

Andújar-Vera F¹, García-Fontana C¹, Lozano-Alonso S^{3,4}, Morales-Santana S^{3,5}, Muñoz-Torres M^{2,3,6}, García-Fontana B^{2,3}

¹ Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria Andalucía Oriental-Alejandro Otero (FIBAO) - Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (Ibs.GRANADA) - Granada (España)

² Unidad de Metabolismo Óseo, UGC Endocrinología y Nutrición - Hospital Universitario Campus de la Salud - Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (Ibs.GRANADA) - Granada (España)

³ Área temática CIBER de Fragilidad y Envejecimiento Saludable (CIBERFES) - Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBER) - Instituto de Salud Carlos III - Madrid (España)

⁴ Servicio de Angiología y Cirugía Vascular - Hospital Universitario Campus de la Salud - Granada (España)

⁵ Servicio de Proteómica - Fundación Pública Andaluza para la Investigación Biosanitaria Andalucía Oriental-Alejandro Otero (FIBAO) - Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (Ibs.GRANADA) - Granada (España)

⁶ Departamento de Medicina - Facultad de Medicina - Universidad de Granada - Granada (España)

Identificación de potenciales biomarcadores de calcificación vascular en pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 mediante el uso de herramientas bioinformáticas de libre acceso

DOI: <http://dx.doi.org/10.4321/S1889-836X2018000200003>

Correspondencia: Beatriz García Fontana - Unidad de Metabolismo Óseo, UGC Endocrinología y Nutrición - Hospital Universitario Campus de la Salud - Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada (Ibs.GRANADA) - Avda. Doctor Olóriz, 16 - 18012 Granada
Correo electrónico: bgfontana@fibao.es

Fecha de recepción: 23/11/2017

Fecha de aceptación: 28/01/2018

Trabajo remitido como prestación por la beca FEIOMM de Investigación Clínica 2017.

Resumen

Objetivos: Identificación de potenciales biomarcadores implicados en procesos de calcificación vascular para avanzar en el diagnóstico y tratamiento de esta patología en sus estadios subclínicos.

Métodos: Se trata de un trabajo experimental en el que se incluyeron 5 pacientes con diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) con enfermedad arterial periférica e isquemia crítica. Se realizó una extracción proteica e identificación del proteoma mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS) de secciones de arteria femoral calcificada. Las proteínas identificadas fueron analizadas a través de *gene ontology* y comparadas con otras proteínas específicas de patologías vasculares relacionadas mediante la base de datos DisGeNET.

Mediante el programa informático *Cytoscape* se analizó la red de funciones biológicas de las proteínas seleccionadas para su clasificación en base a la patología en la que están implicadas.

Resultados: Se identificaron 530 proteínas en las muestras analizadas con funciones mayoritariamente de unión a calcio y catalítica. 37 de ellas fueron comunes en otras patologías vasculares relacionadas.

La exploración de las redes biológicas de las 37 proteínas identificadas, dio lugar a la identificación de 2 potenciales marcadores específicos de calcificación vascular en procesos ateroscleróticos, como la proteína mitocondrial de choque térmico de 10 kDa, y la subunidad flavoproteica de la succinato deshidrogenasa.

Conclusiones: Existe una importante expresión de proteínas implicadas en procesos de mineralización ósea en tejido vascular calcificado, sugiriendo la existencia de mecanismos moleculares comunes entre la regulación ósea y vascular. El uso de herramientas bioinformáticas sugiere la implicación de la proteína de choque térmico de 10 kDa mitocondrial y la subunidad flavoproteica de la succinato deshidrogenasa como posibles biomarcadores de calcificación vascular en pacientes con DM2, aunque son necesarios estudios adicionales que confirmen esta hipótesis.

Palabras clave: diabetes mellitus tipo 2, enfermedad cardiovascular, calcificación vascular, biomarcadores, proteómica, bioinformática.

Using free access bioinformatic tools to identify potential vascular calcification biomarkers in diabetes mellitus type 2 patients

Summary

Objectives: Identify potential biomarkers involved in vascular calcification processes to improve DM2 diagnosis and treatment in its subclinical stages.

Methods: This experimental study included 5 patients suffering diabetes mellitus type 2 (DM2) with peripheral arterial disease and critical ischemia. Protein extraction and identification of the proteome were carried out using liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS/MS) of calcified femoral artery sections. The identified proteins were analyzed through gene ontology and compared with other specific proteins of related vascular pathologies through the DisGeNET database. Cytoscape software analyzed the network of biological functions of the proteins selected for classification based on the disease in which they are involved.

Results: 530 proteins were identified in the analyzed samples with functions mainly of calcium binding and catalytic. 37 of them were common in other related vascular pathologies. The exploration of the biological networks of the 37 proteins identified, led to the identification of 2 potential specific markers of vascular calcification in atherosclerotic processes, such as 10-kDa thermal shock mitochondrial protein, and the flavoprotein subunit of succinate dehydrogenase.

Conclusions: There is significant expression of proteins involved in processes of bone mineralization in calcified vascular tissue, suggesting the existence of common molecular mechanisms between bone regulation and vascular. The use of bioinformatics tools suggests the involvement of the mitochondrial 10 kDa heat shock protein and the subunit of the succinate dehydrogenase as potential biomarkers of vascular calcification in patients with DM2, although additional studies are needed to confirm this hypothesis.

Key words: *diabetes mellitus type 2, cardiovascular disease, vascular calcification, biomarkers, proteomics, bioinformatics.*

Introducción

La diabetes *mellitus* tipo 2 (DM2) es un importante problema de salud pública a nivel mundial que afecta a una gran parte de la población. Se predice un aumento de los casos de DM2 en todo el mundo, pudiendo llegar a afectar a más de 300 millones de personas en 2025¹. La DM2 está relacionada con diversas complicaciones, siendo las cardiovasculares una de las principales causas de mortalidad de esta enfermedad². Dentro de estas complicaciones, la isquemia crónica de miembros inferiores debido a procesos ateroscleróticos es una de las complicaciones vasculares más frecuentes en los pacientes con DM2, existiendo una prevalencia de presencia de placas calcificadas en miembros inferiores que puede alcanzar el 44,6% en esta población³. Varios estudios revelan que la DM2 es un factor de riesgo independiente en el desarrollo de enfermedad cardiovascular (ECV) en hombres y mujeres^{4,5}. El desarrollo de estas complicaciones vasculares está determinado por la presencia de factores de riesgo comunes en DM2 como la obesidad, hiperglucemia crónica, resistencia a la insulina, dislipidemia y estados de inflamación y oxidación entre otros. Sin embargo, solo algunos de los pacientes con DM2 desarrollarán estas complicaciones vasculares mientras que otros, a pesar de presentar los mismos factores de riesgo, no sufrirán eventos cardiovasculares durante el curso de la enfermedad. Esto sugiere que la ruta que vincula la disglucemia y la ECV no está bien establecida, siendo necesario el estudio

en profundidad de los factores implicados en el desarrollo de la ECV asociada a la DM2. Existen evidencias que han mostrado un proceso de regulación de la calcificación vascular semejante a la mineralización ósea, sugiriendo una conexión entre alteraciones del metabolismo óseo y del sistema vascular.

