

Aplicaciones clínicas de las técnicas proteómicas

Clinical Applications of
Proteomic Techniques

Full text

Caballero Villarraso, Javier

Aplicaciones clínicas de las técnicas proteómicas = Clinical Applications of Proteomic Techniques / Javier Caballero Villarraso, Soledad Márquez Calderón, Román Villegas Portero; [Traducido por: Alison Turner].- Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía; Madrid: Ministerio de Sanidad y Consumo, 2007.

75 p.; 24 cm.

1. Proteómica I. Márquez Calderón, Soledad
II. Villegas Portero, Román III. Turner, Alison IV. Andalucía. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias V. España. Ministerio de Sanidad y Consumo

Autores: Javier Caballero Villarraso, Soledad Márquez Calderón y Román Villegas Portero.

Traducido por: Alison Turner

Dirección técnica: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía

Este documento se ha realizado en el marco de colaboración previsto en el Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud, al amparo del convenio de colaboración suscrito por el Instituto de Salud Carlos III, organismo autónomo del Ministerio de Sanidad y Consumo, y la Fundación Progreso y Salud de Andalucía.

Edita:

Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía
Avda. de la Innovación s/n
Edificio Renta Sevilla 2ª Planta
41020 Sevilla
España – Spain

©de la presente edición: Ministerio de Sanidad y Consumo
©de los contenidos: Consejería de Salud – JUNTA DE ANDALUCÍA
ISBN: 978-84-935877-7-2
ISBN: 978-84-935877-4-1
NIPO: 477-08-026-X
Depósito Legal: SE-2543/08
Imprime: Technographic
Maqueta: dOS creativos

Este documento puede ser reproducido en todo o en parte, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia.

<http://publicaciones.administracion.es>

Aplicaciones clínicas de las técnicas proteómicas

Clinical Applications of
Proteomic Techniques

Full text



Conflicto de Interés

Los autores declaran que no tienen intereses que puedan competir con el interés primario y los objetivos de este informe e influir en su juicio profesional al respecto.

Índice

7	Introducción
17	Objetivos
19	Métodos
23	Resultados
31	Discusión
35	Conclusión
37	Referencias
41	Anexos
47	Clinical Applications of Proteomic Techniques

Introducción

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 proteoma¹.

Las proteínas actúan dentro de otra red bioquímica mucho más amplia y compleja, que es el metabolismo de las células. El estudio general de las redes metabólicas se comienza a conocer como metabolómica. Genoma, proteoma y metaboloma forman un entramado, cuyo estudio supone un salto cualitativo determinante en las ciencias biomédicas. La combinación de proteómica con genética, bioquímica y/o biofísica ha supuesto el descubrimiento de muchas proteínas y de la función de éstas².

Mientras el genoma de un organismo es constante en la totalidad de sus células (salvando mosaicismos y mutaciones selectivas), el proteoma supone un concepto mucho más dinámico y variable. Este dinamismo no sólo se observa en diferentes sistemas, tejidos e incluso células; sino en estos mismos elementos, sometidos a distintas condiciones internas y/o externas. Todo ello se traduce en una ingente gama de proteomas y subproteomas en un mismo organismo, así como en una gran cantidad de posibles interacciones entre las proteínas que los componen. Si a esto se añade la ausencia de una metodología de amplificación proteica, puede intuirse que —a diferencia del genoma— el análisis completo de toda esta realidad de proteomas es una tarea difícilmente abaricable^{3,4}.

Esta complejidad hace que el estudio del proteoma plantee retos importantes. Para dar respuesta a estos retos, las técnicas de análisis de proteínas están sometidas a continuos desarrollos y mejoras, como se comentará más detalladamente en el siguiente apartado.

Técnicas de estudio del proteoma

Dentro de las aproximaciones al estudio del proteoma, se pueden distinguir principalmente cuatro grupos de técnicas. En el primero, se incluyen técnicas en las que las proteínas estudiadas no se separan: por ejemplo, las matrices o micromatrices (en inglés, *arrays* o *microarrays*) de proteínas. El segundo grupo incluye técnicas que implican una separación de las proteínas, como es el caso de la electroforesis bidimensional (electroforesis-2D) y la cromatografía líquida (LC). El tercer grupo comprende técnicas de análisis individualizado de

proteínas separadas, como la espectrometría de masas (MS). Habría un cuarto grupo, cuya función sería el procesamiento e interpretación de los datos obtenidos por alguna de las técnicas incluidas en los grupos anteriores.

Matrices de proteínas

Las matrices, *arrays* o biochips de proteínas permiten la detección, caracterización y cuantificación proteica, así como el estudio de las cualidades funcionales de las proteínas y sus interacciones, tanto entre ellas como con moléculas de DNA o lípidos. Un ejemplo son los *arrays* de anticuerpos, que permiten estudiar la expresión de un elevado número de proteínas en una sola matriz. Esta técnica consiste en fijar anticuerpos a una superficie sólida, de manera ordenada, y localizada a modo de puntos (*spots*) distribuidos en dos ejes. 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. De modo análogo, se pueden unir al *array* otro tipo de moléculas^{5,6}.

La complejidad y diversidad estructural proteicas han hecho que el desarrollo de los *microarrays* de proteínas haya sido técnicamente complicado. Al contrario que los ácidos nucleicos, las proteínas no tienen una estructura homogénea ni un patrón de unión específico, sino que cada proteína posee unas características bioquímicas particulares. En cuanto a los procesos de amplificación de la muestra, no existe una técnica equivalente a la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en genómica, que sea capaz de amplificar o multiplicar la cantidad de proteína existente en una muestra.

Por otra parte, el DNA posee una carga negativa que puede utilizarse para inmovilizar la molécula sobre la superficie del *array* mediante fuerzas electrostáticas. Por el contrario, la carga de las proteínas es muy variable, y, por este motivo, se han encontrado dificultades en la estandarización de materiales de soporte que sean adecuados para cada tipo de *microarray* de proteínas. Actualmente, se cuenta con una nueva generación química de superficies de membrana y de vidrio, que no requieren del empleo de agentes bloqueantes para eliminar el ruido de fondo, y que a la vez previenen el contacto directo de la proteína con la superficie. Con todo, la tecnología de *microarrays* de proteínas aún se encuentra ante dificultades técnicas en cuanto a la adquisición y unión estable de proteínas a superficies donde puedan interactuar con otras proteínas o ligandos y detectarse tal interacción^{7,8}.

Técnicas basadas en la separación de elementos proteicos

Entre las técnicas basadas en la separación de las proteínas, la cromatografía líquida (LC) está cobrando cada vez más importancia por su utilidad cuando se quieren separar proteínas pequeñas, y es fundamentalmente utilizada para el aislamiento de péptidos. La LC es un método físico de separación basado en la distribución de los componentes de una mezcla entre dos fases inmiscibles, una fija o estacionaria y otra móvil. La fase móvil es un líquido que fluye a través de una columna que contiene la fase fija. La LC clásica se lleva a cabo en una columna generalmente de vidrio, la cual está rellena con la fase fija. La fase fija puede ser un sólido, de diferentes propiedades químicas; en función de éstas, resultan diferentes tipos de cromatografía (cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de fase reversa, etc.). La fase móvil puede ser un solvente puro o una mezcla de solventes. Tras depositar la muestra en la parte superior, se hace fluir la fase móvil a través de la columna por efecto de la gravedad. Con el objeto de aumentar la eficiencia en las separaciones, el tamaño de las partículas de la fase fija se fue disminuyendo hasta el tamaño de los micrones, lo cual generó la necesidad de utilizar altas presiones para lograr que fluyera la fase móvil. De esta manera, nació la técnica de cromatografía líquida de alta resolución o HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), que requiere de instrumental especial que permita trabajar con las altas presiones requeridas⁹.

Por otra parte, la técnica de separación de proteínas por excelencia es la electroforesis en geles de poliacrilamida, que se basa en las diferencias de peso molecular de las mismas. En este caso, las proteínas se desunen en una primera dimensión según su punto isoeléctrico (isoelectroenfoque) y, posteriormente, se separan ortogonalmente en una segunda dimensión en función de su masa. Esta segunda dimensión se realiza en presencia de SDS (dodecil-sulfato sódico) o SDS-PAGE (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). La separación según sus propiedades eléctricas y su tamaño permite aislar prácticamente todas las proteínas de un proteoma en una matriz bidimensional (electroforesis bidimensional o electroforesis-2D o 2-DE). Esto da lugar a una serie de puntos o spots, cada uno de los cuales corresponde a una proteína. Con esta técnica, se pueden separar varios miles de proteínas en un solo gel.

Teóricamente, esta técnica serviría para estimar el número de proteínas expresadas en la muestra en un momento dado; pero, realmente, el número de spots obtenidos sólo refleja un porcentaje del total de proteínas

expresadas. La extracción proteica a partir del material de partida no es total¹⁰.

A pesar de haberse introducido numerosas mejoras en la técnica de 2-DE, aún presenta algunas limitaciones, como las siguientes:

- Solapamiento de proteínas cuando presentan cargas/pesos moleculares muy próximos.
- No presentan alta sensibilidad.
- Las proteínas muy grandes o muy pequeñas no se resuelven correctamente.
- Necesita mucho tiempo.
- Es muy difícil de automatizar.
- Al tratarse de técnicas manuales, la reproducibilidad es media.
- La técnica puede no conseguir su objetivo debido a las dificultades en la preparación de la muestra desde el material de partida hasta que puede ser cargada en el gel^{11,12}.

Técnicas para el análisis individual de elementos del proteoma

Para la identificación de proteínas, se utiliza la espectrometría de masas (MS). La MS es una de las técnicas instrumentales más usadas tanto para análisis cualitativo como cuantitativo. Es una técnica muy sensible y específica, que proporciona información estructural de las proteínas. La posibilidad del acoplamiento entre distintos tipos de separaciones cromatográficas y espectrómetros de masas permite la identificación de compuestos presentes en mezclas muy complejas. Sin embargo, para identificar proteínas a través de la MS no es necesario usar previamente una de las técnicas de separación comentadas en el apartado anterior (LC o 2-DE).

Un sistema de espectrometría de masas realiza básicamente tres funciones:

1. Ionización de la muestra.
2. Separación de fragmentos o iones.
3. Detección / Análisis de los fragmentos o iones.

Para realizar estas funciones, el espectrómetro de masas cuenta con las siguientes partes: una fuente de ionización, un analizador de masa/carga y un detector¹³.

Producir iones en fase gaseosa es fácil para compuestos volátiles de bajo peso molecular; sin embargo, la aplicación de la MS en el campo de las

proteínas es relativamente reciente. Esto es debido a la dificultad de obtener iones de macromoléculas en fase gaseosa, dado que los péptidos y las proteínas son compuestos de baja volatilidad y alto peso molecular. Por ello, es necesario el uso de técnicas especiales de ionización. Entre las distintas variantes de estas fuentes de ionización, destacan, por su aplicabilidad a los péptidos y las proteínas, la ionización por electrospray (ESI) y la desorción/ionización mediante láser o SELDI (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*), que en el caso de estar asistida por una matriz se conoce como MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*). Cabe reseñar que, mientras en el estudio de proteómica de fluidos se emplea fundamentalmente el SELDI, en el de tejidos se emplea el MALDI (conocido también como *MALDI Imaging*).

Existen diversos tipos de separadores de fragmentos o iones, que pueden estar basados en campos eléctricos o no. Entre los primeros, destacan los sistemas cuadrupolos y las trampas iónicas. Entre los no basados en campos eléctricos, los más utilizados son los sistemas de tiempo de vuelo (*TOF: Time Of Flight*).

Finalmente, los iones llegan al detector, donde se determina su masa.

Otra técnica utilizada habitualmente en las aproximaciones proteómicas es la espectrometría de masas en tándem (MS/MS).

