

Informe de avance la Beca ADUBA

Od. Noelia Sánchez Ratto
Facultad de Odontología
Universidad de Buenos Aires

Título: Estudio proteómico de la saliva de pacientes con espondiloartropatías.

Objetivos:

- Estudiar el perfil proteómico de muestras de saliva provenientes de pacientes con espondiloartropatías.
- Comparar los perfiles proteómicos de espondilitis anquilosante y artritis psoriásica.
- Estudiar la factibilidad de la utilización de la saliva como herramienta de diagnóstico para las espondiloartropatías.
- En el caso de identificar proteínas diferenciales en las muestras de pacientes con espondiloartropatías, se estudiará la posibilidad de su utilización como biomarcadores de la enfermedad.

Desarrollo del trabajo

En esta etapa se reclutaron un total de 98 pacientes con espondiloartropatías (artritis psoriásica y espondilitis anquilosante) de acuerdo a los criterios de inclusión, provenientes del Servicio de Reumatología del Instituto de Rehabilitación Psicofísica, dependiente del Ministerio de Salud de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires situado en Echeverría 955 y 50 pacientes del grupo control provenientes de la Facultad de Odontología- Hospital Odontológico Universitario de la Universidad de Buenos Aires.

Criterios de inclusión: mayores de 18 años, con diagnóstico clínico de espondiloartropatías (artritis psoriásica y espondilitis anquilosante) (criterios ASAS, 2009).

Criterios de exclusión: Pacientes con diagnóstico de: hepatitis C, HIV, enfermedad renal, diabetes. Individuos con valores alterados en el coagulograma. Pacientes que recibieron medicación antibiótica en forma local-general en los últimos ocho meses, o hayan sido sometidos a algún tratamiento antibiótico profiláctico. Pacientes fumadores. Pobre higiene oral. Mujeres embarazadas. Pacientes bajo tratamiento con radiación o quimioterapia. Pacientes que no aceptaron su participación en este estudio a través del Consentimiento Informado.

A todos los pacientes se les realizó una historia clínica médica-odontológica. Las variables médicas que se detallan abajo, fueron realizadas por los médicos reumatólogos del Instituto de rehabilitación Psicofísica. Las variables odontológicas fueron realizadas por la odontóloga becaria.

Toma de saliva

La toma de las muestras de saliva total se realizó con 90 minutos de ayuno.

Sin estimulación: luego de un buche con agua se le solicitó al paciente que junte saliva en su cavidad bucal y luego salive en un tubo estéril y milimetrado, la toma duró 5 minutos.

Las muestras recolectadas en frío, se alicuotaron, se centrifugaron durante 5 minutos a 8000 x g y se conservaron a -70° C. Se determinó la concentración de proteínas de las muestras de saliva, mediante el método de Bradford.

Procesamiento de las muestras de saliva

Las muestras de saliva proveniente de pacientes con artritis psoriásica fueron procesadas agregando buffer bicarbonato de amonio a una concentración final 50 mM a pH 8, luego se redujeron con DTT 20 mM durante 45 minutos a 56° C, se alquilaron con Iodoacetamida 20 mM durante 45 minutos en oscuridad y se digirieron con tripsina durante toda la noche. Las muestras se liofilizaron utilizando una Speed Vac y se resuspendieron en 10 μ l de ácido fórmico 0,1%. Luego las muestras se analizaron por medio de un nanoHPLC acoplado a un espectrómetro de masa con tecnología Orbitrap. Este último está compuesto por un electrodo exterior con forma de barril dividido en su centro y un electrodo interior coaxial con forma de huso que genera un campo electrostático. Las muestras ionizadas se inyectaron tangencialmente en un campo eléctrico. Luego, los péptidos ionizados con una relación masa-carga específica oscilaron en forma de anillos alrededor del huso central, generando una señal-imagen cuya frecuencia pudo medirse por la relación masa-carga. Teniendo en consideración que la frecuencia de estas oscilaciones armónicas es independiente de la velocidad del ion y es inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación masa-

Este estudio proteómico se realizó en el Instituto CEQUIEBEM, perteneciente a la Facultad de Ciencias Exactas.

