



## EDITORIAL

# Proteómica cardiovascular: una nueva tecnología para resolver viejos problemas

## Cardiovascular Proteómica: a new technology to solve old problems

José Tuñón<sup>a,\*</sup> y Óscar Lorenzo<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Servicio de Cardiología, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid

<sup>b</sup> Laboratorio de Investigación Vascular, Instituto de Investigación Sanitaria Fundación Jiménez Díaz, Universidad Autónoma de Madrid

La identificación y tratamiento de los sujetos que tienen un riesgo elevado de sufrir un evento isquémico agudo sigue siendo uno de los retos más importantes de la Medicina Cardiovascular. En la práctica clínica actual, nos basamos fundamentalmente en los factores de riesgo cardiovascular para la prevención primaria. En prevención secundaria, además de estos factores de riesgo utilizamos otras variables clínicas, como la fracción de eyección o el número de arterias coronarias afectadas, que pueden mejorar nuestra capacidad de predecir la probabilidad de que nuestros pacientes tengan un nuevo evento cardiovascular. Sin embargo, todos sabemos que esto no es suficiente, pues no somos capaces de predecir un gran número de estos eventos ni de impedirlos con los tratamientos que estamos empleando. Esto tiene un especial interés si recordamos que muchos pacientes fallecen antes de llegar al hospital sin haberse podido beneficiar de los avances terapéuticos de los que se dispone en este ámbito.

En las dos últimas décadas, se han publicado numerosos trabajos tratando de encontrar biomarcadores plasmáticos que tuvieran capacidad pronóstica y diagnóstica en aterotrombosis, entre otras patologías. A pesar de esto, más allá de la troponina, los biomarcadores propuestos no han encontrado aceptación para su uso en la práctica clínica en esta entidad, fundamentalmente debido a resul-

tados discrepantes en diferentes estudios<sup>1</sup>. Esto ha creado cierto escepticismo en torno a este campo. Sin embargo, el número de biomarcadores testados hasta ahora es muy pequeño si tenemos en cuenta que en el plasma puede haber hasta 900.000 proteínas<sup>2</sup>. Lo que sí resulta evidente, es que la tarea de testar una a una todas las proteínas plasmáticas puede ser un trabajo eterno a la par que muy costoso.

En la metodología tradicional, un investigador indagaba primero en la literatura en busca de alguna molécula que por su función y características pudiera tener valor como biomarcador, estableciendo una hipótesis. A continuación, se debían realizar los estudios necesarios en una población amplia para confirmar la hipótesis, utilizando técnicas como el ELISA. El resultado con esta metodología es que, si la molécula es útil como biomarcador, se está tardando un promedio de diez años desde la generación de la hipótesis hasta que esté disponible el correspondiente kit diagnóstico para usarlo en la práctica clínica<sup>2</sup>. Algo similar ocurre con la detección de nuevas dianas terapéuticas y el desarrollo de nuevos fármacos.

En la última década han irrumpido con fuerza en Medicina Cardiovascular los estudios que utilizan tecnología proteómica. Con esta tecnología no vamos a detectar proteínas previamente especificadas, sino que realizamos un rastreo comparando dos muestras de tejido o fluido para encontrar cuales se expresan diferencialmente en la condición estudiada. Consta de dos fases esenciales<sup>3</sup>. La primera, es la separación de proteínas en la muestra a estudiar. En la actualidad existen diferentes metodologías para realizar

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [jtunon@secardiologia.es](mailto:jtunon@secardiologia.es) (J. Tuñón).

este paso. La técnica clásica es el uso de un gel bidimensional que separa las proteínas en una dimensión de acuerdo con su carga eléctrica y en la otra, según su peso molecular. Se obtiene así un gel con múltiples manchas, cada una de las cuales corresponde a una proteína, aunque varias manchas pueden corresponder a diferentes isoformas de una misma proteína. La segunda etapa es la identificación de las proteínas mediante un espectrómetro de masas, comparando los datos obtenidos para cada mancha con las características de todas las proteínas conocidas almacenadas en una base de datos, estableciendo así de cuál de ellas se trata.

La comparación más común es la de tejido o fluido enfermo frente a sano, aunque hay muchas otras de interés, como por ejemplo, tejido o fluido de organismo enfermo que recibe un determinado tratamiento frente al de otro no tratado<sup>3</sup>. Así, la gran diferencia con el método tradicional es que no precisamos revisar la literatura en busca de proteínas candidatas para construir una hipótesis previa. Aquí debemos decidir únicamente qué tipos de tejido o fluido queremos comparar según cual sea la pregunta que queremos contestar con nuestro experimento. Este tipo de trabajos suele arrojar diferencias en la expresión de múltiples proteínas pero, evidentemente, no explica sus mecanismos de actuación, que deberán ser investigados en trabajos posteriores.

