 2% at 2852 U/L). Glutathione reductase

(GR) was measured following the oxidation of NADH (Ransel Kits; Randox Laboratories Ltd, Crumlin, UK) (CV: 2.1% at 110.5 U/L). Superoxide dismutase (SOD) was measured in erythrocyte lysates with the xanthine oxidase method (Ransod Kits; Laboratories Ltd, Crumlin, UK) (CV: 5.6% at 221 U/L). All these techniques were adapted to the Olympus AU400 analyzer.

Serum paraoxonase (PON-1 lactonase) activity was analyzed by measuring the hydrolysis of 5-thiobutyl butyrolactone (TBBL) as described [8,9]. Lactonase activity was measured in an assay reagent containing 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.25 mM TBBL and 0.5 mM 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) in 0.05 M Tris-HCl buffer, pH=8.0. The change in absorbance was monitored at 412 nm. Activities were expressed as KU/L (1 U=1 μmol of TBBL hydrolyzed per minute).

## 2.4. Immunoblotting

Antibodies: Anti-DNP was from Sigma (St. Louis, MO, USA) and anti-ITIH4 was kindly provided by Dr. M. Piñeiro (PigChamp ProEuropa, Segovia, Spain).

For ITIH4 detection, 25 μg of serum proteins was resolved under reducing conditions in SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes (Immobilon-P, Millipore) for 1.5 h at 400 mA. Membranes were then blocked for 1 h at room temperature with 5% fat-free milk in TBS+0.05% Tween-20 (TBS-T). Membranes were incubated with the polyclonal antibody (diluted 1/1000) in 5% fat-free milk in TBS-T for 16 h at 4 °C, washed and further probed with horseradish peroxidase (HRP)-conjugated immunoglobulin for 1 h at room temperature (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Antibody binding was visualized by chemiluminescence (ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Densitometry was performed in a LAS-3000 Luminescent Image Analyzer with the Multi Gauge software (Fujifilm Corporation, Tokyo, Japan).

For carbonyl protein content detection, a Slot Blot was performed, as described in [10] with some modifications. Briefly, 100 μL of diluted serum (5 μg/mL) were applied to each slot. After an incubation of 20 min, vacuum was applied until all the liquid above the PVDF membrane disappeared. Sequentially, the membrane was incubated for 5 min in 0.05 M Tris-HCl pH 7.4, 0.15 M NaCl (TBS), in 20% MeOH-80% TBS and then in 2 N HCl. Samples were derivatized by incubating the membrane in a solution of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH, 100 mg/mL) in 2 N HCl for exactly 5 min. Sequentially, the membrane was washed for 5 min twice in 2 N HCl, twice in 100% MeOH, twice in 20% MeOH-80% TBS and then twice in TBS. Membrane was incubated with the primary antibody against DNP (diluted 1/20,000) and processed as described above for other blots.

## 2.5. Enrichment of low-abundance proteome

Pools of the *Bruna* (B) and *Bruna* at the Alberes (BA) groups were prepared with all the samples (n=31 each) and its low-abundance proteome was enriched with ProteoMiner™ (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) as described in the manufacturer protocol with a 1:10 relation mg protein:μL resin. The enrichment procedure was performed in triplicate on different days. This technique has been validated previously in bovine samples by our group [11].

## 2.6. Differential gel electrophoresis (DIGE)

Complete and ProteoMiner-treated serum samples were desalted with the 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) and resuspended in lysis buffer (30 mM Tris-HCl pH 8.5, 7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS). Then, samples were quantified with the RcdC Protein Assay Kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Minimal labelling was performed as follows: 50 μg of each treated pool was labelled with Cy3 or Cy5 cyanine dyes (GE Healthcare), while the internal standard pooled sample was labelled with Cy2 dye, by the addition of 400 pmol of Cy dye in 1 μL of anhydrous N, N-dimethylformamide per 50 μg of protein. Dye-swap was performed in order to avoid any possible bias. After 30 min of incubation on ice in the dark, the reaction was stopped with 1 μL 10 mM lysine and additionally incubated for 15 min. Samples were finally combined and diluted 2-fold with IEF sample buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 2% DTT, 2% ampholytes pH 4–7, and 0.002% bromophenol blue). The 2D-DIGE was performed using GE-Healthcare reagents and equipment (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). First-dimension IEF was performed on IPG strips (24 cm; linear gradient pH 4–7) using an Ettan IPGphor system. Initially, strips were incubated overnight in 450 μL of rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 4% (w/v) CHAPS, 1% ampholytes pH 4–7, 100 mM DeStreak, and 0.002% bromophenol blue). Then, samples were applied via cup loading near the acidic end of the strips. After focusing for a total of 60 kV/h, strips were equilibrated first for 15 min in 6 mL of reducing solution (6 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 5 mg/mL DTT, and 0.002% bromophenol blue) and then in 6 mL of alkylating solution (6 M urea, 100 mM Tris-HCl pH 8, 30% (v/v) glycerol, 2% (w/v) SDS, 22.5 mg/mL iodoacetamide, and 0.002% bromophenol blue) for 15 min, on a rocking platform. Proteins were separated in home-made 12.5% SDS-PAGE gels under reducing conditions by overlaying the strips on 12.5% Laemmli gels (24×20 cm), casted in low-fluorescence glass plates, on an Ettan DALTsix system. Gels were run at 20 °C, at constant power of 2.5 W/gel for 30 min followed by 17 W/gel until the bromophenol blue tracking front reached the end of the gel. Fluorescence images of the gels were acquired on a Typhoon 9400 scanner. Cy2, Cy3, and Cy5 images were scanned at 488 nm/520 nm, 532 nm/580 nm, and 633 nm/670 nm excitation/emission wavelengths, respectively, at a 100 μm resolution.

## 2.7. Image analysis

Image analysis and statistical quantification of relative protein abundance were performed using Progenesis SameSpots v2.0 software (NonLinear Dynamics, Newcastle, UK). Protein spots were selected under the following criteria: t test values <0.05, when comparing both Brunas groups, together with a fold-change greater than ±1.2.

## 2.8. Protein identification by peptide mass fingerprint

In-gel trypsin digestion was performed as described in [12], using autolysis-stabilized trypsin (Promega, Madison, WI). Tryptic digests were purified using ZipTip microtiter plates (Millipore, Bedford, MA). MALDI-MS (matrix assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry) analysis of tryptic

peptides was performed on an Ultraflex TOF-TOF Instrument (Bruker, Bremen, Germany). Samples were prepared using  $\alpha$ -cyano-4-hydroxy-cinnamic acid (CHCA) as matrix on anchor-chip targets (Bruker). Calibration was performed in the external mode using a peptide calibration standard kit (Bruker Daltonics). The spectra were processed using Flex Analysis 3.0 software (Bruker Daltonics). Peak lists were generated using the signals in the  $m/z$  800–4000 region, with a signal-to-noise threshold of greater than 3. The resulting final peak list was used for identification of the proteins by peptide mass fingerprint. Mascot 2.2 program (Matrix Science Ltd., London, U.K.) was used to search the Swiss-Prot 55.4 database. Search parameters were as follows: trypsin cleavages excluding N-terminal to P, 1 or 2 missed cleavages allowed, cysteine carbamidomethylation set as fixed modification, methionine oxidation as variable modification, mass tolerance less than 50 ppm, monoisotopic mass values. Criteria for positive identification were a significant Mascot probability score (score >55,  $P < 0.05$ ).

