

La importancia de la proteómica en la salud pública

Rosa Victoria Pando-Robles, Dra en C,⁽¹⁾ Humberto Lanz-Mendoza, Dr en C.⁽¹⁾

Pando-Robles RV, Lanz-Mendoza H.
La importancia de la proteómica en la salud pública.
Salud Publica Mex 2009;51 suppl 3:S386-S394.

Resumen

La salud pública en el nuevo milenio tiene como reto integrar los avances de la genómica al derecho fundamental de la salud de todos los seres humanos. La proteómica, entendida como la disciplina científica que estudia los proteomas, es de vital importancia en la investigación en salud, ya que el conocimiento de las proteínas y moléculas efectoras de la función celular permitirá un mejor entendimiento de la fisiología humana. En este trabajo se describen los antecedentes y los conocimientos básicos del análisis proteómico basado en la espectrometría de masas y se comentan los usos de la proteómica en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de diferentes enfermedades, los avances en la comprensión de los trastornos crónicos y algunas enfermedades infecciosas. De manera adicional, se delinean las ventajas de la espectrometría de masas en la genotipificación de patógenos y el estudio de los polimorfismos de una sola base (SNP, por sus siglas en inglés).

Palabras clave: proteómica; espectrometría de masas; salud pública

Pando-Robles RV, Lanz-Mendoza H.
The significance of proteomics in public health.
Salud Publica Mex 2009;51 suppl 3:S386-S394.

Abstract

The proteome is defined as the entirety of proteins expressed by a genome in a given time under specific physiological conditions. In an organism, the cells contain the same genome; however, they express different proteins in response to a specific micro-environment. Proteomics is responsible for the study of proteomes, using a wide range of methodological techniques. Actually, proteomics is a key tool in health research because it has made possible systematic analysis of hundreds of proteins in clinical samples with the promise of discovering new protein biomarkers for different disease conditions. Finally, proteomic strategy is a technology well-suited to provide a better understanding of systems biology and human health.

Key words: proteomics; mass spectrometry; public health

El desarrollo de las ciencias genómicas y las diferentes tecnologías con aplicación biológica hacen posible el estudio de la información genética contenida en un organismo en distintos niveles: el estructural, que des-

cribe la secuencia de los nucleótidos que conforman un genoma; y el funcional, que analiza la expresión de los productos funcionales del gen, el ARN mensajero (transcriptoma) y las proteínas (proteómica). Antes de

(1) Centro de Investigación sobre Enfermedades Infecciosas, Instituto Nacional de Salud Pública. Cuernavaca, Morelos, México.

la genómica se tenía una visión unidireccional del flujo de información genética, basada sobre todo en el dogma central de la biología, según el cual la información se transmite del ADN al ARN y de éste a la proteína. Sin embargo, este punto de vista ha cambiado, ya que cada vez existen más evidencias de que los procesos celulares responden a la interrelación de diferentes moléculas, en la cual ácidos nucleicos, proteínas y metabolitos están íntimamente ligados y forman una densa red de interacciones con flujos multidireccionales, incluida la posibilidad de una retroalimentación o corrección. Hoy en día, esta compleja dinámica celular se conoce como sistema biológico.¹⁻⁵ Se presupone que la construcción, visualización y entendimiento de esta configuración molecular son muy promisorios, dado que ayudarán a revelar importantes principios de organización y función celular en interrelación con su ambiente. El campo de la genómica supone una serie de metodologías, las cuales están en continuo desarrollo para tener una mejor comprensión de la información genética y por ende del funcionamiento de un organismo. En ese sentido, la secuenciación completa del genoma humano, así como la de diferentes microorganismos patógenos que afectan al hombre,⁶ ha proporcionado a la investigación proteómica una plataforma para la identificación de proteínas a gran escala.

El conocimiento del genoma humano y sus polimorfismos no es suficiente para comprender la función de los genes en los procesos celulares. Algunas enfermedades (monogénicas) son efecto del cambio de un sólo nucleótido y evidencian una relación directa entre el cambio genómico y el fenotípico. Sin embargo, la mayoría de las enfermedades presenta efectos pleiotrópicos y la elucidación de los mecanismos bioquímicos que la ocasionan es más complejo. Las bases biológicas de los procesos celulares no pueden identificarse sólo a partir del estudio del genoma, en particular porque la secuencia de nucleótidos que define a un gen sólo describe el estado estático de la información hereditaria; asimismo, para entender la dinámica de los procesos celulares y la forma en que éstos se alteran en las distintas enfermedades es necesario el estudio de las proteínas y sus interacciones bajo un estímulo determinado, en razón de que éstas definen la complejidad, el ensamble y el funcionamiento de un organismo en relación con su ambiente.

Se ha descrito que el genoma humano se conforma por alrededor de 25 000 genes, aunque sólo se conoce la función de unos 8 000.⁶ Sin embargo, puede anticiparse que el número de proteínas expresadas en el hombre puede variar de 50 000 a ~500 000.^{7,8} La diferencia entre el número de genes y el número de proteínas se debe a que los genes no expresan necesariamente una sola proteína;

se sabe que por procesamiento alternativo de los transcritos de ARNm (maduración y empalme alternativo) se pueden generar diversas proteínas a partir de un gen único. De modo adicional, las proteínas presentan más de 300 tipos de modificaciones postraduccionales, incluidas fosforilación, glucosilación, acetilación, desaminación, miristilación, etc.⁹ La adecuada función de las proteínas depende de su correcta secuencia de aminoácidos, sus modificaciones postraduccionales, su estructura tridimensional, su concentración, interacciones con otras proteínas y por último el ambiente extracelular. Los mamíferos como el hombre contienen un sistema de organización de diferentes niveles, esto es, órganos, tejidos y células. Cada uno de ellos lleva a cabo distintas funciones y responde a alteraciones genéticas y ambientales (p. ej., enfermedad, cambios en la nutrición, infección por patógenos, sustancias tóxicas, etc.), a través de redes biológicas diferentes en las cuales ADN, ARN, proteínas y metabolitos interactúan entre sí. En este artículo se muestra una sinopsis de los avances y contribuciones de la investigación proteómica en el conocimiento de un sistema biológico en el plano proteómico.

