

2. La inmunoproteómica en el descubrimiento de biomarcadores de tercera generación. El ejemplo de las candidiasis invasivas

AIDA PITARCH, CONCHA GIL, CÉSAR NOMBELA *

Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia,
Universidad Complutense de Madrid

RESUMEN

Las candidiasis invasivas son infecciones de notable morbilidad y mortalidad, en pacientes severamente inmunocomprometidos y enfermos críticos que requieren un diagnóstico y tratamiento rápido. Sin embargo, su diagnóstico precoz está seriamente dificultado por sus signos y síntomas clínicos inespecíficos, así como por la limitada sensibilidad (hemocultivos) y viabilidad (biopsias de tejidos) de sus dos estándares actuales. Esta situación hace necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores para las candidiasis invasivas, para la que pueden ser útiles desde métodos bioquímicos/inmunológicos de bajo rendimiento

* **Información de contacto:**

Doctor César Nombela.

Departamento de Microbiología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.

Plaza Ramón y Cajal, s/n. 28040, Madrid (España).

Teléfono: +34 91 394 20 84. Fax: +34 91 394 17 45.

e-mail: cnombela@farm.ucm.es

Abreviaturas: PCR, reacción en cadena de la polimerasa; cDNA, DNA complementario; 2-DE, electroforesis bidimensional; MS, espectrometría de masas; MALDI, ionización desorción con láser asistida con matriz; TOF, tiempo de vuelo; SERPA, análisis del proteoma serológico.

(biomarcadores de primera generación) hasta técnicas globales de alto rendimiento tales como la genómica/transcriptómica y la proteómica/inmunoproteómica (biomarcadores de segunda y tercera generación, respectivamente). Entre estas metodologías, la inmunoproteómica clásica o el análisis del proteoma serológico (SERPA) constituye una herramienta global eficaz, para el descubrimiento de paneles de biomarcadores en estos pacientes. Se han aplicado diferentes estrategias SERPA (basadas en electroforesis bidimensional seguida de *western-blotting* y espectrometría de masas) para examinar y comparar los perfiles séricos de anticuerpos IgG, frente a proteínas citoplásmicas y/o de la pared celular de *Candida* bajo distintas interacciones hongo-hospedador. Con ello se han descubierto un número relativamente alto de biomarcadores candidatos para predecir diagnóstico precoz, pronóstico, respuesta a tratamientos antifúngicos y/o seguimiento clínico de las candidiasis invasivas, así como dianas terapéuticas para el diseño de futuras inmunoterapias o vacunas para estas micosis oportunistas. Aunque estos hallazgos inmunoproteómicos sean alentadores, éstos se deben validar analítica y clínicamente sobre plataformas clínicas adecuadas en futuros estudios prospectivos multicéntricos antes de su puesta en la práctica en el laboratorio de diagnóstico clínico.

Palabras clave: Proteómica. Diagnóstico. Pronóstico. Inmunoterapia. Vacunas.

ABSTRACT

Immunoproteomics in the discovery of third generation biomarkers. The case of invasive candidiasis

Invasive candidiasis (IC) is a leading infectious cause of morbidity and mortality in severely immunocompromised and/or critically ill patients if not diagnosed and treated early. However, its early diagnosis is seriously hindered by its unspecific clinical signs and symptoms, and limited sensitivity (blood cultures) and feasibility (tissue biopsies) of its two current benchmarks. This backdrop has prompted the search for novel biomarkers for invasive candidiasis using for this purpose from low-throughput biochemical/immunological methods (first generation biomarkers) to high-throughput global techniques such as genomics/

transcriptomics and proteomics/immunoproteomics (second and third generation biomarkers, respectively). Among these methodologies, traditional immunoproteomics or serological proteome analysis (SERPA) has proved to be an effective global tool for the discovery of biomarker panels in these patients. Different SERPA strategies (based on two-dimensional electrophoresis followed by Western blotting and mass spectrometry) have been undertaken to examine and compare the serum profiles of IgG antibodies to *Candida* cytoplasmic and/or cell wall proteins under distinct host-fungus interactions. These have brought to light a relatively high number of biomarker candidates for predicting early diagnosis, prognosis, antifungal treatment response and/or clinical follow-up of invasive candidiasis as well as therapeutic targets for the design of future immunotherapy- or vaccine-based strategies for these opportunistic mycosis. Although these immunoproteomic findings are encouraging, they must be validated analytically and clinically on suitable clinical platforms in future prospective multicenter studies before their routine implementation in clinical practice.

Keywords: Proteomic. Diagnosis. Prognosis. Immunotherapy. Vaccines.

1. LAS CANDIDIASIS INVASIVAS, UN PROBLEMA INFECCIOSO CUYO CONTROL REQUIERE LA IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS BIOMARCADORES CLÍNICOS

A partir de la década de 1980, las infecciones por *Candida* se revelaron como entidades que iban más allá de una afectación superficial, mucocutánea, para afectar de forma generalizada (candidiasis invasivas o sistémicas), convirtiéndose en un importante problema sanitario de difícil control (1, 2). Son varios los factores, bastantes frecuentes en la actualidad pero no en el pasado, que han contribuido al notable incremento de estas infecciones profundas. Entre ellos están los estados de inmunodepresión (debidos a enfermedades de base, como cáncer o SIDA, o a tratamientos prolongados con inmunosupresores o agentes citotóxicos), así como otros avances médicos, encaminados a incrementar la supervivencia de los pacientes (uso de antibióticos de amplio espectro, dispositivos intravasculares, hiperalimentación, procedimien-

tos quirúrgicos, etc.). Con ello, los agentes etiológicos de estas micosis oportunistas (las especies incluidas en el género *Candida*, entre las que destaca *Candida albicans*) han llegado a representar la cuarta causa más común de infecciones hospitalarias septicémicas en los últimos tiempos, sobrepasando en prevalencia a todas las especies bacterianas gram-negativas. El origen principal es endógeno, ya que el hongo polimórfico *Candida* suele formar parte de la microbiota comensal mucocutánea, lo que facilita su acceso a otras localizaciones profundas cuando se produce un deterioro en las defensas naturales (locales o sistémicas). Pero no es de desdeñar un posible origen exógeno de este microbio, procedente de la manipulación de catéteres, hiperalimentación, etc.

La importancia clínica de estas micosis invasivas no se debe solamente a su prevalencia, relativamente alta en los países desarrollados, sino también a que pueden desencadenar un proceso de extrema gravedad que, lamentablemente, se traduce en unas tasas persistentes de morbilidad y mortalidad elevadas, en pacientes con deficiencias inmunitarias y en enfermos críticos (cancerosos, necesitados de cuidados intensivos, o sometidos a trasplantes y cirugía mayor). Ello supone un consumo elevado de recursos por las hospitalizaciones largas y las terapias con antifúngicos sistémicos de gran coste que se requieren (1, 3). Este pronóstico fatal que muchas veces tienen estos procesos podría aliviarse con un diagnóstico precoz, que permitiese instaurar el tratamiento antifúngico adecuado y controlar, al mismo tiempo, los trastornos subyacentes. No obstante, el diagnóstico precoz de las candidiasis invasivas supone, hoy por hoy, un gran desafío, tanto para los clínicos como para los micólogos. Depende de una fundada sospecha clínica, que hoy se ve dificultada por la ausencia tanto de signos y síntomas de infección invasora como por la carencia de métodos microbiológicos, anatomopatológicos y/o bioquímicos rápidos y precisos (4). Como consecuencia de ello, el diagnóstico de estas micosis profundas con frecuencia se logra tardíamente, lo que suele suponer un retraso en el tratamiento antifúngico, una mortalidad elevada y/o, desgraciadamente, un hallazgo que solo se confirma con la autopsia (5, 6). Por tanto, cualquier avance en el diagnóstico, pronóstico, progresión, respuesta a terapia o inmunoprevención de las mismas se revela como algo fundamental para aprovechar el potencial de los nuevos agentes antifúngicos.

2. IMPORTANCIA DE LA IDENTIFICACIÓN DE BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS CANDIDIASIS INVASIVAS

El diagnóstico convencional de laboratorio de las candidiasis invasivas, basado en la detección del hongo mediante cultivos de muestras corporales normalmente estériles, tiene notables limitaciones (4). El hemocultivo, el procedimiento más empleado, resulta lento y de sensibilidad limitada en las etapas más precoces de la infección. Tampoco cabe un examen histopatológico pues la obtención de muestras tisulares precisa, sin embargo, de procedimientos invasivos, que en la práctica no se pueden efectuar en muchos de los pacientes con sospecha de candidiasis sistémica. Por ello se investiga sobre nuevas técnicas o métodos de laboratorio, no invasores e independientes del cultivo, como se describen brevemente a continuación, con la intención de lograr mayor precocidad y certeza en el diagnóstico de las estas infecciones.

