

# Biotecnología

Nuria Arroyo de Prada. Business Development  
Manager. PROGENIKA BIOPHARMA / PROTEOMIKA

Uno de los grandes retos de la medicina actual es identificar nuevas dianas terapéuticas y marcadores para el diagnóstico precoz de las enfermedades, especialmente de aquéllas para las que no existen actualmente tratamientos ni diagnóstico temprano.

## Aplicaciones Clínicas de **la Proteómica**

Hasta recientemente, la aproximación que se ha utilizado ha consistido en la búsqueda de una única diana terapéutica o marcador diagnóstico para una determinada enfermedad utilizando muestras humanas. Sin embargo, esta aproximación no ha dado buenos resultados. En primer lugar, porque desde una perspectiva biológica tiene poco sentido ya que las enfermedades complejas y multifactoriales se caracterizan por la variedad de tipos celulares que participan en el desarrollo de la enfermedad, la multiplicidad de interacciones entre el tejido enfermo y su entorno, y por la diversidad de genes que participan en el proceso patológico. Y en segundo lugar, porque las enfermedades en humanos se caracterizan por la variabilidad genética y medioambiental de cada individuo, lo que da lugar a un importante "ruido de fondo" cuando se analizan perfiles de expresión de decenas de miles de parámetros siendo por lo tanto necesario analizar un gran número de pacientes así como individuos sanos.

### Proteómica

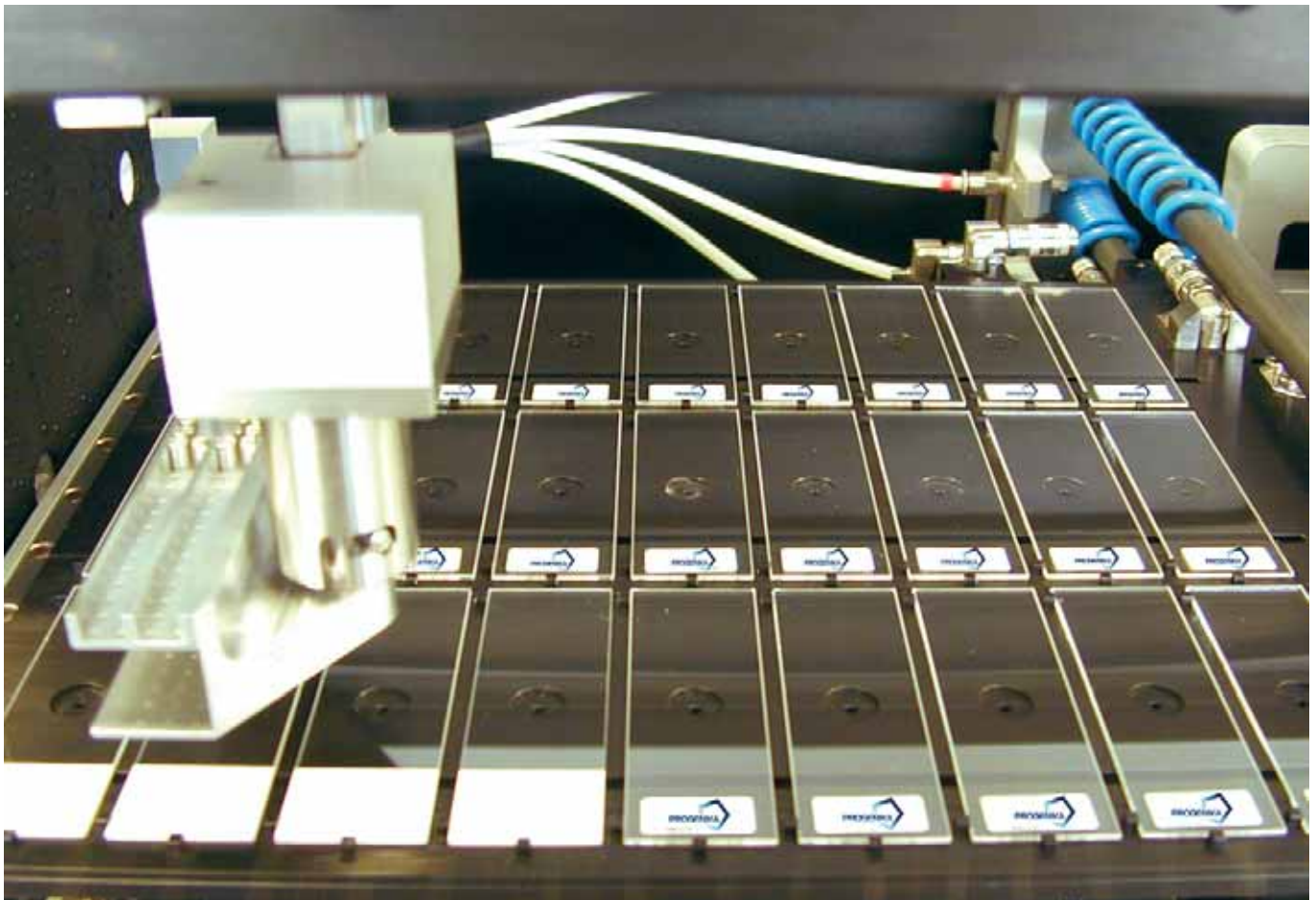
La Genómica Funcional, y en concreto la Pro-