Proteómica

El proteoma está formado con todas las proteínas que se expresan a partir del genoma de un organismo.⁷ La proteómica es una rama de la genómica que estudia los proteomas, es decir, la identificación de las proteínas, el conocimiento de su estructura primaria (secuencia de a-a), la identificación de sus modificaciones postraduccionales, su localización y la cuantificación de la expresión proteica (proteómica cuantitativa).^{1,10,11}

La principal herramienta de la investigación proteómica es la espectrometría de masas (EM), una tecnología que incluye la instrumentación (espectrómetros de masas), los métodos de adquisición y los softwares de análisis de datos. Los espectrómetros de masas constan de tres componentes fundamentales: la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector. De la combinación de estos tres elementos depende la sensibilidad, exactitud y nivel de confianza que se tiene en la identificación de una proteína.^{11,12} La EM es una técnica analítica que mide la relación masa/carga de una molécula y se utiliza en la industria farmacéutica desde hace muchos años para la detección e identificación de moléculas pequeñas (menos 1 000 Da). A fines de los años ochenta, gracias a la adopción de dos nuevos métodos de ionización de macromoléculas, la EM revolucionó la investigación de proteínas. Los científicos J. Fenn¹³ y K. Tanaka¹⁴ desarrollaron los sistemas de ionización de macromoléculas ESI y MALDI, respectivamente, por lo que

se los galardonó con el Premio Nobel de Química en el año 2002. El método de ionización por electrodispersión (ESI, del inglés *electrospray ionization*) permite la ionización de moléculas a partir de una solución acuosa bajo la aplicación de alto voltaje, mientras que la ionización por MALDI (del inglés *matrix laser assisted desorption/ionization*) produce iones a través del bombardeo con rayos láser de muestras en estado sólido asistido por matrices cristalizables. Estas metodologías solucionaron la dificultad de generar iones a partir de analitos no volátiles, como las proteínas y polímeros. Desde entonces, la EM desplazó a la secuenciación parcial de proteínas por Edman, debido a su sensibilidad (pmol-fmol), exactitud (100-5ppm) y rapidez (minutos-segundos), ésta varía de acuerdo con la complejidad del análisis y el equipo utilizado.^{1,15-17} Adicionalmente, la EM se emplea para identificar nucleótidos, carbohidratos, lípidos y polímeros sintéticos.

Infortunadamente, las características que confieren a las proteínas su función fundamental de moléculas efectoras de la función celular, como diversidad química, estructural y abundancia relativa, también dificultan su análisis experimental. Debido a ello, no existe un diagrama de flujo único para el análisis proteómico y queda a criterio del investigador la elección del conjunto de técnicas para dilucidar su pregunta biológica. En la figura 1 se describe de manera sinóptica un diagrama de flujo del análisis proteómico.¹⁸

Aplicaciones de la proteómica en la salud pública

La salud pública en el nuevo milenio tiene como reto integrar las ciencias genómicas al derecho fundamental de la salud de todos los seres humanos. Para ello es prioritario asimilar los conocimientos generados a partir del genoma humano, los avances tecnológicos en el campo de la biología (esto es, genómica, proteómica, metabolómica) y la bioinformática. De forma adicional, la salud pública a nivel mundial experimenta una transición epidemiológica hacia el predominio de las enfermedades crónicas (cáncer, diabetes mellitus, enfermedades cardiovasculares, etc.) sobre las infecciosas, aunque algunas de ellas subsisten y se consideran emergentes (VIH/sida, dengue, malaria, etc.). Por lo anterior, es evidente que los problemas de salud actuales tienen una naturaleza compleja que es difícil abordar desde un enfoque reduccionista. Hasta hace poco, un problema complejo se separaba en partes más simples y se aislaba un solo factor como responsable. Sin embargo, la naturaleza multifactorial de las enfermedades complejas obliga a ver el sistema en su conjunto, y de manera multidisciplinaria, con un enfoque holístico. En

este contexto, la genómica en salud pública es un campo emergente de investigación, que evalúa el impacto de los genes y su interacción con el comportamiento, la dieta y el ambiente sobre la salud de la población.

Como parte de la genómica funcional, la investigación proteómica permite vislumbrar nuevas aplicaciones biomédicas y farmacéuticas. La identificación de las proteínas que intervienen en las diversas etapas de una enfermedad ayudará a comprender las bases moleculares y la naturaleza de dicha anomalía; de igual modo, estas proteínas identificadas pueden utilizarse como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico de la enfermedad. El entendimiento de los procesos moleculares de los trastornos complejos, como el cáncer o las enfermedades autoinmunitarias, contribuirá a instituir políticas de salud más efectivas que repercutan en el bienestar de la población. Asimismo, hará posible la identificación de nuevos blancos terapéuticos para un mejor diseño de fármacos y la vigilancia de los efectos de una sustancia en el tratamiento de un paciente.^{1,10} Más aún, el conocimiento de los proteomas de diferentes patógenos en interacción con su hospedero hará posible comprender mejor la biología del sistema y proporcionará mejores herramientas de control de las enfermedades infecciosas. Por último, debido a su elevada sensibilidad y la capacidad de realizar estudios a escala masiva, la espectrometría de masas es una técnica que se ha utilizado ahora para realizar estudios poblacionales de genotipificación y detectar de manera simultánea y a bajo costo múltiples patógenos.^{19,20}

A continuación se analizan algunas áreas en las que la proteómica tiene grandes impactos.

1. Búsqueda de biomarcadores

El desarrollo de la proteómica ha abierto grandes expectativas para la identificación de biomarcadores, toda vez que la EM puede identificar proteínas en muy baja concentración (fentomoles) y puede realizarse un análisis sistemático de cientos o miles de proteínas en una muestra clínica. Los biomarcadores son moléculas que sirven como indicadores del estado fisiológico y también de los cambios que se producen durante el proceso y que desembocan en el desarrollo y establecimiento de un padecimiento, y cuyos requisitos fundamentales son una elevada especificidad y sensibilidad.^{21,22} Si bien se realiza una búsqueda intensa de biomarcadores de diferentes afecciones mediante proteómica, aquí sólo se mencionan los trabajos relacionados con el cáncer debido a su importancia epidemiológica.