En este contexto, la identificación de nuevos biomarcadores implicados en el desarrollo de las complicaciones vasculares en pacientes con DM2 puede ser de gran importancia para mejorar el pronóstico y la calidad de vida de esta población, así como para diseñar nuevas estrategias preventivas y terapéuticas que impidan el desarrollo de eventos cardiovasculares, reduciendo de esta forma la morbi-mortalidad de los pacientes diabéticos.

El análisis proteómico es un enfoque libre de hipótesis que integra las influencias genéticas y epigenéticas mediante el examen de los perfiles de expresión de proteínas, y no está limitado por conocimientos previos. La mayoría de estudios de búsqueda de biomarcadores se han realizado a nivel sérico, debido a su fácil obtención mediante técnicas no invasivas. Sin embargo, existen proteínas que no se liberan al torrente sanguíneo sino que se expresan de forma específica en los tejidos afectados, no pudiéndose, por tanto, detectar mediante estudios proteómicos de suero. Por ello, el objetivo de este estudio consiste en la identificación de potenciales biomarcadores de ECV en tejido vascular calcificado de pacientes con DM2 mediante el uso de técnicas proteómicas. Una de

las principales limitaciones en estudios de este tipo es la obtención de muestras tisulares procedentes de sujetos sanos, o de pacientes sin complicaciones asociadas, lo que dificulta mucho la realización de un estudio comparativo del perfil proteico entre casos y controles para la identificación de proteínas implicadas en la patología de estudio. La introducción de herramientas bioinformáticas en el ámbito científico en los últimos años ha ayudado a solventar estas limitaciones. La bioinformática es crucial para combinar información de múltiples fuentes y para generar nuevo conocimiento a partir de los datos existentes. Tiene, además, el potencial de simular la estructura, función y dinámica de los sistemas moleculares, entre otras utilidades, y es, por tanto, útil en la formulación de hipótesis que orienten el trabajo experimental.

En este estudio se aplican diferentes herramientas bioinformáticas que nos permiten obtener una gran cantidad de información publicada de forma gratuita *online*. De esta forma, se ha utilizado un clasificador según determinadas características de las proteínas identificadas, como su función molecular, proceso biológico o su comportamiento como componente celular, lo que nos ha permitido estudiar las proteínas en su conjunto, y su proporción según estas características en los sujetos de estudio.

Por otro lado, la utilización de repositorios de proteínas identificadas como biomarcadores de distintas patologías potencialmente relacionadas con la calcificación de la arteria femoral nos permite establecer nexos proteicos entre distintas patologías, así como identificar proteínas específicas de la patología de estudio.

La aplicación de estas herramientas, permite, por tanto, profundizar en el conocimiento de las vías implicadas en las patologías vasculares, ofreciendo, al mismo tiempo, una orientación experimental dirigida para la identificación de potenciales biomarcadores implicados en los procesos ateroscleróticos de la arteria femoral.

Material y métodos

Población de estudio

Nuestro trabajo experimental incluyó 5 sujetos de estudio. Los pacientes incluidos en el estudio son pacientes diagnosticados con DM2 según los criterios de la *American Diabetes Association* (2011). El criterio de inclusión de la enfermedad arterial periférica fue la presencia de isquemia crítica con indicación de amputación mayor de miembro inferior por no ser candidatos a revascularización o porque ésta ha fracasado. Los criterios de isquemia crítica según la recomendación nº 16 del documento de consenso sobre enfermedad arterial periférica, TASC II [1], son: dolor isquémico persistente y recidivante en reposo que exige analgesia con opiáceos durante al menos 2 semanas; úlceras o gangrena en pie o en dedos de los pies; presión arterial sistólica en tobillo menor de 50 mmHg o presión sistólica en dedo del pie menor de 30 mmHg; cronicidad con exclusión de la isquemia aguda.

Los pacientes procedían del Hospital Universitario Campus de la Salud de Granada y fueron evaluados en el Servicio de Angiología y Cirugía Vasculard. Todos los pacientes eran de raza blanca, con niveles séricos normales de calcio y fósforo y sin enfermedades de riñón, hígado, gastrointestinales o enfermedades del tiroides. Todos ellos recibían medicación para la DM2, incluyendo metformina, sulfonilureas, insulina o una combinación de estos fármacos.

Se obtuvieron muestras de tejido vascular procedente de la arteria femoral con presencia de calcificación. Las muestras fueron inmediatamente criopreservadas tras su extracción. Todas las muestras utilizadas para el estudio fueron gestionadas por el Biobanco del Sistema de Salud Público Andaluz (SSPA Biobanco) del Hospital Universitario San Cecilio, de acuerdo con los procedimientos del Biobanco aprobados por el Comité de Ética para la Investigación Biomédica de Andalucía.

Todos los sujetos incluidos en el estudio firmaron la aceptación y la comprensión del consentimiento informado. El estudio se realizó con la aprobación del Comité Ético del Hospital Universitario San Cecilio y conforme a las directrices éticas relevantes para la investigación humana y animal recogida en la declaración de Helsinki.

Estudio proteómico

Extracción proteica

Las muestras correspondientes a 45 secciones de tejido de la arteria femoral fueron homogeneizadas a 4°C tras la adición de 500 µL de tampón de extracción de proteína soluble (20 mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM NaCl, 0,5 mM deoxicolato de sodio, 1 mM EDTA, 4% SDS, 30% glicerol, 5 mM PMSF, 200 mM DTT, benzonasa -1µL/10 mL de tampón-). Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 6.000 r.p.m. y 4°C y se recogió el sobrenadante que representa la fracción citosólica de las células donde se encuentran las proteínas solubles. Estas muestras se conservaron a -80°C hasta su procesamiento posterior para el análisis proteico.