teómica, permite unir el campo de la Biología con la Medicina. La información generada (la identificación de genes o proteínas implicados en un determinado proceso patológico) permite el desarrollo de sistemas de evaluación de la predisposición genética a padecer una determinada enfermedad, el desarrollo de sistemas de diagnóstico precoz de enfermedades, el desarrollo de nuevos fármacos para combatir más eficazmente las enfermedades, la optimización de los ensayos clínicos y la personalización de los tratamientos farmacológicos.

Las proteínas son los componentes fundamentales de la célula y son las responsables de la regulación de cada proceso biológico, incluidos los procesos patológicos. La Proteómica es la rama de la Ciencia que estudia la naturaleza y la función de las proteínas. El estudio de las diferencias de expresión proteica y de las modificaciones post-traduccionales entre tejidos procedentes de individuos sanos y pacientes afectados de una determinada enfermedad, proporciona una información muy valiosa sobre las bases moleculares y fisiológicas de esa enfermedad.

En la actualidad, el Proyecto Genoma Humano ya ha identificado un gran número de genes humanos. Sin embargo, la información que existe sobre el Proteoma Humano (conjunto de proteínas que se producen en el cuerpo humano) es todavía escasa. La complejidad del Proteoma es mucho mayor que la del Genoma, debido fundamentalmente a dichas modificaciones post-traduccionales que sufren las proteínas y a las interacciones proteína-proteína, que tienen una gran importancia funcional.

La medición de los niveles de proteína en tejido sano frente a tejido enfermo es una prueba directa de la regulación proteica asociada al proceso patológico, frente a la medida indirecta que proporciona el análisis de la expresión de ARN mensajero. Esta medida directa podría permitir una identificación y validación más rápida y fiable de marcadores moleculares de valor diagnóstico de la patología, y de potenciales dianas terapéuticas hacia las que dirigir nuevos fármacos. Estos son los principales motivos por los que la Proteómica se considera como el siguiente paso lógico a la Genómica, como



Detalle del proceso de impresión de microrrays.

herramienta para identificar nuevos marcadores y dianas terapéuticas. El Mercado de la Proteómica superó un billón de € el año 2000, y se estima que llegará a más de 6 billones de € el año 2005.

#### Aplicaciones

La Proteómica tiene por tanto dos líneas claras de aplicación en la Medicina. Por un lado, la identificación de marcadores de diagnóstico, pronóstico o respuesta a tratamiento. Y por otro lado, el desarrollo de herramientas que permitan el análisis simultáneo de paneles de proteínas identificados como marcadores.