Cáncer. Los diferentes tipos de cáncer son el resultado de una desregulación de los procesos de proliferación, diferenciación, muerte y migración celular, sucesos que

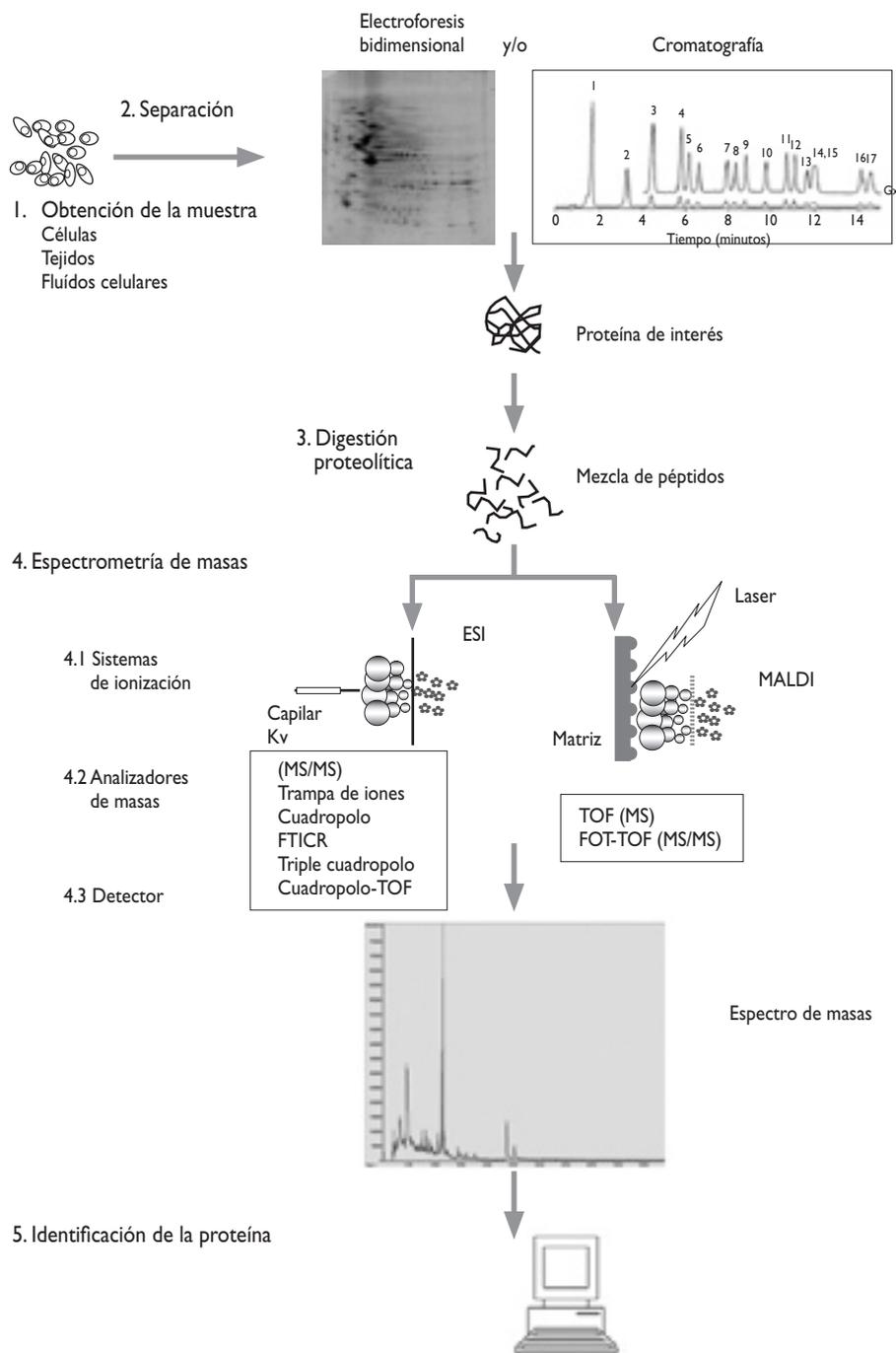


FIGURA 1. DIAGRAMA DE FLUJO DEL ANÁLISIS PROTEÓMICO. (ADAPTADO DE PANDO V Y BATISTA CVF¹⁸). 1) OBTENCIÓN DE LA MUESTRA BIOLÓGICA. 2) SEPARACIÓN Y AISLAMIENTO DE PROTEÍNAS. 3) DIGESTIÓN PROTEOLÍTICA. 4) ANÁLISIS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS. LOS ESPECTRÓMETROS DE MASAS, POSEEN TRES COMPONENTES BÁSICOS: A) SISTEMA DE IONIZACIÓN, MALDI O ESI. B) ANALIZADORES IÓNICOS, SU FUNCIÓN ES LA SEPARACIÓN DE LOS IONES DE ACUERDO A SU RELACIÓN MASA-CARGA (M/Z). DEL TIPO DE ANALIZADOR PRESENTE DEPENDE LA SENSIBILIDAD, EXACTITUD Y RESOLUCIÓN DEL ESPECTRÓMETRO DE MASAS. LOS ANALIZADORES IÓNICOS MÁS USADOS EN EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS SON: i) TIEMPO DE VUELO O TOF (TIME OF FLIGHT), ii) TRAMPA DE IONES O IT (ION TRAP) QUE INCLUYEN LAS TRAMPAS TRIDIMENSIONALES (TRAMPA DE PAUL) Y LAS TRAMPAS LINEALES, iii) TRIPLOCUADROPOLO, iv) FT-ICR (FOURIER TRANSFORM-ION CYCLOTRON RESONANCE), y v) ORBITRAP. c) DETECTORES, ESTOS CENSAN LA CORRIENTE DEL IÓN, LA AMPLIFICAN Y TRANSMITEN LA SEÑAL A LA COMPUTADORA, DONDE SE REGISTRA EN FORMA DE UN ESPECTRO DE MASAS. LOS VALORES M/Z DE LOS IONES SON DIBUJADOS EN EL EJE DE LAS COORDENADAS MIENTRAS QUE LA INTENSIDAD RELATIVA EN EL EJE DE LAS ABCISAS. EL ESPECTRO DE MASAS MUESTRA EL NÚMERO DE COMPONENTES EN LA MUESTRA, EL PESO MOLECULAR DE CADA COMPONENTE Y LA ABUNDANCIA RELATIVA DE LOS MISMOS, VIENE A SER LA HUELLA DIGITAL DE UNA PROTEÍNA. 5) IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS, GENERALMENTE SE BASA EN INFORMACIÓN DE MASAS PEPTÍDICAS O DE SECUENCIACIÓN DE NOVO (CID). LA EXACTITUD CONSIDERADA ACEPTABLE PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS ES <20 PPM