3. MÉTODOS DE LABORATORIO ALTERNATIVOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE LAS CANDIDIASIS INVASIVAS: IMPORTANCIA DE LOS BIOMARCADORES CLÍNICOS POTENCIALES

La identificación de nuevos biomarcadores (o marcadores biológicos), que precedan a la aparición de los síntomas inespecíficos de la infección fúngica invasiva, puede suponer un avance notable que lleve, desde el uso de métodos bioquímicos o inmunológicos relativamente sencillos, de bajo rendimiento y a pequeña escala (biomarcadores de primera generación) (4, 7, 8) hasta el de tecnologías, o incluso de nanotecnologías, de alto rendimiento y a gran escala (donde el objeto de estudio se aborda de un modo global) como son la biología molecular, la genómica y la transcriptómica (biomarcadores de segunda generación) (4, 9-12) o la proteómica (biomarcadores de tercera generación) (13-17) (Figura 1). Los avances en estas tecnologías biómicas abren hoy en día un amplio abanico de posibilidades y expectativas prometedoras, para identificar biomarcadores de estas micosis oportunistas (9-18). A su vez, están proporcionando indirectamente una oportunidad excepcional para mejorar nuestro entendimiento sobre el comportamiento de los sistemas biológicos.

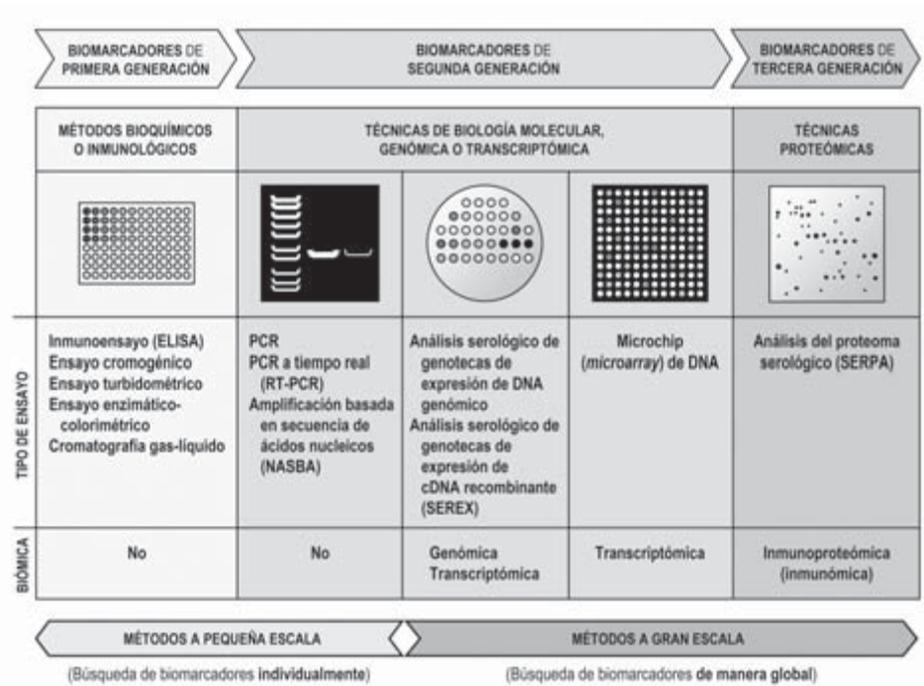


FIGURA 1. Biomarcadores de primera, segunda y tercera generación para el diagnóstico de laboratorio de las candidiasis invasivas.

3.1. Biomarcadores de primera generación (bioquímicos o inmunológicos)

Denominamos aquí biomarcadores de primera generación a aquellas sustancias presentes en el torrente sanguíneo u otros fluidos corporales de los pacientes con candidiasis invasivas, cuya detección y/o medida se determina mediante procedimientos bioquímicos o serológicos (4, 7, 8). Muchos de ellos son conocidos desde la década de los ochenta pero su detección o cuantificación se perfeccionó en el período posterior. Destacan en este grupo:

1. Antígenos de la pared celular del hongo o secretados al medio extracelular por el mismo. Estos pueden ser de naturaleza glucídica (manano y β -1,3-D-glucano) o proteica [enolasa (Eno1p), un fragmento de 47 kDa de la proteína de estrés térmico de 90 kDa (Hsp90p), proteinasa aspártica secretada (Sap),...]. Todos

ellos se detectan en suero (los dos primeros también en líquido cefalorraquídeo) de los pacientes con candidiasis invasivas usando métodos cromogénicos o turbidimétricos (β -1,3-D-glucano) o inmunoensayos tipo ELISA (los restantes).

2. Anticuerpos dirigidos frente a componentes glucídicos (manano, glucano y quitina) o proteicos (Eno1p, Hsp90p, Sap,...) de la pared fúngica o liberados por *Candida* durante el proceso patogénico. Estos igualmente se miden en suero de los pacientes infectados mediante inmunoensayos tipo ELISA.
3. Metabolitos (D-arabinitol) del hongo. El D-arabinitol se detecta en suero u orina de pacientes con candidiasis invasivas principalmente mediante sofisticados métodos de cromatografía gas-líquido o ensayos enzimático-colorimétricos. Para discriminar pacientes con esta infección fúngica invasora de aquéllos con fallo renal, se suele habitualmente estimar la proporción D-arabinitol/creatinina (ya que ambos se aclaran al mismo tiempo por los riñones) o D/L-arabinitol (puesto que *Candida* únicamente produce D-arabinitol, mientras que los humanos sólo L-arabinitol).

Dado que estos métodos mostraban problemas notables, en términos de sensibilidad y/o especificidad, se intentó también plantear la detección combinada de algunos de estos biomarcadores para subsanar sus deficiencias individuales (4, 7, 8). Sin embargo, algunos resultados, no tan propicios como cabría de esperar, por la complejidad añadida, así como el coste de estas combinaciones llevó a la búsqueda de nuevas posibilidades. Precisamente el disponer de las secuencias (parciales o totales) de los genomas de la levadura no patógena *Saccharomyces cerevisiae*, así como de los principales patógenos fúngicos, impulsaron el desarrollo de técnicas moleculares y globales, lo que dio origen a lo que podemos llamar biomarcadores de segunda generación para el diagnóstico clínico de estas micosis oportunistas.

3.2. Biomarcadores de segunda generación (moleculares, genómicos o transcriptómicos)

Las técnicas de biología molecular introducidas en el diagnóstico de laboratorio de las candidiasis invasivas se basan en la amplificación de ácidos nucleicos (DNA y RNA) del hongo en muestras clínicas (sangre, suero, orina, muestras tisulares,...), mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sus distintas versiones (semianidada, análisis de restricción o a tiempo real) o por otros métodos de amplificación para detectar DNA o RNA de *Candida* (4, 7). A diferencia de lo ocurrido con el diagnóstico de otras infecciones víricas o bacterianas, estas técnicas moleculares no han dado el resultado deseado para la detección de micosis invasivas. Es cierto que estos métodos moleculares son más rápidos que los basados en hemocultivos, pero no mejoran su sensibilidad y, además, no se encuentran estandarizados para su uso universal.

Por ello se comenzó a explorar el empleo de estrategias genómicas y transcriptómicas para el diagnóstico micológico. Una apuesta biómica que supone un salto importante en general para el descubrimiento de nuevos biomarcadores en el campo de la micología clínica. Los avances experimentados con estas tecnologías son modestos pero llaman la atención los aspectos siguientes:

1. Para el análisis serológico de genotecas de expresión de DNA genómico de *Candida* (9, 10) se han empleado sueros de pacientes con candidiasis invasivas (pre-adsorbidos frente a lisados desnaturalizados, extractos y células de *Candida*) al objeto de rastrear una genoteca de expresión de DNA genómico creada en la bacteria *Escherichia coli* con la intención de detectar colonias inmunoreactivas. Una vez confirmada esta inmunoreactividad, se identifican los correspondientes marcos abiertos de lectura (*open reading frames* [ORFs]) usando la base de datos del genoma de *C. albicans*. Esta aproximación genómica ha facilitado la identificación de 65 genes (involucrados en adhesión, floculación, respuesta a estrés, adaptación, metabolismo, citoesqueleto, estructura de la pared celular, transcripción, regulación,...) por su expresión en micosis invasivas y, consecuentemente, posibles candidatos para el diagnóstico de las mismas (9, 10, 19). De forma similar, este tipo de análisis se-

rológico se puede realizar también con genotecas de expresión de DNA complementario (cDNA) (11), construidas a partir de mRNA obtenido de aislados clínicos de *Candida* y expresadas

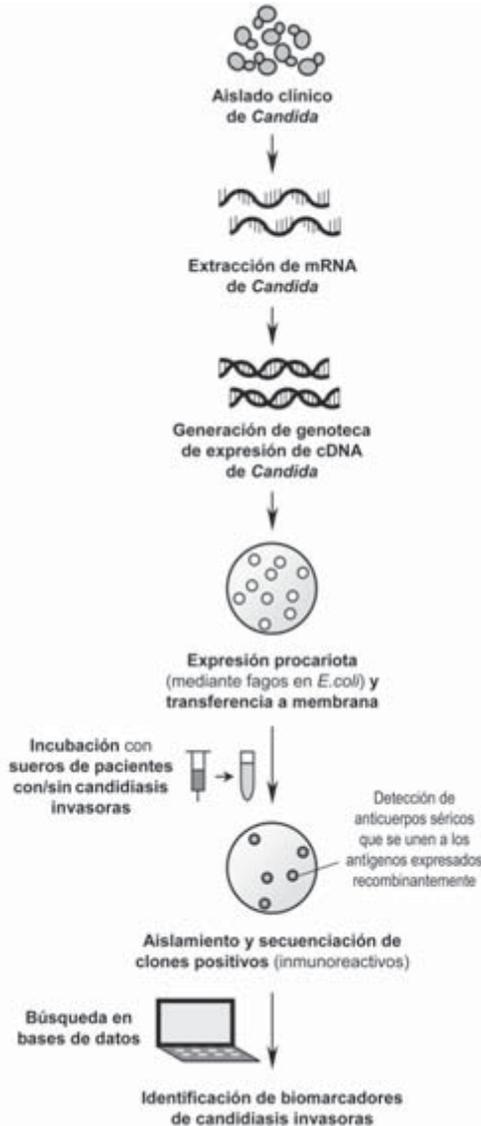


FIGURA 2. *Representación esquemática de la estrategia típica para identificar biomarcadores clínicos basada en el análisis serológico de genotecas de expresión de cDNA recombinante (SEREX).*

en *E. coli* (Figura 2). Esta aproximación transcriptómica también se conoce como SEREX (acrónimo del inglés, *SERological analysis of recombinant cDNA EXpression libraries*) (20).