### 2.9. Protein identification by ion trap MS

When the protein identification was not possible by peptide mass fingerprint, spots were analyzed by ion trap mass spectrometry, as described in [13]. The protein digests were analyzed on an Esquire HCT Ultra IT mass spectrometer (Bruker, Bremen, Germany), coupled to a nano-HPLC system (Ultimate, LC Packings, Amsterdam, The Netherlands). Peptide mixtures were first concentrated on a PepMap nanotrapping column and then loaded onto a PepMap nanoseparation column (LC Packings). Peptides were then eluted by an acetonitrile (ACN) gradient through a PicoTip emitter nanospray needle (New-Objective, Woburn, MA, USA) onto the nanospray ionization source of the IT mass spectrometer. MS/MS fragmentation (100–2800  $m/z$ ) was performed on the most intense ions using a dynamic exclusion time of 1.2 min for precursor selection and excluding single-charged ions. An automated optimization of MS/MS fragmentation amplitude, starting from 0.60 V was used. Proteins were identified using Mascot (Matrix Science, London, UK). MS/MS spectra were searched with a precursor mass tolerance of 1.5 Da, fragment tolerance of 0.5 Da, trypsin specificity with a maximum of 1 missed cleavage, carbamidomethylation set as fixed modification and methionine oxidation as variable modification.

A positive identification criterion was set as an individual Mascot score for each peptide MS/MS spectrum higher than the corresponding homology threshold score.

### 2.10. Statistical analysis

Individuals with SAA concentration higher than 80  $\mu\text{g/mL}$  were excluded since they were considered potentially ill (1 from group B, one from group BA and 2 from group A). Statistical analysis was performed using the SAS statistical package v 9.1 (SAS Institute Inc, 2002, Cary, NC, USA). Normality of data was tested using the Shapiro–Wilk test. Data were analyzed by one-way ANOVA and differences between group means were contrasted with the Duncan test. Pearson correlations among the variables were computed after deleting some outliers with influence on the correlation coefficient calculated with raw data.

## 3. Results

### 3.1. General biochemical profile of cows living in different housing conditions

Conventional stress markers, as serum cortisol and fecal corticosterone were higher in cows living in feral conditions. Serum cortisol concentrations were significantly elevated in the *Alberes* group (group A) compared to *Bruna dels Pirineus* (group B). Conversely, fecal corticosterone concentrations were significantly higher in the *Bruna at the Alberes* group (Group BA) (Table 1).

Since the nutritional balance is conceivable changed for cows living in hard or friendly conditions, we performed a general biochemical profile, specifically aimed to metabolic markers (Table 1). Therefore NEFAs, 3-hydroxybutyrate, triglycerides and cholesterol were determined. Concentrations of NEFAs and cholesterol in group A were increased in comparison with groups B and BA ( $P < 0.001$ ). HDL-cholesterol and LDL-cholesterol followed the same pattern. Triglycerides were higher in group A whereas 3-hydroxybutyrate was higher in group BA compared to group B.

All these results were similar to those obtained by us in a previous study [6].

**Table 1 – Mean values for concentrations of metabolic parameters, serum cortisol and fecal corticosterone in *Bruna*, *Bruna-Alberes* and *Alberes* groups.**

	RSD <sup>a</sup>	CV <sup>b</sup> (%)	B ( <i>Bruna</i> )	BA ( <i>Bruna at Alberes</i> )	A ( <i>Alberes</i> )
Cortisol (ng/mL)	325.80	194.31	45.40 <sup>a</sup>	155.37 <sup>a,b</sup>	306.85 <sup>b</sup>
Fecal corticosterone (ng/g)	38.86	16.09	36.18 <sup>a</sup>	49.05 <sup>b</sup>	38.99 <sup>a</sup>
NEFAs (mmol/L)	0.203	57.02	0.23 <sup>a</sup>	0.13 <sup>a</sup>	0.70 <sup>b</sup>
3-Hydroxybutyrate (mmol/L)	0.114	0.114	0.32 <sup>a</sup>	0.48 <sup>b</sup>	0.27 <sup>a</sup>
Triglycerides (mg/dL)	6.855	6.855	19.03 <sup>a,b</sup>	17.61 <sup>a</sup>	22.03 <sup>b</sup>
Cholesterol (mg/dL)	38.93	38.93	125.47 <sup>a</sup>	120.30 <sup>a</sup>	162.21 <sup>b</sup>
LDL (mM)	0.392	0.392	1.48 <sup>a</sup>	1.21 <sup>b</sup>	1.84 <sup>c</sup>
HDL (mM)	0.490	0.490	2.18 <sup>a</sup>	1.97 <sup>a</sup>	2.54 <sup>b</sup>

Within rows, means with the same superscript did not differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup> RSD: root standard deviation.

<sup>b</sup> CV: coefficient of variation.

### 3.2. Proteomic analysis of the sera from cows living in different housing conditions

In order to identify new stress biomarkers, we analyzed serum samples from *Bruna* cows living in mild and hard conditions (groups B and BA, respectively). Since both groups were from the same breed, no differences in the protein profile could be due to a different genetic background. Two different proteomic approaches by bidimensional DIGE were performed. In the first approach, non-depleted serum was analyzed but few differentially expressed proteins were observed and none of them could be thoroughly validated (data not shown).

In the second approach and to get a deeper insight into the differential serum proteome, serum was depleted with ProteoMiner and subjected again to bidimensional DIGE. The use of ProteoMiner to decrease the concentration of the most abundant proteins in serum has been previously validated in our laboratory for bovine samples [11]. The treatment with ProteoMiner of serum pools from groups B and BA was performed by triplicate in three different days to allow for technical replicates of the enrichment procedure. Three gels were run, each of them containing one ProteoMiner replicate of each group of cows and one pool of all samples as internal standard. Dye swap was performed in order to avoid any possible bias. A total of 1180 of spots were analyzed, out of which 294 spots were differentially expressed with the criteria of the average ratio  $\pm 1.2$  and Student's t-test  $P$  value  $< 0.05$ . Twenty two differential spots were selected on the basis of the spot size and discarding those placed in the side borders of the gel. These spots were identified by MALDI-MS and MS/MS, 12 spots being upregulated in *Bruna* cows living in mild conditions, and ten spots being downregulated. Only 15 of them could be identified (Table 2), including proteins related with oxidative stress (Paraoxonase-1 and Glutathione Peroxidase 3), the complement system (Components C3, C1s and C9; and conglutinin) and acute phase proteins (Alpha-2-HS-Glycoprotein precursor and the AMBP precursor) (Fig. 1).

Some of them were chosen for validation due to their differential expression, their physiological function and the availability of analytical reagents for their measurement in bovines.