#### BÚSQUEDA DE MARCADORES

Entre las deficiencias más importantes de la medicina actual se encuentran por un lado que muchas enfermedades se diagnostican en una etapa avanzada de su desarrollo, lo que dificulta o incluso imposibilita su tratamiento y curación. Es por ello que disponer de métodos que permitan establecer de manera temprana la disposición a padecer una determinada enfermedad, posibilita que el paciente se pueda tratar incluso antes de

que aparezcan síntomas agudos de la misma, aumentando de manera considerable las posibilidades de éxito del tratamiento y reduciendo las dolencias crónicas que pueden ocasionar. En el caso de las patologías difíciles de diagnosticar con exactitud por presentar una sintomatología similar a la de otras enfermedades, es de extrema importancia establecer un diagnóstico correcto con el fin de poder tratar al paciente de la manera más adecuada.

Por otro lado, en la mayoría de patologías los pacientes presentan respuestas altamente heterogéneas. Esto conlleva que muchos de los fármacos o tratamientos actuales sean efectivos en unos pacientes e infructíferos en otros. En otros casos es relevante establecer el pronóstico para poder aplicar el tratamiento más eficiente y a la vez menos perjudicial para el paciente.

Entre los retos de la medicina actual se encuentran por tanto poder diagnosticar las enfermedades de manera precoz para tener la posibilidad de aplicar un tratamiento preventivo y poder discernir entre los diferentes subtipos de pacientes para poder aplicar un

tratamiento personalizado.

Una de las características fundamentales para que los métodos de diagnóstico puedan emplearse como herramientas de cribado poblacional y de rutina clínica es que sean no invasivos, es decir, que se basen en muestras que pueden conseguirse sin necesidad de intervenir al paciente, como son muestras de sangre, de orina, líquido cefalorraquídeo. La invasividad es uno de los mayores impedimentos de la mayoría de métodos de diagnóstico disponibles en la actualidad, ya que muchas de las técnicas disponibles exigen la extracción de biopsias.

A diferencia del genoma, el proteoma varía constantemente según el estado y naturaleza de la célula. Estas variaciones pueden ser causadas por una situación patológica, el tratamiento con una droga o los cambios ambientales a los que la célula puede estar sometida. Los estudios comparativos del proteoma de organismos complejos requieren que las proteínas presentes en extractos de tejido sean separadas antes de su análisis. Esta necesidad se hace patente cuando se considera que del orden de 10.000 proteínas

# Biotecnología

están presentes en una célula humana. Además, el número de copias de una proteína particular en una célula dada puede variar hasta nueve órdenes de magnitud, con la consecuencia de que especies proteicas de baja abundancia pueden ser extremadamente difíciles de detectar y de caracterizar. A esto se suma otro nivel de la complejidad por el hecho de que los genes individuales pueden producir diversas formas proteicas, por ejemplo, a través del inicio de traducción alternativo o el "splicing" diferencial, mientras que las modificaciones post-traduccionales, tales como la fosforilación, dan lugar a cambios dinámicos en las proteínas. Existen una serie de métodos para el estudio simultáneo de un alto número de proteínas, incluyendo electroforesis en geles bidimensionales, espectrometría de masas y combinaciones de espectrometría de masas y cromatografía líquida.