Análisis de los Datos

A partir de la base de datos obtenida se analizaron los espectros con el programa Proteome Discoverer. El programa es un motor de búsqueda en el cual se debe seleccionar la base de datos y ciertas características vinculadas a la forma en que fue tratada la muestra. El programa desarrolla un informe donde indica que proteínas fueron identificadas y los péptidos que utilizó para esta identificación a partir de los datos de tratamiento de las muestras y a los datos crudos obtenidos del espectrómetro de masa. A partir de los péptidos identificados es posible determinar las proteínas presentes y su nivel de expresión. En este estudio se asignó un nivel de confianza High para los péptidos.

El análisis bioinformático se llevó a cabo con los programas Venny graphic y de String.

Resultados

En esta etapa solo se estudiaron las muestras salivales provenientes de pacientes con artritis psoriásica. Fueron identificadas 214 proteínas en las muestras de saliva total en pacientes con diagnóstico de artritis psoriásica con y sin enfermedad periodontal.

Se adjunta a modo de ejemplo una de las planillas con las proteínas identificadas.

A	B	C	D	E	F	G	H	I
Entry	Entry name	Status	Protein nar	Gene name	Organism	Length		
H7BZQ8	H7BZQ8_H	unreviewed	Pancreatic	AMY2A	Homo sapi	209		
P04259	P04259	reviewed	Keratin, ty	KRT6B K6B	Homo sapi	564		
P08779	P08779	reviewed	Keratin, ty	KRT16 KRT	Homo sapi	473		
P02533	P02533	reviewed	Keratin, ty	KRT14	Homo sapi	472		
P07355	P07355	reviewed	Annexin A2	ANXA2	Homo sapi	339		
P35579	P35579	reviewed	Myosin-9 (K	MYH9	Homo sapi	1960		
P02545	P02545	reviewed	Prelamin-A	LMNA	Homo sapi	664		
P04792	P04792	reviewed	Heat shock	HSPB1	Homo sapi	205		
P12035	P12035	reviewed	Keratin, ty	KRT3	Homo sapi	628		
P15924	P15924	reviewed	Desmoplak	DSP	Homo sapi	2871		
Q961E7	Q961E7	reviewed	ERO1-like B	ERO1A	Homo sapi	468		
Q15084	Q15084	reviewed	Protein dis	PDIAG	Homo sapi	440		
Q04695	Q04695	reviewed	Keratin, ty	KRT17	Homo sapi	432		
Q9ULZ3	Q9ULZ3	reviewed	Apoptosis-i	PYCARD	Homo sapi	195		
P67936	P67936	reviewed	Tropomyos	TPM4	Homo sapi	248		
P13797	P13797	reviewed	Plastin-3 (T	PLS3	Homo sapi	630		
Q01546	Q01546	reviewed	Keratin, ty	KRT76 KRT	Homo sapi	638		
P23141	P23141	reviewed	Liver carb	CES1	Homo sapi	567		
P40926	P40926	reviewed	Malate deh	MDH2	Homo sapi	338		
P55058	P55058	reviewed	Phospholip	PLTP	Homo sapi	493		
P31946	P31946	reviewed	14-3-3 pro	YWHA	Homo sapi	246		
P22532	P22532	reviewed	Small proli	SPRR2D	Homo sapi	72		
E9PQD6	E9PQD6_H	unreviewed	Serum amy	SAA1	Homo sapi	122		
Q8N1N4	Q8N1N4	reviewed	Keratin, ty	KRT78 K5B	Homo sapi	520		
P35326	P35326	reviewed	Small proli	SPRR2A	Homo sapi	72		
P13639	P13639	reviewed	Elongation	EEF2	Homo sapi	858		
P61981	P61981	reviewed	14-3-3 pro	YWHA	Homo sapi	247		
P27797	P27797	reviewed	Calreticul	CALR	Homo sapi	417		
FBW151	FBW151_H	unreviewed	Keratin, ty	KRT74	Homo sapi	543		
P07384	P07384	reviewed	Calpain-1 c	CAPN1	Homo sapi	714		
P21333	P21333	reviewed	Filamin-A (I	FLNA	Homo sapi	2647		
P00491	P00491	reviewed	Purine nuc	PNP	Homo sapi	289		
P06703	P06703	reviewed	Protein S1	S100A6	Homo sapi	90		
P29373	P29373	reviewed	Cellular ret	CRABP2	Homo sapi	138		
HOYLF3	HOYLF3_HU	unreviewed	Beta-2-mic	B2M	Homo sapi	71		
P01780	P01780	reviewed	Immunoglc	IGHV3-7	Homo sapi	117		
P31151	P31151	reviewed	Protein S1	S100A7	Homo sapi	101		
P15531	P15531	reviewed	Nucleoside	NME1	Homo sapi	152		