Procesamiento de la muestra

Las muestras congeladas se enviaron para su análisis en la Unidad de Proteómica de los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Córdoba. Una vez descongeladas, las muestras se concentraron por ultrafiltración utilizando una columna de centrifugado Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter de 3kDa. Los extractos de proteína se limpiaron mediante electroforesis SDS-PAGE 1D al 10% de poliacrilamida. Para ello, las muestras se cargaron sobre el gel concentrador, al que se le aplicó un voltaje de 100 V hasta que el frente de electroforesis alcanzó el gel separador. El ensayo se detuvo cuando el extracto de proteína había entrado 1 cm en el gel separador. El gel fue teñido con azul de *Commasie*, y posteriormente se realizó el corte y extracción de las bandas del gel que se mantuvieron en agua hasta la digestión.

Para la digestión proteica, las porciones de gel se conservaron en bicarbonato de amonio (BA) 200 mM/ acetonitrilo al 50% durante 15 minutos, con posterior incubación durante 5 minutos en acetonitrilo al 100%. La proteína se mantuvo en condiciones reductoras mediante la adición de DTT 20 mM en BA 25 mM, y fue incubada durante 20 minutos a 55°C. La mezcla se enfrió a temperatura ambiente, con la posterior alquilación de los grupos tioles libres por adición de iodoacetamida 40 mM en BA 25 mM durante 20 minutos en oscuridad. Posteriormente, las porciones de gel se lavaron dos veces en BA 25 mM. La digestión proteolítica se realizó mediante la adición de tripsina (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.) a 12,5 ng/μL de enzima en BA 25 mM, y se incubó a 37°C durante la noche. La digestión de proteínas se detuvo mediante la adición de ácido trifluoroacético a una concentración final del 1%, y las muestras digeridas fueron finalmente secadas mediante *SpeedVac*.

Análisis por Espectrometría de Masas/Masas acoplada a nano-Cromatografía Líquida (nLC-MS/MS)

La Nano-LC se realizó en un nano UPLC Dionex Ultimate 3000 (Thermo Scientific) con una columna Acclaim PepMap100, C18, 3 μm, 100 Å, 75 μm i.d. x 50 cm, nanoViper (Thermo Scientific). La mezcla de péptidos se cargó previamente en una precolumna de Acclaim Pepmap de 300 μm x 5 mm (Thermo Scientific) en acetonitrilo al 2%/trifluoroacético 0,05% durante 5 min a un flujo de 5 μL/min. La separación del péptido se realizó a 40°C para todas las carreras. Los tampones de elución fueron: tampón A (0,1% de ácido fórmico en agua) y tampón B (20% de acetonitrilo y 0,1% ácido fórmico). Las muestras se eluyeron a un flujo de 300 nL/min con el siguiente gradiente: 4-35% de B durante 120 minutos; 35-55% de B durante 6 minutos; 55-90% de B durante 3 minutos, seguido de 8 minutos de lavado con B al 90% y re-equilibración de 15 minutos al 4% de B. El tiempo total de la cromatografía fue de 150 minutos.

Los cationes de péptido eluidos se convirtieron en iones de fase gaseosa por ionización mediante nano electrospray y se analizaron en un espectrómetro de masas, Thermo Orbitrap Fusion (Q-OT-qIT, Thermo Scientific) operado en modo positivo. El escaneo de reconocimiento de los precursores de péptidos de 400 a 1500 m/z fue realizado a 120.000 FWHM de resolución con el objetivo de conteo de 4×10^5 iones. La espectrometría de masas en tándem se realizó por aislamiento a 1,2 Da con el cuadrupolo, la fragmentación CID con energía de colisión normalizada de 35 y análisis MS de escaneo rápido en la trampa iónica. El objetivo de recuento de iones AGC se ajustó a 2×10^5 y el tiempo máximo de inyección fue de 300 ms. Sólo aquellos precursores con estado de carga de 2-5 se muestrearon para MS/MS. La duración de exclusión dinámica se fijó en 15 s con una tolerancia de 10 ppm alrededor del precursor seleccionado y sus isótopos y activando la selección de precursores monoisotópicos.

Identificación de proteínas

Los datos brutos se procesaron utilizando el paquete informático Proteome Discoverer (versión

2.1.0.81, Thermo Scientific). Los espectros MS/MS se buscaron con el motor SEQUEST™⁶ (Thermo Fisher Scientific) enfrentándolos a una base de datos de Uniprot_Homosapiens_dateofanalysis (www.uniprot.org). Se realizó una digestión triptica teórica de los péptidos, se introdujo carbamido-metilación de cisteínas como modificación post-traducciona fija y oxidación de metionina como modificación post-traducciona variable. La tolerancia de la masa de los precursores fue de 10 ppm y los iones del producto se registraron con una tolerancia de 0,1 Da. Las coincidencias espectrales de los péptidos, fueron validadas utilizando un filtro basado en valores q a un 1% FDR (*False Discovery Rate*) obteniendo una lista de proteínas identificadas en cada una de las muestras procesadas (Proteome Discoverer).

Análisis de datos mediante herramientas bioinformáticas

Análisis por ontología de genes (GO)

El recurso de ontología de genes (*gene ontology*) es una importante iniciativa de la bioinformática que tiene por objetivo estandarizar la representación de atributos de proteínas entre especies y bases de datos⁷. El sistema en línea proporciona un vocabulario de términos para describir características de los productos génicos y los datos de anotación de productos génicos de los miembros del consorcio GO, así como herramientas para ingresar y procesar estos datos. Cada proteína se caracteriza en términos de tres ontologías: función molecular, componente celular y el proceso biológico involucrado⁸. Utilizando la base de datos GO (<http://www.geneontology.org>) y el análisis Onto-Express, los genes involucrados se clasificaron con el fin de obtener una visión general de las funciones potenciales de los genes expresados correspondientes a las proteínas identificadas en el estudio.

Análisis por comparación de patologías

Las proteínas identificadas en este estudio fueron enfrentadas con las proteínas ya descritas en otras patologías vasculares con una posible relación con la calcificación vascular de la arteria femoral. Esta información fue obtenida gracias a la base de datos DisGeNET (<http://www.disgenet.org>) que contiene una de las mayores colecciones de genes y variantes asociados a enfermedades humanas, disponible públicamente⁹. Las patologías desde las que se obtuvo la información fueron: *Carotid Stenosis*, UMLS CUI: C0007282; *Supravalvular aortic Stenosis*, UMLS CUI: C0003499; *Aortic Valve Stenosis*, UMLS CUI: C0003507; *Esophageal Stenosis*, UMLS CUI: C0014866; *Laryngostenosis*, UMLS CUI: C0023075; *Mitral Valve Stenosis*, UMLS CUI: C0026269; *Pulmonary Valve Stenosis*, UMLS CUI: C0034194; *Pyloric Stenosis*, UMLS CUI: C0034194; *Aortic Calcification*, UMLS CUI: C1096249; *Calcification of Mitral Valve*, UMLS CUI: C0919718; *Aortic Valve Calcification*, UMLS CUI: C0428791; *Renal Artery Stenosis*, UMLS CUI: C0035067 y *Vascular Calcification*, UMLS CUI: C0342649. La visualización de estas proteínas se llevó a cabo utilizando la herramienta *Cytoscape*¹⁰.

