

cetónicos en el plasma y, en consecuencia, las células demandan menos glucosa y menos aminoácidos gluconeogénicos. En estas condiciones, no se activa la proteólisis ni tiene lugar, por tanto, la destrucción del fundamental tejido muscular.

Estas interrelaciones están coordinadas a través del glucagón, cuyo efecto es, en definitiva, la estimulación de la glucogenólisis y la liberación de la glucosa desde el hígado, así como la movilización de los ácidos grasos en el tejido adiposo.

#### **Integración metabólica en el estado de realimentación**

Con la realimentación, los triacilgliceroles se

metabolizan inmediatamente en la forma habitual propia del estado nutricional (postabsortivo), pero la glucosa requiere, en cambio, un tiempo de adaptación: inicialmente —debido a la baja concentración de este azúcar en la sangre— las células hepáticas apenas captan glucosa, por lo que la mayor parte de la que recibe el hígado a través de la vena porta se distribuye al cerebro y a otros tejidos periféricos que necesitan este combustible energético. Realmente, el hígado permanece en estado gluconeogénico durante algunas horas después de la ingesta con el fin principal, no de liberar glucosa a la sangre, sino de proporcionar glucosa fosforilada para restablecer las reservas del glucógeno hepático.

Pero, a medida que la concentración plasmática de la glucosa se eleva, también aumenta la velocidad de captación de este azúcar por el hígado que lo se utiliza para obtener energía mediante la glucólisis; su exceso, queda disponible para la síntesis de glucógeno y, seguidamente, los metabolitos procedentes de la degradación oxidativa de la glucosa se destinarán a la síntesis de ácidos grasos y de triacilgliceroles.

Estos ajustes metabólicos desencadenados por la insulina y el glucagón tienen lugar en cortos intervalos de tiempo. A más largo plazo actúan otros mecanismos reguladores para mantener en equilibrio la ingesta de nutrientes y el gasto energético, de manera que el organismo de los mamíferos se mantenga en una homeostasia perfectamente controlada.

## **APROXIMACIONES PROTEÓMICAS A LOS SISTEMAS BIOLÓGICOS**

**Gianni García Faroldi\* e Ignacio Fajardo#**

*Doctorando (\*) y Profesor Ayudante (#) del Departamento de Biología Molecular y Bioquímica, Universidad de Málaga*

Desde hace mucho tiempo, los científicos conocen que desde las moléculas más pequeñas que conforman las células, como los genes o las proteínas, hasta los propios organismos, pasando por las células y los tejidos, interactúan entre sí de manera muy compleja, y que estudiar una pequeña parte de todo este intrincado sistema es insuficiente. No obstante, la comunidad científica ha tenido que conformarse con realizar estudios reduccionistas de estos sistemas complejos debido principalmente a limitaciones técnicas. Afortunadamente, día a día, estas carencias tecnológicas se van superando y, hoy por hoy, es posible abordar multitud de estudios de sistemas complejos con una perspectiva más amplia, algo que hace tan sólo unos años era pura utopía. Así, por ejemplo, se han desarrollado una serie de disciplinas que poseen el sufijo «ómica», como las genómica, proteómica, metabolómica y otras, que pretenden dar una visión de conjunto que se aproxime un poco mejor, si cabe, a lo

que sucede realmente *in vivo*.

De entre estas disciplinas que pretenden dar una visión de conjunto de lo que ocurre en un tipo celular o un tejido, la que se centra en las proteínas se denomina proteómica. La proteómica se podría definir como una serie de métodos y técnicas destinados a estudiar el conjunto de proteínas que se expresan en una célula o tejido bajo unas condiciones dadas, lo que se conoce como el proteoma. Además, las técnicas proteómicas permiten estudiar los cambios postraduccionales que sufren las proteínas y las interacciones que se producen entre las proteínas, y de éstas con otras moléculas. Las proteínas que se expresan en un tipo celular o en un tejido concreto actúan de un modo coordinado para responder ante un estímulo dado como, por ejemplo, la presencia de un fármaco. Estudiar estos cambios globales desde el punto de vista del proteoma es lo que se propone esta aproximación: la proteómica.