La MS es una técnica ampliamente utilizada en análisis químico debido a:

- Su gran sensibilidad.
- La posibilidad de producir información estructural de una molécula.
- La rapidez con la que pueden obtenerse los datos^{14,15}.

Herramientas para el procesamiento de datos e interpretación de datos

La bioinformática aplicada a la proteómica es el conjunto de técnicas para el procesamiento e interpretación de los datos obtenidos con cualquiera de las técnicas anteriormente expuestas u otras. Así, las técnicas bioinformáticas permiten identificar una proteína en una base de datos partiendo de su huella peptídica, que es específica para cada proteína, o de su espectro MS/MS, que también es específico de cada uno de los péptidos o proteínas¹⁶.

Existe un gran número de proteínas y de nuevos genes descubiertos, de los que no se dispone aún de información acerca de su función. Los métodos de predicción de las funciones proteicas constituyen un apoyo teó-

rico importante en el estudio de estas macromoléculas, tanto por la información que proporcionan como por la utilidad que pueden tener en el diseño de péptidos específicos y la prospección de nuevas funciones. Estos métodos de predicción de funciones proteicas son probabilísticos, por lo que dependen de la cantidad de datos o información disponibles en un principio; o, en otras palabras, del tamaño de la muestra que se analiza. Por otro lado, el procedimiento que suele utilizarse para realizar predicciones es la comparación con datos de naturaleza semejante. Por tanto, aquí también es importante el tamaño de la “población de referencia” que, en este caso, se trata del volumen de datos con los que se va a comparar la muestra. A este respecto, las poblaciones de referencia son las actuales bases de datos disponibles sobre secuencias moleculares, estructuras secundarias y terciarias, homología total o parcial de genes y proteínas y un amplio etc.¹⁷.

La mínima información que ha de obtenerse de una proteína para poder predecir su función es un fragmento representativo de su secuencia aminoacídica. De esta forma, al menos, se podrá llevar a cabo un análisis a nivel de “secuencia”. Si además se dispone de información estructural, del conocimiento de su naturaleza iónica, de los efectos mutacionales sobre su función, de la localización de la proteína en la célula o en el organismo o de las interacciones con otras proteínas (es decir, de su “contexto”), podrán abordarse también otros aspectos analíticos que faciliten el objetivo de la predicción, que es la determinación precisa de su función¹⁸.

Proyección de la proteómica en la investigación biomédica

La perspectiva ofrecida por la proteómica ha sido utilizada en estudios de investigación de diversas áreas, incluida la biomedicina. Dichos estudios podrían clasificarse de distintas formas: en función del tipo de muestra empleada, de la patología o tipo de patologías que abordan, de la técnica o técnicas utilizadas, del uso o aplicación de las mismas, etc.

Este apartado se orientará en torno al eje de clasificación según el tipo de muestra empleado. En relación a ella, cabe destacar la investigación con líneas celulares, con tejidos sólidos y la proteómica de fluidos.

Las líneas celulares son variantes derivadas de células cancerosas o células normales inmortalizadas mediante la inhibición de los mecanismos celulares responsables de la interrupción del crecimiento. A diferencia de la mayoría de las células aisladas directamente de los organismos, estas células

son capaces de dividirse indefinidamente cuando se mantienen cultivadas en el laboratorio. En la investigación con líneas celulares, las técnicas proteómicas se han utilizado para caracterizar los perfiles de expresión proteica en diferentes tipos de dichas líneas, como base para futuros experimentos comparativos. Estos estudios han mostrado que el número de proteínas identificadas en cada proteoma varía de forma importante, lo cual probablemente sea el reflejo de la existencia de diferencias en el rango de expresión de las distintas proteínas en cada línea celular¹⁹.

Las líneas celulares tumorales humanas pueden constituir modelos válidos para el estudio del cáncer. De acuerdo con esto, los estudios que comparan los proteomas de diversas líneas tumorales humanas (o células obtenidas directamente de un tumor) con sus correspondientes líneas celulares normales (o tejido sano) comienzan a ser habituales para identificar marcadores de enfermedad o biomarcadores que permitan la detección precoz, la clasificación y la predicción del pronóstico de los tumores; así como para proponer nuevas dianas potenciales o dianas terapéuticas que mejoren su tratamiento. Por tanto, se pueden realizar estudios proteómicos dirigidos a evaluar el potencial maligno de un tumor (potencial metastático según exprese o no una proteína específica), la quimiosensibilidad o quimiorresistencia del mismo, etc.²⁰. El uso de la proteómica para el diseño, indicación y predicción de respuesta a un fármaco o fármacos sería también extrapolable a otras enfermedades; es lo que conocemos como farmacoproteómica^{21,22}.

De otro lado, las líneas celulares se han utilizado clásicamente para conocer los mecanismos adaptativos a distintos tipos de estrés. El desarrollo de la proteómica ha encontrado una clara aplicación en estos estudios, ya que dichas líneas celulares permiten la identificación de nuevas proteínas no relacionadas hasta el momento con el establecimiento de un fenotipo resistente a las condiciones que provocan el estrés celular²³.

Además de los estudios en líneas celulares humanas antes descritos, las técnicas proteómicas se han aplicado recientemente al análisis de tejidos sólidos y de fluidos para el estudio de situaciones fisiológicas (durante el desarrollo, en distintos estados metabólicos, frente a diversas condiciones ambientales) o patológicas (cáncer, autoinmunidad, infecciones, etc.). Estos estudios con tejidos y/o fluidos se han empleado con objetivos similares a los estudios con líneas celulares (identificación de biomarcadores, búsqueda de dianas terapéuticas, farmacoproteómica, etc.).

La utilización de tejidos sólidos en estudios de proteómica presenta, lógicamente, el inconveniente de la mayor dificultad de acceso a las muestras. No obstante, la información obtenida en éstos puede ser determinante y, a veces, no existe mejor alternativa a la utilización de muestras tisulares sólidas²⁴. Tal puede ser el caso del estudio de mutaciones selectivas que alte-

ren el proteoma de un tejido a nivel local, no siendo detectables en otros compartimentos del organismo.

Además, los estudios realizados con técnicas de proteómica que emplean muestras tisulares pueden completarse con la utilización de otros métodos, como, por ejemplo, el empleo de western blot para estudiar la presencia de autoanticuerpos en suero a partir del proteoma obtenido de células tumorales. La caracterización de un conjunto determinado de autoanticuerpos, característico de cada tumor, puede ser de gran valor ya que —al menos en teoría— podría ayudar al diagnóstico precoz en pacientes de riesgo^{25,26}.

En cuanto a la proteómica de fluidos, cabe reseñar que ha supuesto un hito considerable en el ámbito de la investigación clínica, por la mayor facilidad de obtención y procesamiento de las muestras. De entre ellas, cabe destacar el plasma y el suero, por su accesibilidad. La aplicación de técnicas proteómicas a estas muestras se ha utilizado para el estudio de enfermedades muy diversas (neoplásicas, reumáticas, endocrinológicas, toxicológicas, etc.)²⁷⁻³¹.

Otro ejemplo de proteómica de fluidos, aunque la muestra es de más difícil obtención, es el análisis del proteoma del líquido cefalorraquídeo. Éste ha sido empleado recientemente en el estudio de las bases etiopatogénicas y la identificación de biomarcadores de patologías neurológicas, como trastornos neuropsiquiátricos, tumores cerebrales y síndromes dolorosos lumbares^{32,33}.

Contexto y justificación del informe

La proteómica supone una aproximación metodológica a las biociencias que se perfila como una potente herramienta, tanto desde un punto de vista cualitativo como cuantitativo, para el estudio de aspectos fisiológicos y fisiopatológicos del ser humano. Esto, unido al continuo y progresivo avance biotecnológico, ha contribuido a la aparición de una ingente cantidad de literatura científica.

Parte de dicha literatura la componen artículos de investigación traslacional en que el desarrollo de algunas de estas técnicas se plantea como el eje principal del estudio. Desde hace varios años, ciertos artículos llegan incluso a plantear la utilización de técnicas proteómicas en el abordaje de algunas patologías^{34,35} y sugieren la posible presencia de dichas técnicas en laboratorios clínicos para un futuro^{36,37}. Esto, junto al desconocimiento del posible uso actual o a corto- medio plazo de las citadas técnicas en ámbitos asistenciales, ha suscitado el encargo del presente informe por el Ministerio

de Sanidad y Consumo a la Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía. En él se pretende explorar qué cantidad de investigación aplicada se está produciendo sobre proteómica, así como caracterizar dicha investigación en función de las técnicas proteómicas utilizadas, las patologías estudiadas y el tipo de uso que se propone. Asimismo, se pretende identificar a través de la consulta a personas expertas en este campo, si existen en la actualidad aplicaciones de la proteómica en la asistencia sanitaria e identificar posibles aplicaciones a corto o medio plazo.

Objetivos

- Identificar si actualmente existe alguna aplicación de la proteómica en el ámbito de la medicina asistencial; y de existir, enunciar el tipo de técnicas y la utilidad clínica de las mismas.
- Explorar posibles aplicaciones de técnicas proteómicas a la práctica clínica a corto-medio plazo y describirlas.

Estos objetivos generales se concretan en tres objetivos específicos:

- Describir las opiniones de personas expertas en proteómica sobre técnicas cuya aplicación clínica sea ya una realidad o pueda estar cercana en el tiempo.
- Identificar las publicaciones de investigación aplicada sobre técnicas proteómicas.
- Describir estas publicaciones según el tipo de prueba proteómica, la patología donde se aplica o propone su aplicación y el tipo de utilidad clínica.

Métodos

Se han utilizado dos tipos de métodos:

- Una consulta a expertos y personas clave en el ámbito de la proteómica, mediante encuesta. El objetivo de esta consulta era identificar los usos actuales y los posibles usos en un futuro próximo de las técnicas proteómicas en la práctica asistencial.
- Un estudio bibliométrico. Su finalidad ha sido explorar la evolución y contenidos de la investigación aplicada en proteómica. El concepto de investigación aplicada que se ha usado aquí es aquella que pueda traducirse a corto o medio plazo en aplicaciones a la práctica clínica

Encuesta a profesionales expertos en proteómica

Para identificar los usos actuales de la proteómica en el ámbito de la medicina asistencial, así como los posibles usos a corto o medio plazo, se realizó una consulta a expertos y personas clave mediante encuesta. Inicialmente, se localizaron 25 especialistas en la materia a nivel nacional, a través de la red que reúne a los profesionales dedicados a la proteómica (ProteoRed)³⁸ y de la Sociedad Española de Proteómica (SEProt)³⁹, fundada en Agosto de 2005. Estas personas procedían fundamentalmente de los ámbitos de la investigación y de la industria tecnológica.

A dichos expertos se les remitió por correo electrónico, después de contactar telefónicamente con ellos, un cuestionario estándar con preguntas cerradas y preguntas abiertas (anexo 1). Con objeto de lograr una buena tasa de respuesta, a los encuestados que no respondían se les insistió hasta tres veces.

El cuestionario constaba de seis apartados. Los dos primeros hacían referencia al uso actual de la proteómica en ámbitos sanitarios asistenciales (excluida la investigación). El tercero y el cuarto hacían alusión a las técnicas proteómicas de uso potencial en dichos ámbitos (introducción a corto o medio plazo). El quinto apartado era opcional y en él se detallaba la relación de personas que habían sido seleccionadas como expertos, preguntándoseles si creían procedente añadir alguna persona más en función de su

trayectoria y dedicación profesional. Con esta estrategia “en bola de nieve”, se ha pretendido maximizar la probabilidad de localizar a los profesionales más destacados en el ámbito de la proteómica en España. El sexto y último apartado era igualmente opcional y en él se podía expresar, en texto libre, algún aspecto o información adicional si así se estimaba oportuno.

Los resultados de la encuesta se presentan de forma descriptiva, con números absolutos y porcentajes.