Análisis por interacción proteína-proteína y redes funcionales

Para investigar las relaciones directas (físicas) y/o indirectas (funcionales) entre genes identificados, se utilizó la herramienta de búsqueda para la recuperación de genes interactuantes (STRING) en bases de datos para analizar la red funcional (<http://string.embl.de>)¹¹. La base de datos STRING proporcionó una puntuación para cada interacción gen-gen, que se calcula como la probabilidad conjunta de las probabilidades de los diferentes canales de evidencia (interacción de proteínas, fusión, coexpresión, etc.), corrigiendo la probabilidad aleatoria de observar una interacción. Una puntuación de base de datos alta significó que había alta evidencia experimental o predicha, para la interacción gen-gen funcional. Por lo tanto, se construyó una red asociada funcional sobre la base del perfil de expresión de las proteínas identificadas en el presente estudio.

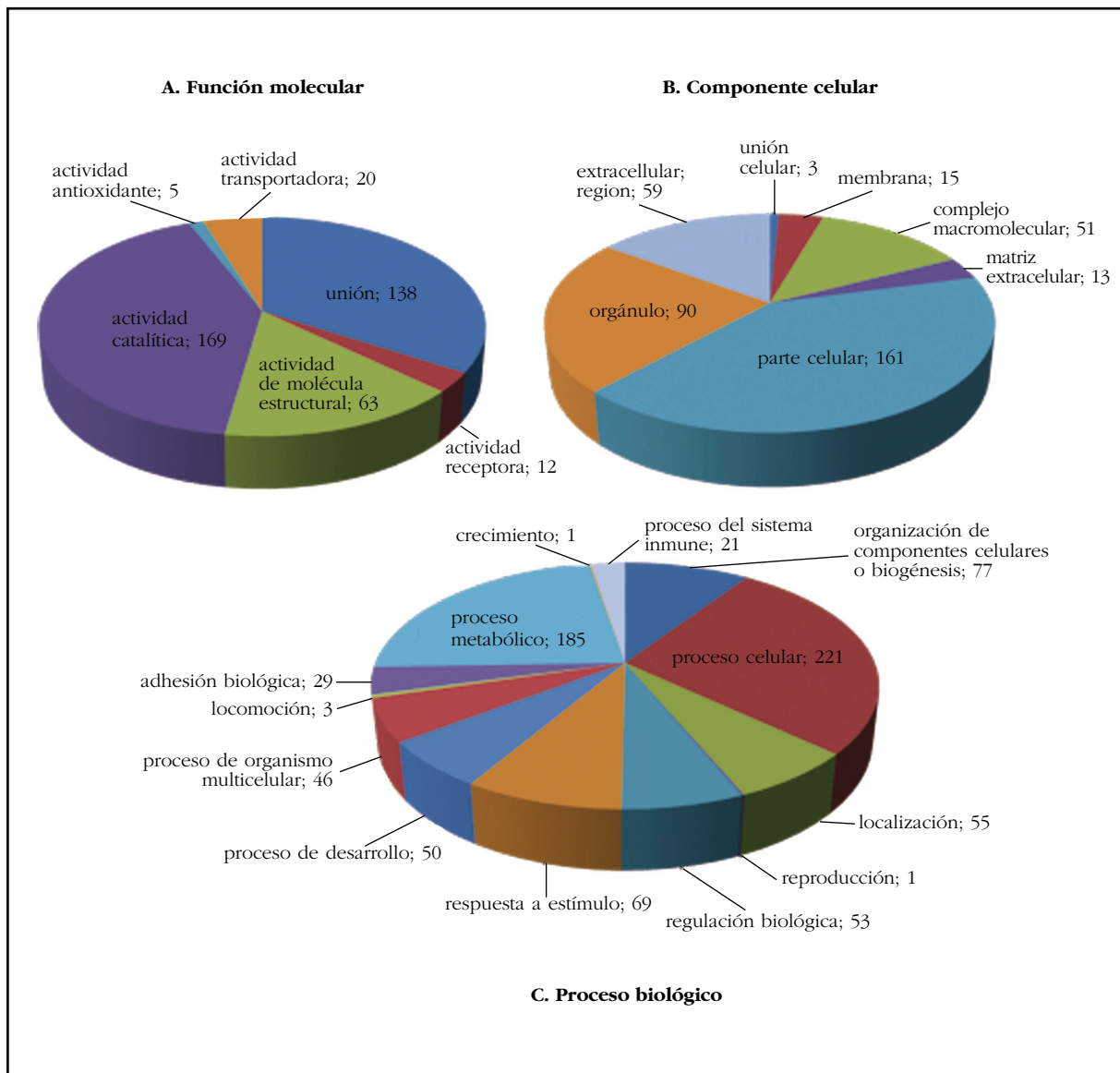
Resultados

Ontología de genes

Se identificaron 530 proteínas procedentes de las muestras procesadas ($p < 0,05$; valor $q = 0$). Todas las proteínas identificadas fueron clasificadas utilizando las anotaciones de ontología de genes y agrupadas en los tres grupos funcionales: procesos biológicos, componentes celulares y funciones moleculares (Figura 1).

El análisis de la ontología de genes mostraba que las dos funciones moleculares más comunes en la selección realizada fueron funciones relacionadas con actividad catalítica (GO:0003824) y con unión (GO:0005488). En cuanto al análisis del componente celular, el más frecuente fue el de porción celular (GO:0044464), seguido de orgánulo (GO:0043226) y región extracelular (GO:0005576); como procesos biológicos destacaron los relacionados con procesos celulares (GO:0009987), procesos metabólicos (GO:0008152) y organización o biogénesis de componentes celulares (GO:0071840).

Figura 1. Clasificación proteica basada en ontología de genes según funciones moleculares (A), componente celular (B) y proceso biológico (C)



En la tabla 1 se muestra la clasificación principal según GO de las proteínas que han sido identificadas clasificadas en clases proteicas. Cabe destacar una elevada proporción de proteínas de unión a calcio.