Dentro de las aproximaciones proteómicas podemos distinguir principalmente dos bloques de técnicas de análisis de proteínas. En el primero se incluyen técnicas en las que las proteínas a estudiar no se separan, por ejemplo, las matrices de anticuerpos y de otras moléculas como alérgenos, glúcidos, otras proteínas, etc. En el segundo bloque se incluyen técnicas que implican una separación de las proteínas, como es el caso de la electroforesis bidimensional (electroforesis-2D) y la cromatografía líquida (LC).

Las matrices de anticuerpos permiten estudiar la expresión de un elevado número de proteínas en una sola matriz diseñada para tal fin. Esta técnica consiste en «pegar» anticuerpos a una superficie sólida de manera ordenada y localizada en puntos (*spots*). A continuación se pone en contacto la muestra objeto de estudio, por ejemplo un lisado celular, con la matriz, con lo que se consigue el reconocimiento y la unión específica proteína-anticuerpo. Esta unión se puede detectar de diversos modos: bien utilizando un anticuerpo secundario, o bien marcando las proteínas de la muestra con un fluoróforo o isótopo radioactivo en un paso previo a la incubación con la matriz. De modo análogo, se pueden «pegar» a la matriz otro tipo de moléculas (azúcares, sustratos enzimáticos o incluso ácidos nucleicos) para estudiar su interacción con las proteínas de la muestra de estudio. A modo de ejemplo de trabajos en los que se han usado estos métodos, Sreekumar *et al.* [*Cancer Res.*, 61: 7585-93 (2001)], desarrollaron una matriz con 149 anticuerpos y la aplicaron a un modelo de células de carcinoma de colon. Como resultado, encontraron no sólo varias proteínas cuya regulación por radioterapia se conocía (p53; DR5: *death receptor-5*), sino también algunas para las que dicha regulación era desconocida (DFF40/CAD: *DNA fragmentation factor-40/caspase-activated DNase*; CEA: antígeno carcinoembrionario).

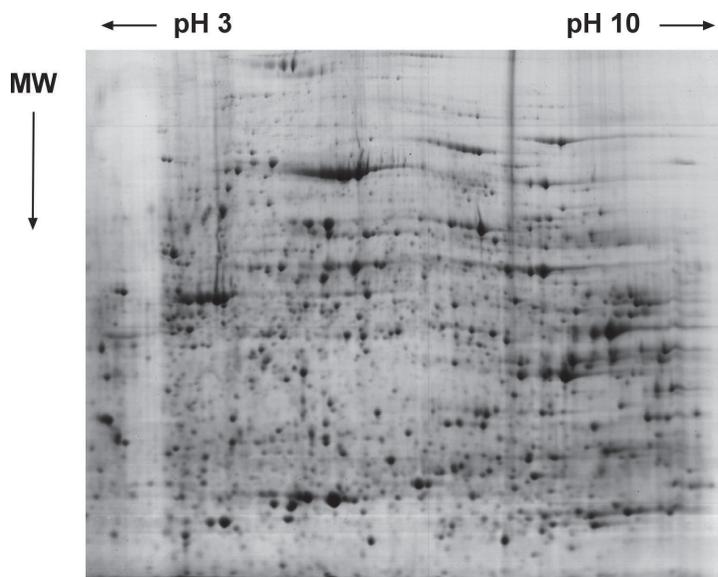


Figura 1. Gel 2D realizado con un extracto de proteínas de intestino delgado humano. Se indican las direcciones de la primera y segunda dimensión. Tinción: azul de Coomassie coloidal.