Estudio bibliométrico sobre investigación aplicada en proteómica

Dado que la finalidad de este estudio era identificar investigaciones sobre técnicas proteómicas en una fase que pudiera estar cercana a la aplicación de las mismas en la práctica asistencial, la búsqueda bibliográfica se orientó a localizar revisiones de literatura y ensayos clínicos. Su objetivo era localizar aportaciones de las técnicas proteómicas en las áreas de apoyo al diagnóstico clínico de enfermedades, de susceptibilidad a enfermar, de pronóstico evolutivo y/o de farmacoproteómica.

Búsqueda en bases de datos referenciales

Se realizó una búsqueda informatizada, limitada al periodo comprendido entre los años 1995 y 2006. La fecha de inicio se determinó en función de que fue en 1995 cuando se introdujo el concepto de “proteoma”. La estrategia de búsqueda fue la siguiente:

- En la base de datos MEDLINE se utilizaron dos estrategias, que posteriormente se combinaron con el operador OR. La primera utilizó el término proteomics (MeSH mayor) sin calificadores y la segunda, el mismo término con el calificador *trends* (tendencias). Posteriormente, esta búsqueda se limitó a los artículos de revisión (PT REVIEW) que trataban la especie humana (TG HUMANS).
- En la misma base, con el término libre *proteomics*, limitando la búsqueda a los ensayos clínicos (PT CLINICAL TRIAL).
- En la base de datos EMBASE, utilizando el término libre *proteomics*, seleccionando los que trataban la especie humana (TG HUMANS).
- A partir de los artículos hallados en la búsqueda, se excluyeron aquellos donde había habido errores en la indización (no versaban sobre proteómica o no se referían a la especie humana).

Clasificación de los estudios

El análisis bibliométrico incluyó la extracción de información sobre las siguientes variables: año de publicación, técnicas de estudio del proteoma, tipo de uso o aplicación de las mismas (screening, diagnóstico o farmacoproteómica) y patología/s que abordaban. Cuando el artículo trataba sobre la técnica de espectrometría de masas, ésta se subclasificó según se tratara de alguna de las técnicas de MS más empleadas (MALDI y SELDI), de otra técnica de MS o sin concretar (es decir, tratara de MS genéricamente).

Podía resultar que un artículo se centrara en un único aspecto o bien que tratara sobre más de uno (más de una técnica y/o patología y/o tipo de uso). En este caso, el artículo se contabilizaba en cada una de las categorías correspondientes a los aspectos tratados.

Finalmente, se cotejó la información obtenida a partir de las personas clave con la resultante de la revisión de la literatura científica.

Resultados

Resultados de la encuesta a expertos

Tasa de respuesta y descripción del perfil de los expertos:

Se seleccionó inicialmente un grupo de 25 especialistas en el ámbito de la proteómica a los que se les remitió el cuestionario. A través de las encuestas, 6 de estas personas sugirieron a 16 especialistas más. De estos 16, se descartaron 3 por no ser hispanohablantes, y se contactó y envió el cuestionario a los 13 restantes.

Las 6 personas a instancias de las cuales se amplió la lista inicial sugirieron de 1 a 3 especialistas cada una, sin observarse solapamiento de respuesta entre ellas. Posteriormente, tras añadir a la lista inicial del cuestionario los expertos de nueva inclusión, los encuestados dejaron de remitir nombres de otras personas; y en dos casos afirmaron observar una lista muy completa, no detectando ninguna ausencia que destacar.

Del grupo inicial de 25, respondieron 17. Uno más contestó no disponer de conocimientos sólidos con que responder el cuestionario. De los 13 incluidos posteriormente, respondieron 6. En resumen, de 38 cuestionarios enviados, 23 especialistas los devolvieron contestados (60,5% de respuesta). La relación de estas personas se presenta en el anexo 2.

De los 23 participantes, 4 (17,4%) trabajaban en la industria tecnológica como responsables de producto. Los otros 19 (82,6%) trabajaban en ámbitos de investigación (institutos, universidades, hospitales universitarios, etc.); 5 de ellos pertenecían a entornos hospitalarios, de los que 4 desarrollaban labor asistencial.

Opiniones sobre el uso actual y potencial de las técnicas proteómicas

De las 23 personas que contestaron la encuesta, 20 (87%) afirmaron no conocer técnicas proteómicas de uso actual en el manejo asistencial de ninguna enfermedad. De los 3 que contestaron afirmativamente a esta pregunta (13%), 2 eran responsables de producto en la industria relacionada y 1 investigador. Estas 3 personas especificaron la siguiente información:

- Una de las personas de la industria se refirió a pruebas de química básica de proteínas (como el ELISA), que realmente no pueden considerarse como técnicas proteómicas.

- La otra persona de la industria indicó dos técnicas denominadas “Bioplex (tecnología Luminex)”. Una de ellas se aplicaría para conocer el pronóstico de la malaria y otra para conocer el pronóstico y predecir el riesgo de bronquiolitis por Virus Respiratorio Sincitial en niños menores de 2 años.
- La persona dedicada a la investigación mencionó la espectrometría de masas en metabolopatías. Sin embargo, no conocía centros españoles ni extranjeros donde se empleara ni respondió acerca del tipo de utilidad clínica de la prueba.

En cuanto a las técnicas de uso potencial a corto o medio plazo, 10 expertos (43,5%) declararon no conocer ninguna técnica de estudio del proteoma de próxima introducción en ámbitos clínicos asistenciales. Uno de ellos añadió la siguiente opinión: “sería ahora mismo puramente especulativo decir si funcionarían en 3, 5 ó 7 años”.

Los 13 expertos restantes (56,5%) mencionaron alguna técnica de uso posible —a su juicio— en un corto o medio plazo, concretando además de qué técnicas se trataba, junto con otros aspectos que se resumen en la tabla 1. Cabe subrayar que las técnicas más citadas fueron las de espectrometría de masas, destacando el SELDI sobre el MALDI. Las seguían la tecnología de *arrays* de proteínas y la electroforesis bidimensional.

En cuanto a las enfermedades en las que se aplicarían estas pruebas, las respuestas no citaban entidades concretas, sino que se hacía alusión a amplios grupos de patologías (como las neoplásicas), a especialidades médicas (como la anatomía patológica) o se citaba como “cualquier enfermedad” o “perfil proteico de diversas enfermedades”. Las respuestas relativas al tipo de uso fueron igualmente poco específicas y hubo una gran variabilidad entre ellas. La única aplicación que puede destacarse por ser mencionada por un cierto número de expertos (7 personas) fue el uso del SELDI-TOF para *screening*, diagnóstico y pronóstico; sin embargo, no se concretó cuál de estos usos y en qué enfermedad. También se señalaron el uso para diagnóstico y pronóstico de la tecnología de *arrays* de proteínas y el MALDI-Imaging para diagnóstico de certeza (aunque igualmente tampoco se especificó en el abordaje de qué entidad nosológica).

De los centros españoles implicados en el desarrollo de estas técnicas, el más citado fue el Centro Nacional de Biotecnología, ubicado en Madrid, concretamente en la técnica de SELDI-TOF. De los centros extranjeros más importantes en la investigación con estas técnicas, el más nombrado fue el de la Food and Drug Administration y National Cancer Institute (National Institutes of Health), en Bethesda (Maryland, EEUU), también en la técnica de SELDI-TOF.

En cuanto al plazo en que opinaban que podrían introducirse en medios clínicos asistenciales dichas técnicas, de las opciones dadas en el cuestionario, ningún experto contestó en ninguna técnica que ésta podría aplicarse en menos de 1 año. Los plazos sugeridos en las respuestas eran de entre 3-5 años, y de más de 5 años. En este último apartado de la encuesta, se registró el mayor índice de no respuesta; y, generalmente, las contestaciones sobre plazos se refirieron a la espectrometría de masas, especialmente en el SELDI.

En el último apartado del cuestionario, donde se invitaba a expresar libremente algún aspecto o información adicional si se creía conveniente, 14 expertos (60,9%) aportaron algún dato u opinión. De éstos, 4 (17,4%) adjuntaron algún documento que creían de especial interés y 10 (43,5%) hicieron aportaciones en forma de texto libre.

Los documentos adjuntados eran literatura sobre alguna técnica de uso en proteómica, grupos de investigación que la tenían implementada, biomarcadores y patologías relacionadas y, en definitiva, información que vendría a redundar o a matizar aspectos tratados en la encuesta.

De los 10 expertos que añadieron algún comentario en texto libre, cabe destacar una opinión expresada por 7 de ellos (30,4%). Coincidían en que si bien la proteómica es útil para la investigación y descubrimiento de proteínas de interés, como marcadores de enfermedad, dianas terapéuticas, etc., lo que probablemente se utilizará en la práctica habitual (una vez demostrada la validez analítica y clínica de estas proteínas) será la determinación analítica de forma clásica, por ejemplo, mediante enzimoimmunoanálisis.

Los otros 3 expertos que hacían algún tipo de comentario en la parte abierta del cuestionario aportaban opiniones sobre temas diversos. Uno aludía a la gran cantidad de tiempo que precisa el análisis de datos obtenidos en estudios proteómicos para la identificación de alguna proteína o péptido concreto que se presume de cierto valor clínico. Otro comentaba que “la búsqueda de marcadores por técnicas proteómicas (por ejemplo, en cáncer) está despegando a gran velocidad”, mencionando la gran iniciativa financiada por los institutos nacionales de salud y su posible traslado a la clínica en no demasiado tiempo. Finalmente, el tercero afirmaba textualmente que “todo lo que se está haciendo en proteómica clínica está en fase muy experimental”.

Resultados del estudio bibliométrico

Como resultado de la búsqueda en las bases de datos referenciales, se recuperaron 259 referencias bibliográficas. Tras observar que no había duplicados y valorar a texto completo los artículos donde había alguna duda, se excluyeron 6 documentos donde había habido errores de indización (3 no eran de proteómica y 3 no se referían a humanos). De los 253 artículos incluidos, 240 eran revisiones no sistemáticas (editoriales, tutoriales y revisiones narrativas) y 13 estaban indizados como ensayos clínicos, si bien se trataba de estudios originales con otros diseños.

El análisis según año de publicación mostró un crecimiento exponencial, como se muestra en la Figura 1, en la cual se excluye el año en curso por no haber concluido y, por tanto, no ser valorable. Aunque el concepto de proteoma se introdujo en 1995, no aparecieron artículos de revisión publicados hasta 2002. Los primeros estudios indizados como ensayos clínicos se publicaron en 2004. La suma de ambos tipos de artículos mostró anualmente un valor creciente: de 21 en 2002 a 85 en 2005.

Las características de los artículos recuperados se resumen esquemáticamente en la tabla 2. El hecho de que un mismo artículo pudiera incluirse en más de una categoría hace que la suma de los valores de la última columna para cada característica estudiada no sea igual a 253.

De los tres tipos de características estudiadas, la que aparece en mayor número de artículos es la técnica de análisis del proteoma, seguida del tipo de patología. La forma de uso es el tema menos tratado.

La técnica más veces citada es la MS, destacando el SELDI por la cantidad de artículos y el nivel de crecimiento de éstos entre 2002 y 2005. La siguen las técnicas bioinformáticas, la electroforesis bidimensional y los *arrays*.

La aplicación clínica más veces tratada en los artículos es la farmacoproteómica, seguida del diagnóstico. Sin embargo, de 2004 a 2005 se observa un descenso en el número de documentos que tratan sobre estas dos utilidades de ambas técnicas. Las enfermedades más veces abordadas son las oncológicas. La siguen con frecuencias similares las patologías endocrinológicas y las neurológicas; y con menor frecuencia las cardiovasculares, infecciosas y reumáticas. En el apartado "Otras patologías", se agruparon el resto de disciplinas biomédicas:

- En el año 2003: 2 artículos de dermatología, 1 de patología digestiva, 1 de inmunología y 1 de oftalmología (total: 5).
- En el año 2004: 6 artículos de inmunología, 4 de patología digestiva, 3 de nefrología, 2 de neumología, 2 de toxicología, 1 de otorrinolaringología, 1 de ginecología, 1 de pediatría, 1 de fisiología, 1 de filogenia y 1 de bioética (total: 23).

