

## Sesión de proteómica de biomarcadores y patologías humanas

Coordinadores: <sup>1</sup>Ángel García, <sup>2</sup>Cristina Ruiz

<sup>1</sup> Departamento de Farmacología; Universidad de de Santiago de Compostela

<sup>2</sup> Laboratorio de investigación Osteoarticular y del Envejecimiento, INIBIC-CH Universitario A Coruña.

La sesión 3 de las II Jornadas Bienales de Jóvenes Investigadores en Proteómica estuvo enfocada en la aplicación de estrategias proteómicas para el estudio de patologías humanas y la búsqueda de biomarcadores proteicos de las mismas.

La nutrida participación, con 8 presentaciones orales y 14 en formato de póster, ya prometía a priori que iba a tratarse de una sesión intensa, y no decepcionó. Además, la gran calidad de los trabajos presentados, que combinaban originales estrategias técnicas con inteligentes diseños experimentales, dio idea del gran nivel existente en proteómica biomédica. Las temáticas fueron de lo más variado, abarcando desde avances tecnológicos concretos hasta aplicaciones prácticas en diferentes campos biomédicos: cáncer, cardiovascular, artritis, obesidad, etc.

Con el fin de promover el debate, la presentación de las comunicaciones orales se repartió en dos fases: una más centrada en estrategias de búsqueda o validación de biomarcadores de potencial interés clínico, y otra enfocada en estudios de patogénesis de distintas enfermedades. Cada fase concluyó con un periodo de discusión en el que se trataba de resumir la información presentada y discutir los problemas relacionados con la proteómica clínica.

### Detección de biomarcadores en fluidos biológicos

#### 1. Empleo de *arrays* de proteínas

La primera participante de la sesión fue Ingrid Babel, del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid), la cual nos presentó una interesante estrategia para la búsqueda de autoanticuerpos en sueros de pacientes con

cáncer colorrectal (CCR) que puedan tener utilidad como biomarcadores. Se trata de una alternativa a los *arrays* de proteínas clásicos, que se basa en el empleo de librerías de fagos T7 que contienen cDNA de tejido de pacientes con CCR. Estos fagos se imprimen sobre soportes de nitrocelulosa, que a continuación son cribados con sueros de pacientes con CCR, con el fin de identificar aquellos péptidos desplegados en la superficie de los fagos reconocidos por autoanticuerpos específicos de CCR. Para completar el estudio, se verificó mediante ELISA la inmunoreactividad de 5 fagos homólogos a proteínas conocidas.

#### 2. Estrategias de proteómica dirigida (MRM)

Los experimentos de proteómica al azar para el descubrimiento de péptidos o proteínas con potencial como biomarcadores deben ir acompañados del diseño de estrategias dirigidas, con el fin de poder verificar su utilidad biomarcadora en un número más amplio de muestras. Una estrategia muy empleada en este campo, y que se basa en espectrometría de masas, es la técnica de Multiple Reaction Monitoring (MRM). Antonio Serna, de ABSciex, presentó la tecnología que dispone su empresa para la realización de estudios MRM. Este tipo de estudios han mostrado ya su utilidad para el análisis cuantitativo de biomarcadores, debido a su gran reproducibilidad, rango dinámico y límites de detección, y por ello aparecen como una alternativa prometedora para la cuantificación de proteínas en líquidos biológicos que evita la necesidad de anticuerpos específicos y posibilita análisis múltiples (de más de 100 proteínas simultáneamente).

### 3. Estudio proteómico de fluidos biológicos: un ejemplo con la orina

La presentación de Marina Rigau, del *Institut de Recerca* (Barcelona), nos mostró a todos un ejemplo de estrategia proteómica para búsqueda de biomarcadores en orina. Tras un procesamiento de las muestras con ProteoMiner (de Bio-Rad), realizó un estudio diferencial mediante 2D-DIGE, y validó la posible utilidad biomarcadora de 15 candidatos mediante MRM.

El empleo de ProteoMiner en este estudio fue objeto de discusión posterior ya que, además del de Marina, había otros dos trabajos que presentaban este procesamiento como método para reducir el rango dinámico de las muestras.

### 4. Nuevas estrategias basadas en MALDI profiling para búsqueda de biomarcadores

A continuación, Francesco Tortorella, de los laboratorios Bio-Rad, nos presentó el sistema Lucid, que comercializa su empresa. Este sistema combina la estrategia de separación mediante cromatografía de retención (empleando los ProteinChips de SELDI) con espectrometría de masas de alta resolución de tipo MALDI-TOF y MALDI-TOF/TOF. De este modo, la especificidad de las superficies de los chips permite limpiar la muestra directamente y simplificar muestras complejas, mientras que el análisis posterior con espectrometría de masas en tándem posibilita la identificación de los picos diferenciales en los perfiles de MALDI. Esto constituye una gran ventaja frente a las clásicas estrategias de SELDI-TOF, en la que no se identificaban los péptidos y por tanto no era posible obtener información biológica acerca de los cambios en los espectros de masas.