de manera individual o en conjunto distan mucho de comprenderse. A nivel mundial, más de 11 millones de personas se diagnostican con cáncer cada año y se calcula que representan 13% del total de muertes por año (7.5 millones). Con el incremento de la expectativa de vida, la prevalencia de muchos tipos de cáncer se incrementará, a tal punto que para el año 2030, 11.5 millones de personas morirán por esta enfermedad.²³ Estos datos obligan a efectuar un mayor y mejor esfuerzo en la búsqueda de nuevos biomarcadores para la detección temprana del cáncer, predecir el desarrollo de la enfermedad y evaluar la respuesta terapéutica. Los líquidos humanos son la principal fuente de biomarcadores, en particular por su bajo costo, fácil recolección, procesamiento y el carácter no invasivo de sus muestras.²⁴ De éstos, se hallan en estudio la sangre (plasma y suero), líquido cefalorraquídeo, orina, saliva, lágrimas, aspirado nasal, líquido seminal, etc. Sin embargo, debido a la complejidad de la muestra y la baja concentración de proteínas que pueden actuar como biomarcadores (ng/ml), se debe considerar una serie de variables, entre ellas las siguientes: preparación de la muestra, prefraccionamiento, depleción de las proteínas más abundantes, cuantificación de las proteínas, programas para el análisis de datos, etc., con la finalidad de que los resultados sean comparables y reproducibles.²⁵ En la actualidad existen biomarcadores de uso frecuente para la detección de algunos tipos de cáncer; sin embargo, el diagnóstico temprano de la enfermedad es limitado, debido a un pobre conocimiento de la etiología del cáncer y una baja sensibilidad y especificidad de los marcadores diagnósticos. Es importante mencionar que los biomarcadores deben someterse a diversas evaluaciones científicas antes de considerarse

para la práctica clínica y recibir aprobación de la FDA. En esencia, son cinco: estudios preclínicos (analíticos), estudios clínicos y validación, estudios retrospectivos, estudios prospectivos y estudios de casos con cáncer validados en diferentes instituciones.²² Hoy día existen algunos biomarcadores en proceso de validación y otros en espera de aprobación por la FDA.²⁶ En el cuadro I²⁷⁻⁴³ se presenta un resumen del estado del arte en este campo y se resalta que los biomarcadores propuestos con base en estudios proteómicos poseen una mayor sensibilidad y especificidad respecto de los que se usan actualmente. Por ejemplo, en el cáncer de ovario, el primer biomarcador identificado en la década de 1980 fue el CA-125, una glucoproteína de alto peso molecular que se encuentra elevada en 80 a 85% de las mujeres en etapas tardías de la enfermedad y sólo en 50 a 60% de las pacientes en etapas tempranas de la afección.³⁹ Pese a ello, la concentración de esta proteína puede estar incrementada en otras anomalías fisiológicas y también estados normales como el embarazo, lo que da origen a la baja especificidad y sensibilidad.²⁵ Se han incrementado estas variables al usarlas en combinación con otras proteínas, como OVX1 y M-CSF.⁴⁴ Mediante SELDI-TOF (*surface enhanced laser desorption ionization time of flight*) se han identificado varios picos proteicos que pueden servir como biomarcadores y que poseen una alta sensibilidad, aunque no se conoce su identidad.⁴⁵⁻⁴⁷ Asimismo, se han notificado incrementos de la haptoglobina alfa en muestras de suero de pacientes con cáncer de ovario⁴⁸ y de las formas glucosiladas de esta proteína.^{49,50} En fecha reciente se han propuesto la CA-125, la apolipoproteína A1, un fragmento truncado de la transtiretina, y un fragmento de la cadena pesada H4 del inhibidor de la

Cuadro I
COMPARACIÓN DE LOS BIOMARCADORES PROPUESTOS CON BASE EN ESTUDIOS PROTEÓMICOS
Y LOS BIOMARCADORES USADOS EN LA ACTUALIDAD EN LA DETECCIÓN DE ALGUNOS TIPOS DE CÁNCER

Cáncer	Biomarcadores propuestos			Biomarcador	Biomarcadores de uso actual		
	Sensibilidad	Especificidad	Año y referencia		Sensibilidad	Especificidad	Año y referencia
Uretra	80%	90-97%	2005 ²⁷	NMP22	31%	95%	1996 ²⁸
Mama	93%	91%	2002 ²⁹	CA15-3	63%	80-88%	1984-5 ^{30,31}
Colon	91%	93%	2004 ³²	CEA	43%	***	1965 ²²
Gástrico	83%	95%	2006 ³³	CEA	49%	***	1965 ²³
Hígado	94%	86%	2006 ³⁴	AFP	50%	90%	1963 ³⁵
Pulmón	87%	80%	2005 ³⁶	CyfrA21-I	63%	94%	1994 ^{23,37}
Ovario	83%	95%	2004 ³⁸	CA-125	57%	***	1981 ³⁹
Páncreas	78%	97%	2005 ⁴⁰	CA19-9	72%	***	1979 ⁴¹
Próstata	83%	97%	2002 ⁴²	PSA	86%	20-34%	1979 ⁴³

Adaptación a partir de Cho²³ y Kulasingam²¹

tripsina alfa como biomarcadores de la fase temprana de cáncer de ovario con una sensibilidad de 83% y una especificidad de 95%.³⁸ Otra de las contribuciones de la proteómica ha sido la detección de modificaciones posttraduccionales (PTM) en relación con los diversos tipos de cáncer. De manera específica se han encontrado varias proteínas fosforiladas como EGFR para cáncer de colon, c-kit para tumores gastrointestinales y Her2 para cáncer de mama. Ha tenido gran importancia la aprobación por la FDA de los fármacos Erbitux, Gleevec y Herceptin, que actúan como inhibidores de cinasas de tirosina y se utilizan para el tratamiento del cáncer.^{26,51}