- En el año 2005: 4 artículos de inmunología, 2 de patología digestiva, 2 de neumología, 2 de fisiología, 1 de ginecología, 1 de pediatría, 1 de toxicología, 1 de geriatría y 1 de dermatología (total: 16).
- En el año 2006: 1 artículo de nefrología y 1 de odontología (total: 2).

Figura 1: Número de artículos por año de publicación.

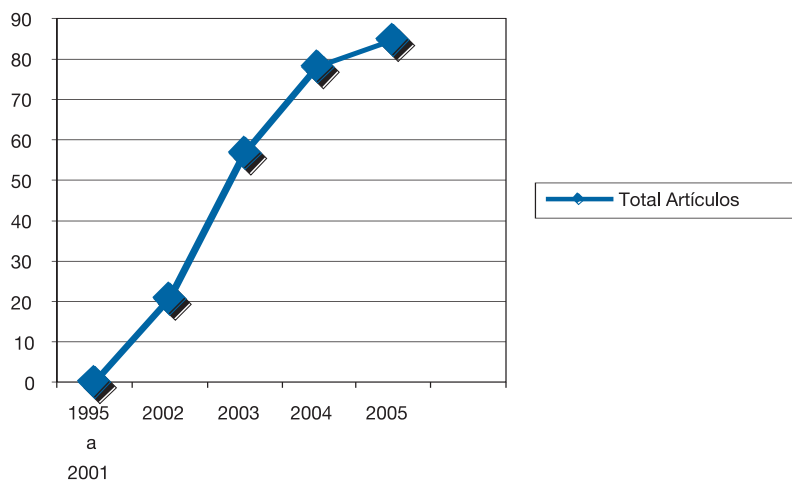


Tabla 1: Técnicas proteómicas de previsible introducción en medicina clínica asistencial. Opiniones de los expertos.						
Técnicas	Prueba y Enfermedad/es relacionada/s	Tipo de uso	Centros españoles implicados	Centros más importantes del extranjero implicados	Plazo en que podría implantarse	
SELDI-TOF (12)	-Perfil proteico de diversas enfermedades (5) -Tumores de ovario y otras neoplasias (2) -Estudio del metabóloma (2)	-Seguimiento de biomarcadores (2) -Screening, diagnóstico y pronóstico (7)	FJD (1), CNB (5), CNIO (1), CIC-bioGUNE (1), CIC (2), Oryzon Genomics (1)	MD Anderson (Houston, TX) (1), FDA-NCI (NIH) (Bethesda, MD) (4), CNRS (Paris, Francia) (1), Ludwig Institute for Cancer Research (Londres, GB) (1), Ovachek (1), The Netherlands Cancer Institute (Amsterdam, Holanda) (1)	3-5 años (5) >5 años (3)	
MALDI-Imaging (6)	-Perfil proteico de diversas enfermedades (5) -Anatomía Patológica (2)	-Screening (2) -Diagnóstico de certeza (3) -Seguimiento (1) -Pronóstico (1)	FJD (1), CNIC (1), CIC-bioGUNE (1), Universidad de Murcia (1), Parc Científico de Barcelona (1)	-Memorial Sloan-Kettering Cancer Center (Nueva York) (1) -Universidades de Vanderbilt (Tennessee, EEUU) (1), Magdeburgo (1), Lille (1), Dijon (1) y Groningen (Holanda) (1)	3-5 años (3) >5 años (3)	
Arrays de proteínas (6)	-Perfil proteico de diversas enfermedades (3) -Diversas neoplasias (1) -Enf. Inflamatorias (1)	-Seguimiento (1) -Diagnóstico (5) -Pronóstico (3)	FJD (1), Progenika (Bilbao) (2), CNIC (1)	FDA-NCI (NIH) (Bethesda, MD) (1) -Universidades de Groningen (Holanda) (1), Oslo (Noruega) (1), Basilea (Suiza) (1) y Lund (Suecia) (1)	3-5 años (2)	
SDS-PAGE-2D (1)	-Perfil proteico de diversas enfermedades (1)	-Screening, diagnóstico de certeza, diagnóstico (1)	CIC-bioGUNE (1), Parc Científico de Barcelona (1), CIC (1)			
Proteom (1) (tecnología SPR)	-Diversos (1)	-Pronóstico evolutivo y farmacoproteómica (1)	-Unidad de Investigación Hospital de Puerto Real (Cádiz) (1)			

Tabla 2: Resultados del estudio bibliométrico.

		1995 a 2001	2002	2003	2004	2005	2006	TOTAL
TÉCNICA	Arrays de proteínas	0	8	9	14	13	0	44
	Electroforesis-2D (SDD+PAGE)	0	6	18	19	4	1	48
	MALDI	0	0	0	13	8	0	21
	SELDI	0	6	12	17	24	3	62
	Otra o no concreta	0	4	9	3	13	0	29
	Total MS	0	10	21	33	45	3	112
USO	Bioinformática	0	7	21	23	18	3	72
	Screening	0	2	2	3	3	1	11
	Diagnóstico	0	7	10	19	4	2	42
	Farmacoproteómica	0	8	20	33	14	3	78
PATOLOGÍA	Cáncer	0	2	14	28	20	1	65
	Patología Cardiovascular	0	1	4	3	4	1	13
	Endocrinología & Metabolismo	0	1	4	4	11	2	22
	Neurología	0	1	5	5	9	0	20
	Enfermedades infecciosas	0	0	1	3	3	0	7
	Reumatología	0	1	0	2	3	0	6
	Otras patologías	0	0	5	23	16	2	46
	TOTAL ARTÍCULOS	0	21	57	78	85	12	

Discusión

En este estudio se pone de manifiesto, en primer lugar, que actualmente no parece existir una utilización de las técnicas proteómicas en la práctica clínica para el manejo de ninguna enfermedad. Por otra parte, las opiniones de los 23 expertos en proteómica que se han consultado no fueron coincidentes cuando se trataba de la posible aplicación a corto o medio plazo de estas técnicas. De hecho, algo más de la mitad de ellos identificaron alguna técnica concreta de estudio del proteoma que —a su juicio— estaría en una fase de investigación aplicada suficientemente avanzada como para prever su uso en la práctica clínica en un período de 1 a 5 años; mientras que el resto de expertos no conocía ninguna técnica que estuviera tan cerca de su aplicación en el manejo clínico de ninguna enfermedad. Algunos aspectos adicionales aportados por las respuestas de los expertos y por el estudio bibliométrico, que se comentarán más en detalle a continuación, hacen suponer que la proteómica tiene utilidad actualmente en la investigación y descubrimiento de proteínas de interés clínico, pero que el uso de estas técnicas en la práctica clínica habitual parece poco viable a corto plazo.

Discusión de las limitaciones y aspectos metodológicos

Antes de entrar a una discusión más detallada de los resultados del estudio, es necesario comentar algunas posibles limitaciones. El método principal utilizado ha sido la consulta a expertos, que puede presentar algunas limitaciones para identificar el uso actual de las técnicas proteómicas. Para ello, un método más exhaustivo hubiera sido una encuesta de utilización a todos los hospitales del Sistema Nacional de Salud. Sin embargo, teniendo en cuenta que se trata de personas que conocen el tema en profundidad y observando la homogeneidad de sus respuestas en la pregunta sobre uso actual, parece claro que —de haber algún tipo de utilización en la práctica clínica de alguna técnica proteómica— sería casi anecdótica.

La opinión de expertos es un método bastante aceptado en los estudios de prospectiva (en este caso, la indagación sobre la posible aplicación de las técnicas proteómicas en la práctica clínica a corto o medio plazo), siempre que la selección de los mismos sea adecuada. Para asegurar este

punto, se ha utilizado una estrategia “en bola de nieve” para localizar a los expertos y se ha llegado hasta la saturación de la lista de personas clave. Por otra parte, se obtuvo una tasa de respuesta del 60,5%, que puede considerarse aceptable para una encuesta administrada por correo electrónico. Por otra parte, cabe destacar que las técnicas proteómicas de posible uso futuro identificadas por algunos expertos coinciden con los temas de investigación más frecuentemente observados en el estudio bibliométrico.

En cuanto a la estrategia de búsqueda en bases de datos referenciales, ésta se planteó con la intención de recuperar los conocimientos más asentados. De tal forma, se circunscribió sobre todo a los artículos de revisión, deduciendo que, en el caso de existir algún test proteómico de uso actual o inminente en el abordaje de alguna enfermedad (diagnóstico, tratamiento, etc.), sería localizable en dichos artículos. Sin embargo, con esta estrategia se han descartado la mayor parte de los artículos originales en el ámbito de la proteómica; por lo que es posible que no se haya localizado toda la investigación aplicada relevante para el manejo de enfermedades concretas a medio plazo.

Discusión de los resultados

No se han podido comparar los resultados con los de otros estudios, al no haber encontrado en la literatura ningún trabajo basado en la consulta a expertos sobre los usos actuales y futuros de la proteómica.

Con respecto al uso actual de la proteómica, hubo bastante uniformidad en las respuestas, ya que un 87% de los expertos dijo no conocer técnicas proteómicas que se utilizaran en ámbitos clínicos asistenciales. Sin embargo, en cuanto a las técnicas proteómicas de potencial uso en la práctica clínica, hubo división de pareceres. De un lado, un 44% del total de encuestados opinó que no se introducirían técnicas proteómicas a corto o medio plazo. De otro, estaría la opinión del 56% restante, que cree que es factible la próxima instauración de pruebas proteómicas en ámbitos de asistencia sanitaria. No obstante, hay algunos aspectos importantes para matizar las respuestas de estos expertos.

En primer lugar, ninguno de ellos nombró una patología concreta en la que se intuyera que fuera a aplicarse alguna de las técnicas, sino que hicieron alusión a grupos de enfermedades o áreas genéricas de la medicina (como “cualquier enfermedad”, “perfil proteico de diversas enfermedades”, etc.). La falta de concreción en una enfermedad y/o aplicación al sugerir las técnicas de uso potencial podría apuntar hacia una falta de consolidación

del conocimiento científico que sustentaría dicho uso. Además, ninguno de los expertos opinó que alguna técnica pudiera introducirse en el menor plazo sugerido (es decir, menos de un año).

Hubo, no obstante, cierta homogeneidad en las respuestas del 56% de expertos que opinaban que había técnicas posiblemente utilizables a corto o medio plazo en la práctica clínica, al señalar las pruebas concretas a las que se referían. Así, se destacó la espectrometría de masas (sobre todo, SELDI), lo que además coincidió con la información aportada por el estudio bibliométrico. Las características inherentes de estas técnicas (sensibilidad, rapidez, posibilidad de información estructural, etc.) las harían más propicias que otras para su uso clínico. Por otra parte, esta preponderancia del SELDI, que se utiliza en proteómica de fluidos, puede obedecer a la facilidad de obtención de las muestras que analiza.

Uno de los resultados más destacable de la consulta a expertos es que, en el espacio abierto al final del cuestionario (para opinar en texto libre sobre algún aspecto adicional que consideraran de interés), casi un tercio de los encuestados convergían en una misma idea: el papel de la proteómica en medicina se sitúa en la fase de descubrimiento (“fase discovery”) de proteínas de interés (como biomarcadores, dianas terapéuticas, etc.). Una vez identificadas dichas proteínas, el análisis clínico para su determinación se realizaría de forma convencional. En otras palabras, la proteómica se vislumbraría como una potente herramienta para la investigación, pero de muy difícil introducción en ámbitos clínicos asistenciales.