### 3.3. Validation of oxidative stress markers and analysis of the redox state of the three groups of cows

GPx (Glutathione peroxidase) activity and PON-1 (Paraoxonase-1) activity were measured in the serum of all individuals corresponding to the three groups of cows, including the *Alberes* breed. Enzymatic validation confirmed the results of protein expression, GPx being higher in *Bruna* cows living in the *Alberes* than living in a controlled environment, whereas PON-1 activity was higher in control cows. Results in the *Alberes* cows confirmed the same tendency, showing very high GPx activity and low PON-1 (Table 3).

Since living conditions altered the redox equilibrium, other measures of oxidation were also determined. GR activity, although not significantly altered between both *Bruna* groups, showed a tendency to decrease in harsh conditions. SOD measured in erythrocyte lysates was higher in *Alberes* cows, with no differences between both groups of *Bruna* (Table 3).

We aimed to see whether the oxidative state of plasma components was also altered. Thus, total carbonyl content in proteins determined by slot blot and densitometry was higher in cows from both breeds living in the *Alberes* mountains (Table 3).

### 3.4. Validation of acute phase proteins in the three groups of cows

Alpha-2-HS-Glycoprotein was also found to be increased in the control group of *Bruna* in the proteomic analysis. This marker was validated by using an ELISA technique specific for this species in the three groups of animals.  $\alpha 2$ -HSG was found to be higher in cows living in mild conditions and lowest in the *Alberes* breed (Table 4). Since  $\alpha 2$ -HSG is a negative acute phase protein, other markers belonging to this category were also measured. Thus, the positive APPs haptoglobin and SAA tended to be higher in cows living in the *Alberes* (Table 4). ITIH4, another positive APP well characterized in porcine, was also increased in these groups when visualized by immunoblotting using an antibody against the porcine protein with cross-reactivity with the bovine species (Supplementary data S1) [14].

### 3.5. Correlation analysis

Pearson correlation analysis of results showed the expected correlations between lipid metabolism markers (not shown). When analyzing other parameters, we could observe that serum cortisol was not correlated to fecal corticosterone, as expected since they are markers for acute and chronic stress, respectively. Fecal corticosterone is correlated with oxidative stress markers, especially GPx, as well as with  $\alpha 2$ -HSG. Some oxidative stress markers are correlated between them.  $\alpha 2$ -HSG is inversely correlated with these "positive" oxidative markers (GPx and CO), as well as with fecal corticosterone and cholesterol, whereas it shows a direct correlation with PON-1 and GR (Fig. 2 and Supplementary Table S1).

---

## 4. Discussion

We have used a proteomic approach to understand the mechanism of adaptation of cattle to the environment and to identify new markers for stress or welfare in cows. Our rationale was to compare cows from the same breed living in different conditions, in such a way that differences due to the genetic background could not account for changes in the proteomic profile. The *Bruna* group (group B) represented the group living in milder conditions, close to humans and with access to abundant cultivated pastures, the *Bruna* at the *Alberes* (group BA) represented an intermediate state since they were living in semiferal conditions, in the lowest part of the mountains and with limited contact to humans. For biological validation of the results, we included a third group of cows from the *Alberes* breed (group A), which represented those animals living in harsher conditions, far from humans and with a bush-based diet. In this way, the three groups of cattle used in the present study (B, BA, A) represent three different management systems that keep the animals under several degrees of nutritional and environmental challenges. These three groups

Table 2 – List of differentially expressed proteins identified by mass fingerprinting and ion trap.

# spot	Fold change <sup>a</sup> (B/BA)	T-test	q value <sup>b</sup>	Power <sup>c</sup>	Protein name	SwissProt access name	NCBI nr (gi) access no.	Gene name	Theor. Pi <sup>d</sup>	Theor. MW <sup>e</sup>	E score/ion score <sup>f</sup>	Pep match (%seq) <sup>g</sup>	Error <sup>h</sup>	% cov <sup>i</sup>	Peptides
542	7.78	4.96E-04	5.21E-03	≥.9995	FGG protein	Q3SZZ9_BOVIN	74267780	FGG	5.56	49763	65	10 (33)	17	51.9	K.IHLISTQSTIPYVLR.I K.ESGLYFIRPLK.A
691	1.52	0.05	7.48E-02	0.557	Complement C3B	CO3_BOVIN	99028969	C3	6.41	188675	178	35 (24)	20	87.2	K.TIYTPGSTVLYRVFTVDHK.L K.IRYTTYMIMNK.G K.DSCMGTLVVKNGGKEEK.H K.AGQYSSDLRK.C K.CCEDGMRDNPMPKPCQR.R K.AFLDCCEYITQLR.Q R.LPYSVVRNEQVEIR.A K.VRVELLYNPAFCSLATAK.K K.KRHQQTTIPAR.S R.HQQTITIPAR.S R.SSVAVPYVIVPLKIGLHEVEVK.A K.AAVYNHFISDGVK.K K.AAVYNHFISDGVK.T R.TLNPEHLGQGGVQR.E R.TLNPEHLGQGGVQREEVPAADLSDQVPDTESETK.I K.RQESLELIR.K K.RQESLELIRK.G R.QESLELIRK.G R.KGYTQQLAFR.Q K.QKPDGIFQEDGPVIHQEMIGGFR.D K.AGDFLENHYR.E R.RPYTVAIAAYALALLGK.L
723	1.75	5.53E-03			–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
751	1.35	0.0247			–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
761	1.42	2.49E-04			–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
775	-1.90	5.37E-04	5.37E-03	≥.9995	Complement component C9 precursor	CO9_BOVIN	78369352	C9	5.66	63327	107	14 (27)	7	62.7	R.QGTPLPIDCR.M K.QMFRSRSEIFGQFNGR.K R.SIEIFGQFNGR.K R.SIEIFGQFNGRK.C R.QQCVPTEACEDPEEGCGNDFQCGTGR.C R.NRVVESELAR.T R.VWDGNTLTYYR.R R.RPWNVASLTYDTK.A R.TENHEESIQLR.T K.KGMGQTETNPEADLFDDVITFIR.G K.GMGQTETNPEADLFDDVITFIR.G K.LVPIYDLIPVK.M R.AIEDYINEFSVR.K R.AIEDYINEFSVRK.C
786	-1.7	0.01	3.00E-03	0.922	Complement C1s subcomplement	C1S_BOVIN	146286057	C1S	4.98	78156	70	6 (9)	33	59	R.CDYQIQLEEGFR.V K.FRYHGDPIPCPK.E K.EVTANSFWEPER.A K.EVTANSFWEPERAK.Y

