

El Estado Actual del Proteoma de *Aspergillus*

Lizzete Ruth Torres y Guillermo Aguilar Osorio*

Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Conjunto E, Facultad de Química, UNAM, Ciudad Universitaria, C.P. 04510. México, D.F., México. Tel: 56225306 E-mail: gao@unam.mx

RESUMEN

La proteómica estudia mezclas complejas de proteínas que proceden de muestras biológicas como cultivos de bacterias u hongos, pero también de plantas o tejidos de mamíferos y nos da información sobre la síntesis de proteínas, su distribución, vías de secreción, así como la respuesta fisiológica de un organismo a la variación de las condiciones ambientales. Estas diferencias son representadas en forma de patrones de proteína obtenidas bajo diferentes condiciones y se denomina patrones de expresión diferencial, que son aprovechados para identificar proteínas útiles en diversas funciones. En el campo biotecnológico, las proteínas de hongos como el género *Aspergillus* poseen un alto impacto en la actividad humana, pues se utilizan en la elaboración de aditivos, alimentos, clarificación de bebidas o en el mejoramiento de la calidad del papel. También se elaboran con ellas medicamentos, antibióticos y otras proteínas que permiten establecer nuevas técnicas de diagnóstico de enfermedades como el cáncer, infecciones bacterianas y de otros tipos. Todo esto es posible gracias a la manipulación de las condiciones ambientales en el medio y la respuesta del hongo ante ellas.

Palabras clave: *Aspergillus*, proteómica, secretoma.

ABSTRACT

Proteomics is the global analysis of complete sets of proteins from a great diversity of complex mixtures of biologic samples. The changes on protein patterns named, differential expression, could provide us information about the function of specific proteins or the response of an organism to environmental changes. This information is used in benefit of society to identify protein to establish new techniques and protocols to diagnose some diseases as cancer, bacterial or virus infections and other kind of conditions. Fungal proteomics has been developed recently, even when some fungus are industrially relevant. *Aspergillus* has a big impact on biotechnology due to its ability to produce antibiotics, drugs, enzymes and food additives. Due to *Aspergillus* is able to grow in unfavorable conditions, is capable to secrete a wide range of enzymes to take advantage of circumstances. Some other secreted proteins are used as antigens to produce specific vaccines. In the end all proteins either extra- or intracellular could come as result of environmental changes.

Key words: *Aspergillus*, proteomics, secretome.

INTRODUCCIÓN

Desde la década pasada, cuando se completó la secuenciación del genoma humano, el desarrollo de nuevas y más eficientes técnicas de secuenciación masiva de DNA, aceleró la generación de conocimiento que prometía proporcionar la información suficiente para entender plenamente los mecanismos biológicos y con esto mejorar la obtención de medicamentos o implementar nuevos tipos de terapias (Thomas *et al.*, 2003). Sin embargo, la información arrojada por el estudio del genoma no ha sido suficiente para comprender la complejidad de los sistemas eucariontes, pues la presencia de un gen no conlleva necesariamente su expresión para producir un RNA mensajero, que a su vez, de lugar a una proteína activa. Proteína, que por otra parte, está sujeta a un riguroso control de activación y demás modificaciones postraduccionales (Glazer *et al.*, 2007). Otras técnicas como los microarreglos y la tecnología de PCR en tiempo real se sumaron a la genómica, y han favorecido la generación de información que permite entender algo más de los sistemas biológicos, abriendo también la puerta a la proteómica (Klein *et al.*, 2004).

El término "Proteómica" fue acuñado a finales de los años 90 para describir el estudio de proteínas a gran escala, es decir, un gran grupo de proteínas que provienen de una misma línea celular u organismo (Pandey *et al.*, 2000). Con estos alcances, pronto fue evidente que la proteómica era una tarea compleja, pues un paso crítico en el establecimiento de las condiciones

particulares de trabajo está relacionado con el tratamiento de la muestra.