2. Enfermedades crónicas

Obesidad. La prevalencia de la obesidad ha aumentando en grado considerable en los últimos 20 años.⁵² Los trastornos metabólicos ocasionados por la obesidad se vinculan con la resistencia a la insulina (periférica y hepática), la diabetes tipo 2 y los procesos inflamatorios, aunque aún no se conoce el mecanismo molecular que los relaciona.^{53,54} Diferentes estudios proteómicos, tanto en seres humanos como en ratones obesos, muestran que los adipocitos de los individuos obesos sufren estrés del retículo endoplásmico (RE), también conocido como respuesta a proteínas mal plegadas, o UPR (*unfolded protein response*).⁵⁴⁻⁵⁶ Este hallazgo abre una ventana de posibilidades para el estudio de la obesidad y la alteración metabólica que ello implica. El RE es un organelo celular de vital importancia en la biosíntesis de lípidos y proteínas e integra las distintas señales que recibe la célula y es en él donde se origina y se coordina la respuesta al estrés. En el RE se llevan a cabo el plegamiento y la modificación posttraduccionales de casi un tercio del total de las proteínas celulares. La acumulación y agregación de proteínas mal plegadas, ya sea por ser proteínas defectuosas o porque se generan tan rápido que no cumplen adecuadamente su control de calidad, causan estrés en este organelo y provocan una respuesta celular coordinada llamada UPR.⁵⁷ La función de la UPR es contener el trastorno fisiológico que lo originó y lo realiza principalmente por tres vías: a) sobreexpresa chaperonas para favorecer el plegamiento de proteínas, b) incrementa la actividad del proteosoma para degradar proteínas mal plegadas y c) disminuye la síntesis de proteínas para detener su acumulación en el RE. Si la célula no se recupera de los daños ocasionados por el estrés, se inician programas de muerte celular, que pueden ser apoptosis, autofagia o muerte citoplásmica.^{58,59} En fecha reciente, diversos estudios han señalado la relación entre UPR, apoptosis y diabetes tipo 2,^{60,61} sin embargo, aún quedan muchas preguntas por responder en relación con la causa y el efecto.

Enfermedades autoinmunitarias. Son de naturaleza compleja y no existe un tratamiento efectivo. Recientemente, Han y colaboradores⁶² analizaron a nivel proteómico diferentes lesiones cerebrales en necropsias de pacientes con esclerosis múltiple y encontraron dos proteínas relacionadas con la coagulación, un factor de tejido y un inhibidor de la proteína C. La administración de hirudina (inhibidor de la trombina) o proteína C recombinante redujo la gravedad de la enfermedad en un modelo animal de encefalomiélitis. La relación de la cascada de coagulación y la inflamación en la esclerosis múltiple abre una serie de posibilidades terapéuticas para contrarrestar los efectos de esta enfermedad. En el INSP, Moreno Rodríguez realiza estudios proteómicos en células mononucleares de pacientes con artritis reumatoide con el objetivo de identificar nuevos objetivos terapéuticos para la intervención y la detección temprana de la enfermedad.

3. Enfermedades infecciosas

Las interacciones entre el hospedero y el patógeno reflejan el equilibrio de los mecanismos de defensa de aquél y la virulencia de éste. Sin embargo, los mecanismos que el patógeno emplea para superar la reacción inmunitaria del hospedero y alterar otros procesos celulares se comprende en escasa medida. Con los avances de la tecnología proteómica es posible caracterizar la interacción patógeno-hospedero en función de las alteraciones de la expresión proteica. Se han publicado estudios proteómicos para distintos patógenos: *Bacillus anthracis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus pneumoniae*, *Yersinia pestis*.⁶³⁻⁶⁵ Estos resultados proveen una lista de moléculas del hospedero que pueden servir para elucidar los procesos celulares importantes en la replicación del patógeno y de esta forma contrarrestarlo. Asimismo, los virus como parásitos celulares obligatorios se adaptan o modulan el ambiente intracelular del hospedero durante su replicación y propagación. Los virus codifican proteínas multifuncionales que interactúan y modifican las proteínas de la célula hospedadora. Si bien los genomas virales fueron los primeros en secuenciarse, hoy en día se está replanteando el estudio de los proteomas correspondientes, ya que con los adelantos de la espectrometría de masas se han encontrado sorprendentemente, diferentes modificaciones posttraduccionales en las proteínas virales, las que aumentan su diversidad funcional.^{66,67} En fecha reciente, Burgener y colegas⁶⁸ publicaron un estudio de proteómica cuantitativa, en el que analizaron la expresión diferencial de proteínas entre mujeres resistentes a la infección por VIH-1 y mujeres controles. Estos investigadores piensan que ciertos factores de la