Comparación de proteínas

De las 530 proteínas identificadas en el estudio proteómico, 37 proteínas coincidieron con proteínas ya descritas en patologías vasculares, algunas de las cuales eran reincidentes en distintas patologías vasculares (Tabla 1). Estas proteínas se seleccionaron como candidatas para realizar un estudio de su red biológica con el objeto de conocer su relación con la calcificación vascular en la arteria femoral (Figura 2).

Redes funcionales

Las 37 proteínas de interés dieron como resultado una red funcional extensa donde se observa un núcleo que representa la calcificación de la arteria

femoral donde confluyen numerosas proteínas que forman parte además, de otras patologías relacionadas (Figura 3).

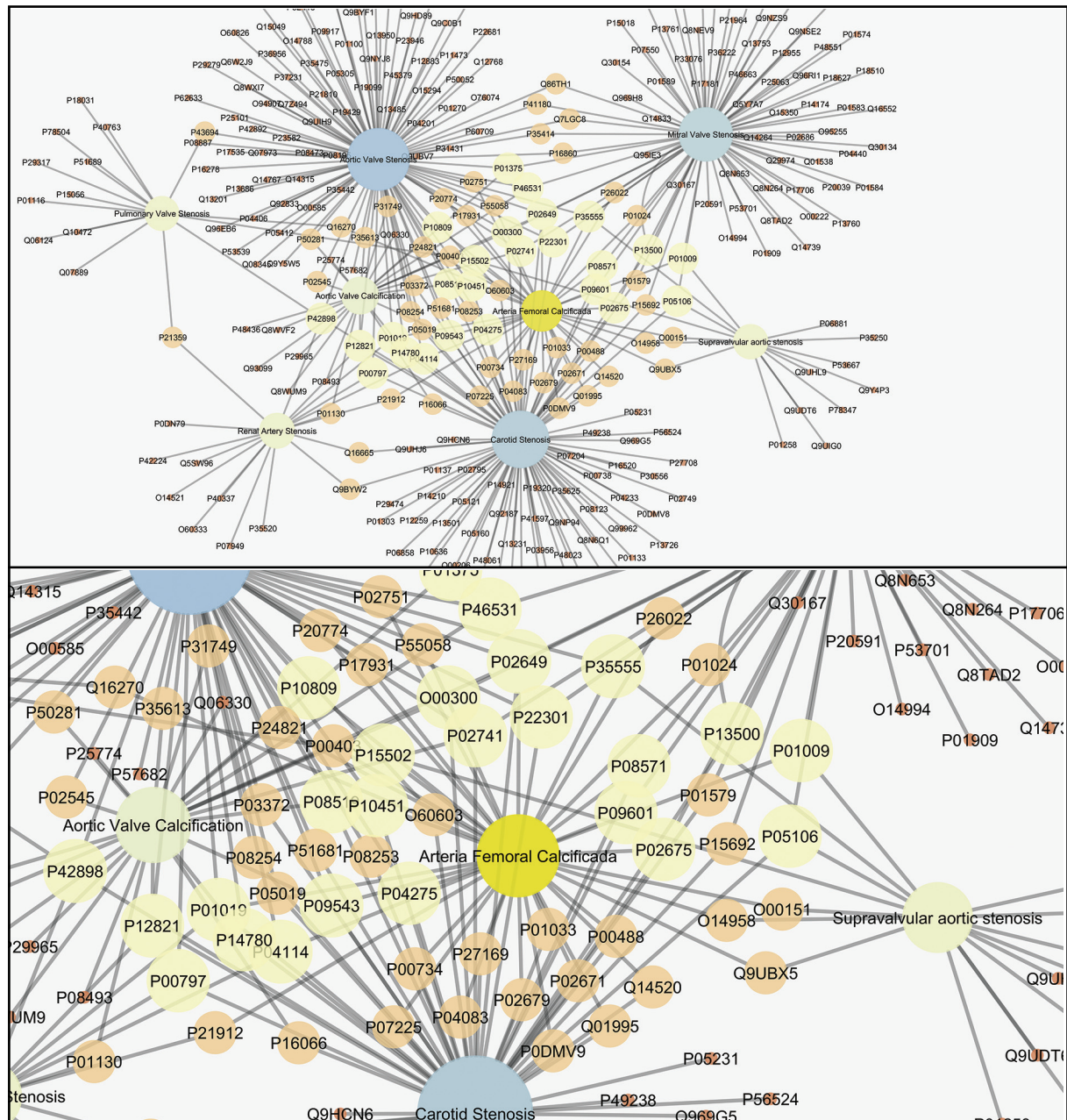
A esta primera red funcional, se añadieron 5 proteínas más, relacionadas con la red inicial (Figura 4). La adición de este segundo nivel permitió encontrar dos de las cinco proteínas incluidas en la red como posibles biomarcadores específicos de calcificación de arteria femoral, al no encontrarse en el resto de patologías relacionadas estudiadas.

Estas dos proteínas fueron además identificadas en nuestro análisis proteómico (subunidad flavoproteica de la succinato deshidrogenasa (SDHA, P31040); proteína de choque térmico de 10 kDa, mitocondrial (HSP1, P61604), expresándose en las muestras de pacientes con calcificación de la arteria femoral. Por tanto, fueron las seleccionadas como las dos primeras candidatas para comenzar su estudio en mayor profundidad.

Tabla 1. Clasificación de las proteínas por Clases según GO

Clase proteica	ID Clase	Cantidad	%
Proteína reguladora/adaptadora del receptor transmembrana	PC00226	1	0,2
Proteína de almacenamiento	PC00210	2	0,4
Proteína de unión celular	PC00070	3	0,6
Ligasa	PC00142	8	1,6
Chaperona	PC00072	9	1,8
Isomerasa	PC00135	9	1,8
Molécula de adhesión celular	PC00069	11	2,2
Liasa	PC00144	12	2,4
Proteína de tráfico de membrana	PC00150	12	2,4
Factor de transcripción	PC00218	12	2,4
Proteína estructural	PC00211	12	2,4
Proteína de defensa/inmunidad	PC00090	13	2,7
Receptor	PC00197	13	2,7
Proteína de matriz extracelular	PC00102	15	3,1
Transportadora	PC00227	16	3,3
Proteína de unión a calcio	PC00060	17	3,5
Proteína de transferencia/portadora	PC00219	17	3,5
Transferasa	PC00220	22	4,5
Unión a ácido nucleico	PC00171	31	6,3
Molécula de señalización	PC00207	31	6,3
Oxido-reductasa	PC00176	34	6,9
Modulador enzimático	PC00095	37	7,6
Hidrolasa	PC00121	48	9,8
Proteína citoesquelética	PC00085	61	12,4