Con toda esta información, parece evidente que no hay un consenso entre los expertos consultados acerca de las posibilidades de uso de las técnicas proteómicas en el futuro próximo. Desde hace años, vienen publicándose numerosos artículos que sugieren la próxima introducción de estas técnicas en el diagnóstico de ciertas enfermedades, sobre todo las oncológicas y neurológicas^{27,28,31-35,40,41}. El propio estudio bibliométrico reveló que la proteómica es una disciplina que ha despertado un gran interés, lo que se manifiesta en el crecimiento exponencial de los artículos encontrados en los últimos años. Sin embargo, a fecha de hoy, los laboratorios clínicos no recurren a dichas técnicas para la determinación de biomarcadores.

Es destacable que al categorizar los artículos según el tipo de uso o aplicación de técnicas proteómicas, el más iterativo fue el de la farmacoproteómica. Quizá la identificación y validación de dianas terapéuticas y la búsqueda de tratamientos específicos para las correspondientes patologías sean el objetivo final de numerosas investigaciones. El sufragio de muchas de éstas por parte de la industria farmacéutica y, en definitiva, el interés económico que puede suscitar esta parcela de la investigación farmacológica son factores que hay que considerar como posibles promotores de producción científica y utilización en la práctica.

Implicaciones del estudio para la Evaluación de Tecnologías Sanitarias

Según la tendencia observada en el estudio bibliométrico, es previsible que el interés por la proteómica en biomedicina continúe en un futuro y siga siendo objeto de numerosos trabajos de investigación. El conocimiento aportado por dicha investigación puede llevar a la identificación de nuevas moléculas de naturaleza aminoproteica de interés clínico⁴². La validación y estudio de la utilidad de dichas moléculas como herramientas para el uso asistencial⁴³ puede generar una futura demanda de actividad en el ámbito de la Evaluación de Tecnologías Sanitarias. Dada la divergencia de opiniones entre los expertos consultados en este estudio, es difícil prever las características de esta demanda. Podría estar relacionada con la efectividad y coste-efectividad del uso de técnicas proteómicas o bien de técnicas convencionales para la determinación de proteínas (como el enzimoanálisis o la cromatografía líquida), todo ello en indicaciones concretas como el diagnóstico, la predicción del pronóstico o las indicaciones de fármacos⁴⁴.

Conclusiones

1. No se han identificado usos estandarizados de técnicas proteómicas en la práctica clínica actual para el manejo de ninguna enfermedad.
2. No hay consenso entre los expertos sobre las posibles aplicaciones de la proteómica en la práctica clínica a corto o medio plazo. Las opiniones están divididas en un 44% que opina que esto es poco probable o especulativo y un 56% que piensa que habrá alguna aplicación. En este último caso, no se han concretado usos y enfermedades concretas.
3. De haber algún tipo de utilización clínica de la proteómica en el futuro próximo, la técnica de más probable aplicación —tanto según los expertos como el estudio bibliométrico— es la espectrometría de masas, especialmente el SELDI-TOF; y los ámbitos de aplicación más probables, la oncología y la farmacoproteómica.

Referencias

1. Yan JX, Tonella L, Sanchez JC, Wilkins MR, Packer NH, Gooley AA, et al. The Dictyostelium discoideum proteome--the SWISS-2DPAGE database of the multicellular aggregate (slug). *Electrophoresis*. 1997;18:491-7.
2. Wasinger VC, Cordwell SJ, Cerpa-Poljak A, Yan JX, Gooley AA, Wilkins MR, et al. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: Mycoplasma genitalium. *Electrophoresis*. 1995;16:1090-4.
3. Kahn P. From genome to proteome: looking at a cell's proteins. *Science*. 1995;270:369-70.
4. Nielsen J, Oliver S. The next wave in metabolome analysis. *Trends biotechnol*. 2005;23:544-6.
5. Khandurina J, Guttman A. Microchip-based high-throughput screening analysis of combinatorial libraries. *Curr Opin Chem Biol*. 2002;6:359-66.
6. Templin MF, Stoll D, Schwenk JM, Potz O, Kramer S, Joos TO. Protein microarrays: promising tools for proteomic research. *Proteomics*. 2003;3:2155-66.
7. MacBeath G. Protein microarrays and proteomics. *Nature Genet*. 2002;32:526-32.
8. López M, Mallorquín P, Vega M. Aplicaciones de los microarrays y biochips en salud humana [Internet]. Madrid: Fundación Española para el Desarrollo de la Investigación en Genómica y Proteómica/Fundación General de la Universidad Autónoma de Madrid, 2006 [consulta el 26/05/2006]. pp 24-37. URL: http://www.madrimasd.org/biotecnologia/Seleccion/Downloads_GetFile.aspx?id=5000
9. McDonald WH, Yates JR. Shotgun proteomics and biomarker discovery. *Dis Markers*. 2002;18:99-105.
10. Klose J, Kobalz U. Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis*. 1995;16:1034-59.
11. Gorg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*. 2004;4:3665-85.
12. Fuchs D, Winkelmann I, Johnson IT, Mariman E, Wenzel U, Daniel H. Proteomics in nutrition research: principles, technologies and applications. *Br J Nutr*. 2005;94:302-14.

13. Aebersold A, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature*. 2003;422:198-207.
14. Issaq HJ, Conrads TP, Prieto DA, Tirumalai R, Veenstra TD. SELDI-TOF MS for diagnostic proteomics. *Anal Chem*. 2003;75:148-55.
15. Chaurand P, Sanders ME, Jensen RA, Caprioli RM. Proteomics in diagnostic pathology: profiling and imaging proteins directly in tissue sections. *Am J Pathol*. 2004;165:1057-68.
16. Fiehn O, Weckwerth W. Deciphering metabolic networks. *Eur J Biochem*. 2003;270:579-88.
17. Lilien RH, Farid H, Donald BR. Probabilistic disease classification of expression-dependent proteomic data from mass spectrometry of human serum. *J Comput Biol*. 2003;10:925-1046.
18. Droit A, Poirier GG, Hunter JM. Experimental and bioinformatic approaches for interrogating protein-protein interactions to determine protein function. *J Mol Endocrinol*. 2005;34:263-80.
19. Moore GE, Minowada J. Historical progress and the future of human cell culture research. *Hum Cell*. 1992;5:313-33.
20. Le Naour F. Contribution of proteomics to tumor immunology. *Proteomics*. 2001;1:1295-302.
21. Lage H. Proteomics in cancer cell research: an analysis of therapy resistance. *Pathol Res Pract*. 2004;200:105-17.
22. Jain KK. Role of pharmacoproteomics in the development of personalized medicine. *Pharmacogenomics*. 2004;5:331-6.
23. Yan Y, Weaver VM, Blair IA. Analysis of protein expression during oxidative stress in breast epithelial cells using a stable isotope labeled proteome internal standard. *J Proteome Res*. 2005;4:2007-14.
24. Bhattacharya SH, Gal AA, Murray KK. Laser capture microdissection MALDI for direct analysis of archival tissue. *J Proteome Res*. 2003;2:95-8.
25. Caldwell RL, Caprioli RM. Tissue profiling by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*. 2005;4:394-401.
26. Reyzer ML, Caprioli RM. MALDI mass spectrometry for direct tissue analysis: a new tool for biomarker discovery. *J Proteome Res*. 2005;4:1138-42.
27. 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;359:572-7.
28. Liotta LA, Petricoin EF. Serum peptidome for cancer detection: spinning biologic trash into diagnostic gold. *J Clin Invest*. 2006;116:26-30

29. Tampoia M, Brescia V, Fontana A, Maggiolini P, Zucano A, Pansini N. Proteomic: new advances in the diagnosis of rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta*. 2005;357:219-25.
30. Clynen E, De Loof A, Schoofs L. The use of peptidomics in endocrine research. *Gen Comp Endocrinol*. 2003;132:1-9.
31. Petricoin EF, Rajapaske V, Herman EH, Arekani AM, Ross S, Johann D, et al. Toxicoproteomics: serum proteomic pattern diagnostics for early detection of drug induced cardiac toxicities and cardioprotection. *Toxicol Pathol*. 2004;32(Suppl. 1):122-30.
32. Zheng PP, Luider TM, Pieters R, Avezaat CJ, van den Bent MJ, Sillevius Smitt PA, et al. Identification of tumor-related proteins by proteomic analysis of cerebrospinal fluid from patients with primary brain tumors. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62:855-62.
33. Romeo MJ, Espina V, Lowenthal M, Espina B H, Petricoin EF, Liotta LA. CSF proteome: a protein repository for potential biomarker identification. *Expert Rev Proteomics*. 2005;2:57-70.
34. Diamandis EP. Proteomic patterns in biological fluids: do they represent the future of cancer diagnostics?. *Clin Chem*. 2003;49:1272-8.
35. Zapico Muniz E, Mora Bruges J, Blanco Vaca F. Diagnóstico precoz del cancer mediante análisis proteómicos del suero: ¿ficción o realidad?. *Med Clin (Barc)*. 2005;124:181-5.
36. Master SR. Diagnostic proteomics: back to basics?. *Clin Chem*. 2005;51:1333-4.
37. Righetti PG, Castagna A, Antonucci F, Piubelli C, Cecconi D, Campostrini N, et al. Proteome analysis in the clinical chemistry laboratory: myth or reality?. *Clin Chim Acta*. 2005;357:123-39.
38. Instituto nacional de proteómica (ProteoRed). [consulta el 03/04/2006]. URL: <http://www.proteored.org/Default.asp>.
39. Sociedad Española de Proteómica (SEProt). [consulta el 03/04/2006]. URL: <http://www.cbm.uam.es/seprot/index.htm>.
40. Wulfkuhle JD, Sgroi DC, Krutzsch H, McLean K, McGarvey K, Knowlton M, et al. Proteomics of human breast ductal carcinoma in situ. *Cancer Res*. 2002;62:6740-9.
41. Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Uo T, Ho JT, McBee JK, et al. Proteomic analysis in the neurosciences. *Mol Cell Proteomics*. 2002;1:553-60.
42. Dhingra V, Gupta M, Andacht T, Fu ZF. New frontiers in proteomics research: a perspective. *Int J Pharm*. 2005;299:1-18.
43. Lindsay MA. Target discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:831-8.

44. Posadas EM, Simpkins F, Liotta LA, MacDonald C, Kohn EC. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer: realistic hope?. *Ann Oncol.* 2005;16:16-22.

Anexos

Anexo 1: cuestionario remitido a los especialistas

La Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía agradece de antemano tu colaboración en este informe. Te presentamos el siguiente cuestionario. Consta de cuatro preguntas (y dos más opcionales). Las dos primeras hacen alusión al USO ACTUAL de la proteómica en ámbitos sanitarios asistenciales (excluida la investigación). La tercera y cuarta preguntas hacen referencia a las técnicas proteómicas de USO POTENCIAL en dichos ámbitos (introducción a corto-medio plazo).

1º) ¿Conoces alguna/s técnica/s de estudio del proteoma que ACTUALMENTE se utilicen en el manejo asistencial de alguna enfermedad?

Entendiendo por manejo asistencial el uso en la práctica clínica, fuera del contexto de proyectos de investigación. Quedarían excluidos también los usos en investigación aplicada.

Dentro del manejo asistencial, atenderíamos a las técnicas útiles para: cribado de enfermedades (diagnóstico precoz), diagnóstico de certeza, predicción de riesgo (susceptibilidad), pronóstico y farmacoproteómica.

Contestar sólo SÍ o NO: ____

2º) En caso de haber respondido SÍ a la pregunta anterior, especificar:

Técnica/s	Prueba y Enfermedad/es relacionadas	Tipo de uso (2)	Centros españoles donde se usa	Destacar el centro o centros más importantes del extranjero donde se usa

(2) Decir si se trata de uso para screening de enfermedad (diagnóstico precoz), diagnóstico de certeza de la misma, predicción de riesgo de padecerla (susceptibilidad a enfermar), pronóstico evolutivo y/o farmacoproteómica.