La proteómica se puede aplicar a todos los niveles experimentales. En primer lugar, se puede ensayar en cultivos celulares. De este modo se establecieron las alteraciones en la expresión proteica que se producen al estimular células monocíticas con LDL oxidada<sup>4</sup>. Con este mismo abordaje se ha visto que las plaquetas, al ser estimuladas con trombina liberan más de 300 proteínas, de las cuales, algunas no se sabía que eran producidas por estas células, como el precursor de quimoattractantes denominado secretogranina III<sup>5</sup>.

Se pueden hacer también estudios proteómicos con tejido. Aquí posiblemente el área del cáncer nos lleve alguna ventaja, ya que se publicó hace unos años un estudio que mostraba que el análisis proteómico de los especímenes de cáncer pulmonar extraídos en la cirugía era capaz de discernir qué pacientes iban a tener una mala evolución<sup>6</sup>. Posteriormente, en un estudio similar, Pasterkamp y colaboradores analizaron los especímenes extraídos de endarterectomía carotídea e identificaron que una elevada presencia de osteopontina se asociaba con una mayor incidencia de eventos cardiovasculares tras la cirugía<sup>7</sup>.

El estudio de la sangre es especialmente atractivo en la aterotrombosis por diferentes razones: 1) Puede proporcionarnos mucha información porque intercambia moléculas y células con la pared vascular y es la responsable de la formación de los trombos. 2) Es muy accesible, y, si detectamos en ella nuevos biomarcadores pueden ser fácilmente trasladables a la práctica clínica. Dentro de la sangre podemos centrarnos en el estudio de sus componentes celulares o bien del plasma y del suero. Estudiando el proteoma del monocito circulante en pacientes con síndrome coronario agudo hemos detectado modificaciones en la expresión de hasta 17 proteínas, que posteriormente se iba normalizando y a los seis meses mostraban un patrón similar al de sujetos con cardiopatía isquémica crónica<sup>8</sup>. También comprobamos cómo el tratamiento intensivo con estatinas modificaba la expresión de 20 proteínas tras este cuadro<sup>9</sup>.

Sin embargo, probablemente no son los elementos celulares, sino el plasma y el suero los que pueden tener más interés de cara a la búsqueda de biomarcadores. La razón es que para investigar células circulantes debemos hacer la extracción de las células en un período no superior a unas cuatro horas tras obtener la sangre, y por métodos más complejos que el simple centrifugado. En cambio, para realizar la determinación de la mayor parte de biomarcadores en plasma o suero basta con separarlos de las células con un centrifugado de la sangre y después se pueden guardar congelados para su uso posterior. Este tipo de procedimientos son más fáciles de estandarizar en la práctica clínica.

En el presente número de Clínica e Investigación en Arteriosclerosis, Cubedo et al publican la comparación del proteoma sérico en una población de pacientes con Infarto Agudo de Miocardio (IAM) con elevación de segmento ST con un grupo de sujetos sanos<sup>10</sup>. A pesar del gran rendimiento que puede llegar a dar, el estudio del suero o el plasma mediante técnicas proteómicas tiene una gran complejidad, pues el 90% de la masa ocupada por las proteínas está constituido por solo 9 de ellas<sup>3</sup>. Así, un paso clave antes de realizar el estudio es efectuar una separación de estas proteínas más abundantes para que no tapen a otras de menor peso molecular. De este modo, mostraban que con suero no tratado tan solo eran visibles la albúmina, la transferrina, y las cadenas pesadas y ligeras de la IgG. Cuando retiraban la albúmina y las IgG, quedaban la alfa1-antitripsina, haptoglobina y transferrina como las más abundantes. Finalmente, cuando separaban también éstas, aparecían hasta 90 proteínas no identificadas con el primer método. En total había nada menos que 131 proteínas solo en el grupo de pacientes y 27 que solo estaban en el de controles. Si comparamos estos resultados con trabajos previos, vemos que el número de proteínas detectadas es mucho mayor<sup>11</sup> y este es el resultado de las mejoras técnicas introducidas en la deplección de las proteínas más abundantes.

El siguiente paso es ver el significado de las proteínas que mostraban expresión alterada. Entre los grupos funcionales de proteínas descrito por Cubedo et al aparecen algunos de los más conocidos en la fisiopatología de la enfermedad coronaria, como las pertenecientes al sistema inmune, la coagulación, las moléculas de adhesión y el metabolismo lipídico, y se aprecian otros a los que se conoce una menor relación. En general, en este tipo de estudios vamos a encontrar un grupo de proteínas cuyo papel en la patología que estamos investigando ya será conocido. Otro grupo estará constituido por proteínas ya conocidas pero no relacionadas hasta ahora con esa patología, y en teoría será el de máximo interés. Finalmente, puede haber un tercer grupo que sería el formado por proteínas desconocidas hasta ahora cuyas características no coinciden con las almacenadas en las bases de datos existentes y que requerirán más estudios para caracterizarlas.