Figura 2. Visualización de los nexos proteicos entre diversas patologías vasculares relacionadas, mediante *Cytoscape*



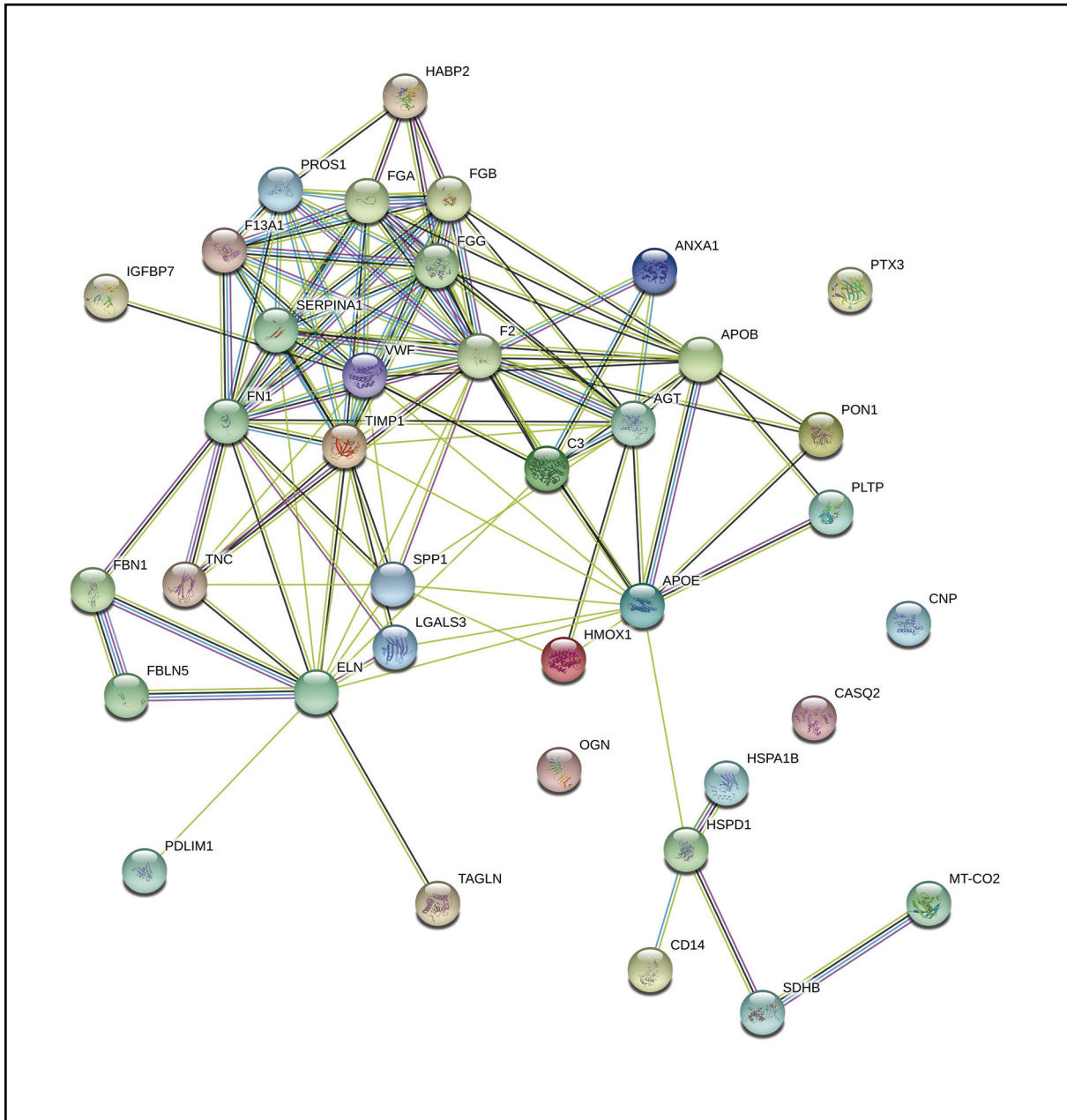
Discusión

La DM2 actualmente representa un grave problema de salud ya que afecta a una gran proporción de la población. Los pacientes con DM2 tienen un mayor riesgo de desarrollar diversas complicaciones, principalmente eventos cardiovasculares que representan la principal causa de mortalidad de esta enfermedad. La probabilidad de desarrollar complicaciones vasculares en esta población depende de una serie de factores tradicionales y otros que no se conocen completamente. La identificación de nuevos factores involucrados en estos trastornos puede facilitar el diagnóstico temprano de los sujetos de alto riesgo antes de que se produzcan daños irre-

versibles. El objetivo del presente estudio fue la identificación de proteínas en tejido vascular que podrían estar relacionadas con procesos de calcificación vascular y, por tanto, con un mayor riesgo cardiovascular en sujetos con DM2.

Los estudios de identificación de biomarcadores a nivel proteómico presentan una elevada complejidad debido a la gran cantidad de proteínas y vías implicadas en las diferentes patologías, la interacción entre proteínas, las diferencias proteicas dependiendo del tejido de estudio, los elevados costes tecnológicos, entre otros. Todo ello, además de la gran cantidad de datos a procesar que se generan en estos estudios, dificulta, en

Figura 3. Red funcional de las 37 proteínas identificadas mediante *nLC-MS/MS* en muestras de arteria femoral calcificada de pacientes con DM2, descritas previamente en patologías vasculares



muchas ocasiones, la identificación de biomarcadores reales de una determinada patología. A todo esto hay que sumar la dificultad de obtener muestras tisulares procedentes de sujetos controles para poder realizar un estudio comparativo entre los diferentes grupos de estudio.