797	1.4	1.57E-03	9.42E-03	≥.9995	Prepro complement component C3	CO3_BOVIN	83764016	C3	6.41	188715	123	21 (16)	27	72.2	R.CQPVDCGAPEPIQHGR.V R.VEDPESTLFGSITR.Y R.LPYSVVRNEQVEIR.A R.AILYNYREAENLK.V K.KRHQQTITIPAR.S R.HQQTITIPAR.S R.SSVAVPYVIVPLKIGLHEVEVK.A K.AAVYNHFISDGVK.K K.AAVYNHFISDGVK.K.T R.TLNPEHLGQGGVQR.E R.TLNPEHLGQGGVQREEVPAADLSDQVPDTESETK.I K.ILLQGTPVAQMTEDAIDGER.L K.RQESLELIR.K R.KGYTQQLAFR.Q K.QKPDGIFQEDGPVIHQEMIGGFR.D K.AGDFLENHYR.E K.AGDFLENHYREL.R R.RPYTVAIAAYALALLGKLEGDR.L K.LEGDRLTKFLNTAK.E K.NRWEENQK.L K.LYNVEATSYALLALLAR.K R.KDYDTTPPVVR.W K.AEGKGQGTLSVTVYHAK.L
833	-1.2	0.0221			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
843	-1.44	0.005	1.91E-03	0.984	Serum albumin	ALBU_BOVIN	30794280	ALB	5.82	71274	57	1 (2)	135	-	R.RHPYFYAPELLEYANK.Y
865	-1.3	3.34E-03			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
906	4.69	0.002	1.21E-02	0.998	FGG protein	Q3SZZ9_BOVIN	74267780	FGG	5.56	49763	104	10 (33)	26	77.3	R.FGSYCPTTCGIADFLNNYQTSVDKDLR.T K.AIQISYNPDQPSKPNNIESATK.N K.SMMEEIMKYETLISTHESTIR.F K.YETLISTHESTIR.F R.FLQEIYNSNSQK.I K.ESGLYFIRPLK.A K.IHLISTQSTIPYVLR.I K.CHAGHLNGVYQGGTYSK.T R.LAIGEGQQHQLGGAK.Q K.LLVLTLLGLGLAFFR.D K.LIKGIETGAEDLEILPGLAFISSGLR.Y K.GIETGAEDLEILPGLAFISSGLR.Y K.GIETGAEDLEILPGLAFISSGLRYPGVK.S K.STVELFKFQEEK.S K.STVELFKFQEEKSLHLK.T K.FQEEKSLHLK.T K.TIKHELLPNLNDLVAVGR.E K.HELLPNLNDLVAVGR.E R.EH FYATNDHYFVDQYMR.S R.VVASGFDFANGISMSPDR.K
1045	1.46	1.96E-04	3.24E-03	≥.9995	Paraoxonase 1	Q2KIW1_BOVIN	114053183	PON1	5.24	40044	200	20 (52)	16	77.8	M.AKLLVLTLLGLGLAFFR.D K.LLVLTLLGLGLAFFR.D K.LIKGIETGAEDLEILPGLAFISSGLR.Y K.GIETGAEDLEILPGLAFISSGLR.Y K.GIETGAEDLEILPGLAFISSGLRYPGVK.S K.STVELFKFQEEK.S K.STVELFKFQEEKSLHLK.T K.FQEEKSLHLK.T K.TIKHELLPNLNDLVAVGR.E K.HELLPNLNDLVAVGR.E R.EH FYATNDHYFVDQYMR.S R.VVASGFDFANGISMSPDR.K

(continued on next page)

Table 2 (continued)

# spot	Fold change <sup>a</sup> (B/BA)	T-test value	q value <sup>b</sup>	Power <sup>c</sup> ≥	Protein name	SwissProt access name	NCBI nr (gi ) access no.	Gene name	Theor. Pi <sup>d</sup>	Theor. MW <sup>e</sup>	E score/ion score <sup>f</sup>	Pep match (%seq) <sup>g</sup>	Error <sup>h</sup>	% cov <sup>i</sup>	Peptides
1049	1.7	3.63E-04	4.36E-03	≥.9995	Conglutinin	CONG_ BOVIN	461774	CGN1	5.82	38370	51	7 (21)	10	38.4	R.VVASGFDFANGISMSPDRK.Y R.KYVYIAELLAHK.I K.YVYIAELLAHK.I K.YVYIAELLAHKIHVYEK.H K.IFSYDPENPPGSEVLQIQNILAEEP.V K.VTVVYAEDGKVLHGSTVASVYK.G K.LIAPVAEEETR.I K.IVVVTAGVR.Q R.LNLVQR.N R.VIGSGCNLDSAR.F
1181	-1.52	0.001	8.64E-03	≥.9995	Lactate dehydrogenase B	B0JYN3_ BOVIN	154425698	LDHB	5.72	36986	261	4 (15)	168	-	K.LIAPVAEEETR.I K.IVVVTAGVR.Q R.LNLVQR.N R.VIGSGCNLDSAR.F
1278	-2.2	9.73E-03			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1293	1.8	1.24E-04			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1297	1.59	0.001	7.49E-03	≥.9995	Protein AMBP precursor	AMBP_ BOVIN	27806743	AMBP	7.81	40122	104	1 (5)	9	-	A.SSVPTLPDDIQVQENFDLSR.I
1300	1.78	1.68E-06	3.80E-04	≥.9995	Alpha-2-HS- Glycoprotein precursor (α2-HSG)	B0JYN6_ BOVIN	27806751	AHSG	5.26	39193	45	2 (6)	32	-	R.AQFVPLPVSVSVEFAVAATDCIAK.E
1357	-1.83	4.45E-05	1.57E-03	≥.9995	Immunoglobulin J chain	Q3SYR8_ BOVIN	32401410	IGJ	5.1	18359	77	1 (9)	14	-	R.IIPSAEDPSQDIVER.N K.MVETALTPDSCYPD.- R.IIPSAEDPSQDIVER.N K.YVRPGGGFTPNFQLFEK.G
1427	-5.33	4.16E-04	4.53E-03	≥.9995	Selenium- Dependent Glutathione Peroxidase	GPX3_ BOVIN	449500	GPX3	6.84	25836	47	1 (7)	3	-	K.YVRPGGGFTPNFQLFEK.G
1430	-2.10	4.32E-04	4.53E-03	≥.9995	Glutathione Peroxidase 3	GPX3_ BOVIN	151554274	GPX3	6.84	25876	70	6 (37)	24	39.9	K.QEPGENSEILATLK.Y K.YVRPGGGFTPNFQLFEKGDVNGEK.E K.NSCPPTSELLGSPDR.L K.FLVGPDGIPIMR.W K.FLVGPDGIPIMRWYHR.T R.TTVNSVKMDILTYMR.R

<sup>a</sup> Fold change: increment/decrease of the intensity of the spot in natural habitat/semiferal conditions. -2 means that the protein was 2-fold less abundant in semiferal conditions.

<sup>b</sup> q value: adjusted T-tests with a false discovery rate (FDR) approach.

<sup>c</sup> Power: probability of finding a real difference if it exists.

<sup>d</sup> Theoretical pI: predicted isoelectric point of the protein according to protein sequence.

<sup>e</sup> Theoretical MW: predicted molecular weight of the protein according to protein sequence.

<sup>f</sup> E score/ion score: the Mascot MS and MS/MS scores are based on the calculation probability that the observed match between the experimental data and the database sequence is a random event.

<sup>g</sup> Pep match (%seq): refers to the percentage of the protein sequence that corresponds to matched peptides.

<sup>h</sup> Error: difference between observed and theoretical mass (ppm).

<sup>i</sup> Coverage(%): refers to the percentage of the peaks intensity that corresponds to matched peptides.