¿Va a conseguir la proteómica detectar los nuevos biomarcadores y dianas terapéuticas que precisemos en Medicina Cardiovascular? En principio podría ser así, pero este camino no está exento de dificultades. En primer lugar, este tipo de estudios no demuestran que las proteínas con expresión alterada jueguen un papel en el proceso patológico que estamos investigando y conocer este dato es especialmente importante cuando buscamos nuevas dianas sobre las que desarrollar futuros fármacos. Por consiguiente, la publica-

ción de listados de proteínas obtenidos en trabajos similares al realizado por Cubedo et al supone simplemente una base de partida en la búsqueda de proteínas que jueguen un papel en el cuadro clínico del IAM. Posteriormente, habrá que seleccionar algunas proteínas cuyas funciones sugieran que pueden tener un papel relevante en el proceso para realizar estudios mecanísticos, principalmente *in vitro* y en modelos animales, para conocer su papel en la fisiopatología de este proceso. Otro tipo de estudios serían aquellos a realizar en seres humanos para tratar de evidenciar si las proteínas propuestas tienen capacidad de actuar como biomarcadores pronósticos o diagnósticos.

En segundo lugar, un punto de interés es el tratamiento estadístico de los datos. Dado que con esta metodología se identifican cientos de proteínas, en general estaremos comparando los niveles de todas esas proteínas en dos tipos de muestras. Esto quiere decir que estaremos haciendo cientos de tests estadísticos y que si usamos una  $p < 0,05$  en cada uno de ellos vamos a obtener diferencias en la expresión de varias proteínas que no son reales. Por tanto, en proteómica se debe seleccionar muy cuidadosamente el nivel de significación exigido para dar como válida la diferencia de expresión entre las proteínas que estamos investigando.

Por último, a pesar de la mejora tecnológica que ha supuesto la incorporación de plataformas más potentes y rápidas en la separación de proteínas, como por ejemplo la denominada "shotgun proteomics", el nivel de resolución de esta tecnología dista mucho de ser el adecuado. Así, recientemente se ha visto que combinando los resultados de tres plataformas de proteómica diferentes se llegaban a identificar 3.020 proteínas, un número aún distante de las 900.000 que algunos autores sostienen que están presentes en plasma<sup>2</sup>.

En conclusión, los abordajes proteómicos nos van a permitir sin duda dar un gran salto cuantitativo a la hora de buscar nuevas dianas terapéuticas y biomarcadores. Sin embargo, la necesidad de complementar los hallazgos obtenidos con estudios mecanísticos, las precauciones que se deben tomar en el análisis estadístico y la limitada resolu-

ción de esta tecnología que se pone de manifiesto en fluidos tan complejos como el plasma, nos deben llevar a moderar nuestro optimismo ante lo que es, en todo caso, uno de los grandes avances de la Investigación en los últimos años.

## Referencias

1. Wang TJ, Gona P, Larson MG, et al. Multiple biomarkers for the prediction of first major cardiovascular events and death. *N Engl J Med.* 2006;355:2631–9.
2. Anderson L. Candidate-based proteomics in the search for biomarkers of cardiovascular disease. *J Physiol.* 2005;563:23–60.
3. Tuñón J, Martín-Ventura JL, Blanco-Colio LM, Lorenzo O, López JA, Egido J. Proteomic strategies in the search of new biomarkers in atherothrombosis. *J Am Coll Cardiol.* 2010;55:2009–16.
4. Fach EM, Garulacan LA, Gao J, et al. In vitro biomarker discovery for atherosclerosis by proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3:1200–10.
5. Coppinger JA, Cagney G, Toomey S, et al. Characterization of the proteins released from activated platelets leads to localization of novel platelet proteins in human atherosclerotic lesions. *Blood.* 2004;103:2096–104.
6. Yanagisawa K, Shyr Y, Xu BJ, et al. Proteomic patterns of tumour subsets in non-small-cell lung cancer. *Lancet.* 2003;362:433–9.
7. Pasterkamp G, Moll F, Hellings W, et al. Local atherosclerotic plaque osteopontin is a prognostic biomarker for adverse cardiovascular events in heart, brain and periphery. *Eur Heart J.* 2008;29 Abstr:276–7.
8. Barderas María G, Tuñón José, Dardé Verónica M, et al. Circulating human monocytes in the acute coronary syndrome express a characteristic proteomic profile. *J Proteome Res.* 2007;6:876–86.
9. Barderas MG, Tuñón J, Dardé VM, et al. Atorvastatin modifies the protein profile of circulating human monocytes after an acute coronary syndrome. *Proteomics.* 2009;9:1982–93.
10. Cubedo J, Padró T, García-Moll X, Pintó X, Cinca J, Badimon. Proteoma Sérico en el Infarto Agudo de Miocardio. *Clin Invest Arterioscler* 2011;.
11. Mateos-Cáceres PJ, García-Méndez A, López Farré A, et al. Proteomic Analysis of Plasma From Patients During an Acute Coronary Syndrome. *J Am Coll Cardiol.* 2004;44:1578–83.