3º) ¿Conoces alguna/s técnica/s de estudio del proteoma que actualmente aún no se utilice/n en el manejo asistencial pero que esté/n en UNA FASE DE INVESTIGACIÓN APLICADA SUFICIENTEMENTE AVANZADA COMO PARA PREVER QUE SE UTILIZARÁN EN EL MANEJO ASISTENCIAL EN UN CORTO PLAZO DE TIEMPO (1-5 años)?

Contestar sólo SÍ o NO: ____

4º) En caso de haber respondido SÍ a la pregunta anterior, especificar:

Técnica/s	Prueba y Enfermedad/es relacionadas	Tipo de uso (2)	Especificar si hay algún centro español implicado en la investigación	Destacar el centro o centros más importantes del extranjero implicados en la investigación	Plazo aproximado en que estimas que pueda implantarse (3)

2) Decir si se trata de uso para screening de enfermedad (diagnóstico precoz), diagnóstico de certeza de la misma, predicción de riesgo de padecerla (susceptibilidad a enfermar), pronóstico evolutivo y/o farmacoproteómica.

(3) Elegir entre: menos de 1 año, de 1 a 2,9 años, entre 3 y 5 años.

LAS PREGUNTAS 5 Y 6 SON OPCIONALES:

5º) Las personas a las que inicialmente hemos enviado este cuestionario son las siguientes: (se incluía aquí el listado de expertos seleccionados).

¿Qué personas que no estén en esta lista consideras que sería importante que contestaran este cuestionario? Te agradeceremos que nos aportes sus nombres y forma de contacto (sea teléfono o e-mail).

6º) En caso de no incluir dentro de las cinco preguntas anteriores algún aspecto o información adicional que crees pueda resultar de interés, por favor, exprésalo en este espacio:

GRACIAS UNA VEZ MÁS POR TU COLABORACIÓN

Anexo 2: relación de especialistas que respondieron la encuesta

NOMBRE	CENTRO DE TRABAJO
Joaquín Abián Moñux	Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona
Juan Pablo Albar Ramírez	Centro Nacional de Biotecnología (CNB), Madrid
José Antonio Bárcena Ruiz	Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Córdoba
Francisco Blanco Vaca	Departamento Bioquímica Hospital. Sant Pau, Barcelona
Bernabé Bodas	Thermo Electron Corporation®
Xosé Bustelo	Centro de Investigación del Cáncer (CIC), Salamanca
Juan José Calvete Chornet	Instituto de Biomedicina de Valencia
Elías Campo Guerri	Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Clinic i Provincial, Barcelona
Francesc Canals Surís	Institut Recerca de Hospital Vall Hebrón, Barcelona
Ignacio Casal Alvarez	Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid
Fernando J Corrales Izquierdo	Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Pamplona
Anabel Marina Ramírez	Centro de Biología Molecular (CBM) Severo Ochoa, Madrid
Antonio Martínez Ruiz	Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC), Madrid
Francesc Márquez	Bruker® Biosciences Española
Isidro Masana	Agilent Technologies®
José María Mato de la Paz	CIC bioGUNE, Bilbao
Samuel Ogueta Villarreal	Servicio Central de Apoyo a la Investigación (SCAI), Universidad de Córdoba
Enrique Orozco García	Laboratorios Bio-Rad®
Francisco X. Real Arribas	Institut Municipal D'Investigació Medica (IMIM), Barcelona
Jean-Charles Sánchez	Hôpital Cantonal Universitaire, Ginebra, Suiza
Manuel Sánchez del Pino	Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia
Jesús Vázquez Cobos	Centro de Biología Molecular (CBM) Severo Ochoa, Madrid
Fernando Vivanco Martínez	Fundación Jiménez Díaz (FJD), Madrid

Clinical Applications of Proteomic Techniques

Table of contents

51	Introduction
59	Aims
61	Methods
65	Results
71	Discussion
75	Conclusions

Introduction

Proteomics can be defined as a series of methods and techniques conceived to study the entire protein complement in a given cell or tissue under certain conditions, which is referred to by the term proteome¹.

Proteins operate within another, far broader and more complex biochemical network, namely cell metabolism. The general study of metabolic networks is beginning to be known as metabolomics. Genome, proteome and metabolome form an intricate entity whose study marks an unprecedented qualitative leap in biomedical sciences. The combination of proteomics with genetics, biochemistry and/or biophysics has led to the discovery of numerous proteins and to unravelling their functions².

While an organism's genome is constant in the entirety of its cells – except for mosaics and selective mutations – the proteome is conceptually far more dynamic and variable. Its dynamism is not only apparent in various systems, tissues and even cells but also in the proteome itself, when subject to varying internal and/or external conditions. All this means that there is a huge array of proteomes and sub-proteomes in any given organism, along with a wide range of possible interactions among the proteins that make them up. This, together with the absence of methodology for protein amplification suggests that, unlike the genome, complete analysis of proteomes is a mammoth task^{3,4}.

Such a complex picture poses major challenges for proteomic studies. In order to meet those challenges, protein analysis techniques are constantly being reviewed and improved, as explained in the following section.

Proteome analysis techniques

The various approaches adopted in proteomic studies essentially involve four sets of techniques. The first comprises those which do not entail protein separation, such as protein arrays or microarrays. The second group includes techniques which do involve protein separation, such as 2D electrophoresis and liquid chromatography (LC) and the third set covers individual analysis techniques for separate proteins, such as mass spectrometry (MS). The fourth group refers to techniques for processing and interpreting the data compiled using any of the above.

Proteins arrays

Protein arrays or biochips enable proteins to be detected, characterised and quantified as well as allowing the functional qualities of proteins and their interactions - both between proteins themselves as well as their interactions with DNA molecules or lipids - to be studied. Good examples are antibody arrays which enable the expression of a significant number of proteins to be studied in a single array. This technique involves arranging antibodies on a solid surface, spread out in an orderly and localised manner, as spots along two axes. Then, the sample under study – a cell lysate for instance – is put into contact with the array thus leading to specific protein-antibody recognition and bonding. Similarly, other kinds of molecules may be fixed to the array^{5,6}.

The complexity and diversity of protein structures has made development of protein microarrays a complicated technical feat. Unlike nucleic acids, proteins do not have a homogenous structure or a specific bonding pattern, but rather each protein displays its own unique biochemical features. As for sample amplification processes, there are no techniques like polymerase chain reactions (PCR) in genomics, capable of amplifying or multiplying the amount of protein present in a given sample.

On the other hand, the negative charge of DNA may be used to immobilise a molecule on the array surface via electrostatic forces. Protein charge states are highly variable, however, and hence it has been difficult to standardise adequate support materials for each type of protein microarray. A new chemical generation of membrane and glass surfaces are currently available; they do not require blocking agents to eliminate background noise and at the same time they also avoid direct contact between protein and surface. Despite all of this, protein microarray technology has yet to overcome technical hurdles in terms of the acquisition and stable bonding of proteins to surfaces where they may interact with other proteins or ligands and for such interactions to be detected^{7,8}.

Techniques based on protein separation

Among the various techniques based on protein separation, liquid chromatography (LC) plays an increasingly important role given its effectiveness when separating small proteins, and is used primarily to isolate peptides. LC is a physical method of separation based on the distribution of the various components of a mixture into two immiscible phases – one

steady or stationary and the other mobile. The mobile phase involves a liquid that flows through a column containing the steady phase. Classic LC is carried out in a column which is generally made of glass and filled with the steady phase. The steady phase may be a solid with different chemical properties which give rise to different types of chromatography – ion exchange chromatography, reverse-phase chromatography, and others. The mobile phase may be a pure solvent or mixture of solvents. After placing the sample on the upper part, the mobile phase flows through the column as a result of gravity. To improve the efficiency of separations, the size of steady phase particles was gradually diminished down to microns, and this called for high pressures to ensure mobile phase flow. This was the start of high-resolution chromatography or HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*), which requires state-of-the-art instruments enabling work to be undertaken at the high pressures required⁹.

However, the technique of choice for protein separation is polyacrylamide gel electrophoresis which is based on the differences in molecular weight found in proteins. In this case, initially (first dimension) proteins are unbound according to their isoelectric point (“isoelectric focussing”) and are later separated orthogonally according to mass (second dimension). This second dimension is conducted using SDS (sodium dodecyl-sulfate) or SDS-PAGE (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Separation according to electrical properties and size enables virtually all the proteins in the proteome to be isolated in a 2D array (*2D electrophoresis or 2-DE*), thus giving rise to a series of spots, each representing a protein. This technique allows several thousand proteins to be separated in a single gel.

In theory, this technique would allow the number of proteins expressed in a sample at a given time to be estimated, but in fact the number of spots obtained only reflects a percentage of the total number of proteins expressed. Complete protein extraction from baseline material is not achieved¹⁰.

Despite the fact that significant improvements have been introduced to the 2-DE technique, some limitations persist, namely:

- Overlapping of proteins with similar molecular charges/weights.
- Modest sensitivity.
- Very large or very small proteins cannot be resolved correctly.
- A long time is required.
- Es muy difícil de automatizar.
- Very large or very small proteins cannot be resolved correctly.
- It is very difficult to automate.
- Since these are manual techniques, reproducibility is moderate.
- The technique is hindered by the difficulties that arise in preparing the sample using raw material until it can be loaded on the gel^{11,12}.

Techniques for individual analysis of proteomic elements

Mass spectrometry (MS) is used for protein identification. MS is one of the most frequently used instruments techniques, both in quantitative and qualitative analyses. This is a highly sensitive and specific technique, providing information on protein structure. The possibility of coupling between different types of chromatographic separations and mass spectrometers allows the components present in highly complex mixtures to be identified. However, protein identification by MS does not require prior application of any of the separation techniques outlined in the previous section (i.e. LC or 2-DE).

A mass spectrometry system basically performs three tasks:

1. Sample ionisation.
2. Separation of fragments or ions.
3. Detection / analysis of fragments or ions.

A mass spectrometer is equipped with the following devices to carry out these tasks, namely, an ionization source, a mass/charge ratio analyser and a detector¹³.

Producing gaseous ions is easy when dealing with volatile, low molecular weight compounds. However, application of MS to proteins is relatively recent. This is due to the fact that it is difficult to obtain gaseous phase macromolecular ions, since peptides and proteins are compounds with low volatility and high molecular weight. As a result, special ionisation techniques become necessary. Among the different ionisation source variants the most noteworthy – given their applicability – are peptides and proteins, electrospray ionisation (ESI) and desorption/ionisation via laser or SELDI (*Surface-Enhanced Laser Desorption/Ionization*), known as MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) if assisted by an array. Note that while fluid proteomic studies essentially rely on SELDI, studies involving tissue resort to MALDI - also known as *MALDI Imaging* in this case.

There are different types of fragment or ion separators that may (or may not) be based on electrical fields. The most common ion separators are quadrupole systems and ion traps while among those not based on electrical fields the most widely used are systems based on time of flight (TOF).

Finally, the detector determines the mass of incoming ions.

Another technique commonly applied in proteomics testing is tandem mass spectrometry (MS/MS).

MS is broadly used in chemical analysis given

- Its high sensitivity.
- The possibility of obtaining structural data for a given molecule.
- That data are acquired very rapidly^{14,15}

Tools for data processing and interpretation

Bioinformatics applied to proteomics denotes a series of techniques for processing and interpreting the data obtained with any of the methods outlined above, or others. Essentially, bioinformatics techniques allow for the identification of a protein in a database according to its peptide footprint – which is unique to each protein – or its MS/MS spectrum – also specific to each peptide or protein¹⁶.

A large number of proteins and new genes have been discovered but no information is available as yet on their particular function. Protein function prediction methods provide significant theoretical support in the study of these macromolecules, both as a result of the data they provide and because they may be useful in designing specific peptides and identifying new functions. These protein function prediction methods are probabilistic in nature so they are largely dependent on the amount of data or information available initially, i.e. the size of the sample to be analysed. On the other hand, the procedure customarily used to make predictions is to draw comparisons with similar data. Therefore, here too the size of the “reference population” is important which, in this particular case, it entails the volume of data against which the sample is to be compared. In this regard, reference populations are the actual databases available with molecular sequences, secondary and tertiary structures, total or partial homology of genes and proteins, and many more¹⁷.