2. También se ha descrito el empleo de *microarrays* (microchips o micromatrices) de DNA para el diagnóstico rápido de ocho especies patógenas de *Candida* y cuatro del hongo *Aspergillus*, agentes etiológicos de micosis invasivas (12). Estos soportes sólidos, que contienen sondas de captura, diseñadas a partir de la secuencia de las regiones espaciadoras internas de los genes que codifican para el RNA ribosómico (rRNA), han permitido la identificación del género y especie fúngica causante de la infección sistémica. Ello resulta crucial para iniciar una terapia antifúngica específica, dados los diferentes patrones de sensibilidad a los antifúngicos propios de cada especie.

Aunque estos métodos genómicos y transcriptómicos pueden aportar ventajas incuestionables (mayor precocidad, mejor especificidad y sensibilidad diagnósticas, monitorización del curso evolutivo de la infección...), por el momento, no se encuentran suficientemente desarrollados y validados para aplicarse en el diagnóstico de rutina de las candidiasis invasivas.

3.3. Biomarcadores de tercera generación (proteómicos o inmunoproteómicos)

La tecnología proteómica aplicada al diagnóstico micológico está permitiendo identificar biomarcadores potenciales para las candidiasis invasivas que podríamos calificar como de tercera generación (13-17, 21). Es razonable postular que puedan llegar a ser los preponderantes durante la próxima década. Los datos obtenidos mediante aproximaciones inmunoproteómicas aportan criterios acerca de la evolución de la infección invasiva, así como la supervivencia de los enfermos y su respuesta a terapias. De estos trabajos también se deducen avances en el conocimiento de antígenos candidatos para el diseño de vacunas o inmunoterapias para estas micosis oportunistas (13-17). Nos centramos en datos de estas tecnologías biómicas y en los biomarcadores potenciales que han permitido identificar, en el resto de este artículo.

4. LA PROTEÓMICA, UNA PLATAFORMA MULTIDIMENSIONAL PARA UNA VISIÓN GLOBAL E INTEGRADA

Las metodologías de análisis de proteínas despiertan gran interés, tanto para la investigación básica como para la más directamente biomédica (13, 15, 21, 22). Se puede así analizar sistemáticamente el proteoma en las más variadas circunstancias de tiempo y ambiente. Evidentemente, muchas de las características propias de estos componentes esenciales, que regulan la maquinaria biológica, como son sus modificaciones post-traduccionales o sus interacciones, no son deducibles directamente de estudios genómicos ni transcriptómicos. Cuatro factores han resultado decisivos para que la moderna proteómica ofrezca las posibilidades experimentales que permite en la actualidad (Figura 3) (18, 22-24). Estos son:

1. La instauración de técnicas de separación de mezclas complejas de proteínas con un alto poder de resolución, entre las que resalta la electroforesis bidimensional (2-DE). Su gran capacidad de resolución surge de separar las proteínas de un proteoma en función de dos parámetros independientes, sus puntos isoeléctricos (en los que sus cargas netas son cero) en una primera dimensión (isoelectroenfoque, IEF) y sus masas moleculares en una segunda dimensión (electroforesis en geles de acrilamida en presencia de dodecil-sulfato sódico, SDS-PAGE), en una matriz bidimensional. El impacto de esta técnica en el ámbito de la proteómica se ha ido acrecentando con las mejoras que aporta el uso de gradientes de pH inmovilizados en el isoelectroenfoque, así como con las nuevas aplicaciones y posibilidades (electroforesis bidimensional en gel diferencial, 2D-DIGE) que han ensanchado su campo de acción.
2. El desarrollo de técnicas de ionización suave (ionización desorción con láser asistida con matriz [MALDI, del inglés, *Matriz Assisted Laser Desorption Ionization*] y electrospray) para el análisis de proteínas y péptidos (macromoléculas polares y no volátiles) mediante espectrometría de masas (MS) en sus múltiples variantes. Asociadas con diferentes técnicas de análisis de masas (tiempo de vuelo [TOF, del inglés, *Time-of-Flight*], trampa iónica, cuadrupolo...) constituyen verdaderamente una herra-

mienta imprescindible, hoy por hoy, para la identificación y/o secuenciación sistemática de proteínas y péptidos.

3. Los grandes proyectos de secuenciación de genomas de muchos organismos modelo y el establecimiento de bases de datos genómicas y/o de proteínas bien anotadas de los mismos. Aunque en la actualidad ya se dispone de las secuencias genómicas de los principales patógenos fúngicos, incluyendo el de *C. albicans*, la publicación de la secuencia completa del genoma de la levadura *S. cerevisiae* (cuyos genes son bastante homólogos a los de *C. albicans*) en 1996 supuso un avance crucial para los micólogos clínicos, especialmente para la caracterización de proteínas con valor diagnóstico para las candidiasis invasivas (13, 21, 25).
4. La introducción de algoritmos o motores de búsqueda notablemente elaborados, capaces de correlacionar los datos de espectrometría de masas con bases de datos de secuencia. Así mismo, diversas herramientas bioinformáticas para analizar, procesar e integrar toda la información generada en este tipo de estudios han ayudado a la expansión de la proteómica en diferentes campos de la biología y medicina en los últimos años.

La proteómica actual se asienta principalmente sobre tres metodologías, que sostienen por igual el análisis de los proteomas y que se agrupan en las categorías de: separación de proteínas (2-DE o cromatografía multidimensional), identificación de las mismas (MS), y análisis e interpretación de los datos obtenidos (bioinformática) (23, 24). A modo de ejemplo, en la aproximación más común o clásica, las proteínas del proteoma de interés se separan mediante 2-DE, se extraen del gel bidimensional, teñido convenientemente, para ser digeridas con una proteasa (generalmente tripsina). La mezcla de péptidos resultante se analiza directamente mediante MS tipo MALDI-TOF, para determinar sus masas y obtener la «huella peptídica» o el espectro de masas del conjunto de péptidos de la proteína. Dado que el criterio más determinante para la identificación de una proteína es su secuencia aminoacídica, en muchas ocasiones, se procede a la fragmentación de los péptidos producidos mediante espectrometría de masas en tándem (MS/MS) para obtener esta información. El hecho de que las huellas peptídicas y espectros MS/MS (o de fragmentación) sean característicos de cada una de las proteí-

LA INMUNOPROTEÓMICA EN EL DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES