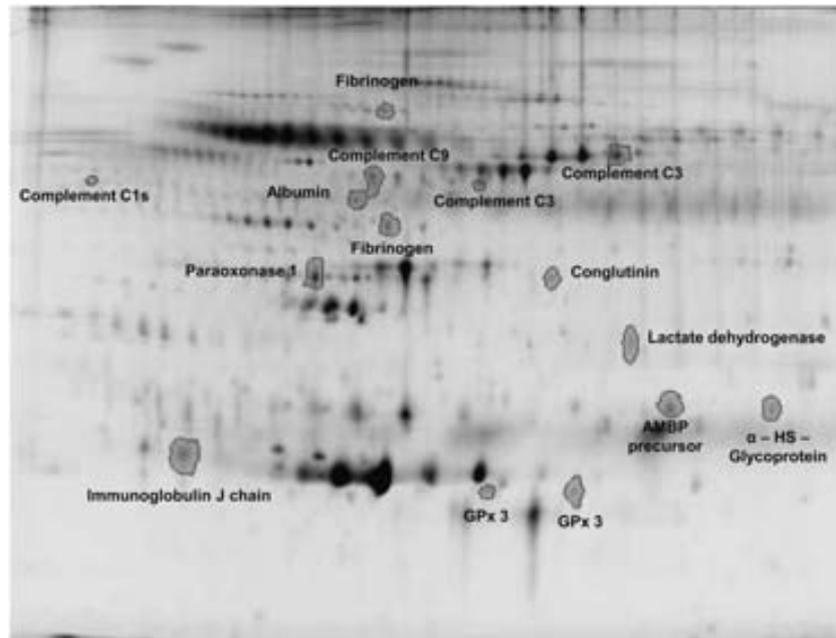


Fig. 1 – Representative image of a gel with the differentially expressed proteins identified in Table 2.

Table 3 – Mean values for concentrations of oxidative stress-related parameters in Bruna, Bruna-Alberes and Alberes groups.

	RSD <sup>a</sup>	CV <sup>b</sup> (%)	B (Bruna)	BA (Bruna at Alberes)	A (Alberes)
GPx (U/L)	389.21	99.24	68.87 <sup>a</sup>	197.59 <sup>b</sup>	910.09 <sup>c</sup>
PON-1 (KU/L)	2.012	26.18	9.256 <sup>a</sup>	6.379 <sup>b</sup>	7.333 <sup>b</sup>
GR (U/L)	33.22	18.29	200.16 <sup>a</sup>	185.39 <sup>a</sup>	159.29 <sup>b</sup>
SOD (U/L)	61.48	20.59	284.28 <sup>a</sup>	285.48 <sup>a</sup>	336.62 <sup>b</sup>
Carbonyl groups (AU)	0.207	18.35	0.990 <sup>a</sup>	1.159 <sup>b</sup>	1.232 <sup>b</sup>

Within rows, means with the same superscript did not differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup> RSD: root standard deviation.

<sup>b</sup> CV: coefficient of variation.

of cows were already characterized in a previous work by our group [6].

The proteomic comparison was performed with serum samples pooled from all the individuals in both groups of *Bruna*, labelled with DIGE. A first DIGE analysis using complete, non-depleted serum provided few positive results and none of them could be thoroughly validated by immunological or enzymatic techniques (not shown). For this reason, we enriched the serum preparation by treatment with ProteoMiner, a technique that

consists of a unique library of hexapeptides, which bind proteins of different abundance with same capacity; the fast saturation with the high-abundance proteins allowing the enrichment of medium- and low-abundance proteins. We have previously validated this technique in bovine, and shown that it has a good reproducibility [11]. In the present study, the experimental design included the treatment with ProteoMiner by triplicate in three different days and differential labelling (dye-swapping) to ensure that samples were equally enriched. Results showed that the

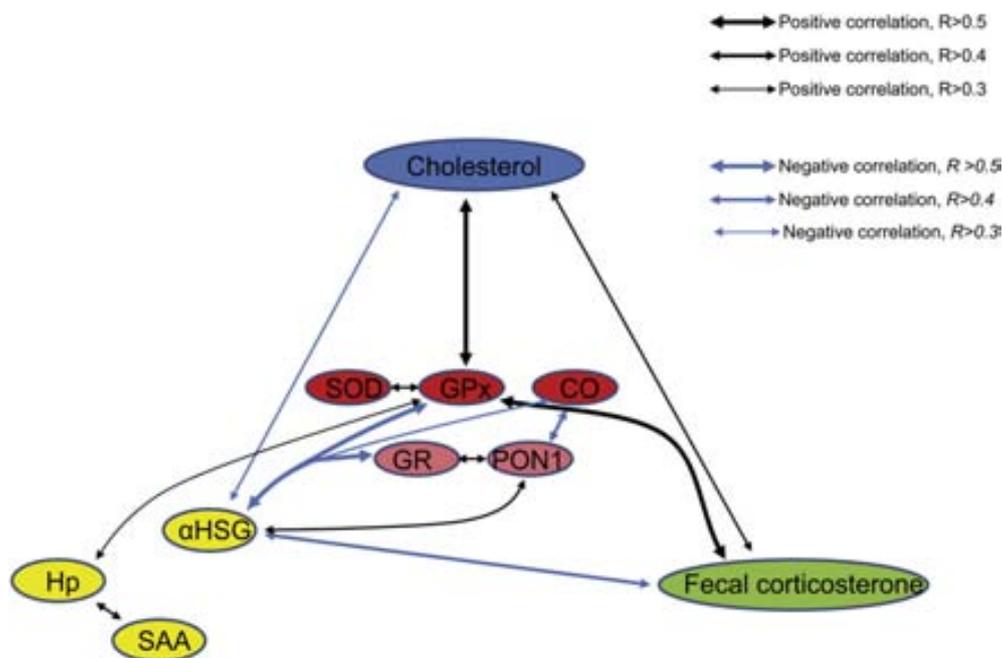
Table 4 – Mean values for concentrations of acute phase proteins in Bruna, Bruna-Alberes and Alberes groups.

	RSD <sup>a</sup>	CV <sup>b</sup> (%)	B (Bruna)	BA (Bruna at Alberes)	A (Alberes)
$\alpha$ 2HSG (mg/mL)	0.39	31.70	1.99 <sup>a</sup>	1.17 <sup>b</sup>	0.50 <sup>c</sup>
Haptoglobin (mg/mL)	0.18	82.33	0.16 <sup>a</sup>	0.24 <sup>a,b</sup>	0.27 <sup>b</sup>
SAA ( $\mu$ g/mL)	23.80	142.29	13.06 <sup>a</sup>	20.12 <sup>a</sup>	17.12 <sup>a</sup>

Within rows, means with the same superscript did not differ significantly ( $P < 0.05$ ).

<sup>a</sup> RSD: root standard deviation.

<sup>b</sup> CV: coefficient of variation.



**Fig. 2 – Comprehensive view of the correlation between biomarkers in cows living in different conditions (redox markers, lipid markers, acute phase proteins and fecal corticosterone).**

ProteoMiner treatment had good reproducibility and that the relative abundance of differentially expressed spots was very similar in both study groups (Supplementary Figure S2).