In order to predict a protein’s function, the essential requirement is a representative fragment of its amino acid sequence. At the very least, this enables a “sequence” analysis to be conducted. If structural information is also available, along with knowledge of its ionic makeup, mutational effects affecting its function, location of the protein in a cell or organism, or information on interactions with other proteins – i.e. its “context” – then other analytical aspects can also be covered with the aim of facilitating the prediction, i.e. accurate determination of its function¹⁸.

Proteomics in biomedical research

The perspective afforded by proteomics has been incorporated into research studies in different fields, including biomedical research. These studies may be classified in a variety of ways, according to the type of sample used, the pathology or group of diseases under study, technique(s) applied, use or application of the research, etc.

This section will focus on classification according to the type of sample employed. From this point of view, most noteworthy are research studies on cell lines, solid tissue and fluid proteomics.

Cell lines are variants derived from tumour cells or normal cells which are immortalised via inhibition of the cellular mechanisms responsible for growth stagnation/interruption. Unlike most of the cells which are directly isolated in an organism, these are capable of dividing indefinitely when cultured in a laboratory. In cell line research, proteomics techniques have been used to characterise protein expression profiles in several types of cell lines, as the stepping stone for future comparative experiments. These studies have shown that the number of proteins identified in each proteome varies significantly, probably as a result of differences in the range of expressions of the various proteins in each cell line¹⁹.

Human tumour cell lines may constitute feasible models for cancer research. As a result, studies that compare the proteomes of different human tumour lines – or cells obtained directly from a tumour – with their corresponding normal cell lines – or healthy tissue – are becoming more widely used to identify disease markers or biomarkers for early detection, classification and tumour prognosis prediction as well as for proposing new potential targets or therapeutic targets to improve treatment. Therefore, proteomic studies can be conducted to assess the malignant potential of a tumour – metastatic potential depending on whether or not it expresses a specific protein – its chemosensitivity, chemoresistance etc²⁰. Applying proteomics to the design, indication and prediction of responses to a drug or group of drugs may also be extrapolated to other diseases; this is known as pharmacoproteomics^{21,22}.

On the other hand, cell lines have traditionally been studied to gain insight into the mechanisms that come into play in adaptation to different types of stress. Proteomics can clearly be applied to these studies, given that the said cell lines allow new proteins to be identified that were un-related up until now with the establishment of a phenotype resistant to the conditions that trigger cell stress²³.

In addition to studies conducted with human cell lines, as outlined above, proteomics techniques have recently been applied to the study of

solid tissue and fluids with a view to analysing physiological situations – during development, at various metabolic stages, when subject to changing environmental conditions – or pathological conditions – cancer, autoimmunity, infections, etc. The goals pursued with tissue and/or fluids studies are similar to those sought by cell line research – i.e. identification of biomarkers, ascertaining therapeutic targets, pharmacoproteomics, etc.

Naturally, one of the drawbacks posed by the use of solid tissue in proteomics studies is that samples are hard to access. However, the information obtained may be determinant and sometimes there is no better alternative than to use solid tissue samples²⁴. This is probably the case in studies focussing on selective mutations which locally alter a tissue's proteome and cannot be detected in other compartments in the body.

Moreover, studies based on tissue samples, conducted using proteomics techniques, can be completed by other methods. Such is the case of the Western blot, to decipher the presence of serum autoantibodies on the basis of the proteome obtained from tumour cells. Characterisation of a given set of autoantibodies – exclusive to each tumour – may be extremely valuable given that, in theory at least, they may assist in early diagnosis for high-risk patients^{25,26}.

Fluid proteomics has meant a major breakthrough in clinical research as samples are more easily obtained and processed. In particular, there can be enhanced plasma and serum given their ready availability. Proteomic techniques have been applied to these samples in studies targeting a wide variety of diseases - neoplastic, rheumatic, endocrine, toxicological etc²⁷⁻³¹.

Another example of fluid proteomics – although samples are harder to obtain - is proteome analysis of cerebrospinal fluid. This approach has been applied recently to unravel the aetiopathogenic bases and biomarkers of neurological disease, such as neuropsychiatric disorders, brain tumours and painful lumbar syndromes^{32,33}.

Background and rationale of the report

Proteomics constitutes a methodological approach to biosciences, and is set to become a powerful tool, both qualitatively and quantitatively, for the study of physiological and physiopathological issues in humans. This, together with unabated and progressive advances in biotechnology, has contributed to a plethora of scientific publications.

Part of the literature is made up of translational research articles which see some of these techniques as the main strand of study. For a

number of years now, some papers have even proposed the use of proteomic techniques for tackling certain diseases^{34,25} and suggested that they be made available to clinical laboratories in the future^{36,37}. This trend, together with a lack of understanding regarding the possible current or short-to-medium term use of the said techniques in healthcare delivery, has led the Spanish Ministry of Health and Consumer Affairs to commission the Andalusian Agency for Healthcare Technology Assessment to conduct the present review. This report intends to explore the amount of applied research on proteomics is being carried out, and to characterise that research in terms of the most commonly used proteomic techniques, the diseases studied and the type of use proposed. Likewise, the report seeks to identify – via consultation with experts in the field – whether proteomics is currently being applied in healthcare delivery and to pinpoint feasible short-to-medium term applications.

Aims

- To ascertain whether proteomics is currently being applied in healthcare delivery and, if so, to describe existing types of techniques and their clinical usefulness.
- To explore and describe the possible short-to-medium term applications of proteomic techniques in clinical practice.

These overall objectives comprise three specific goals:

- To describe the views of experts in the field of proteomics regarding techniques which are already being applied in clinical practice, or which may see the light in the near future.
- To identify applied research publications on proteomic techniques.
- To describe those publications in terms of type of proteomic tests, diseases they are applied to or are proposed for, and clinical usefulness.

Methods

Two types of methods have been used:

- Consultation with experts and key figures in the field of proteomics, via a questionnaire. The aim of consultation was to pinpoint current use and possible future use of proteomic techniques in healthcare delivery.
- A bibliometric study whose aim was to explore trends and topics in applied proteomic research. The term “applied research” used here, refers to research that may lead to the short-to-medium term application of these techniques in clinical practice.

Questionnaire to experts in proteomics

Consultation with experts and key figures in the field seeking to identify current usage of proteomics in the field of healthcare delivery, as well as possible short-to-medium term application(s) was based on a questionnaire. Initially, 25 specialists were identified in Spain, through the ProteoRed network which brings together experts in proteomics³⁸ and the Spanish Proteomics Society (SEProt)³⁹ set up in August 2005. Essentially, experts are either researchers or work in the technology industry.

After contacting experts by telephone, they were sent a questionnaire by e-mail. This is a standard questionnaire with closed and open-ended questions (Appendix 1). With the aim of ensuring a good response rate, those who failed to return the questionnaire were contacted again up to three times.

The questionnaire includes six sections. The first two refer to the current use of proteomics in the provision of healthcare delivery – excluding research. The third and fourth sections concern proteomic techniques to be potentially used in the before mentioned healthcare fields (short-to-medium term introduction). The fifth section was optional; it provided the list of individuals appointed as experts and invited respondents to nominate any other experts on the grounds of their professional expertise. This “snow ball” strategy was intended to maximise the chances of locating leading experts in the field of proteomics in Spain. The sixth and final section was also optional and invited experts to provide additional information or to elaborate on certain aspects as they saw fit.

The results of the survey are presented descriptively, with absolute figures and percentages.

Bibliometric study regarding applied research in proteomics

Given that the purpose of the survey was to identify research in proteomic techniques that is at a stage approaching implementation in clinical practice, the bibliography search focused on pinpointing literature reviews and clinical trials. The main goal was to identify the contributions of proteomic techniques in areas supporting clinical diagnosis of disease, susceptibility to illness, prognosis and/or pharmacoproteomics.

Search in reference databases

A computer search was conducted for the period 1995 to 2006. This particular start date was chosen for the search as the term “proteome” was first introduced in 1995. Our search strategy was as follows:

- Two strategies were adopted for the MEDLINE database, which were later combined with the OR operator. The first approach used the term “proteomics” (major MeSH) without qualifiers and the second search used the same term with the qualifier “trends”. Later, the search was limited to review papers (PT REVIEW) discussing the human species (TG HUMANS).
- In the same database, using the term “proteomics”, but limiting the search to clinical trials (PT CLINICAL TRIAL).
- In the EMBASE database, using the term “proteomics”, selecting those studies that focus on the human species (TG HUMANS).
- From the articles retrieved in the search, we ruled out those presenting index errors – i.e. they did not address proteomics or did not discuss the human species.

Classification of studies

Our bibliometric analysis included data on the following variables: year of publication, proteome analysis techniques, type of use or application of those techniques (screening, diagnosis or pharmacoproteomics) and disease(s) studied. When the paper discussed the mass spectrometry

technique, this was sub-classified depending on whether it was one of the most commonly used MS techniques (MALDI & SELDI), another MS technique, or when no specifications were given (general MS).

Some articles focussed on a single particular issue, while other addressed more than one topic, i.e. technique and/or disease, and/or type of use. In this second case, the papers were included in each of the categories applicable to the topics discussed.

Finally, the information obtained from experts and key figures was checked against data obtained from the scientific literature review.

Results

Results from questionnaires submitted to experts

Response rate and experts' profile description

An initial group of 25 specialists was shortlisted from the field of proteomics, and a questionnaire was sent to each of them. In the process of completing the questionnaire, six of those initial experts suggested 16 additional names, three of which were ruled out since they are not Spanish speakers. The remainder were contacted and a further 13 questionnaires were sent out.

The six experts who proposed additional names provided between one and three suggestions each. No overlapping responses were observed. Subsequently, after adding the new names to the initial list of experts, respondents ceased to provide further names. Two stated that they found the list to be very thorough, and no significant absences were noted.

From the initial group of 25 experts, 17 completed the questionnaire. One failed to do so on the grounds that he/she lacked the sound knowledge required. Of the 13 experts included *a posteriori*, six replied to the questionnaire. In short, 38 questionnaires were submitted and 23 experts completed and returned them (response rate 60.5%). The list of respondents is presented in Annex 2.

Four out of 23 participants (17.4%) work for the technology industry, as product managers. The remainder (19 experts, i.e. 82.6%) are researchers (at institutes, universities, university hospitals, etc), five belong to hospital settings, of which four are involved in healthcare delivery.

Opinions regarding current use and future potential of proteomic techniques

Twenty out of 23 respondents (87%) stated that they were unaware of any proteomic techniques currently used in disease management. Two out of the three experts that replied affirmatively to this question (i.e. 13%), were product managers in related industry, and one a researcher. These three respondents provided the following information:

- One of the respondents, working in industry, referred to basic protein chemistry tests (such as ELISA) which cannot truly be considered as a proteomic technique.
- The other industry-related respondent pointed to two techniques known with the term “Bioplex (Luminex technology)”. One would be applied for malaria prognosis and the other for prognosis and predicting risk for bronchiolitis due to Respiratory Syncytial Virus in infants under 2 years of age.
- The researcher did mention mass spectrometry for metabolic disease but was unaware of any centres in Spain or abroad where the technique has been implemented, and gave no indications regarding the clinical usefulness of the test.

With regard to techniques which may have the potential for implementation in the short-to-medium term, 10 experts (43.5%) stated that they were unaware of proteome analysis techniques that could be introduced into clinical practice in the near future. One particular expert went a step further stating that “at present, it would be merely speculative to say that the techniques may be feasible in 3, 5 or 7 years”.