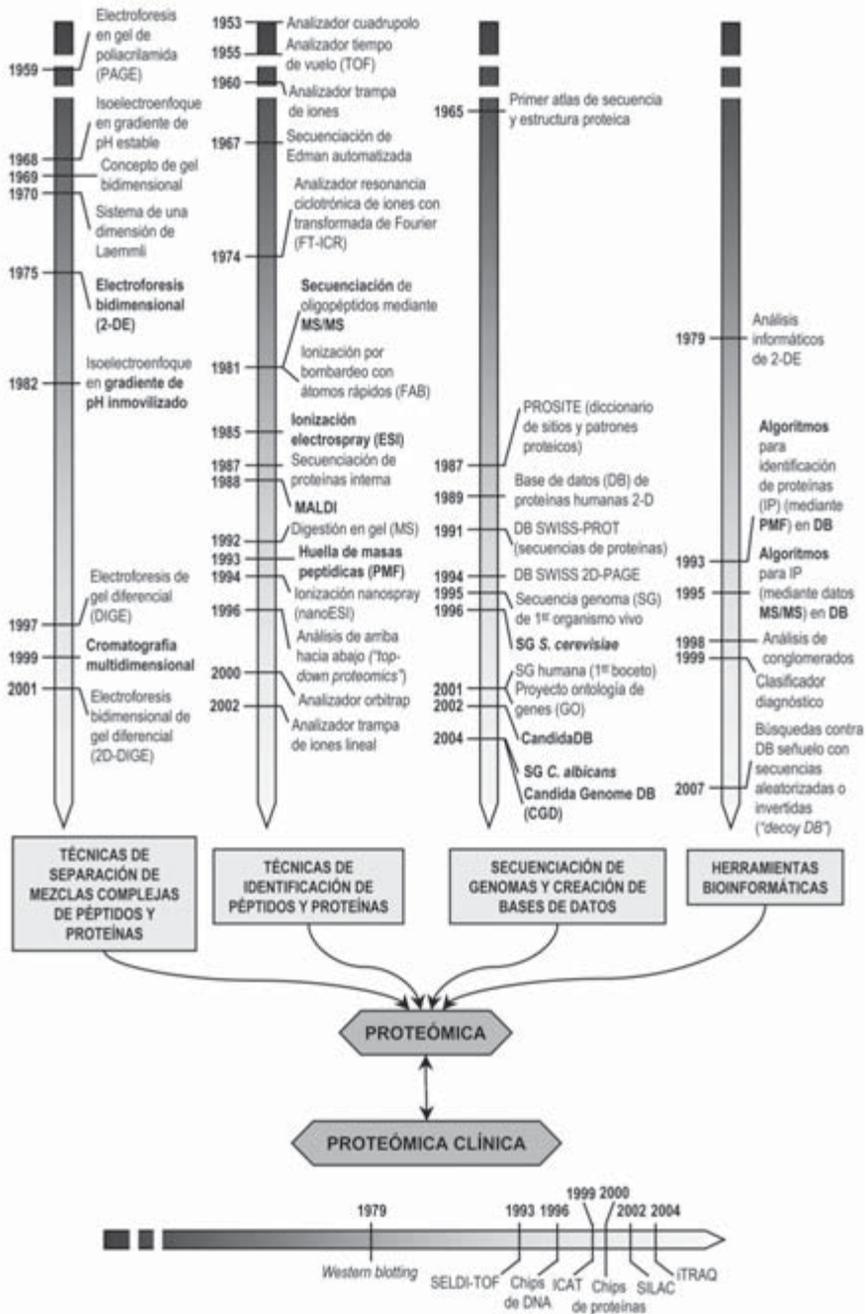


FIGURA 3. Grandes hitos de los principales pilares de la proteómica.

nas y de cada uno de los péptidos, respectivamente, capacita posteriormente la identificación *in silico* de las proteínas de estudio en las bases de datos mediante técnicas bioinformáticas.

5. EL INMUNOMA, UN CONJUNTO DESTACADO DE BIOMARCADORES CLÍNICO POTENCIALES Y DE CANDIDATOS PARA INMUNIZACIÓN

El inmunoma de un agente infeccioso es la parte del proteoma que actúa como diana del sistema inmunitario (26). La caracterización del inmunoma de *Candida* bajo una determinada condición fisiológica, patológica o farmacológica ofrece la oportunidad de obtener una visión global e integrada de los diferentes anticuerpos que se producen frente a este agente. Ello se extiende a cualquier tipo de interacción hongo-hospedador, así como a la exploración de las bases moleculares subyacentes a la infección y a la patogenicidad fúngica. Además, en la actualidad existe expectación acerca de sus posibilidades para identificar biomarcadores de diagnóstico, pronóstico, respuesta a tratamientos antifúngicos y seguimiento clínico de las candidiasis invasivas, así como posibles dianas moleculares para bosquejar futuras estrategias terapéuticas más eficaces frente a estas micosis oportunistas (13, 16).

La inmunoproteómica o inmunómica se constituye así en herramienta útil y prometedora para el develamiento de grandes paneles de biomarcadores clínicos potenciales, así como de candidatos terapéuticos para el diseño de futuras vacunas o inmunoterapia, no solamente de las candidiasis invasivas, como se menciona arriba, sino también de otras enfermedades infecciosas, alergias, trastornos autoinmunitarios y/o cánceres (patologías donde también se desarrollan anticuerpos o autoanticuerpos) (20, 27). Se trata de examinar, global y simultáneamente, los perfiles de reactividad de los anticuerpos séricos dirigidos frente a un amplio espectro de antígenos, muchos de los cuales tienen una notable significación clínica y/o terapéutica.

Entre las diferentes y variadas estrategias inmunoproteómicas, descritas para identificar antígenos reconocidos por anticuerpos circulantes en pacientes con este tipo de afecciones (20), el análisis del proteoma serológico (SERPA, acrónimo del inglés *SER*ological *Proteome* *Analysis*) es la aproximación más común para explorar el inmunoma de *Can-*

da y descubrir posibles biomarcadores clínicos y/o candidatos terapéuticos para las candidiasis invasivas (13-16). Introducida a finales del siglo pasado para el estudio de las candidiasis (13, 21), se basa en la combinación de proteómica clásica con serología (Figura 4) (17, 28). La

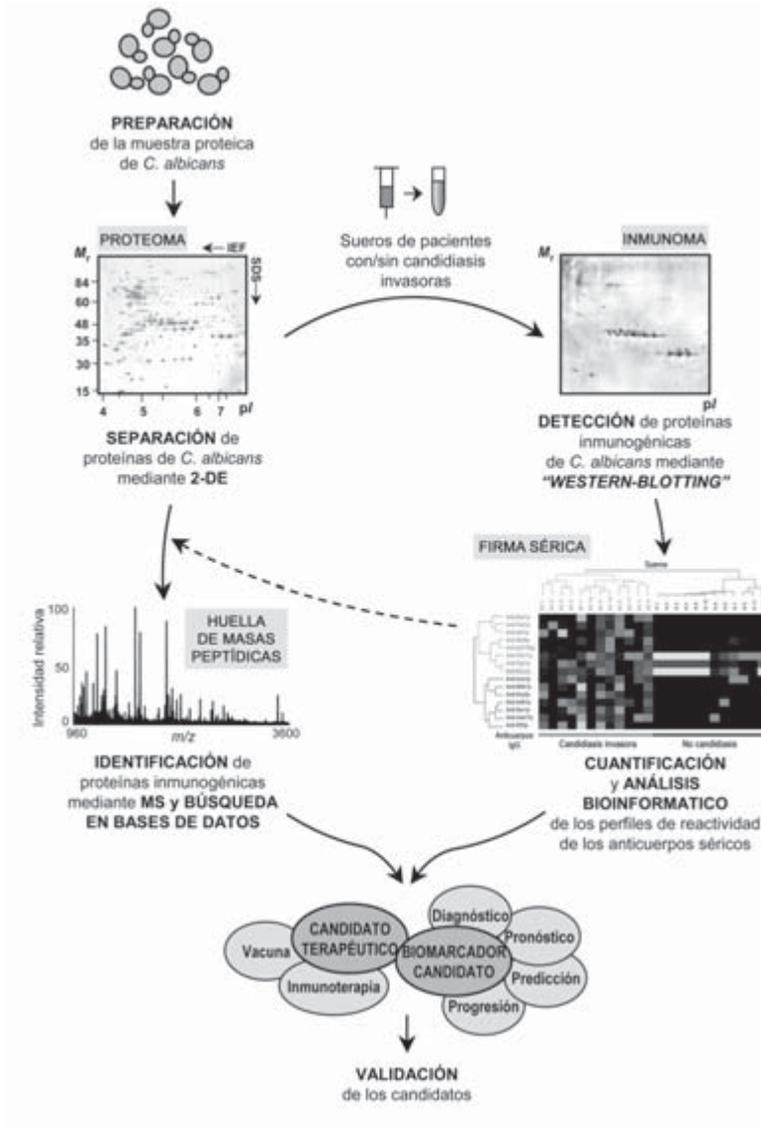


FIGURA 4. Diagrama de flujo de la estrategia general para analizar el inmunoma de *Candida* mediante SERPA.

tecnología consiste en fraccionar extractos proteicos de *Candida*, obtenidos del proteoma o subproteoma de interés, primero mediante 2-DE para transferirlos a una membrana. La detección de las proteínas inmunogénicas se realiza tras aplicar sueros (de pacientes con y sin candidiasis invasivas o de animales de experimentación inmunizados artificialmente) sobre la membrana a través de la técnica de *western-blotting* o *immunoblotting*. La identificación de dichas proteínas se efectúa mediante MS, después de extraerlas directamente de un gel de 2-DE teñido adecuadamente y de digerirlas con tripsina. Los diferentes patrones bidimensionales de reactividad de anticuerpos séricos, dirigidos frente a estas proteínas identificadas, se comparan mediante análisis estadísticos y bioinformáticos, manejando datos clínicos con el propósito de desenmarañar posibles biomarcadores de diagnóstico, pronóstico, predicción o monitorización, o incluso candidatos con utilidad en inmunoterapia y/o vacunación.

Los datos multidimensionales que se obtienen de estos estudios SERPA suponen una cantidad demasiado abundante y compleja como para ser tratados con métodos tradicionales. Por eso, la aplicación de herramientas bioinformáticas y/o de la biología computacional a este tipo de estudios permite no solamente explorarlos sistemáticamente, sino también dar un salto conceptual en el entendimiento de la patología estudiada, estableciendo la respuesta que desencadena el inmunoma de la especie infecciosa (29, 30).