Proteomic analysis of differentially expressed spots identified three main groups of proteins: one of them were proteins related to oxidative stress, including two spots corresponding to Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase 3, which were increased 5.33 and 2.10-fold respectively in *Bruna* living in the Alberes mountains, and Paraoxonase-1, which was decreased 1.46-fold in the *Bruna* group living in the Alberes. Another group of proteins was related to the complement system, including Complement Components C3, C1s and C9; and conglutinin, a calcium-dependent lectin-like protein which binds to immune complexes through the complement component C3bi [15]. A third group of proteins is related to the acute phase proteins, including the Alpha-2-HS-Glycoprotein precursor ( $\alpha$ 2-HSG), which was increased 1.78-fold in the control group of *Bruna*, and the alpha-1-microglobulin/bikunin precursor (AMBp). A fragment corresponding to albumin was also identified (see below for discussion).

The use of ProteoMiner to identify new biomarkers may have some pitfalls due to the fact that the actual concentration of analytes may influence the degree of enrichment in each sample. Furthermore, some differentially expressed proteins may have been lost with this protocol, since ProteoMiner pretreatment “equalizes” levels of proteins, especially those more abundant. In any case, biological validation of the results is mandatory to confirm the results of the DIGE analysis. The analysis of all the individuals included in the study is also an important point since the proteomic analysis was carried out with pooled sera from all the individuals in each group.

Biological validation confirmed that GPx was increased in *Bruna* cows living in harsh conditions, whereas PON-1 was decreased in this group. It is interesting to note that similar

results are observed in the *Alberes* breed (Group A), which had the highest GPx activity and the lowest PON-1 activity. Both enzymes were validated by an enzymatic analysis that actually measures enzyme activity and not amount of protein. Although it may not be a complete correlation between both magnitudes, enzyme activity should provide a more biologically meaningful information since it relates to enzyme functionality.

GPx is the protein we have found most up-regulated in the proteomic analysis (5.33 and 2.10-fold) as well as in the enzymatic analysis (2.9-fold in *Bruna* living in the Alberes compared to control *Bruna* and 13.2-fold in *Alberes* cows related to control *Bruna*). Plasma GPx (GPx-3) is one of five known glutathione peroxidases and it is unique among the members of the GPx family as the only extracellular isoforms [16]. GPx is a highly inducible antioxidant enzyme, which increases in many pathological conditions as well as in other oxidative insults. PON-1 was down-regulated in group BA (1.46-fold in the proteomic analysis and 1.45-fold in the enzymatic analysis). This enzyme prevents and retards the oxidation of HDL and LDL and therefore inhibits the onset and progression of oxidative stress [17].

Superoxide dismutase (SOD), another enzyme involved in redox homeostasis which catalyzes the decomposition of the superoxide radical into hydrogen peroxide  $H_2O_2$ , was higher in *Bruna* cows living in hard conditions and even higher in *Alberes* cows, similarly to GPx. On the contrary, glutathione reductase (GR), the enzyme responsible for the regeneration of reduced glutathione, did not change significantly with living conditions, although it showed a tendency to decrease in hard conditions. This is not unexpected since, although GR is an essential enzyme for redox homeostasis, it is normally not included in the list of the most physiologically relevant antioxidant enzymes [18,19], probably because its activity [19] depends mainly on the availability of NADPH and it is less susceptible to other mechanisms of regulation [20].

The increase in GPx and SOD indicates an imbalance in the redox status of the individual, which could or could not be resolved. To assess whether a real change in the degree of oxidation of biological compounds occurred in animals living in hard conditions, the presence of carbonyl groups into proteins as a hallmark of protein oxidation [21–23] was determined by immunoblot. Protein oxidation was highest in *Alberes* cows, intermediate in *Bruna* living in the mountain and lowest in *Bruna*, indicating that indeed the degree of protein oxidation is higher in individuals living in hard conditions.

Animals living in hard environments can suffer oxidative insults by several reasons. One is the existence of disease which is more plausible in cows living in semiferal conditions. This may be due to direct causes (presence of parasites, exposition to microorganisms) or to indirect causes, since diets containing inadequate amounts of nutrients may also indirectly result in oxidative stress by impairing cellular defence mechanisms [21]. A negative energy balance is another major factor in the development of oxidative stress [17]. Other possible origins of oxidative stress are uncomform and stress. In this regard, several aspects of cattle management have also been shown to alter redox markers, such as diet [24,25], transport [26] and in transition dairy cows [27]. It has been also described that cold stress induces an acute phase reaction in rats (and indeed cows living in the mountains were more exposed to cold than cows living close to humans) [28]. The increased levels of fecal corticosterone in *Bruna* cows living in the mountains compared to those living in better conditions indicates that these animals indeed suffer a certain degree of chronic stress.

The challenging environment in the mountains can be counteracted by a diet probably rich in antioxidants. The diet of *Alberes* cows has been described in detail and shown to be composed mainly by woody plants from the genus *Quercus* and *Erica* indicating that these breed of cows behave preferentially as browsers [29]. *Quercus* species are rich in polyphenols and other antioxidants and show high antioxidant potency [30]. This may explain, at least partially, the high levels of GPx in *Alberes* cows and probably in *Bruna* cows living in the mountains with a broader food source than control *Bruna* cows.

Nutritional stress may also contribute to oxidative stress, since a negative energy balance increases lipid mobilization and degradation to free fatty acids in the mitochondria, giving rise to reactive oxygen species (ROS) leaking from the electron transport chain [21]. Redox alterations associated to a negative energy balance condition, such as lactation, have been widely described in dairy cows [17,31]. Nevertheless, and despite the better feeding conditions of control cows (group B), no clear indication of nutritional stress between the three groups of cows could be inferred. Markers of nutritional stress such as serum NEFAs and 3-hydroxybutyrate do not indicate clear differences between groups B and BA since 3-hydroxybutyrate is increased but NEFAs are decreased in *Bruna* cows living in the *Alberes*. In the *Alberes* breed, 3-hydroxybutyrate is slightly lower than in *Bruna* cows indicating a good metabolic adaptation to the bush-based diet. The higher concentration of serum NEFAs in these individuals may indicate a lipolytic response to adrenaline after stressful handling (as indicated also by the higher levels of serum cortisol) better than an increased requirement of energy mobilization. Very similar results were found in our previous work with different individuals in the same conditions [6]. Cholesterol and

triglycerides were higher in the *Alberes* breed, maybe indicating a higher degree of lipid mobilization in these animals.

Acute phase proteins and the complement system are part of the innate immune response against pathogens. Some acute phase proteins are directly related to oxidative stress, such as haptoglobin, which binds free haemoglobin and thus reduces the oxidative damage associated with haemolysis [32]. In the present case, all cows included in the study were healthy animals, as indicated by the absence of clear clinical symptoms and the levels of IgG, which were determined in all the individuals by a specific ELISA for bovine IgG (not shown), but a subclinical pathology cannot be excluded. Immunoglobulin J chain, a component of oligomeric IgA and IgM [33], was found increased in cows living in challenging conditions in the proteomic analysis (Table 2), suggesting that at least a subclinical disease could exist in some individuals. An increase in acute phase proteins may also be a consequence of stress, such as weaning, mixing and transportation in cattle [4]. Whether this is a consequence of psychological stress or an indirect measure of inflammation is still a matter of controversy.