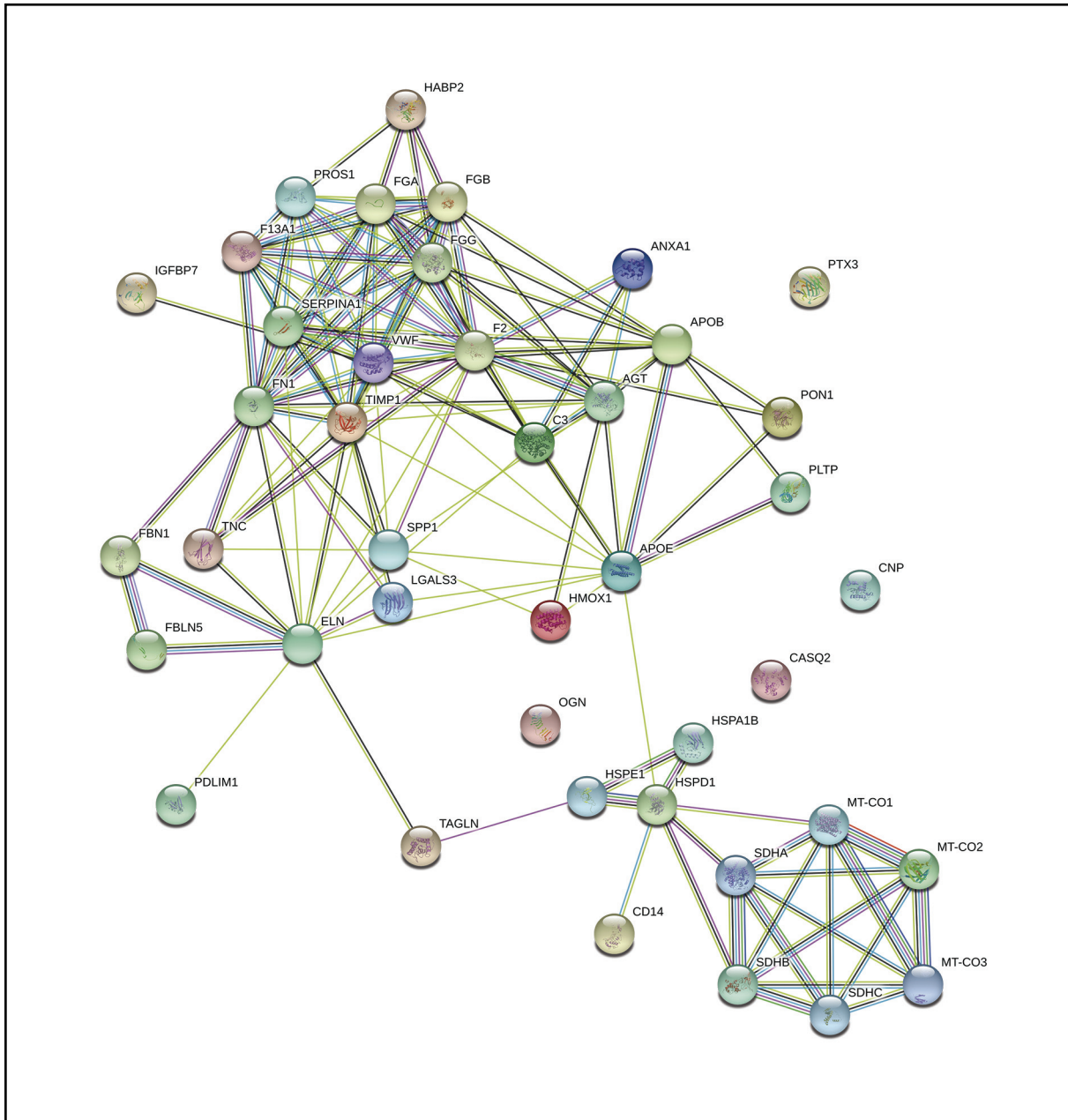
El uso de herramientas bioinformáticas permite, en gran medida, solventar muchos de los inconvenientes que se plantean en los estudios de identificación de biomarcadores. El uso de estas herramientas facilita el estudio, la comparación y la correlación de datos hallados experimentalmente; la predicción de dominios, estructuras y relaciones filogenéticas de las secuencias examinadas; el desarrollo de algoritmos y estadística necesario para la comprensión de la información biológica, interconectan-

do información desde diferentes enfoques. La información aportada por estas herramientas permite, además, una orientación del trabajo científico ofreciendo claves que permiten un ahorro de tiempo y de recursos económicos y humanos.

Hoy en día las herramientas bioinformáticas, disponibles de manera gratuita en la red y cada vez más eficientes para estudios *in silico*, están en auge.

En este estudio se establece un método sencillo e intuitivo para localizar biomarcadores relacionados con los procesos de calcificación vascular. Tras la identificación de 530 proteínas correspondientes al perfil proteico característico de arteria femoral con presencia de calcificación de pacientes con DM2 mediante *nLC-MS/MS*, se han empleado diver-

Figura 4. Red funcional de las 37 proteínas identificadas mediante *nLC-MS/MS* en muestras de arteria femoral calcificada de pacientes con DM2, descritas previamente en patologías vasculares, tras la adición de 5 nuevas proteínas relacionadas



sas estrategias bioinformáticas para acotar y filtrar la búsqueda de biomarcadores, así como descartar aquellas que no estuvieran relacionadas con patologías vasculares. En primer lugar, se ha empleado la metodología *gen ontology*, que se centra en el estudio de las funciones del grupo de genes correspondientes a las proteínas identificadas, con el objeto de seleccionar aquellas funciones más relacionadas con procesos implicados en la calcificación vascular. La función molecular mayoritaria de los genes codificantes de las proteínas identificadas fue la función catalítica y la de unión. Estudios recientes han demostrado que, en un entorno calcificante, las células del músculo liso vascular son capaces de sufrir una transición fenotípica a células similares a osteocitos capaces de expresar marcadores

típicos óseos, contribuyendo de esta forma, a la mineralización arterial¹². No es de extrañar que, en estas condiciones, se produzca un incremento de las proteínas que unen calcio, contribuyendo así al depósito de calcio en la pared arterial. Estos procesos dan lugar al desarrollo de los procesos ateroscleróticos tan frecuentes en los pacientes con DM2. Estudios recientes muestran que los macrófagos que rodean los depósitos de calcio en las placas ateroscleróticas humanas son fenotípicamente defectuosos e incapaces de reabsorber la calcificación¹³. En esta línea, la identificación de proteínas con actividad catalítica en las muestras vasculares analizadas, con presencia de calcificaciones, podría reflejar un mecanismo de defensa del organismo para tratar de disgregar los compo-

nentes de la placa de ateroma generada en estas situaciones. De acuerdo a esta hipótesis, existen estudios que muestran un aumento de marcadores de resorción ósea en pacientes con patologías vasculares^{14,15}.

Con el objetivo de dirigir y acotar el estudio de identificación de biomarcadores, se realizó una comparación de las 530 proteínas identificadas en el proteoma de los sujetos de estudio con aquellas descritas como proteínas implicadas en diversas patologías vasculares, en el repositorio de marcadores moleculares Disgenet. Mediante el uso de esta herramienta, se redujo el número de proteínas candidatas a 37, que son las proteínas que se encuentran expresadas de forma común en diversas patologías vasculares asociadas a procesos de calcificación vascular. La disposición de estos nexos proteicos en una red biológica muestra una potencial capacidad como biomarcador de algunas de las proteínas, que participan en diversas patologías vasculares.