6. BIOMARCADORES DE TERCERA GENERACIÓN PARA LAS CANDIDIASIS INVASIVAS: UNA APORTACIÓN PARA EL DESARROLLO DE UNA MEDICINA INDIVIDUALIZADA

Cualquier cambio o alteración en una proteína (antígeno o anticuerpo) que esté propiamente vinculado con la enfermedad, supervivencia, respuesta a terapia y progresión tiene, teóricamente, el potencial de ser un biomarcador clínico. Sin embargo, éste debería cumplir una serie de criterios mínimos (31, 32) tal y como se esquematizan en la Figura 5. En esta sección se resaltarán las diferentes estrategias inmunoproteómicas basadas en SERPA que se han utilizado en los últimos años para analizar los perfiles de reactividad de los anticuerpos séricos IgG frente

al inmunoma soluble global y de la pared celular de *Candida*, en distintas situaciones de interacción patógeno-hospedador. Como ya se señaló anteriormente, los resultados aportan lo que puede ser una tercera generación de biomarcadores, por su posible contribución al diagnóstico, pronóstico, predicción y monitorización de las candidiasis invasivas, e incluso de candidatos terapéuticos para estas infecciones oportunistas (25, 29, 33-38).

6.1. El inmunoma soluble global de *Candida* como fuente de biomarcadores clínicos

La estrategia SERPA se ha empleado para establecer las huellas séricas de anticuerpos IgG frente al inmunoma soluble global de *Candida*. La comparación de pacientes con candidiasis invasivas con individuos libres de ellas (incluyendo pacientes con patologías de base similares e/o individuos sanos) (33, 35, 36, 38) así lo ha permitido. Al menos

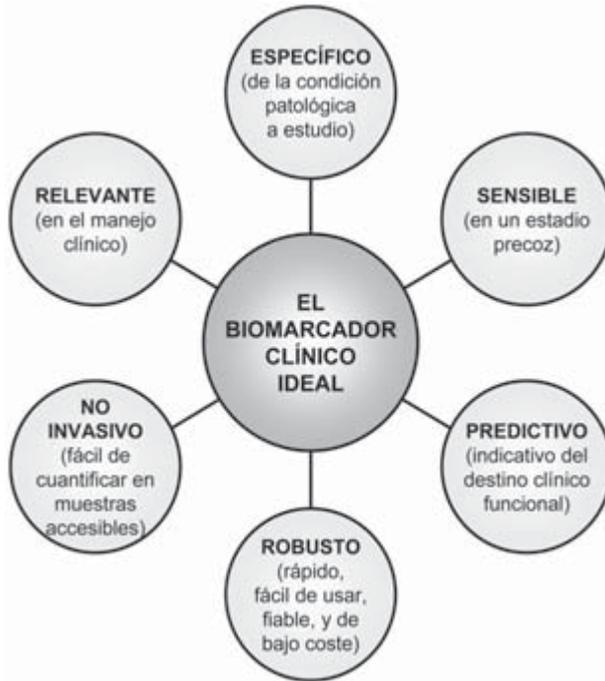


FIGURA 5. Criterios mínimos que debería cumplir un biomarcador clínico ideal.

42 proteínas citoplásmicas (entre ellas chaperonas y proteínas de estrés térmico, enzimas glucolíticas y fermentativas, otras enzimas metabólicas, proteínas ribosomales, factores de alargamiento de las cadenas peptídicas, enzimas redox y porinas) de *C. albicans* aparecen como dianas específicas de la respuesta de anticuerpos, en etapas iniciales de las candidiasis invasivas. Estos antígenos y sus anticuerpos aportan datos para el diagnóstico anticipado de estas micosis oportunistas (35). Análisis bioinformáticos arrojan un patrón de anticuerpos frente a 15 de estas 42 proteínas, que discrimina pacientes bajo cuidados intensivos con candidiasis invasivas, de aquéllos sin ellas, con una buena precisión e independientemente de las características demográficas y clínicas de la población de estudio (36). De éstos, en particular, los anticuerpos frente a la Eno1p constituyen una importante huella molecular en suero para la detección precoz de estas infecciones invasivas (33, 36).

Contrariamente a las investigaciones genómicas y transcriptómicas, estos estudios SERPA pueden también evidenciar la presencia de antigenicidad asociada a modificación post-traducciona, una característica crucial para el diseño de métodos de diagnóstico ya que puede reflejar los efectos patogénicos de una enfermedad y ser relevantes en la etiología de la misma. Así, por ejemplo, algunos epítomos propios de las especies acídicas de la Pgc1p y Adh1p, modificadas post-traduccionalmente, que son reconocidas específicamente por sueros de pacientes con candidiasis invasivas, podrían ser de gran valor diagnóstico para estas micosis oportunistas (35).

Otra aproximación SERPA de posible interés clínico, se basa en la evaluación de los cambios globales en los perfiles de reactividad de los anticuerpos IgG frente a proteínas citoplásmicas de *Candida*, en un estadio precoz de la infección, entre pacientes o animales de experimentación con estas micosis oportunistas que sobrevivan y aquéllos que fallezcan durante el proceso patogénico (35, 37). En un modelo animal de candidiasis, se observó un incremento marcado en los niveles séricos de los anticuerpos frente a Ssb1p, Gap1p, Pgc1p, Fba1p, Eno1p y Adh1p (éstos dos últimos con títulos bajos en sueros preinmunes), en un primer estadio de infección, y frente a Met6p en un estadio posterior, que se correspondió con un pronóstico fatal; por el contrario un nivel basal elevado de anticuerpos frente a Eno1p (con títulos altos en sueros preinmunes) se relacionó con un pronóstico favorable (Figura 6) (37).

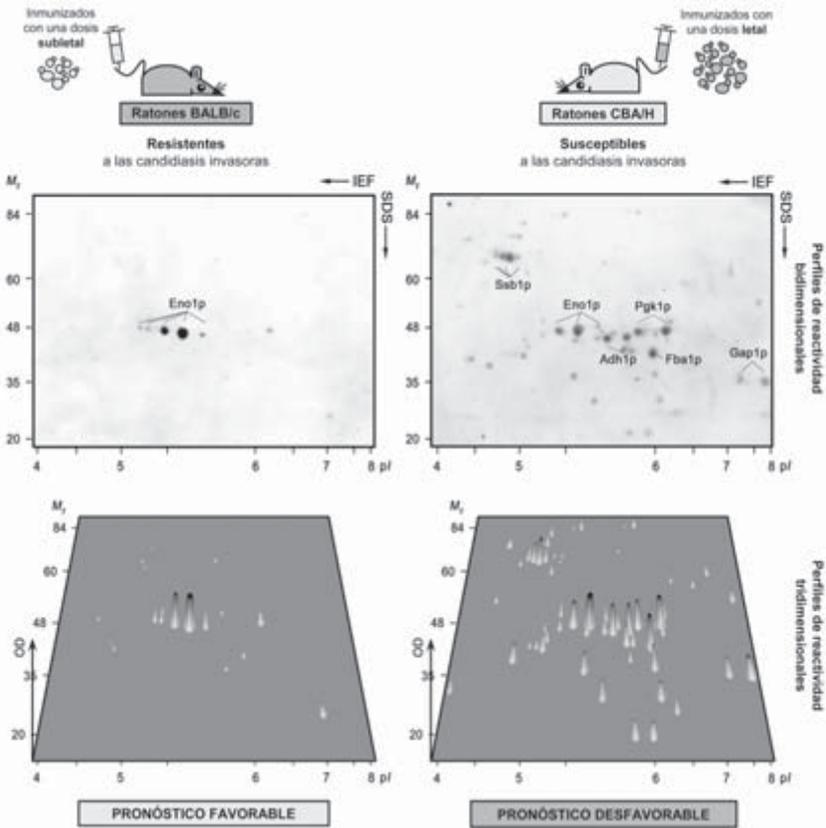


FIGURA 6. *Patrones representativos bi- y tridimensionales de reactividad de los anticuerpos séricos frente al inmunoma intracelular de Candida en un modelo animal de candidiasis invasora. Distintos perfiles de reactividad de anticuerpos séricos se obtuvieron en un estadio temprano de candidiasis invasivas con dos cepas de ratón con diferentes susceptibilidades a estas infecciones oportunistas, e inmunizados con distintas dosis (37).*

Asimismo, anticuerpos séricos frente a un gran panel de proteínas de *C. albicans*, particularmente frente a Pgc1p, Eno1p, Pdc11p, Tkl1p, Met6p, Sah1p y una manoproteína de 52 kDa, resultaron ser los biomarcadores candidatos más significativos para predecir el pronóstico en pacientes con estas micosis oportunistas (35). Se ha propuesto que el hallazgo de todos estos biomarcadores candidatos de pronóstico, para las candidiasis invasivas, abre un nuevo camino para tomar decisiones terapéuticas más precisas e individualizadas que podría mejorar la evolución clínica de estos pacientes.