## MICROARRAYS DE PROTEÍNAS

La Genómica Funcional y en concreto la Proteómica está suponiendo la identificación de nuevas proteínas y su asociación a enfermedades complejas como el cáncer o que transcurren a través de procesos inflamatorios como la artritis reumatoide, la psoriasis o la enfermedad inflamatoria intestinal. Decenas de estas proteínas se han convertido en marcadores tanto del diagnóstico, como del pronóstico o la respuesta al tratamiento. Es por ello que es necesario el desarrollo de herramientas que permitan el análisis simultáneo de decenas o incluso centenas de proteínas. La tecnología de los microarrays permite la investigación de cientos de parámetros en un solo experimento. Gracias a esta tecnología, moléculas de interés son inmovilizadas de forma ordenada en soportes sólidos para ser posteriormente interrogadas con otras moléculas marcadas con el fin de detectar interacciones específicas. Esta interacción puede medirse gracias a sistemas de escaneado y lectura. El desarrollo de los microarrays de proteínas ofrece un importante avance en la miniaturización y automatización del análisis del proteoma así como en la reducción de costes asociado al bajo consumo de reactivos. Las aplicaciones de los arrays de proteínas son múltiples, como por ejemplo, el screening de interacciones proteína-proteína, la identificación de sustratos para protein-quinasas e identificación de proteínas diana para "small molecules". En general este tipo de aplicación puede revolucionar tanto el campo del conocimiento como el campo de la clínica (diagnóstico, monitorización del paciente durante el tratamiento, etc.) como del área



Proceso de escaneado del array.

farmacéutica (búsqueda de nuevas drogas). Existen diferentes tipos de moléculas de captura (capture molecule) depositadas en el array. Estas moléculas pueden ser péptidos, anticuerpos, proteínas, fragmentos de proteínas, aptámeros, enzimas, sustratos, compuestos de bajo peso molecular, "scaffolds". Durante el proceso de la hibridación el array es expuesto a una mezcla compleja de proteínas, anticuerpos, etc., dependiente del modelo de array elegido. Las uniones específicas pueden ser entonces monitorizadas siguiendo diferentes aproximaciones basadas en métodos de detección por fluorescencia, quimioluminiscencia, resonancia superficial del plasmón, radioactividad, espectrometría. La detección basada en fluorescencia (con moléculas como Cy3 y Cy5) está ampliamente extendida. La misma instrumentación que se usa para la lectura de los arrays de DNA es aplicable a los arrays de proteínas. Existen así mismo sistemas para la amplificación de la señal fluorescente entre 10 y 100 veces. Utilizando también métodos de fluorescencia existen sistemas de alta sensibilidad como por ejemplo la tecnología "planar waveguide" (Zeptosens), la tecnología basada en "beads" y partículas en suspensión usando ficoeritrina como marcaje (Luminex) o la basada en las propiedades de semiconductor de nanocristales (Quantum Dot). El progreso de los arrays de proteínas tanto para investigación como para aplicaciones clínicas ha sido o está siendo más lento que

el de los arrays de DNA debido a las características propias de las moléculas de proteínas, muy distintas a las del DNA. El DNA es una molécula muy uniforme compuesta de cuatro nucleótidos, con una estructura hidrofílica bien definida. Por el contrario, las proteínas son moléculas muy diversas construidas a partir de 20 diferentes aminoácidos; pueden ser hidrofílicas o hidrofóbicas, ácidas o básicas. Adicionalmente, debido a la complementariedad del DNA, la interacción específica entre moléculas de DNA puede predecirse de forma fácil. En el caso de las proteínas, debido a la diversa y singular estructura de cada proteína, la interacción entre proteínas no puede predecirse en función de su secuencia de aminoácidos. Glicosilaciones, acetilaciones o fosforilaciones aumentan la diversidad de cada proteína al mismo tiempo que influyen en su interacción con otras proteínas. Por último, resulta relativamente fácil generar las moléculas de DNA para depositar en el array, ya sean productos de PCR u oligonucleótidos sintéticos. Sin embargo, no existe un sistema equivalente para el caso de las proteínas. A pesar de todo ello los arrays de proteínas constituyen la "progresión natural" de los ampliamente extendidos y aceptados arrays de DNA. El gran potencial que ofrecen los arrays de proteínas empuja a su estudio y desarrollo. La mejora de la técnica y puesta a punto de esta tecnología es fundamental para obtener el máximo beneficio de esta prometedora herramienta.