Similarly to our previous results [6], haptoglobin concentration showed a tendency to increase in cows living in the mountains. SAA, the main APP in bovine [3], was very variable between individuals, with few individuals with high SAA concentration, suggesting that these animals may be suffering from subclinical infection/inflammation. ITIH4 is the homologue to Pig-MAP in pigs, where it is one of the main acute phase proteins, but it is also present in bovine [14]. This protein was also increased in cows living in the mountains as shown by western blot of the pooled samples. Unfortunately, analysis of all individuals was not possible since the ELISA assay does not work for this specie. Albumin, which is considered a negative acute phase protein, was decreased in *Bruna* cows living in the *Alberes* compared to control *Bruna* cows, using pooled serum samples and agarose gel electrophoresis (3,30 g/dl versus 3,73 g/dl).

The correlation between parameters may help to understand whether a true acute phase response exist in these animals. As shown in Suppl Table S1 and in Supp Figure S3, a moderate correlation between SAA and haptoglobin exists ( $R=0.344$ ), whereas the correlation between  $\alpha 2$ -HSG is weak for haptoglobin ( $R=-0.262$ ) and does not exist for SAA ( $-0.043$ ).

$\alpha 2$ -HSG, also known as fetuin, is a negative, well characterized acute phase protein in humans [34] and not as much in bovine where it was proposed even as a positive APP several years ago [35]. In the present study,  $\alpha 2$ -HSG behaves differently from the established acute phase proteins SAA and haptoglobin, which raises the question whether or not it is really an acute phase protein in the bovine.  $\alpha 2$ -HSG is decreased in animals living in hard conditions, being lowest in *Alberes* cows, intermediate in *Bruna* living in the mountains and highest in control *Bruna* cows. The physiological role of this protein is complex, since it has an anti-inflammatory effect [36], it acts as a potent inhibitor of ectopic mineralization [37] and it is related to energy metabolism and insulin action, since high levels have been found in metabolic syndrome and obesity [38,39]. This condition, from the nutritional point of view, could be considered as the contrary to cows living in restrictive conditions. Interestingly,  $\alpha 2$ -HSG has been identified in several proteomic studies of pathological conditions. A nice example is preeclampsia, where  $\alpha 2$ -HSG was found to be inversely related to oxidative stress markers [40].

The decrease in serum PON-1 activity may be related to the acute phase response. PON-1 circulates in plasma bound to HDL, which also contain apolipoprotein A-I (apoA-I) and SAA. It has been suggested that, during the acute phase response, HDL particles become enriched in SAA and lose apoA-I. As a result, PON-1 is decreased since this enzyme needs apoA-I for activity [41,42].

Finally, several components of the complement pathway have been found deregulated in our proteomic approach. The complement is a cytotoxic defence system involved in the elimination of invading foreign cells and initiation of inflammation, and some components as C3 are considered acute phase proteins. It can be also altered as a consequence of oxidative stress [43,44]. The interpretation of the results is complex since some spots are up-regulated and some are down-regulated. The existence of fragments due to the proteolytic activation of the cascade makes the interpretation more difficult.

Altogether, our results suggest that a chronic low grade inflammation induced by adverse conditions of complex nature, and the accompanying deleterious effects in cells and tissues, exist in animals living in challenging environments. The inflammatory process is tightly associated with oxidative stress and an excess of lipid peroxidation [45]. This leads to the activation of inflammatory cells that further increase the oxidation in a vicious cycle that must be resolved. This situation, which has been evidenced in humans, probably applies also to the present situation.

Hard environments lead to complex changes in biochemical markers. A comprehensive view of the correlation analysis is summarized in Fig. 2. “Positive” oxidative markers (especially GPx) directly correlate with fecal corticosterone, positive acute phase proteins (Hp) and markers of lipid metabolism, especially cholesterol. On the other hand, these positive redox markers inversely correlate with  $\alpha$ 2-HSG (a potential negative acute phase protein) and with “negative” oxidative markers (PON-1).

## 5. Conclusion

Living in challenging environments, with food restriction and far from the human care and contact, induces a higher oxidative stress in cows, as indicated by increased carbonyl content in plasma proteins and higher GPx and SOD activity. Our results indicate that a combination of antioxidant enzymes, such as glutathione peroxidase (GPx), together with  $\alpha$ 2-HSG, cholesterol and fecal corticosterone could be used as an appropriate biomarker profile to assess welfare in challenging living conditions in cattle.

Supplementary materials related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.002>.

## Acknowledgments

The authors thank Dr. Matilde Piñeiro (PigChamp ProEuropa, Segovia, Spain) for providing the anti-ITIH4 antibody, Dr. Dan Tawfik (Weizmann Institute of Science, Rehovot, Israel) for the generous gift of the TBBL reagent, and Alba Folch and Anna Vilalta for her excellent technical assistance. We are

grateful to Dr. F. Canals, Dr. M. Monge and Dr. J. J. Bech-Serra (Servei de Proteòmica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, Spain) for their help with proteomic analysis. This work was supported by grant AGL2010-21578-C03-03 from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología, and grant 2009 SGR-1091 from the Generalitat de Catalunya (to A.B.). A.M-R. was supported by a fellowship from the Spanish Ministerio de Educación. Part of the funding was financed by the FEDER program from the European Union.

## REFERENCES

- [1] Morrow CJ, Kolver ES, Verkerk GA, Matthews LR. Fecal glucocorticoid metabolites as a measure of adrenal activity in dairy cattle. *Gen Comp Endocrinol* 2002;126:229–41.
- [2] Mostl E, Palme R. Hormones as indicators of stress. *Domest Anim Endocrinol* 2002;23:67–74.
- [3] Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PM. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res* 2004;35:163–87.
- [4] Lomborg SR, Nielsen LR, Heegaard PM, Jacobsen S. Acute phase proteins in cattle after exposure to complex stress. *Vet Res Commun* 2008;32:575–82.
- [5] Pineiro M, Pineiro C, Carpintero R, Morales J, Campbell FM, Eckersall PD, et al. Characterisation of the pig acute phase protein response to road transport. *Vet J* 2007;173:669–74.
- [6] Saco Y, Fina M, Gimenez M, Pato R, Piedrafitra J, Bassols A. Evaluation of serum cortisol, metabolic parameters, acute phase proteins and faecal corticosterone as indicators of stress in cows. *Vet J* 2008;177:439–41.
- [7] Mostl E, Messmann S, Bagu E, Robia C, Palme R. Measurement of glucocorticoid metabolite concentrations in faeces of domestic livestock. *Zentralbl Veterinarmed A* 1999;46:621–31.
- [8] Gaidukov L, Tawfik DS. The development of human sera tests for HDL-bound serum PON1 and its lipolactonase activity. *J Lipid Res* 2007;48:1637–46.
- [9] Marsillach J, Aragones G, Beltran R, Caballeria J, Pedro-Botet J, Morcillo-Suarez C, et al. The measurement of the lactonase activity of paraoxonase-1 in the clinical evaluation of patients with chronic liver impairment. *Clin Biochem* 2009;42:91–8.
- [10] Robinson CE, Keshavarzian A, Pasco DS, Frommel TO, Winship DH, Holmes EW. Determination of protein carbonyl groups by immunoblotting. *Anal Biochem* 1999;266:48–57.
- [11] Marco-Ramell A, Bassols A. Enrichment of low-abundance proteins from bovine and porcine serum samples for proteomic studies. *Res Vet Sci* 2010;89:340–3.
- [12] Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* 1996;68:850–8.
- [13] Esselens CW, Malapeira J, Colome N, Moss M, Canals F, Arribas J. Metastasis-associated C4.4A, a GPI-anchored protein cleaved by ADAM10 and ADAM17. *Biol Chem* 2008;389:1075–84.
- [14] Pineiro M, Andres M, Iturralde M, Carmona S, Hirvonen J, Pyorala S, et al. ITIH4 (inter-alpha-trypsin inhibitor heavy chain 4) is a new acute-phase protein isolated from cattle during experimental infection. *Infect Immun* 2004;72:3777–82.
- [15] Tabel H. Alternative pathway of complement in ruminants: role in infection. *Vet Immunol Immunopathol* 1996;54:117–21.
- [16] Bierl C, Voetsch B, Jin RC, Handy DE, Loscalzo J. Determinants of human plasma glutathione peroxidase (GPx-3) expression. *J Biol Chem* 2004;279:26839–45.
- [17] Antoncic-Svetina M, Turk R, Svetina A, Geres D, Rekić B, Juretic D. Lipid status, paraoxonase-1 activity and metabolic