La aproximación SERPA también fundamenta la comparación de los patrones de reactividad de los anticuerpos IgG, frente al inmunoma intracelular de *Candida*, en pacientes con candidiasis invasivas que responden a un tratamiento antifúngico específico (anfotericina B y/o fluconazol) con aquéllos que no lo hacen (35). Enfermos de estas micosis oportunistas, con un pronóstico bueno por responder al tratamiento con anfotericina B, presentaban niveles altos de anticuerpos frente a Pgk1p, Eno1p, Met6p y una manoproteína de 52-kDa y niveles moderados de anticuerpos frente a Tkl1p y Pdc11p en etapas iniciales de la infección. Se trata de un perfil de reactividad significativamente distinto del de pacientes que no responden a la terapia antifúngica (anfotericina B y fluconazol) y, por tanto, con pronóstico desfavorable. Estos biomarcadores, candidatos para predecir la respuesta a una terapia específica en una etapa temprana de las candidiasis invasivas, pueden suponer tras la validación de estudios prospectivos, una pieza clave para aproximaciones individualizadas al diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades.

Otra estrategia SERPA se centra en la evaluación de los cambios experimentados en las huellas séricas de los anticuerpos IgG, frente a proteínas citoplásmicas de *Candida*, a lo largo del curso de las candidiasis invasivas, tanto en pacientes con estas micosis oportunistas como en animales bajo inmunización artificial (35, 37). En dos estirpes de ratón, con diferentes susceptibilidades a las candidiasis invasivas e inmunizados con distintas dosis de *C. albicans* (susceptibles y resistentes con dosis letales y subletales, respectivamente), mostraron patrones distintos de reactividad en diferentes días post-infección (37). Mientras que un incremento destacado en la reactividad de los anticuerpos frente a Ssb1p, Pgc1p y Met6p, entre otros, a lo largo del curso de estas micosis oportunistas, se correlacionó con un pronóstico adverso, elevados niveles de anticuerpos frente a Eno1p ayudaron, por el contrario, a extender la tasa de supervivencia de los animales durante la progresión de la infección. Igualmente, los patrones de anticuerpos séricos, en pacientes con candidiasis invasivas antes y después del tratamiento antifúngico, se correlacionaron con la evolución de la infección y la eficacia de la terapia (35). En concreto, se producía un incremento acentuado de altos niveles de anticuerpos séricos frente a Eno1p, así como un mantenimiento o desarrollo moderado de anticuerpos frente a Hsp90p, Tpi1p y una manoproteína de 52-kDa, y/o una caída pronunciada o incluso desaparición de los niveles de anticuerpos frente a Met6p, Pgc1p, Pdc11p y Grp2p, entre

otros, cuando la infección remitía por el tratamiento antifúngico administrado, y, por tanto, con un pronóstico favorable para estos pacientes. Todos estos anticuerpos pueden ser buenos biomarcadores candidatos para el seguimiento clínico de los pacientes con candidiasis invasivas, así como para predecir sus pronósticos y monitorizar la eficacia de los regímenes de sus tratamientos antifúngicos.

6.2. El inmunoma de la pared celular de *Candida*, en la interfase entre el patógeno y el hospedador: un conjunto de biomarcadores clínicos y candidatos terapéuticos

Dada la localización de las proteínas de la pared celular de *Candida* en el área de contacto entre el hongo y el hospedador, es lógico que algunas de ellas puedan desencadenar una respuesta inmunitaria específica, útil también para identificar nuevos biomarcadores clínicos y/o de candidatos con utilidad en inmunoterapia y/o vacunación (29, 33). Además, muchas de ellas no solamente juegan un papel clave en antigenicidad, inmunomodulación de la respuesta, patogénesis o morfogénesis, sino que son posibles dianas para el diseño de nuevos antifúngicos de acción selectiva, debido a que esta estructura no se encuentra en células humanas (21, 39, 40). Estas características peculiares de las mismas hacen del proteoma de la pared celular (hasta hace poco un importante talón de Aquiles) un objeto de estudio muy fascinante y prometedor tanto en investigación básica como aplicada. El análisis de proteínas, secretadas por protoplastos sometidos a procesos de regeneración de su pared celular, permite plantear una aproximación proteómica efectiva para abordar su estudio. Con ello se pueden solventar los problemas propios de las extracciones químicas o enzimáticas, debidos a modificaciones proteicas o extracciones de proteínas, con restos de cadenas laterales de glucano y/o quitina que dificultan su resolución en geles de 2-DE e identificación mediante MS (29, 33, 41-43).

Esta estrategia proteómica, combinada con SERPA y análisis bioinformáticos, ha puesto de manifiesto que las huellas séricas de los anticuerpos IgG frente al inmunoma de la pared celular de *Candida* discriminan, con una buena sensibilidad y especificidad, pacientes con candidiasis invasivas pertenecientes a diferentes grupos de riesgo frente

a aquéllos sin ellas (29). Es de interés que estos perfiles de anticuerpos séricos revelan dos nuevos biomarcadores potenciales, independientes y precisos de candidiasis invasivas. Se trata de los anticuerpos frente a Bgl2p, como biomarcador de diagnóstico de estas micosis oportunistas (Figura 7), y aquéllos frente a la forma de la Eno1p asociada a la pared celular, como biomarcador de pronóstico de estas infecciones. Al mismo tiempo, estas huellas moleculares han revelado que anticuerpos séricos frente a Bgl2p y a Eno1p, de pared celular, confieren protección frente a estas micosis invasivas, suscitando que estas dos proteínas o sus anticuerpos relacionados pueden servir como base para el desarrollo de una futura vacuna o inmunoterapia, respectivamente, frente a estas infecciones oportunistas. Por tanto, si estos hallazgos inmunoproteómicos se confirman en ulteriores estudios multicéntricos prospectivos podrían tener repercusiones, no solamente para la toma de decisiones diagnósticas y terapéuticas en pacientes con alto riesgo de candidiasis invasivas, que puedan reducir el porcentaje de mortalidad y el periodo de hospitalización de estos pacientes, sino también para la prevención y tratamiento de estas infecciones invasivas.

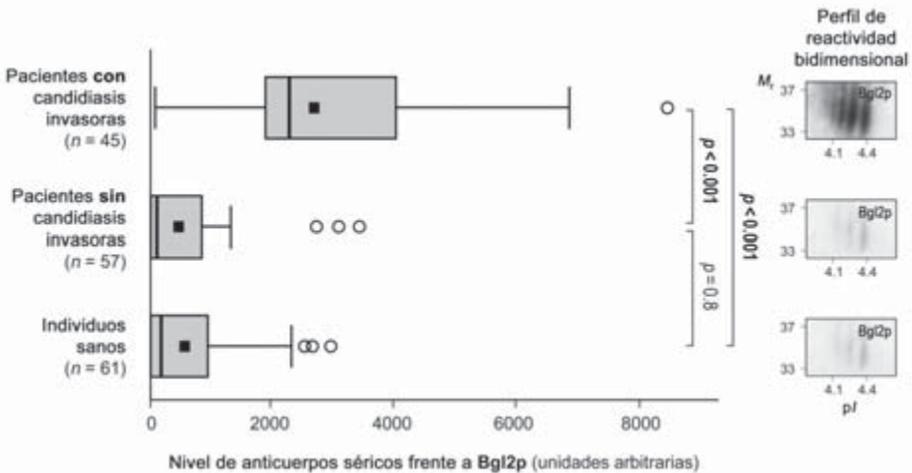


FIGURA 7. Niveles séricos de los anticuerpos IgG frente a Bgl2p en pacientes con y sin candidiasis invasivas e individuos sanos. En estos diagramas de cajas y bigotes, las cajas muestran los rangos intercuartílicos; las líneas horizontales anchas, las medianas; los cuadrados negros, las medias; los círculos, los valores atípicos; y los bigotes extienden 1,5 veces el rango intercuartílico.

7. DEL DESCUBRIMIENTO A LA VALIDACIÓN DE BIOMARCADORES CLÍNICOS

Las aproximaciones inmunoproteómicas comentadas han proporcionado un número relativamente alto de biomarcadores clínicos para mejorar el diagnóstico precoz, estimar el pronóstico del paciente, predecir la respuesta a una terapia antifúngica específica, y monitorizar la progresión de la infección invasora, entre otros. Esta nueva generación de biomarcadores clínicos potenciales para candidiasis invasivas precisa de estudios clínicos adicionales para su empleo práctico. La inmunoproteómica es actualmente una técnica idónea para descubrir nuevos biomarcadores en suero, pero las plataformas cimentadas en SERPA no se pueden sin embargo extrapolar al laboratorio clínico práctico ya que requieren bastante tiempo y son extremadamente caras para su aplicación rutinaria en el entorno hospitalario (44, 45). Por esa razón, a diferencia de otros sistemas proteómicos que se pueden emplear indistintamente en las tres fases del desarrollo de biomarcadores clínicos [descubrimiento, validación e implementación (46-47)], los datos de SERPA necesitan la subsiguiente translación a otras plataformas clínicas precisas, sensibles, manejables y económicas, como son los inmunoensayos tipo ELISA, para que sus correspondientes hallazgos se validen. No obstante, muy pocos del gran panel de posibles candidatos específicos de las candidiasis invasivas identificados mediante SERPA se han validado analítica y clínicamente en ensayos de prototipos (36, 48). Como suele ocurrir en otros campos, el porcentaje de biomarcadores candidatos descubiertos para las candidiasis invasivas ya supera al de biomarcadores validados, constituyendo un importante cuello de botella propio de las tecnologías biómicas (49-51) (Figura 8).