Figura 1: Planilla de los datos provista por el Proteome Discoverer a partir de las muestras de saliva de pacientes con artritis psoriasisica.

Luego se estudiaron por el programa Venny graphic y se analizaron parcialmente por el programa String.

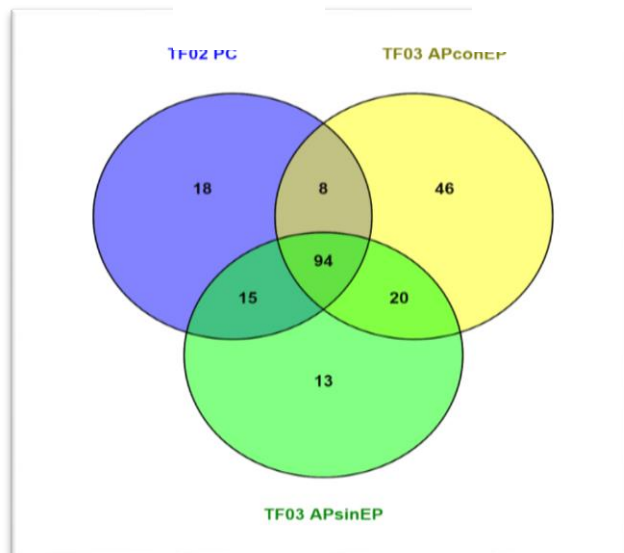


Figura 2: Análisis de los datos utilizando el programa Venny graphic.

1: mue po control.

2: muestras de saliva provenientes de pacientes con artritis psoriásica con enfermedad periodontal.

3: muestras de saliva provenientes de pacientes con artritis psoriásica sin enfermedad periodontal.

Se observa en el diagrama de Venn que se identificaron 46 proteínas únicas en las muestras salivales de pacientes con artritis psoriásica con enfermedad periodontal, 13 proteínas únicas en pacientes con artritis psoriásica sin enfermedad periodontal.

Las muestras se analizaron por el programa de String para analizar sus posibles relaciones de las proteínas.