reacción inmunitaria innata en el tracto genital pueden tener una función en la resistencia a la infección y el conocimiento de este mecanismo puede contribuir al desarrollo de microbicidas o vacunas contra el VIH. Los resultados muestran 15 proteínas expresadas en forma diferencial, algunas de ellas hasta con un aumento de ocho veces. Las proteínas sobreexpresadas son algunas antiproteasas (de la familia de las serpinas B y cistatina A) y un factor conocido como anti-VIH-1. Otro ejemplo muy interesante de la complejidad de la interacción entre hospederos y patógenos son las enfermedades transmitidas por insectos vectores, como la malaria, el dengue y la enfermedad de Chagas. En estas afecciones, el patógeno debe adaptarse a dos hospederos muy diferentes, por un lado el insecto vector y por otro el huésped vertebrado (que en muchas ocasiones es el ser humano). La malaria se transmite al hombre por mosquitos del género *Anopheles*, el dengue por mosquitos del género *Aedes* y la enfermedad de Chagas por especies del género *Triatoma*. En la actualidad no se cuenta con una vacuna para estas enfermedades y los mosquitos han desarrollado resistencia a los insecticidas, por lo que la proteómica podría proporcionar información valiosa para interrumpir la transmisión de los patógenos en los insectos vectores a través de la identificación de proteínas fundamentales para su desarrollo. Se han iniciado los estudios proteómicos de tejidos clave en la reacción inmunitaria del mosquito *Anopheles*, como es la hemolinfa (líquido que baña los tejidos del insecto y donde se transporta la mayor parte de las moléculas defensivas). El perfil de expresión de la hemolinfa de *A. gambiae* ante la presencia de bacterias como *E. coli* y *Micrococcus luteus* muestra la expresión de 32 proteínas que se inducen por el daño o inoculación de bacterias.⁶⁹ Dentro de las proteínas más relevantes se identificaron la fenoloxidasa, una proteína con enlace tioéster y dos serpinas (SRPN2 y SRPN15) que intervienen en la melanización de patógenos y parásitos (enzima que deposita melanina en los microorganismos, con limitación de su desarrollo) y la eliminación de microorganismos a través de la opsonización. La fiebre del dengue es una enfermedad muy importante en salud pública, pese a lo cual sus mecanismos patogénicos y patofisiológicos no se entienden del todo. En fecha reciente se publicó el primer trabajo de proteómica del dengue y se notificaron 17 proteínas que cambian su expresión durante la infección de DENV 2 en células HepG2; llama la atención que algunas de estas proteínas participan en los procesos de transcripción y traducción, por lo que al parecer pueden ayudar a dilucidar los mecanismos patológicos de esta enfermedad.⁷⁰ Cabe resaltar que los autores de esta revisión pertenecen al INSP y tienen como línea de investigación las enfermedades transmitidas por vectores.

En este contexto, realizan estudios de proteómica de la interacción patógeno-huésped tanto en la relación *Plasmodium berghei*-*Anopheles albimanus* como en la relación *Aedes aegypti*-virus del dengue. En fecha reciente, Pando y Moreno empezaron a trabajar en la búsqueda de biomarcadores para el dengue hemorrágico en células mononucleares de pacientes con dengue clásico.

Estudios poblacionales mediante espectrometría de masas

Identificación de polimorfismos de una sola base (SNP)

Los espectrómetros de masas tipo MALDI-TOF se han utilizado para el análisis de ADN, productos de PCR, determinación de alelos e identificación de polimorfismos de una sola base.^{71,72} Estos equipos son ideales para los estudios masivos, ya que tienen la capacidad de realizar 20 000 espectros por día y, debido a su sensibilidad, se usa menos de 0.5% de la reacción inicial del PCR. En general, esta metodología se ha empleado para la identificación de SNP (si se lleva a cabo una búsqueda en PUBMED de los términos MALDI-SNP, resultan 280 artículos cuya publicación se remonta a 1996).

Detección y genotipificación de patógenos

La sensibilidad y especificidad de la EM permiten incrementar el nivel de detección de un patógeno. Se denomina masstag-PCR a la técnica de PCR multiplex realizada con oligos marcados con grupos químicos de masa conocida que se identifican mediante EM. Con la PCR multiplex se efectúa la amplificación de dos o más fragmentos de ARN o ADN de diferentes patógenos, como virus, bacterias y parásitos, de manera simultánea;⁷³ con el aumento del número de amplicones existe el inconveniente de no poder diferenciarlos en el plano electroforético y por ello su detección se realiza por EM. Esta técnica se ha probado en el diagnóstico diferencial para identificar hasta 22 agentes patógenos de muestras clínicas causantes de enfermedades respiratorias y 10 patógenos causantes de fiebres virales hemorrágicas, con sensibilidad y especificidad elevadas.^{20,74} En fecha reciente se analizaron 44 muestras de secreciones nasales de niños con enfermedades respiratorias, cuyo resultado por métodos convencionales (cultivo e inmunofluorescencia) fue negativo para siete patógenos respiratorios comunes. Mediante masstag-PCR se detectaron patógenos respiratorios en 27 muestras (66%) presumiblemente negativas: 17 fueron positivas para picornavirus y nueve positivas para una nueva clase de rinovirus.⁷⁵ En la unidad de genómica y proteómica del CISEI-INSP se desarrolla un proyecto, en colaboración con el INDRE,

para la identificación de patógenos causantes de fiebres hemorrágicas por esta técnica. Los patógenos que se detectarán son: virus del Nilo Occidental, hantavirus, virus Chikunguya y las bacterias *Leptospira* y rickettsia; este proyecto lo conduce M. H. Rodríguez.

La genotipificación de patógenos se realiza también mediante PCR multiplex acoplado a masas. En esencia, se diseñan los oligos para generar amplicones de diferente tamaño, los cuales se detectan por EM. Esta técnica se ha usado para genotipificar diferentes virus, como la genotipificación de 14 genotipos del virus del papiloma humano, con un costo de 2 dólares por muestra.⁷⁶

Conclusiones

La proteómica es una herramienta fundamental en salud pública, ya que permite el estudio a nivel poblacional de proteínas que pueden estar alteradas en respuesta a una determinada enfermedad.

La epidemiología molecular a nivel del genoma, proteoma y metaboloma constituye un reto para la investigación en salud pública en el nuevo milenio.

Asimismo, el estudio de un sistema biológico en forma integrada, en los planos genómico, proteómico y metabolómico, en conjunción con los datos clínicos y epidemiológicos, hará posible caracterizar el sistema en su conjunto y de esta forma incrementar exponencialmente la posibilidad de entender diferentes procesos celulares, la patofisiología de una enfermedad o encontrar un nuevo biomarcador.