Una vez optimizado el ensayo de prototipos, elegido para valorar la utilidad diagnóstica del biomarcador candidato identificado, estos estudios deberían incluir una fase de «validación analítica» para establecer la idoneidad del ensayo que va a ser aplicado en clínica (16, 36, 44, 45, 48, 51, 52). En esta primera etapa, se han de evaluar diferentes parámetros analíticos tales como linealidad, imprecisión, especificidad analítica, recuperación, límites de detección y cuantificación, intervalos de referencia, estabilidad (durante recogida, almacenaje y procesamiento de los especímenes séricos) y comparativa con otros métodos analíticos. Dado que diferentes formatos de ensayos así como distintos procedi-

mientos de manipulación de las muestras de estudio pueden dar lugar a resultados dispares, suelen requerirse estudios adicionales de estandarización. Posteriormente, el ensayo se desplaza, si cumplimenta todos estos requerimientos, a una nueva fase o nivel, «validación clínica», para estimar sus aplicaciones, limitaciones y valor clínico. En esta segunda etapa, se examina la capacidad del ensayo para discriminar correctamente pacientes con candidiasis invasivas de controles, o en otras palabras, para diagnosticar estas micosis oportunistas. Si ésta resulta no estar dentro de los parámetros establecidos, entonces otros formatos de ensayos se deberían aplicar, y empezar de nuevo con todas los pasos previos (optimización, validación analítica, estandarización, validación clínica...) antes de entrar en la tercera fase del desarrollo de biomarcadores (Figura 8).

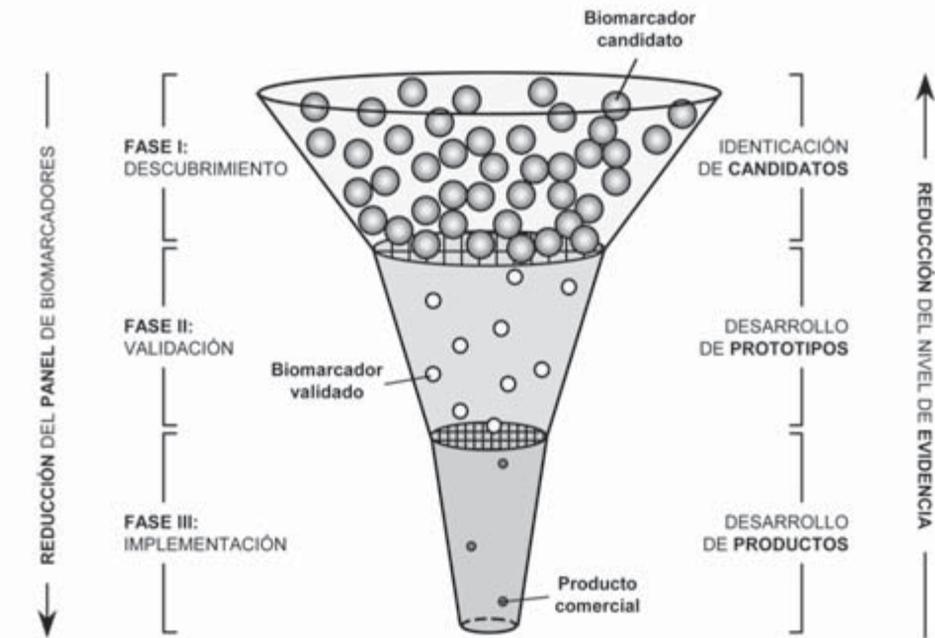


FIGURA 8. **Las tres fases del desarrollo de biomarcadores clínicos.** La proporción de biomarcadores candidatos descubiertos mediante SERPA para las candidiasis invasivas es superior a la de biomarcadores validados. Este paso (del descubrimiento a la validación de biomarcadores clínicos) supone un importante cuello de botella en su desarrollo.

8. DESAFÍOS FUTUROS

No hay duda de que aún queda un largo camino por recorrer en el desarrollo de biomarcadores clínicos para las candidiasis invasivas. Tras la gran expectación que la inmunoproteómica ha suscitado en el descubrimiento de biomarcadores en la biomedicina moderna, y en particular, en el diagnóstico de las candidiasis invasivas, el siguiente reto será el de ensanchar los cuellos de botella que obstaculizan el progreso de las sucesivas fases y, en definitiva, su introducción en el ámbito clínico práctico. La gran revolución científica que nos ofrece esta era de las tecnologías biómicas abre, además, en la actualidad, numerosas oportunidades en el campo de la investigación micológica, especialmente las de última generación (metabolómica, metaproteómica, interactómica...). Éstas suponen una oportunidad importante para el micólogo clínico en esta búsqueda de biomarcadores.

9. AGRADECIMIENTOS

Nuestra especial gratitud a A. Jiménez (del Departamento de Medicina Interna, Hospital Clínico de Salamanca) por proporcionarnos los especímenes séricos, a los pacientes que participaron en nuestros estudios, y a M. D. Gutiérrez, M. L. Hernáez, P. Ximénez-Embún y M. Martínez-Gomariz (de la Unidad de Proteómica, Universidad Complutense y Parque Científico de Madrid, un miembro del Instituto Nacional de Proteómica, ProteoRed) por su asistencia técnica. Los autores también expresan su más sincero agradecimiento a la Cátedra Extraordinaria Merck, Sharp & Dohme (MSD) en Genómica y Proteómica (dirigida por César Nombela), a la Comunidad de Madrid (proyecto S-SAL-0246/2006 DEREMICROBIANA-CM), a la Red Española para la Investigación en Enfermedades Infecciosas (REIPI) del Ministerio de Salud y Consumo e Instituto de Salud Carlos III - FEDER (proyecto RD06/0008/1027), a la Fundación Ramón Areces, a la Comunidad de Madrid y Universidad Complutense (proyecto 920685), y a la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (proyecto BIO-2006-01989) por las becas y ayudas financieras recibidas.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Pfaller, M. A. & Diekema, D. J. (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**: 133-163.
2. Eggimann, P., Garbino, J. & Pittet, D. (2003) Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. *Lancet Infect. Dis.* **3**: 685-702.
3. Falagas, M. E., Apostolou, K. E. & Pappas, V. D. (2006) Attributable mortality of candidemia: a systematic review of matched cohort and case-control studies. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **25**: 419-425.
4. Ellepola, A. N. & Morrison, C. J. (2005) Laboratory diagnosis of invasive candidiasis. *J. Microbiol.* **43**: 65-84.
5. Horvath, L. L., Hospenthal, D. R., Murray, C. K. & Dooley, D. P. (2003) Detection of simulated candidemia by the BACTEC 9240 system with plus aerobic/F and anaerobic/F blood culture bottles. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 4714-4717.
6. Schwesinger, G., Junghans, D., Schroder, G., Bernhardt, H. & Knoke, M. (2005) Candidosis and aspergillosis as autopsy findings from 1994 to 2003. *Mycoses.* **48**: 176-180.
7. Ponton, J. (2009) Utilidad de los marcadores biológicos en el diagnóstico de la candidiasis invasora. *Rev. Iberoam. Micol.* **26**: 8-14.
8. Ponton, J. (2006) El diagnóstico microbiológico independiente del cultivo en la candidiasis invasora. Importancia de los marcadores fúngicos. *Rev. Iberoam. Micol.* **23**: 20-25.
9. Cheng, S., Clancy, C. J., Checkley, M. A., Handfield, M., Hillman, J. D., Progulskifox, A., Lewin, A. S., Fidel, P. L. & Nguyen, M. H. (2003) Identification of *Candida albicans* genes induced during thrush offers insight into pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **48**: 1275-1288.
10. Clancy, C. J., Cheng, S. & Nguyen, M. H. (2009) Antibody-based strategy to identify *Candida albicans* genes expressed during infections. En: *Methods in Molecular Biology: Host-Pathogen Interactions* (Rupp, S. & Sohn, K., Eds.), pp. 169-185. The Humana Press, New Jersey.
11. Swoboda, R. K., Bertram, G., Hollander, H., Greenspan, D., Greenspan, J. S., Gow, N. A., Gooday, G. W. & Brown, A. J. (1993) Glycolytic enzymes of *Candida albicans* are nonubiquitous immunogens during candidiasis. *Infect. Immun.* **61**: 4263-4271.
12. Leinberger, D. M., Schumacher, U., Autenrieth, I. B. & Bachmann, T. T. (2005) Development of a DNA microarray for detection and identification of fungal pathogen involved in invasive mycoses. *J. Clin. Microbiol.* **43**: 4943-4953.
13. Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. (2006) Contributions of proteomics to diagnosis, treatment and prevention of candidiasis. En: *Microbial Proteomics: Functional Biology of Whole Organisms* (Humphery-Smith, I. & Hecker, M., Eds.), pp. 331-361. Wiley-Vch, New Jersey.