The remaining 13 experts (56.5%) mentioned certain techniques whose application is feasible, in their view, over the short-to-medium term. They also specified the techniques and gave additional input which is summarised in Table 1. It is worth highlighting that the most cited techniques were mass spectrometry – with a preference for SELDI over MALDI – followed by protein array technology and 2-dimensional electrophoresis.

As for the diseases to be targeted by these tests, respondents fell short of mentioning specific conditions, but rather referred to major groups of diseases (e.g. neoplastic disease), medical fields of expertise (e.g. pathology), or responses referred to “any disease” or the “protein profile of various diseases”. Responses regarding type of use were equally ambiguous and exhibited a high degree of variability. The only application worth highlighting – since a number of experts 7 mentioned it – is the use of SELDI-TOF for screening, diagnosis and prognosis. However, no indication was given as to which particular use and for what disease. Also mentioned for diagnosis and prognosis were protein array technology and MALDI-Imaging for confirmatory diagnosis– although, likewise, no indication was given as to the nosologic entity.

Of the various Spanish centres involved in developing these techniques, the most cited was the National Biotechnology Centre in Madrid, especially for the SELDI-TOF technique. The most cited leading international centres involved in research on these techniques were the

Food and Drug Administration and the National Cancer Institute (National Institutes of Health) in Bethesda (Maryland, USA), also in relation to the SELDI-TOF technique.

As to experts' opinions regarding the time required to roll these techniques out in clinical practice, of the various options provided in the questionnaire, none of the experts opted for the option "under 1 year". The time-frames suggested were 3 to 5 years and more than 5 years. This last section of the questionnaire yielded the highest non-response rate and, in general, responses regarding time-frames referred to mass spectrometry, especially in SELDI.

In the last section of the questionnaire – where experts were invited to freely express any further information or aspects of interest – 14 specialists (60.9%) provided some information or personal views. Of these, four (17.4%) attached a document of special relevance, and 10 (43.5%) made free-style contributions.

The attached documents were scientific papers regarding certain techniques in proteomics, or referred to research groups that had implemented the techniques, or biomarkers and related diseases. In short, the information provided helped to support or clarify issues tackled in the questionnaire.

Of the ten experts that made comments, seven (30.4%) expressed a view that is worth highlighting. They agreed that while proteomics is useful for research and for the discovery of proteins of interest as disease markers, therapeutic targets etc, common practice will mostly resort to traditional determination methods of analysis, for instance via enzyme-linked immunosorbent assay, once analytical and clinical validity of these proteins has been established.

The remaining three experts who made comments in this section of the questionnaire provided their views on a variety of topics. One referred to the lengthy time required for analysis of the data obtained from proteomic studies to identify a specific protein or peptide presumed to have some clinical value. Another expert stated that "the search for markers using proteomics techniques – in cancer for instance – is taking off at breakneck speed", highlighting a major initiative funded by the national institutes of health and its possible implementation in clinical practice in a relatively short period of time. Finally, the third expert said (verbatim) that "work in clinical proteomics is still in its very experimental stages".

Bibliometric review results

As a result of our search in reference databases, 259 bibliographical references were retrieved. After checking that there were no duplicate entries and appraising the full text version where there was any doubt, six documents were excluded on the grounds of indexing errors (3 did not deal with proteomics, and 3 did not discuss the human species). Of the 253 articles included, 240 were non-systematic reviews – editorials, tutorials and narrative reviews – and 13 were indexed as clinical trials, although in fact these were original studies with other designs.

Analysis according to year of publication highlighted an exponential increase – as shown in graph 1 which excludes data from the current year given that 2006 has not yet concluded and hence cannot be assessed. Although the term proteome first appeared in 1995, no review articles were published until 2002. The first studies indexed as clinical trials were published in 2004. Adding both categories of articles shows increasing values year on year; from 21 publications in 2002 to 85 in 2005.

Table 2 summarises the characteristics of the articles retrieved in the search. The fact that a given article may be included in more than one category, explains that the sum of figures in the last column – for each of the features examined – does not equal 253.

Of the three kinds of features examined, the topic that appears in the highest number of articles is proteome analysis technique followed by type of disease. Type of use is the least discussed topic.

The most cited technique is MS, especially SELDI, given the number of papers that address this topic and the increase in number of papers between 2002 and 2005. MS is followed by bioinformatics techniques, 2D-electrophoresis and arrays.

Pharmacoproteomics is the most widely discussed clinical application in scientific papers, followed by diagnosis. However, between 2004 and 2005 a decrease is noted in the number of papers that focus on the two applications for both techniques. As for disease types, the most discussed are cancer-related, followed in similar numbers by endocrine conditions, and neurological disease. Cardiovascular, infectious and rheumatoid diseases appear less frequently. Remaining biomedical disciplines were grouped under the heading “other pathologies/diseases” with the following results:

- In 2003: dermatology (2 papers), digestive diseases (1), immunology (1) and ophthalmology (1) (total: 5).

- In 2004: immunology (6 papers), digestive diseases (4), nephrology (3), pneumology (2), toxicology (2), otorhinolaryngology (1), gynaecology (1), paediatrics (1), physiology (1), phylogeny (1) and bioethics (1) (total: 23).
- In 2005: immunology (4 papers), digestive diseases (2), pneumology (2), physiology (2), gynaecology (1), paediatrics (1), toxicology (1), geriatrics (1) and dermatology (1) (total: 16).
- In 2006: nephrology (1 paper) and dentistry (1) (total: 2).

Discussion

This study highlights, first and foremost, that there is no indication that proteomic techniques are being applied in clinical practice for disease management. Secondly, the opinions voiced by the 23 proteomics experts consulted were disparate in terms of possible short-to-medium term application of these techniques. In fact, slightly over half of the experts consulted identified a specific proteome analysis technique which, in their view, is currently at a sufficiently advanced stage in applied research to foresee its use in clinical practice within 1 to 5 years. However, the remaining experts were unaware of any technique close to use in clinical practice for disease management. Some additional aspects – that came up in experts’ replies and the bibliometric review which we shall comment on below – lead to the assumption that proteomics is currently useful for research and in the discovery of clinically relevant proteins, but the use of these techniques in everyday clinical practice does not seem feasible in the short term.

Discussion regarding limitations and methodological issues

Before engaging in more detailed discussion of this review’s outcomes, we must first comment on some of its possible limitations. The primary method in this study was consultation with experts which may pose certain limitations in terms of identifying the current use of proteomic techniques. A more comprehensive method would have been a survey including all hospitals within the National Health System. However, bearing in mind that the experts consulted are leading specialists in the field and considering that there is broad agreement in their responses to the question regarding current use, it seems clear that any application of proteomic technique(s) in clinical practice, is merely anecdotal.

The method based on compiling experts’ opinions is fairly broadly accepted in prospective studies – in this case, an enquiry regarding the possible application of proteomic techniques to clinical practice in the short-to-medium term – provided that the right experts are recruited. To ensure this requirement was fully met, we adopted the “snowball” strategy

to pinpoint experts and the list of key contributors reached saturation point. Also, the response rate obtained (60.5%) can be considered acceptable for questionnaires forwarded by e-mail. It is also worth noting that the proteomic techniques identified by some of the experts as having some potential for future use, tally with the research topics most frequently observed in the bibliometric review.

The search strategy run on reference databases was intended to retrieve widely accepted knowledge. Hence we restricted our analysis to review articles particularly, assuming that such papers would most likely contain any proteomic test that may currently be in use – or that is likely to be introduced shortly – to tackle disease (diagnosis, treatment, etc). However, by adopting this strategy most of the original articles in the field of proteomics have been ruled out, so it is possible that we may have overlooked some applied research outcomes relevant to the short-term management of specific diseases.

Discussion regarding outcomes

It has not been possible to compare our results with those from other studies, since no other review – based on consultation with experts – was found in the literature, regarding current and future use of proteomics.

With regard to the current application of proteomics, responses were consistent, since 87% of experts state that they are not aware of any proteomics techniques currently being applied in healthcare delivery. However, in terms of the potential use of proteomics techniques in clinical practice, experts held discrepant views. While 44% of all respondents believe that proteomics techniques will not be introduced in the short-to-medium term, the remainder (56%) believe that implementation of proteomics tests in healthcare delivery is feasible in the near future. However, there are significant nuances in the responses provided by specialists which need to be pointed out.

Firstly, none named a specific disease or pathology for which they would suggest application of these techniques but rather referred to groups of diseases or general fields in medicine (e.g. “any disease”, “protein profile of various diseases”, etc). This lack of specificity – pinpointing a disease and/or application when suggesting potentially feasible techniques – could point to the lack of robust scientific evidence to support their introduction. In addition, none of the experts believed that any of the techniques in question is on the brink of implementation in the shortest term suggested, i.e. within 12 months.

There was a certain degree of homogeneity in the responses of 56% of experts who believed that some techniques might be applicable in clinical practice over the short-to-medium term and provided concrete evidence to support their claims. Most noteworthy is mass spectrometry – especially SELDI – which, moreover, tallied with the data obtained from the bibliometric study. The inherent features of these techniques – namely sensitivity, speed, possibility of obtaining structural information, etc. – would make them more suitable for clinical use than others. Note though that the predominance of SELDI – used in fluid proteomics – may be due to the fact that test samples are easy to obtain.

One of the most notable results obtained from consultation with experts is that, in the final section of the questionnaire – an open section for experts to comment on any other issues of interest – almost one third of respondents agreed on a common idea, namely, that the role of proteomics in medicine is still at the “discovery stage” (discovery of proteins as biomarkers, therapeutic targets etc.) but that once these proteins have been fully identified, clinical analysis for determination will follow conventional methods. In other words, proteomics would be seen as a powerful tool for research, but will be very hard to introduce in clinical practice for healthcare delivery.

With this information, it seems obvious that there is no consensus among the experts consulted regarding the possibilities of applying proteomics techniques in the near future. Many articles published over the past few years point to the introduction of these techniques in the short term for diagnosis of certain diseases, especially cancer and neurological conditions^{27,28,31-35 40,41}. The bibliometric study revealed that proteomics has aroused a great deal of interest, as is apparent from the exponential growth in literature on this topic seen over the last few years. However, to date, clinical laboratories do not resort to these techniques for biomarker identification.

Also noteworthy is that when classifying scientific papers according to the type of use or application of proteomic techniques, the most recurrent topic was pharmacoproteomics. Perhaps the identification and validation of therapeutic targets and the search for specific treatments for each disease may be the ultimate aim of a large part of the research. The pharmaceutical industry’s support towards many of these techniques, and ultimately the financial interest surrounding this particular field of drug research, are factors to be borne in mind as possible triggers of scientific production and practical use of the techniques.

Implications of this review for Healthcare Technology Assessment

In the light of the trends noted in our bibliometric study, it is foreseeable that interest in proteomics in biomedicine will continue in the future, and that it will continue to generate a great deal of research. Contributions from that research may lead to the identification of new aminoprotein molecules of clinical interest⁴². The validation and analysis of those molecules as tools in healthcare delivery may generate future demands for action in the field of Healthcare Technology Assessment⁴³. Given the divergence of views expressed by the experts consulted in this review, it is difficult to predict how those demands might materialise. They might be linked to the effectiveness and cost-effectiveness of using proteomic techniques or conventional techniques for protein determination, such as ELISA or liquid chromatography, for specific indications such as diagnosis, predicting prognosis or indications for drug therapies⁴⁴.

Conclusions

1. No standardised use of proteomic techniques have been identified in current clinical practice for the management of any disease.
2. There is no consensus among experts regarding the possible introduction of proteomics into clinical practice over the short-to-medium term. Opinions are divided: 44% believe that this is highly improbable or speculative and 56% claim that some sort of application is in the making. In this latter case, none of the respondents pinpointed specific applications or diseases.
3. Should proteomics be implemented in clinical practice in the near future, mass spectrometry, especially SELDI-TOF, is the most plausible technique – on the basis of experts' responses and the bibliometric study – while oncology and pharmaco-proteomics are the most likely fields of application.