Referencias

- Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 2003;422:198-207.
- Barabasi AL, Oltvai ZN. Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* 2004;5:101-113.
- Bork L, Serrano BL. Towards cellular systems in 4D. *Cell* 2005;121:507-509.
- Hollywood K, Brison DR, Goodacre R. Metabolomics: current technologies and future trends. *Proteomics* 2006;6:4716-4723.
- Van der Greef J, Stroobant P, van der Heijden R. The role of analytical sciences in medical systems biology. *Curr Opin Chem Biol* 2004;8:559-565.
- Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/genome>. Acceso: marzo 2009.
- Wilkins MR, Sanchez JC, Gooley AA, Appel RD, Humphery-Smith I, Hochstrasser DF, et al. Progress with proteome projects: why all proteins expressed by a genome should be identified and how to do it. *Biotechnol Genet Eng Rev* 1996;13:19-50.
- Williams KL. Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis* 1999;20:678-688.
- Disponible en: www.abrf.org/index.cfm/dm.home. Acceso: marzo 2009.
- Hanash S. Disease proteomics. *Nature* 2003;422:226-232.
- Steen H, Mann M. The ABC's (and XYZ's) of peptide sequencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5(9):699-711.
- Ziuzdak G. *Mass spectrometry and biotechnology*. San Diego, California: Academic Press, 1996.
- Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science* 1989;246:64-71.
- Tanaka K, Waki H, Ido Y, Akita S, Yoshida Y, Yoshida T. Protein and polymer analysis up to m/z 100,000 by laser ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* 1988;2:151.
- Bradshaw RA, Burlingame AL. From proteins to proteomics. *IUBMB Life* 2005;57:267-272.
- Huber LA. Is proteomics heading in the wrong direction? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4:74-80.
- de Hoog CL, Mann M. Proteomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2004;5:267-293.
- Pando V, Batista CVF. Capítulo Proteómica: hacia el entendimiento del lenguaje de las proteínas. En: Rebolledo F, López Munguía A. (eds). Una ventana al quehacer científico. México: UNAM, Instituto de Biotecnología, 2008:97-108.
- Sauer S, Lechner D, Berlin K, Lehrach H, Escary JL, Fox N, et al. A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2000;28(5):E13.
- Briese T, Palacios G, Kokoris M, Jabado O, Liu Z, Renwick N, et al. Diagnostic system for rapid and sensitive differential detection of pathogens. *Emerg Infect Dis* 2005;11:310.
- Kulasingam V, Diamandis EP. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nat Clin Pract Oncol* 2008;5(10):588-599.
- Ludwig JA, Weinstein JN. Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 2005;5(11):845-856.
- Cho WC. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer* 2007;6:25.
- Veenstra TD, Conrads TP, Hood BL, Avellino AM, Ellenbogen RG, Morrison RS. Biomarkers: mining the biofluid proteome. *Mol Cell Proteomics* 2005;4(4):409-418.
- Bermudez-Crespo J, López, JL. A better understanding of molecular mechanisms underlying human disease. *Proteomics Clin Appl* 2007;1:983-1003.
- Disponible en: <http://www.fda.gov>. Acceso: marzo 2009.
- Mueller J, von Eggeling F, Driesch D, Schubert J, Melle C, Junker K. ProteinChip technology reveals distinctive protein expression profiles in the urine of bladder cancer patients. *Eur Urol* 2005;47(6):885-893.
- Soloway MS, Briggman V, Carpinito GA, Chodak GW, Church PA, Lamm DL, et al. Use of a new tumor marker, urinary NMP22, in the detection of occult or rapidly recurring transitional cell carcinoma of the urinary tract following surgical treatment. *J Urol* 1996;156(2 Pt 1):363-367.
- Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem* 2002;48(8):1296-1304.
- Kufe D, Inghirami G, Abe M, Hayes D, Justi-Wheeler H, Schlom J. Differential reactivity of a novel monoclonal antibody (DF3) with human malignant versus benign breast tumors. *Hybridoma* 1984;3(3):223-232.
- Hilkens J, Buijs F, Hilgers J, Hageman P, Calafat J, Sonnenberg A, et al. Monoclonal antibodies against human milk-fat globule membranes detecting differentiation antigens of the mammary gland and its tumors. *Int J Cancer* 1984;34(2):197-206.
- Chen YD, Zheng S, Yu JK, Hu X. Artificial neural networks analysis of surface-enhanced laser desorption/ionization mass spectra of serum protein pattern distinguishes colorectal cancer from healthy population. *Clin Cancer Res* 2004;10(24):8380-8385.
- Poon TC, Sung JJ, Chow SM, Ng EK, Yu AC, Chu ES, et al. Diagnosis of gastric cancer by serum proteomic fingerprinting. *Gastroenterology* 2006;130(6):1858-1864.
- Ward DG, Cheng Y, N'Kontchou G, Thar TT, Barget N, Wei W, et al. Changes in the serum proteome associated with the development of