Entre las técnicas que sí separan las proteínas, la LC está cobrando cada vez más importancia por su utilidad cuando se quieren separar proteínas pequeñas. En esta técnica, las proteínas de la muestra interactúan con una fase estacionaria de un modo característico, lo que se aprovecha para su separación. Utilizando la LC se pueden resolver un gran número de proteínas. Por ejemplo, mediante la LC y la espectrometría de masas (MS) se separaron e identificaron 1484 proteínas de levadura en un único experimento [Yates *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 19: 242-47 (2001)]. Por otra parte, la técnica de separación de proteínas por excelencia es la electroforesis-2D. En este caso, las proteínas se separan en una primera dimensión en función de su punto isoeléctrico para, posteriormente, separarse ortogonalmente en una segunda dimensión en función de su masa. Esto da lugar a una serie de puntos, cada uno de los cuales corresponde a una proteína. Con esta técnica se pueden separar varios miles de proteínas en un solo gel. Como ejemplo, obsérvese el ingente número de puntos resuelto en un único gel realizado en nuestro laboratorio a partir de una minúscula biopsia de intestino delgado (ver figura 1).

Tanto la LC como la electroforesis-2D requieren otras técnicas para identificar las proteínas separadas, siendo de especial importancia para ello el desarrollo de la MS. Con esta técnica se puede calcular de forma muy precisa y exacta la masa de las moléculas. Inicialmente, las moléculas se volatilizan en forma de iones. A continuación, dichos iones pasan a un sistema analizador de masas en vacío, que usa campos eléctricos (sistemas cuadrúpolos y trampas iónicas) o no (sistemas de tiempo de vuelo), capaz de separar los iones en virtud de su relación masa/carga ( $m/z$ ). Finalmente, los iones llegan a un detector y se determina su masa gracias a la separación efectuada en el paso anterior. Existen distintas variantes para la volatilización/ionización de las moléculas, entre las que destacan, por su aplicabilidad a los péptidos y las proteínas, la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización mediante láser asistida por una matriz (MALDI). En el primer caso (ESI), las moléculas en disolución se hacen pasar por un fino capilar sometido a un intenso campo eléctrico. Así, se obtiene una dispersión de la solución en microgotas en las que el solvente se evapora y las moléculas pasan a la fase gaseosa y adquieren carga. En el segundo caso (MALDI), las moléculas se mezclan con una matriz sólida absorbente de luz. Sobre esta matriz se hace incidir un láser que provoca la ionización y desorción de las moléculas, que quedan en fase gaseosa. Tras la ionización de las moléculas por un método u otro, éstas se someten a la MS. Aunque es posible emplear la MS para calcular la masa de proteínas completas, cuando se quieren identificar éstas, habitualmente se digieren con proteasas (por ejemplo: tripsina) y son los péptidos resultantes los que se someten a la MS para obtener sus masas moleculares. Cada proteína presenta un patrón muy específico de péptidos o «huella dactilar peptídica» tras digerirla con proteasas concretas que cortan por

sitios específicos. Esta característica permite identificar las proteínas contrastando las masas moleculares de los péptidos obtenidos, tras la digestión de la proteína a analizar, con las bases de datos que contemplan las masas moleculares de los péptidos que se obtendrían, teóricamente, tras digerir cada proteína codificada por el genoma de un organismo. Este proceso es posible cuando se encuentra secuenciado el genoma completo de la especie objeto del estudio.

Otra técnica utilizada habitualmente en las aproximaciones proteómicas es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Este método consiste en someter una mezcla de péptidos a una primera MS donde se separan en función de su relación m/z. A continuación, se ajustan los instrumentos para seleccionar una relación m/z determinada correspondiente a un péptido concreto, el cual se introduce en una cámara de colisión. En dicha cámara, el esqueleto de enlaces peptídicos de las moléculas del péptido escogido se fragmenta predominantemente una sola vez. Con este procedimiento se obtiene una mezcla de «péptidos hijos» que se someten a una segunda MS, lo que da lugar a una «escalera» de tamaños en la que la diferencia entre cada «peldaño» corresponde a un solo aminoácido, lo que permite deducir la secuencia peptídica. Obtenida esta secuencia «real» de la proteína, se puede buscar en las bases de datos a qué proteína «teórica» corresponde.