3

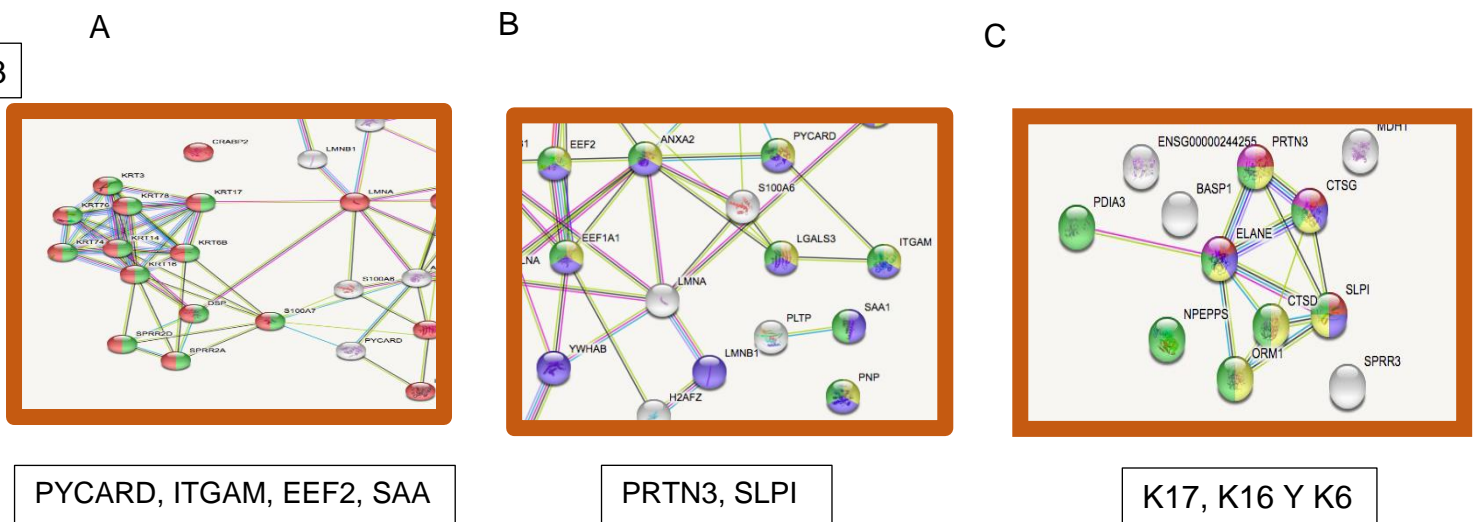


Figura 3: Fragmentos del diagrama correspondiente al análisis de las muestras de saliva provenientes de pacientes artritis psoriásica con y sin enfermedad periodontal utilizando el programa STRING. Debajo de cada fragmento del diagrama se destacan las proteínas más relevantes.

A y B: Fragmentos del análisis de muestras de artritis psoriásica con enfermedad periodontal.

C: Fragmento del análisis de muestras de artritis psoriásica sin enfermedad periodontal.

En este primer análisis las proteínas provenientes de las muestras salivales provenientes de pacientes con diagnóstico de artritis psoriásica con y sin enfermedad periodontal que se expresan en forma diferencial en cada grupo, son: K17, K16, K6, PYCARD, ITGAM, EEF2, SAA, PRTN3, SLPI. Todas estas proteínas se encuentran involucradas en vías metabólicas implicadas en la patogénesis de la enfermedad sistémica.

En una segunda etapa se estudiaron las muestras salivales de pacientes adultos sin ninguna enfermedad sistémica emparejados por género, edad y sexo con el grupo de pacientes con

espondilitis anquilosantes. Fueron identificadas 167 proteínas en las muestras de saliva total en pacientes con diagnóstico de espondilitis anquilosante en relación con su respectivo grupo control.