El diseño de redes de interacción específica entre cada una de las 37 proteínas seleccionadas mostró una red de interacción bien formada, en la que se aprecia una estrecha relación entre la mayoría de estas proteínas. Entre estas proteínas, encontramos algunas que podrían estar indirectamente relacionadas con procesos de calcificación, como son la osteopontina y la osteoglicina, ambas implicadas en procesos de biomineralización y remodelación ósea. Así mismo, también identificamos proteínas musculares típicas de células del músculo liso vascular como transgelina o tropoelastina, lo que podría indicar la pérdida del fenotipo vascular. La presencia de otras proteínas de interés identificadas, pero que no pasaron el nivel de significación estadística, como es el caso de la osteoprotegerina o la proteína GLA de la matriz, podría deberse al bajo número de sujetos de estudio, lo que genera una variabilidad lo suficientemente elevada como para descartarlas estadísticamente. No obstante, al aumentar en 5 proteínas la red de interacción, añadiendo las cinco primeras proteínas estrechamente más vinculadas a las dispuestas en la primera red, observamos que 2 de ellas forman parte del proteoma característico de las muestras de tejido vascular analizadas. Una de ellas, la subunidad flavo-proteica de la succinato deshidrogenasa (P31040), está involucrada en diversos procesos, como la síntesis de fumarato a succinato en el ciclo del ácido tricarbóxico del metabolismo de carbohidratos, o en procesos de óxido-reducción, entre otros. La deficiencia de la succinato deshidrogenasa está relacionada con un menor flujo de electrones y una disminución de la actividad antioxidante en la cadena respiratoria, aumentando el estrés oxidativo y la hipoxia, con importantes consecuencias en el proceso de calcificación vascular. La presencia de esta proteína en tejido vascular calcificado, podría estar relacionada con un mecanismo defensivo para preservar la producción de energía aeróbica en el estado de hipoxia generado en el proceso de calcificación vascular durante la aterosclerosis¹⁶. La otra, una proteína de choque

térmico de 10 kDa, mitocondrial (HSPE1, P61604), es una co-chaperona implicada en la importación de proteínas mitocondriales y ensamblaje macromolecular. Además, está también implicada en la diferenciación osteoblástica y en la activación de la actividad endopeptidasa durante el proceso apoptótico.

El hecho de que estas dos proteínas no aparezcan en el resto de las patologías relacionadas que se compararon en el estudio, hace pensar que podrían ser dos buenas candidatas para sugerirlas como biomarcadores específicos de aterosclerosis en miembros inferiores en DM2.

Nuestro estudio tiene ciertas limitaciones. En primer lugar, la inexistencia de sujetos controles imposibilita la comparación con un grupo de estudio de referencia. En segundo lugar, el reducido número de sujetos incluidos en el estudio origina una elevada variabilidad de los resultados, limitando la identificación de potenciales proteínas de interés.

Aunque son necesarios estudios futuros para confirmar el papel de las proteínas identificadas como posibles biomarcadores de calcificación vascular en pacientes diabéticos, el uso de herramientas bioinformáticas nos ha permitido poder generar hipótesis sobre las que trabajar gracias a la simplificación de la gran cantidad de datos obtenidos. La identificación de proteínas con un elevado grado de expresión en tejido vascular calcificado en pacientes de elevado riesgo cardiovascular podría ofrecer información para lograr un tratamiento temprano y dirigido.

Financiación: El presente trabajo ha sido financiado a través de una beca de investigación de la FSEEN en la convocatoria 2016 y de un proyecto de la Junta de Andalucía (PI0207-2016).

Conflicto de intereses: Los autores declaran que no existen conflictos de interés, así como haber leído y actuado conforme a los preceptos de la declaración de Helsinki sobre estudios clínicos.

Bibliografía

1. Lowell BB, Shulman GI. Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science*. 2005;307(5708):384-7.
2. Jensen MK, Bertoia ML, Cahill LE, Agarwal I, Rimm EB, Mukamal KJ. Novel metabolic biomarkers of cardiovascular disease. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(11):659-72.
3. He C, Yang J, Li Y, Rong J, Du F, Yang Z, et al. Comparison of lower extremity atherosclerosis in diabetic and non-diabetic patients using multidetector computed tomography. *BMC Cardiovasc Disord*. 2014;14:125.
4. Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger AM, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*. 1998;97(18):1837-47.
5. Wilson PW. Diabetes mellitus and coronary heart disease. *Am J Kidney Dis*. 1998;32(5 Suppl 3):S89-100.
6. Eng JK, McCormack AL, Yates JR. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J Am Soc Mass Spectrom*. 1994;5(11):976-89.

7. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet.* 2000;25(1):25-9.
8. Harris MA, Clark J, Ireland A, Lomax J, Ashburner M, Foulger R, et al. The Gene Ontology (GO) database and informatics resource. *Nucleic Acids Res.* 2004;32:D258-261.
9. Piñero J, Queralt-Rosinach N, Bravo À, Deu-Pons J, Bauer-Mehren A, Baron M, et al. DisGeNET: a discovery platform for the dynamical exploration of human diseases and their genes. *Database J Biol Databases Curation.* 2015;2015:bav028.
10. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-504.
11. von Mering C, Jensen LJ, Snel B, Hooper SD, Krupp M, Foglierini M, et al. STRING: known and predicted protein-protein associations, integrated and transferred across organisms. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:D433-7.
12. Zhu D, Mackenzie NCW, Millán JL, Farquharson C, MacRae VE. The appearance and modulation of osteocyte marker expression during calcification of vascular smooth muscle cells. *PloS One.* 2011;6(5):e19595.
13. Chinetti-Gbaguidi G, Daoudi M, Rosa M, Vinod M, Louvet L, Copin C, et al. Human alternative macrophages populate calcified areas of atherosclerotic lesions and display impaired RANKL-induced osteoclastic bone resorption activity. *Circ Res.* 2017;121(1):19-30.
14. Morisawa T, Nakagomi A, Kohashi K, Kusama Y, Shimizu W. Serum Tartrate-resistant acid phosphatase-5b levels are associated with the severity and extent of coronary atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb.* 2017;24(10):1058-68.
15. Pasqualini L, Ministrini S, Macura A, Marini E, Leli C, Siepi D, et al. Increased bone resorption: a possible pathophysiological link between hypovitaminosis D and peripheral arterial disease. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 2016;52(3):352-9.
16. Lukyanova LD, Kirova YI. Mitochondria-controlled signaling mechanisms of brain protection in hypoxia. *Front Neurosci.* 2015;9:320.