Las aproximaciones proteómicas también incluyen estudios de las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas, las cuales con frecuencia juegan un papel fundamental en la regulación de su actividad. Existen multitud de modificaciones postraduccionales: fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones... (<http://av.bmbq.uma.es/bma/apuntes/T16/modCov.htm>), muchas de ellas relacionadas con las vías de transducción de señales y los procesos celulares. La importancia de estas modificaciones ha llevado al desarrollo de técnicas para conocer qué tipos de modificaciones ocurren y en qué residuos de la proteína se producen. Algunas de estas técnicas se centran en un tipo de modificación concreta, como las fosforilaciones. En este caso, se puede enriquecer la muestra en proteínas fosforiladas utilizando una inmunoprecipitación con anticuerpos específicos para

fosfopéptidos y, tras digerir con tripsina, los fragmentos resultantes se pueden analizar por MS e identificar las proteínas que han sufrido esta modificación. Existen otras metodologías (entre ellas la MS/MS) que permiten estudiar múltiples modificaciones de forma simultánea. Utilizando algunas de estas técnicas, en un trabajo reciente se identificaron 73 modificaciones postraduccionales, entre las que se incluyen fosforilaciones, metilaciones, oxidaciones y acetilaciones, en 11 familias de proteínas del cristalino [MacCoss *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99: 7900-5 (2002)].

Para dar una pincelada de la utilidad de las aproximaciones proteómicas en la resolución de una gran diversidad de incógnitas, sirvan de ejemplo algunos de los estudios que se han llevado a cabo utilizando estas técnicas. Así, se ha conseguido encontrar potenciales marcadores diagnósticos de infecciones de *Neisseria meningitidis*, con el consiguiente beneficio para detectar dichas infecciones de manera inequívoca y poder aplicar así un tratamiento adecuado [Steller *et al.*, *Proteomics*, 5: 2048-55 (2005)]. Se han podido estudiar en detalle la virulencia y la respuesta de un patógeno fúngico (de gran repercusión en la agricultura) al tratamiento con un antifúngico de uso generalizado, lo que hace posible conocer mejor los mecanismos de infección y patogenia, aspectos clave para poder mejorar los tratamientos y disminuir los efectos colaterales del antifúngico [Hooshdaran *et al.*, *Methods Mol. Med.*, 118: 57-70 (2005)]. En otro estudio, se han identificado potenciales marcadores tempranos en la hepatocarcinogénesis que podrían servir para disminuir el tiempo de diagnóstico y mejorar el tratamiento de esta enfermedad [Fella *et al.*, *Proteomics*, 5: 1914-27 (2005)]. También se han identificado proteínas marcadoras implicadas en la iniciación de los procesos apoptóticos en los colonocitos preneoplásicos, que podrían ser muy útiles en el desarrollo de nuevas estrategias contra la prevención del cáncer [Herzog *et al.*, *Int. J. Cancer*, 109: 220-9 (2004)]. Finalmente, se han identificado unas proteínas del polen que actúan como alérgenos, por lo que este trabajo es muy útil para el diagnóstico clínico y la inmunoterapia de las alergias [Corti *et al.*, *Proteomics*, 5: 729-36 (2005)].

## ¿QUIÉN USÓ POR VEZ PRIMERA ...?

Fernando A. Navarro

*Médico, diccionarista, traductor especializado y director de la revista Panace@*

### **Tabaco**

Desconocido en el Viejo Mundo, la primera noticia que tenemos del tabaco data de la anotación correspondiente al 6 de noviembre de 1492 en el diario del primer viaje colombino a las Indias. Es bien sabido que el auténtico diario de a bordo de Cristóbal Colón se ha perdido, pero

nos ha llegado una copia resumida que elaboró Bartolomé de las Casas, donde podemos leer:

*«Hallaron los dos cristianos por el camino mucha gente que atravesaba a sus pueblos, mujeres y hombres, con un tizón en la mano, yerbas para tomar sus sahumeros*