A continuación se muestra el listado parcial de las proteínas encontradas

A	B	C	D	E	F	G	H
Entry	Entry name	Status	Protein name	Gene name	Organism	Length	
H7BZQ8	H7BZQ8_H	unreviewed	Pancreatic	AMY2A	Homo sapiens	209	
P04259	P04259	reviewed	Keratin, type I	KRT6B	Homo sapiens	564	
P08779	P08779	reviewed	Keratin, type I	KRT16	Homo sapiens	473	
P02533	P02533	reviewed	Keratin, type I	KRT14	Homo sapiens	472	
P07355	P07355	reviewed	Annexin A2	ANXA2	Homo sapiens	339	
P35579	P35579	reviewed	Myosin-9	MYH9	Homo sapiens	1960	
P02545	P02545	reviewed	Prelamin-A	LMNA	Homo sapiens	664	
P04792	P04792	reviewed	Heat shock protein	HSPB1	Homo sapiens	205	
P12035	P12035	reviewed	Keratin, type I	KRT3	Homo sapiens	628	
P15924	P15924	reviewed	Desmoplakin	DSP	Homo sapiens	2871	
Q96HE7	Q96HE7	reviewed	ERO1-like protein	ERO1A	Homo sapiens	468	
Q15084	Q15084	reviewed	Protein disulfide isomerase	PDI	Homo sapiens	440	
Q04695	Q04695	reviewed	Keratin, type I	KRT17	Homo sapiens	432	
Q9ULZ3	Q9ULZ3	reviewed	Apoptosis-inducing factor	PIF1	Homo sapiens	195	
P67936	P67936	reviewed	Tropomyosin	TPM4	Homo sapiens	248	
P13797	P13797	reviewed	Plastin-3	PLS3	Homo sapiens	630	
Q01546	Q01546	reviewed	Keratin, type I	KRT76	Homo sapiens	638	
P23141	P23141	reviewed	Liver carboxylase	CES1	Homo sapiens	567	
P40926	P40926	reviewed	Malate dehydrogenase	MDH2	Homo sapiens	338	
P55058	P55058	reviewed	Phospholipase	PLTP	Homo sapiens	493	
P31946	P31946	reviewed	14-3-3 protein	YWHAH	Homo sapiens	246	
P22532	P22532	reviewed	Small proline-rich protein	SPRR2D	Homo sapiens	72	
E9PQD6	E9PQD6	unreviewed	Serum amyloid A	SAA1	Homo sapiens	122	
Q8N1N4	Q8N1N4	reviewed	Keratin, type I	KRT78	Homo sapiens	520	
P35326	P35326	reviewed	Small proline-rich protein	SPRR2A	Homo sapiens	72	
P13639	P13639	reviewed	Elongation factor	EEF2	Homo sapiens	858	
P61981	P61981	reviewed	14-3-3 protein	YWHAQ	Homo sapiens	247	
P27797	P27797	reviewed	Calreticulin	CALR	Homo sapiens	417	
F8W1S1	F8W1S1	unreviewed	Keratin, type I	KRT74	Homo sapiens	543	
P07384	P07384	reviewed	Calpain-1	CAPN1	Homo sapiens	714	
P21333	P21333	reviewed	Filamin-A	FLNA	Homo sapiens	2647	
P00491	P00491	reviewed	Purine nucleoside phosphorylase	PNP	Homo sapiens	289	
P06703	P06703	reviewed	Protein S100	S100A6	Homo sapiens	90	
P29373	P29373	reviewed	Cellular reticulocaldesmon	CRABP2	Homo sapiens	138	
HOYLF3	HOYLF3	unreviewed	Beta-2-microglobulin	B2M	Homo sapiens	71	
P01780	P01780	reviewed	Immunoglobulin	IGHV3-7	Homo sapiens	117	
P31151	P31151	reviewed	Protein S100	S100A7	Homo sapiens	101	
P15531	P15531	reviewed	Nucleoside diphosphate kinase	NME1	Homo sapiens	152	
P17931	P17931	reviewed	Galectin-3	LGALS3	Homo sapiens	250	

Figura 4: Planilla de los datos provista por el Proteome Discoverer a partir de las muestras de saliva de pacientes con espondilitis anquilosante

Luego se estudiaron por el programa Venny graphic y se analizaron parcialmente por el programa String

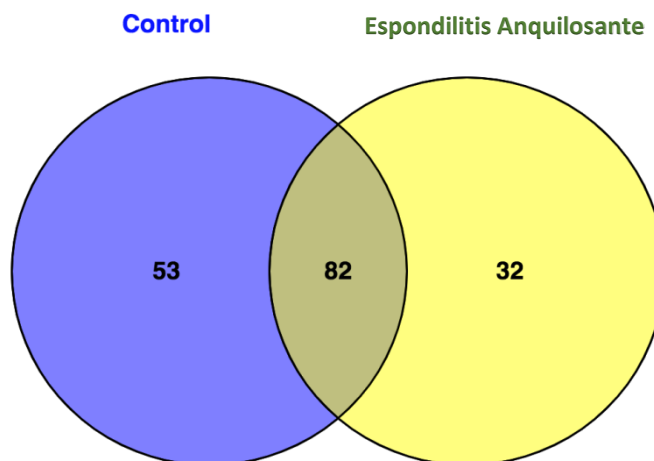


Figura 5 Análisis de los datos utilizando programa Venny graphic. A través de éste diag se encontraron 53 proteínas únicas en el grupo de control; del mismo modo se encontraron 32 proteínas

únicas en la saliva de pacientes con espondilitis anquilosante, mientras que 82 proteínas fueron compartidas por ambos grupos.