- parameters in serum of heifers and lactating cows related to oxidative stress. *Res Vet Sci* 2011;90:298–300.
- [18] Mates JM, Sanchez-Jimenez F. Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci* 1999;4:D339–45.
- [19] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39:44–84.
- [20] Rahman Q, Abidi P, Afaq F, Schiffmann D, Mossman BT, Kamp DW, et al. Glutathione redox system in oxidative lung injury. *Crit Rev Toxicol* 1999;29:543–68.
- [21] Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals. *Vet J* 2007;173:502–11.
- [22] Barelli S, Canellini G, Thadikkaran L, Crettaz D, Quadroni M, Rossier JS, et al. Oxidation of proteins: basic principles and perspectives for blood proteomics. *Proteomics Clin Appl* 2008;2:142–57.
- [23] Madian AG, Diaz-Maldonado N, Gao Q, Regnier FE. Oxidative stress induced carbonylation in human plasma. *J Proteomics* 2011;74:2395–416.
- [24] Gabai G, Testoni S, Piccinini R, Marinelli L, Stradaoli G. Oxidative stress in primiparous cows in relation to dietary starch and the progress of lactation. *Anim Sci* 2004;79:99–108.
- [25] Pedernera M, Celi P, Garcia SC, Salvin HE, Barchia I, Fulkerson WJ. Effect of diet, energy balance and milk production on oxidative stress in early-lactating dairy cows grazing pasture. *Vet J* 2010;186:352–7.
- [26] Chirase NK, Greene LW, Purdy CW, Loan RW, Auvermann BW, Parker DB, et al. Effect of transport stress on respiratory disease, serum antioxidant status, and serum concentrations of lipid peroxidation biomarkers in beef cattle. *Am J Vet Res* 2004;65:860–4.
- [27] Bernabucci U, Ronchi B, Lacetera N, Nardone A. Markers of oxidative status in plasma and erythrocytes of transition dairy cows during hot season. *J Dairy Sci* 2002;85:2173–9.
- [28] Kim JC, Kim JY, Yeom SR, Jeong BY, Hwang HZ, Park KJ, et al. 2-D DIGE and MS/MS analysis of protein serum expression in rats housed in concrete and clay cages in winter. *Proteomics* 2008;8:3632–44.
- [29] Bartolome J, Plaixats J, Piedrafita J, Fina M, Adrobau E, Aixas A, et al. Foraging behavior of Albares cattle in a Mediterranean forest ecosystem. *Rangel Ecol Manage* 2011;64:319–24.
- [30] Rocha-Guzman NE, Medina-Medrano JR, Gallegos-Infante JA, Gonzalez-Laredo RF, Ramos-Gomez M, Reynoso-Camacho R, et al. Chemical evaluation, antioxidant capacity, and consumer acceptance of several oak infusions. *J Food Sci* 2012;77:C162–6.
- [31] Turk R, Juretic D, Geres D, Svetina A, Turk N, Flegar-Mestric Z. Influence of oxidative stress and metabolic adaptation on PON1 activity and MDA level in transition dairy cows. *Anim Reprod Sci* 2008;108:98–106.
- [32] Murata H, Shimada N, Yoshioka M. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J* 2004;168:28–40.
- [33] Miller I, Goldfarb M. Immunoglobulin patterns in health and disease. In: Smejkal GB, Lazarev A, editors. *Separation Methods in Proteomics*. Boca Raton, USA: CRC Taylor & Francis; 2006. p. 235–67.
- [34] Arnaud P, Kalabay L. Alpha2-HS glycoprotein: a protein in search of a function. *Diabetes Metab Res Rev* 2002;18:311–4.
- [35] Dziegielewska KM, Brown WM, Gould CC, Matthews N, Sedgwick JE, Saunders NR. Fetuin: an acute phase protein in cattle. *J Comp Physiol B* 1992;162:168–71.
- [36] Ombrellino M, Wang H, Yang H, Zhang M, Vishnubhakat J, Frazier A, et al. Fetuin, a negative acute phase protein, attenuates TNF synthesis and the innate inflammatory response to carrageenan. *Shock* 2001;15:181–5.
- [37] Jahnen-Dechent W, Heiss A, Schafer C, Ketteler M. Fetuin-A regulation of calcified matrix metabolism. *Circ Res* 2011;108:1494–509.
- [38] Ix JH, Sharma K. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: the roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. *J Am Soc Nephrol* 2010;21:406–12.
- [39] Xu Y, Xu M, Bi Y, Song A, Huang Y, Liu Y, et al. Serum fetuin-A is correlated with metabolic syndrome in middle-aged and elderly Chinese. *Atherosclerosis* 2011;216:180–6.
- [40] Johnstone ED, Sawicki G, Guilbert L, Winkler-Lowen B, Cadete VJ, Morrish DW. Differential proteomic analysis of highly purified placental cytotrophoblasts in pre-eclampsia demonstrates a state of increased oxidative stress and reduced cytotrophoblast antioxidant defense. *Proteomics* 2011;11:4077–84.
- [41] Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, et al. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures. *J Clin Invest* 1995;96:2758–67.
- [42] Camps J, Marsillach J, Joven J. The paraoxonases: role in human diseases and methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2009;46:83–106.
- [43] Collard CD, Lekowski R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL. Complement activation following oxidative stress. *Mol Immunol* 1999;36:941–8.
- [44] Hart ML, Walsh MC, Stahl GL. Initiation of complement activation following oxidative stress. In vitro and in vivo observations. *Mol Immunol* 2004;41:165–71.
- [45] Rull A, Camps J, Alonso-Villaverde C, Joven J. Insulin resistance, inflammation, and obesity: role of monocyte chemoattractant protein-1 (or CCL2) in the regulation of metabolism. *Mediators Inflamm* 2010;2010:326580. Epub 2010 Sep 23.