14. Thomas, D. P., Pitarch, A., Moteoliva, L., Gil, C. & López-Ribot, J. L. (2006) Proteomics to study *Candida albicans* biology and pathogenicity. *Infect. Disord. Drug Targets*. **6**: 335-341.
15. Pitarch, A., Molero, G., Moteoliva, L., Thomas, D. P., López-Ribot, J. L., Nombela, C. & Gil, C. (2007) Proteomics in *Candida* species. En: *Candida: Comparative and Functional Genomics* (d'Enfert C. & Hube, B., Eds.), pp. 169-194. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
16. Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. (2008) The *Candida* immunome as a mine for clinical biomarker development for invasive candidiasis: From biomarker discovery to assay validation. En: *Pathogenic Fungi: Insights in Molecular Biology* (San-Blas, G. & Calderone, R. A., Eds.), pp. 103-142. Caister Academic Press, Wymondham, UK.
17. Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. (2009) Proteomic profiling of serological response to *Candida albicans* during host-commensal and host-pathogen interactions. En: *Methods in Molecular Biology: Host-Pathogen Interactions* (Rupp, S. & Sohn, K., Eds.), pp. 369-411. The Humana Press, New Jersey.
18. Álvarez-Pérez, S., García, M. E. & Blanco, J. L. (2008) Diagnóstico micológico: algo está cambiando. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **26**: 638-46.
19. Nguyen, M. H., Cheng, S. J. & Clancy, C. J. (2004) Assessment of *Candida albicans* genes expressed during infections as a tool to understand pathogenesis. *Med. Mycol.* **42**: 293-304.
20. Caron, M., Choquet-Kastylevsky, G. & Joubert-Caron, R. (2007) Cancer immunomics using autoantibody signatures for biomarker discovery. *Mol. Cell Proteomics* **20**: 1115-1122.
21. Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. (2006) *Candida albicans* biology and pathogenicity: Insights from proteomics. En: *Microbial Proteomics: Functional Biology of Whole Organisms* (Humphery-Smith, I. & Hecker, M., Eds), pp. 285-330. Wiley-Vch, New Jersey.
22. Graves, P. R. & Haystead, T. A. (2002) Molecular biologist's guide to proteomics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 9-63.
23. Pitarch, A., Sánchez, M., Nombela, C. & Gil, C. (2003) Analysis of the *Candida albicans* proteome. I. Strategies and applications. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **787**: 101-128.
24. Pitarch, A., Sánchez, M., Nombela, C. & Gil, C. (2003) Analysis of the *Candida albicans* proteome. II. Protein information technology on the Net (update 2002). *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **787**: 129-148.
25. Pardo, M., Ward, M., Pitarch, A., Sánchez, M., Nombela, C., Blackstock, W. & Gil, C. (2000) Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and mass spectrometry. *Electrophoresis*. **21**: 2651-2659.
26. Wilson, R. A., Curwen, R. S., Braschi, S., Hall, S. L., Coulson, P. S. & Ashton, P. D. (2004) From genomes to vaccines via the proteome. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **99**: 45-50.

27. Tjalsma, H., Schaeps, R. M. J. & Swinkels, D. W. (2008) Immunoproteomics: From biomarker discovery to diagnostic applications. *Proteomics Clin. Appl.* **2**: 167-180.
28. Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. (2009) Identification of the *Candida albicans* immunome expressed during systemic infection by mass spectrometry. En: *Methods in Molecular Biology: Host-Pathogen Interactions* (Rupp, S. & Sohn, K., Eds.), pp. 187-235. The Humana Press, New Jersey.
29. Pitarch, A., Jiménez, A., Nombela, C. & Gil, C. (2006) Decoding serological response to *Candida* cell wall immunome into novel diagnostic, prognostic, and therapeutic candidates for systemic candidiasis by proteomic and bioinformatic analyses. *Mol. Cell Proteomics.* **5**: 79-96.
30. Haoudi, A. & Bensmail, H. (2006) Bioinformatics and data mining in proteomics. *Expert. Rev. Proteomics.* **3**: 333-343.
31. Vidal, B. C., Bonventre, J. V. & Hong, H. S. (2005) Towards the application of proteomics in renal disease diagnosis. *Clin. Sci.* **109**: 421-430.
32. Hayes, D. F., Bast, R. C., Desch, C. E., Fritsche, H., Kemeny, N. E., Jessup, J. M., Locker, G. Y., MacDonald, J. S., Mennel, R. G., Norton, L., Ravdin, P., Taube, S. & Winn, R. J. (1996) Tumor marker utility grading system: a framework to evaluate clinical utility of tumor markers. *J. Natl. Cancer Inst.* **88**: 1456-1466.
33. Pitarch, A., Pardo, M., Jiménez, A., Pla, J., Gil, C., Sánchez, M. & Nombela, C. (1999) Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. *Electrophoresis.* **20**: 1001-1010.
34. Valdes, I., Pitarch, A., Gil, C., Bermúdez, A., Llorente, M., Nombela, C. & Méndez, E. (2000) Novel procedure for the identification of proteins by mass fingerprinting combining two-dimensional electrophoresis with fluorescent SYPRO red staining. *J. Mass Spectrom.* **35**: 672-682.
35. Pitarch, A., Abián, J., Carrascal, M., Sánchez, M., Nombela, C. & Gil, C. (2004) Proteomics-based identification of novel *Candida albicans* antigens for diagnosis of systemic candidiasis in patients with underlying hematological malignancies. *Proteomics.* **4**: 3084-3106.
36. Pitarch, A., Jiménez, A., Nombela, C. & Gil, C. (2008) Serological proteome analysis to identify systemic candidiasis patients in the intensive care unit: Analytical, diagnostic and prognostic validation of anti-*Candida* enolase antibodies on quantitative clinical platforms. *Proteomics Clin. Appl.* **2**: 596-618.
37. Pitarch, A., Díez-Orejas, R., Molero, G., Pardo, M., Sánchez, M., Gil, C. & Nombela, C. (2001). Analysis of the serologic response to systemic *Candida albicans* infection in a murine model. *Proteomics.* **1**: 550-559.
38. Hernando, F. L., Calvo, E., Abad, A., Ramírez, A., Rementería, A., Sevilla, M. J. & Ponton, J. (2007) Identification of protein and mannoprotein antigens of *Candida albicans* of relevance for the serodiagnosis of invasive candidiasis. *Intern. Microbiol.* **10**: 103-108.

39. Chaffin, W. L., López-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. & Martínez, J. P. (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**: 130-180.
40. Chaffin, W. L. (2008). *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**: 495-544.
41. Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. (2008) Collection of proteins secreted from yeast protoplasts in active cell wall regeneration. En: *Methods in Molecular Biology: 2D-PAGE, Applications and Protocols* (Posch, A., Ed), pp. 241-263. The Humana Press, New Jersey.
42. Pitarch, A., Sánchez, M., Nombela, C. & Gil, C. (2002) Sequential fractionation and two-dimensional gel analysis unravels the complexity of the dimorphic fungus *Candida albicans* cell wall proteome. *Mol. Cell Proteomics.* **1**: 967-982.
43. Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. (2008) Cell wall fractionation for yeast and fungal proteomics. En: *Methods in Molecular Biology: 2D-PAGE, Applications and Protocols* (Posch, A., Ed), pp. 217-239. The Humana Press, New Jersey.
44. Mischak, H., Apweiler, R., Banks, R. E., Conaway, M., Coon, J., Dominiczak, A., Ehrlich, J. H. H., Fliser, D., Girolami, M., Hermjakob, H., Hochstrasser, D., Jankowski, J., Julian, B. A., Kolch, W., Massy, Z. A., Neusuess, C., Novak, J., Peter, K., Rossing, K., Schanstra, J., Semmes, O. J., Theodorescu, D., Thongboonkerd, V., Weissinger, E. M., Van Eyk, J. E. & Yamamoto, T. (2007) Clinical proteomics: A need to define the field and to begin to set adequate standards. *Proteomics Clin. Appl.* **1**: 148-156.
45. Lumberras, B., Porta, M., Márquez, S., Pollán, M., Parker, L. A. & Hernández-Aguado, I. (2009) Sources of error and its control in studies on the diagnostic accuracy of «-omics» technologies. *Proteomics Clin. Appl.* **3**: 173-184.
46. Zolg, J. W. & Langen, H. (2004) How industry is approaching the search for new diagnostic markers and biomarkers. *Mol. Cell Proteomics.* **3**: 345-354.
47. Pisitkun, T., Johnstone, R. & Knepper, M. A. (2006) Discovery of urinary biomarkers. *Mol. Cell Proteomics.* **5**: 1760-1771.
48. Pitarch, A., Nombela, C. & Gil, C. (2007) Reliability of antibodies to *Candida* methionine synthase for diagnosis, prognosis and risk stratification in systemic candidiasis: A generic strategy for the prototype development phase of proteomic markers. *Proteomics Clin. Appl.* **1**: 1221-1242.
49. Bodovitz, S. & Joos, T. (2004) The proteomics bottleneck: strategies for preliminary validation of potential biomarkers and drug targets. *Trends Biotechnol.* **22**: 4-7.
50. Paulovich, A. G., Whiteaker, J. R., Hoofnagle, A. N. & Wang, P. (2008) The interface between biomarker discovery and clinical validation: The tar pit of the protein biomarker pipeline. *Proteomics Clin. Appl.* **2**: 1386-1402.
51. Whiteley, G. (2008) Bringing diagnostic technologies to the clinical laboratory: Rigor, regulation, and reality. *Proteomics Clin. Appl.* **1**: 1378-1385.
52. 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**: 971-983.