Las proteínas encontradas solo en muestra de saliva de pacientes con espondilitis anquilosante se analizaron por el programa de String para analizar sus posibles relaciones de las proteínas.

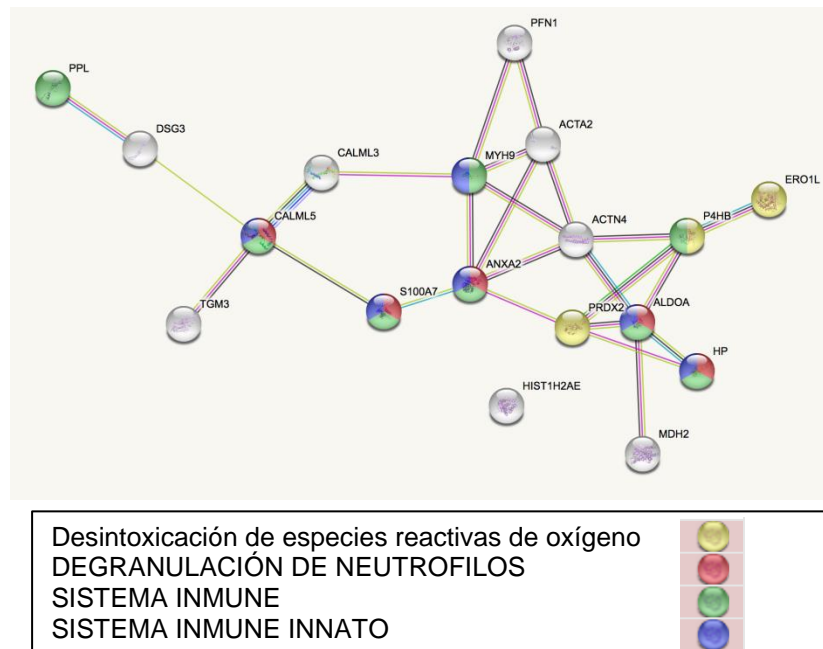


Figura 6: gráfico extraído del programa String que arroja las relaciones de proteínas.

Se observa que las proteínas representadas por círculos coloreados en azul, verde y rojo están relacionadas con formas de señalización relacionadas con el sistema inmune. Entre estas proteínas se investigó la Haptoglobina (HP).

La HP es una proteína de fase aguda sintetizada en el hígado y juega un papel importante en el metabolismo de la hemoglobina.

Liu y col. estudiaron el péptido señal de HP como péptidos número / decantador de unión a HLA-B * 27. Los programas utilizados se basaron en motivos de secuencia específicos de alelos HLA que corresponden a los aminoácidos que anclan los péptidos en los surcos de unión a péptidos de las moléculas HLA. Sus resultados pueden sugerir que pre-Hp tiene epítopos de afinidad mucho más alta que se unen a HLA-B * 2705 que la unión a otras moléculas de HLA-I. Por lo tanto, estos péptidos se consideran más fácilmente como antígenos y pueden ser presentados por moléculas HLA en individuos positivos para HLAB * 2705. Sugieren al menos que la pre-haptoglobina es una proteína importante involucrada en

la espondilitis anquilosante y puede ser un nuevo biomarcador y un posible antígeno para dicha patología.

CONCLUSIÓN

La comprensión del proteoma salival humano es un requisito previo para obtener información sobre los procesos fisiológicos y patológicos relevantes para la salud oral y sistémica, y es crucial para la identificación de biomarcadores significativos para enfermedades orales y sistémicas

La haptoglobina y la anexina-2 podrían formar parte de un panel de biomarcadores salivales para la espondilitis anquilosante y artritis psoriásica. Es necesario validar dicho resultado.

Se necesita profundizar aún más en este estudio y realizar otros análisis proteómicos para poder definir proteínas únicas que puedan ser utilizadas como biomarcadores para el diagnóstico y testeo de espondilitis anquilosante y artritis psoriásica.

Nos queda además realizar la etapa de validación de los potenciales marcadores encontrados, que nos llevara un tiempo aún mayor.