- hepatocellular carcinoma in hepatitis C-related cirrhosis. *Br J Cancer* 2006;94(2):287-292.
35. Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin IS. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation* 1963;1:174-180.
36. Yang SY, Xiao XY, Zhang WG, Zhang LJ, Zhang W, Zhou B, et al. Application of serum SELDI proteomic patterns in diagnosis of lung cancer. *BMC Cancer* 2005;5:83.
37. Grenier J, Pujol JL, Guilleux F, Daures JP, Pujol H, Michel FB. Cyfra 21-1, a new marker of lung cancer. *Nucl Med Biol* 1994;21(3):471-476.
38. Zhang Z, Bast RC Jr, Yu Y, Li J, Sokoll LJ, Rai AJ, et al. Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 2004;64(16):5882-5890.
39. Bast RC Jr. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest* 1981;68:1331-1337.
40. Koopmann J, Zhang Z, White N, Rosenzweig J, Fedarko N, Jagannath S, et al. Serum diagnosis of pancreatic adenocarcinoma using surface-enhanced laser desorption and ionization mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2004;10(3):860-868.
41. Koprowski H, Stepelwski Z, Mitchell K, Herlyn M, Herlyn D, Fuhrer P. Colorectal carcinoma antigens detected by hybridoma antibodies. *Somatic Cell Genet* 1979;5(6):957-971.
42. Adam BL, Qu Y, Davis JW, Ward MD, Clements MA, Cazares LH, et al. Serum protein fingerprinting coupled with a pattern-matching algorithm distinguishes prostate cancer from benign prostate hyperplasia and healthy men. *Cancer Res* 2002;62(13):3609-3614.
43. Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol* 1979;17(2):159-163.
44. Woolas RP, Xu FJ, Jacobs IJ, Yu Y, et al. Elevation of multiple serum markers in patients with stage I ovarian cancers. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:1748-1751.
45. Petricoin EF, Ardekani AM, Hitt BA, Levine PJ, Fusaro VA, Steinberg SM, et al. Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer. *Lancet* 2002;359(9306):572-577.
46. Kong F, Nicole-White C, Xiao X, Feng Y, Xu C, He D, et al. Using proteomic approaches to identify new biomarkers for detection and monitoring of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006;100(2):247-253.
47. Kozak KR, Ammeus MW, Pusey SM, Su F, Luong MN, Luong SA, et al. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(21):12343-12348.
48. Ye B, Cramer DW, Skates SJ, Gygi SP, Pratomo V, Fu L, et al. Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 2003;9(8):2904-2911.
49. Fish RG, Gill TS, Adams M, Kerby I. Serum haptoglobin and alpha 1-acid glycoprotein as indicators of the effectiveness of cis-diamminedichloroplatinum (CDDP) in ovarian cancer patients—a preliminary report. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1984;20(5):625-630.
50. Thompson S, Dargan E, Turner GA. Increased fucosylation and other carbohydrate changes in haptoglobin in ovarian cancer. *Cancer Lett* 1992;66(1):43-48.
51. Yu LR, Issaq HJ, Veenstra D. Phosphoproteomics for the discovery of kinases as cancer biomarkers and drug targets. *Proteomics Clin Appl* 2007;1:1042-1057.
52. Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, McDowell MA, Tabak CJ, Flegal KM. Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999-2004. *JAMA* 2006;295(13):1549-1555.
53. Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, et al. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *Eur Cytokine Netw* 2006;17(1):4-12.
54. Boden G, Duan X, Homko C, Molina EJ, Song W, Perez O, et al. Increase in endoplasmic reticulum stress-related proteins and genes in adipose tissue of obese, insulin-resistant individuals. *Diabetes* 2008;57(9):2438-2444.
55. Gregor MF, Yang L, Fabbrini E, Mohammed BS, Eagon JC, Hotamisligil GS, et al. Endoplasmic Reticulum Stress Is Reduced in Tissues of Obese Subjects After Weight Loss. *Diabetes* 2009;58:693-700.
56. Sharma NK, Das SK, Mondal AK, Hackney OG, Chu WS, Kern PA, et al. Endoplasmic reticulum stress markers are associated with obesity in nondiabetic subjects. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(11):4532-4541.
57. Rutkowski DT, Kaufman RJ. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol* 2004;14(1):20-28.
58. Argüello M, Montero H, López S. Una ventana al quehacer científico. 25 aniversario, Capítulo Como contienen los virus con el estrés. México: UNAM, Instituto de Biotecnología, 2008:167-176.
59. Covarrubias L, Castro S. Una ventana al quehacer científico. 25 aniversario, Capítulo Degeneración y regeneración tisular: de la embriogénesis a la medicina regenerativa. México: UNAM, Instituto de Biotecnología, 2008:145-158.
60. Gurzov EN, Ortis F, Bakiri L, Wagner EF, Eizirik DL. JunB inhibits ER stress and apoptosis in pancreatic beta cells. *PLoS ONE* 2008;3(8):e3030.
61. Kutlu B, Burdick D, Baxter D, Rasschaert J, Flamez D, Eizirik DL, et al. Detailed transcriptome atlas of the pancreatic beta cell. *BMC Med Genomics* 2009;2:3.
62. Han MH, Hwang SI, Roy DB, Lundgren DH, Price JV, Ousman SS, et al. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature* 2008;451(7182):1076-1081.
63. Zhang CG, Chromy BA, McCutchen-Maloney SL. Host-pathogen interactions: a proteomic view. *Expert Rev Proteomics* 2005;2:187-202.
64. Wu HJ, Wang AH, Jennings MP. Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr Opin Chem Biol* 2008;12(1):93-101.
65. Lee EY, Choi DS, Kim KP, Gho YS. Proteomics in gram-negative bacterial outer membrane vesicles. *Mass Spectrom Rev* 2008;27(6):535-555.
66. Viswanathan K, Früh K. Viral proteomics: global evaluation of viruses and their interaction with the host. *Expert Rev Proteomics* 2007;4(6):815-829.
67. Maxwell KL, Frappier L. Viral proteomics. *Microbiol Mol Biol Rev* 2007;71(2):398-411.
68. Burgener A, Boutilier J, Wachhi C, Kimani J, Carpenter M, Westmacott G, et al. Identification of differentially expressed proteins in the cervical mucosa of HIV-1-resistant sex workers. *J Proteome Res* 2008;7(10):4446-4454.
69. Paskewitz SM, Shi L. The hemolymph proteome of *Anopheles gambiae*. *Insect Biochem Molec Biol* 2005;35:815-824.
70. Pattanakitsakul SN, Rungrojcharoenkit K, Kanlaya R, Sinchaikul S, Noisakran S, Chen ST, et al. Proteomic analysis of host responses in HepG2 cells during dengue virus infection. *J Proteome Res* 2007;6(12):4592-4600.
71. Haff LA, Smirnov IP. Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF mass spectrometry. *Genome Res* 1997;7(4):378-388.
72. Sauer S, Lechner D, Berlin K, Lehrach H, Escary JL, Fox N, et al. A novel procedure for efficient genotyping of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2000;28(5):E13.
73. Elnifro E, Ashshi A, Cooper R, Klapper P. Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev* 2000;13:559.
74. Palacios G, Briese T, Kapoor V, Jabado O, Liu Z, Venter M, et al. Mass Tag polymerase chain reaction for differential diagnosis of viral hemorrhagic fever. *Emerg Infect Dis* 2006;12:692.
75. Dominguez SR, Briese T, Palacios G, Hui J, Villari J, Kapoor V, et al. Multiplex Mass Tag-PCR for respiratory pathogens in pediatric nasopharyngeal washes negative by conventional diagnostic testing shows a high prevalence of viruses belonging to a newly recognized rhinovirus clade. *J Clin Virol* 2008;43(2):219-222.
76. Söderlund-Strand A, Dillner J, Carlson J. High-throughput genotyping of oncogenic human papilloma viruses with MALDI-TOF mass spectrometry. *Clin Chem* 2008;54(1):86-92. Epub 2007 Nov 2.