### 5. Discusión general: el problema del rango dinámico

Las preguntas y cuestiones surgidas en las presentaciones de esta primera parte de la sesión se englobaron en un periodo de discusión general, en el que el tema principal fue el problema del gran rango dinámico de las proteínas presentes en las muestras que

clásicamente se utilizan para la búsqueda de biomarcadores. Los fluidos biológicos humanos son excelentes fuentes de biomarcadores proteicos, ya que se encuentran en contacto con la mayoría de los tejidos, incorporando proteínas secretadas o liberadas por ellos que pueden detectarse sin necesidad de biopsia. El plasma (o suero) tiene la gran ventaja de su fácil obtención, pero también la desventaja de que aquellas proteínas liberadas por un tejido o tipo celular específico (que son las que tienen mayor potencial como biomarcadores) se diluyen, haciéndose muchas veces indetectables con los métodos disponibles en la actualidad. Por ello, también hay gran interés en el análisis de otro tipo de fluidos (denominados “proximales”) que entran en contacto con uno o pocos tejidos, en los que se espera una menor dilución.

De todas formas, sea cual sea el fluido sobre el que se realice la búsqueda de biomarcadores, éstos aparecerán típicamente a bajas concentraciones, siendo difícil su detección por la presencia de otras proteínas más abundantes que los enmascaran. Como estrategias para resolver este problema de sensibilidad se encuentran las técnicas de proteómica dirigida (MRM, SISCAPA, etc.), pero en el caso de realizar estudios al azar la única alternativa consiste en enriquecer las muestras en estas proteínas menos abundantes, empleando productos como el ProteoMiner o eliminando las proteínas más abundantes de plasma mediante cromatografía de afinidad. Varios de los pósters presentados en la sesión trataron este tema, y la conclusión es que cualquier tratamiento altera la cuantificación posterior. En el caso del ProteoMiner, se discutió su uso en estudios cuantitativos, ya que altera las proporciones de las proteínas de forma global, y algún participante propuso su empleo únicamente en análisis cualitativos de las muestras. Por su parte, la depleción mediante cromatografía de afinidad tiene como principal desventaja que muchas proteínas pueden ser eliminadas de forma inespecífica por su interacción con proteínas abundantes como la albúmina.

## Estudios de patologías humanas mediante abordajes proteómicos.

### 1. Estudio de biomarcadores plaquetarios en síndrome coronario agudo

La sección de proteómica aplicada al estudio de patologías humanas comenzó con la charla de Andrés F. Parguñá, del Departamento de Farmacología de la Universidad de Santiago de Compostela, quien nos presentó un análisis del proteoma plaquetario en pacientes con síndrome coronario agudo (SCA), patología en la que las plaquetas juegan un papel fundamental y que es principal causa de muerte en el mundo occidental. Este trabajo se basó en 2-DE de alta resolución para la separación de proteínas y MALDI-TOF/TOF para su identificación. El análisis de imagen fue con el software Ludesi REDFIN (Suecia) y las validaciones mediante *western blot*. Se detectaron 55 puntos en el gel que variaban de forma significativa entre plaquetas de un grupo de 18 pacientes con SCA sin elevación del segmento ST en el electrocardiograma (SCASEST) y un grupo control constituido por 10 pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable. Los grupos se cotejaron de manera que no hubiese diferencias significativas en cuanto a edad, sexo y tratamientos. Las proteínas identificadas se correspondían a 30 genes diferentes y la mayoría de las mismas pertenecía a los siguientes grupos funcionales: señalización, citoesqueleto y rutas de secreción / vesículas. Esto concuerda con la idea de una mayor activación plaquetaria en los pacientes SCASEST, y se confirmó con el descenso del número de diferencias en estudios de seguimiento de los pacientes. Este estudio abre un campo de investigación para explorar el papel de proteínas plaquetarias en la patogénesis del SCA, así como para la búsqueda de biomarcadores secretados por las plaquetas que puedan ser de utilidad en dicha enfermedad.

### 2. Visión proteómica de la estenosis valvular aórtica

La siguiente presentación corrió a cargo de Tatiana Martín-Rojas, del laboratorio de fisiopatología vascular del Hospital Nacional de

Paraplégicos de Toledo. La charla se centró en el estudio de la estenosis aórtica (EA) valvular desde un punto de vista proteómico. La EA degenerativa es una enfermedad de elevada prevalencia en los países desarrollados y es la responsable del mayor número de reemplazos aórticos. Debido a que las proteínas que componen las válvulas aórticas son esenciales para el correcto funcionamiento de éstas, su identificación y caracterización es de gran relevancia. En este trabajo se comparó el proteoma de válvulas aórticas procedentes de pacientes sometidos a reemplazo valvular aórtico con el de válvulas aórticas sanas procedentes de necropsias. El análisis proteómico diferencial fue mediante 2D-DIGE y la identificación de proteínas mediante MALDI-TOF/TOF. Se encontraron 51 *spots* que variaban entre grupos, que se correspondían a 18 genes diferentes. Las validaciones fueron mediante *western blot* e inmunohistoquímica.

### 3. Empleo de SILAC como técnica cuantitativa para estudios de patogénesis y farmacoproteómica *in vitro*

Valentina Calamia, del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC), mostró a continuación una aplicación de la técnica cuantitativa de SILAC en estudios de proteómica biomédica. Esta estrategia se basa en el marcaje metabólico diferencial de células en cultivo con aminoácidos que presentan isótopos estables, lo que permite llevar a cabo análisis de proteómica cuantitativa. Como ejemplo de la utilidad de esta técnica en estudios *in vitro*, la presentación mostró la estandarización del marcaje de condrocitos, que son las únicas células presentes en el cartílago articular humano y responsables del mantenimiento de la integridad del tejido. Una vez estandarizada la técnica, se aplicó para evaluar el efecto de una citoquina proinflamatoria, la interleuquina-1 $\beta$ , sobre el perfil de proteínas secretadas por los condrocitos. Esta estrategia posibilitó la identificación de un gran número de componentes de la matriz extracelular del cartílago, lo que da idea de la utilidad del estudio de los secretomas como reflejo de los

procesos de remodelación de los tejidos. El análisis cuantitativo demostró el desequilibrio que la citoquina (un mediador esencial en la patogénesis de la artrosis) produce entre los procesos anabólicos y catabólicos del condrocito, incrementando la síntesis de metaloproteasas y otras citoquinas inflamatorias. El empleo de este modelo posibilitará la realización de análisis farmacoproteómicos en el futuro, con el fin de evaluar el efecto de compuestos con potencial acción terapéutica en artrosis.

#### **4. Análisis proteómico diferencial de células hepáticas tras depleción de prohibitina**

La última charla de la sesión corrió a cargo de Virginia Sánchez-Quilés, del CIMA (Universidad de Navarra). La prohibitina 1 (Phb1) es una proteína que juega un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis hepática. En este trabajo se silenció la expresión de Phb1 en la línea celular humana de carcinoma de hígado PLC/PRF 5 mediante siRNAs. Se llevó a cabo un estudio proteómico diferencial mediante DIGE y espectrometría de masas para explorar los mecanismos involucrados en la respuesta de las células PLC a la disminución de la actividad de Phb1. Los estudios de validación fueron mediante *western blot*. La principal conclusión fue que el silenciamiento de Phb1 en la línea celular PLC/PRF5 condujo a un aumento de apoptosis y a una disminución de la proliferación celular.

#### **5. Discusión general: Obtención de muestras clínicas para análisis proteómicos.**

La sesión concluyó con una discusión sobre aspectos fundamentales a la hora de plantear un estudio de proteómica clínica. El debate fue muy participativo y quedó clara la importancia de llevar a cabo una recogida y almacenamiento de muestras riguroso para evitar que los estudios estuvieran sesgados por la presencia de contaminantes, o por artefactos debido a que no todas las muestras incluidas en un estudio fuesen tratadas por igual. En el caso de suero o plasma, es fundamental que todas las muestras se hayan obtenido con un mismo

protocolo y que se almacenen adecuadamente a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Así mismo, las muestras deben ser alicuotadas para evitarse en la medida de lo posible un elevado número de congelaciones /descongelaciones, lo cual debe ser convenientemente controlado. En cuanto al estudio de tejidos, debe asegurarse con el patólogo correspondiente que se está obteniendo el tejido adecuado para nuestro estudio y que el mismo ha sido convenientemente “lavado” para evitar contaminaciones, por ejemplo, con restos de sangre o plasma. Para todo lo anterior es clave una buena coordinación entre investigadores básicos y clínicos. Las enfermeras o cirujanos encargados de la toma de muestra deben estar advertidos de la importancia de una adecuada recogida de muestra para el estudio que se llevará a cabo. La investigación translacional a este nivel sólo puede tener éxito si existe buena voluntad y coordinación entre el equipo multidisciplinar que involucra a clínicos e investigadores básicos. Ello es también fundamental a la hora de plantear los grupos objetos de estudio: la elección de grupos de pacientes control adecuados es clave; debe tenerse en cuenta la patología a estudiar, los tipos de pacientes, y sus tratamientos. Sin una adecuada supervisión clínica de estos factores, el estudio quedará comprometido, al dar lugar a resultados difíciles de interpretar. El debate fue muy participativo y todo el mundo coincidió en el reto que supone llevar a cabo estudios de proteómica clínica rigurosos y reproducibles, y que sería deseable que se estableciesen unas guías claras que ayudasen a conseguir dicho objetivo.

**Conclusión final**

La sesión de biomarcadores y patologías humanas fue de las más extensas de las Jornadas. El número y calidad de los trabajos presentados hizo muy difícil la selección de comunicaciones orales, las cuales dieron una buena visión de lo que se está haciendo a nivel nacional, y en el seno de la SEProt, en un área

claramente en expansión. Debemos en cualquier caso tener en cuenta que la proteómica clínica presenta todavía muchos retos de procedimiento y tecnológicos que se deben afrontar para garantizar que una proporción cada vez mayor de los trabajos publicados tengan su reflejo en una mejora real del tratamiento / predicción de la patología concreta objeto de estudio.