Una herramienta muy importante en la proteómica ha sido la electroforesis en dos dimensiones (2 DE) (O'Farrell, 1975). Con esta técnica se dio un salto hacia el estudio de grupos completos de proteínas, no obstante esta prometedora técnica mostraba inconvenientes debidos a la baja reproducibilidad del método, por lo que fue temporalmente abandonada. Tiempo después fue retomada, no sin antes haber sufrido diferentes modificaciones dirigidas a mejorar la resolución de la separación de las proteínas (Görg *et al.*, 2000). A la par nuevas técnicas de análisis y separación de proteínas fueron emergiendo como las denominadas "libres de gel" implementadas originalmente para proteínas de *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*, o las técnicas de Análisis Multidimensional de Proteínas (MudPIT por sus siglas en inglés), que involucran el uso de cromatografía acoplada a espectrometría de masas, sin una separación previa por electroforesis (Washburn *et al.*, 2001). Otras tecnologías de análisis de proteínas más sofisticadas incluyen los arreglos de proteínas (Zhu *et al.*, 2001), la marcación por afinidad isotópica conocida como ICAT (por sus siglas en inglés). Esta técnica consiste en la marcación con biotina unida a protinio (1H) o deuterio (2H) unido a un brazo con marcaje (D0 o D8) y a una iodo acetamida que reacciona covalentemente con tioles unidos a residuos de cisteína de una muestra de proteínas previamente reducida y desnaturalizada (Gygi *et al.*, 1999). Otra

técnica recientemente implementada es el marcaje de aminoácidos en cultivo con isótopos estables (SILAC por sus siglas en inglés), que incorpora aminoácidos con marcaje radioactivo al metabolismo (Ong *et al.*, 2002) o el marcaje isobárico de aminos reactivas acoplado a masas (iTRAQ-MS/MS). Ambos son métodos actualmente utilizados para reducir la complejidad de las mezclas de péptidos (Parviainen *et al.*, 2011). Así, el tratamiento que se dé a las muestras y la concentración de las proteínas de interés dan la pauta para seleccionar el mejor método de análisis, no sin antes sortear dificultades durante la recuperación de proteínas y que se asocian con la presencia de sustancias propias de la naturaleza de la muestra, generando interferencias en los análisis. Independientemente del tipo de separación o análisis elegido, el uso de la proteómica ha incrementado en los últimos años, pues se reconoce su utilidad como una poderosa herramienta de análisis en biotecnología. En el área clínica, las proteínas identificadas por medio de estudios proteómicos son utilizadas como marcadores moleculares, que permiten asociar su presencia directamente con enfermedades específicas como el cáncer o ciertos tipos de infecciones (Encarnación *et al.*, 2005), (Song *et al.*, 2008). La relación que las proteínas guardan con la respuesta de un organismo ante la infección es actualmente investigada con ahínco (Cherkady *et al.*, 2008). Ejemplos de esto son un estudio recientemente publicado sobre el análisis de las proteínas del fluido cerebro espinal

utilizado para identificar infecciones del virus de VIH en etapas tempranas (Angel *et al.*, 2012) o el estudio de las proteasas producidas por *Plasmodium falciparum*, el agente responsable de la malaria (Lilburn *et al.*, 2010). Una de las especies fúngicas patógenas para humanos es *Aspergillus fumigatus*, que es responsable de causar aspergilosis, una infección invasiva muy común en hospitales, y que está asociada con el 90% de mortandad en pacientes inmunocomprometidos (Carberry *et al.*, 2007). No todos los representantes del género *Aspergilli* presentan riesgos para los humanos, pues la mayor parte de estos hongos son saprófitos de vida libre, capaces de utilizar una gran variedad de materiales en descomposición como fuentes de carbono y nitrógeno. Estas características han sido explotadas por las que actualmente poseen particular importancia en el desarrollo de procesos biotecnológicos (Tekaiia *et al.*, 2005). De hecho, son ampliamente utilizados en la industria de alimentos, como en la producción de fermentados de la cocina tradicional japonesa, así como la elaboración de aditivos para alimentos y medicamentos de tipo esteroideo. Algunos procesos que involucran cultivos de hongos incluyen la panificación (Camacho & Aguilar 2003), elaboración y clarificación de bebidas, la producción de antibióticos, enzimas (Polizeli *et al.*, 2005), ácidos orgánicos y alcoholes (Witteveen *et al.*, 1995), así como otros productos farmacéuticos (Bennett, 1998), de tal forma que resulta sorprendente el hecho de que la investigación del proteoma de

Aspergillus este aún restringida a unas cuantas especies.

El propósito de este trabajo es revisar el estado actual de la investigación del proteoma de *Aspergillus*, abordando los inicios de la investigación en esta área, el desarrollo de este campo y una breve revisión cronológica de algunos de los trabajos más representativos sobre la investigación de la respuesta de estos hongos a diferentes condiciones.

Obtención y preparación de la muestra

Los primeros esfuerzos de investigación proteómica no se enfocaron en la separación de las proteínas propiamente, de hecho el principal problema fue obtener mezclas de proteínas con la calidad adecuada para analizar. Esto es; el origen de la mezcla proteica determina el protocolo a seguir. Así, para obtener concentraciones suficientes de las proteínas, que sea de buena calidad y representativas de la

muestra original, es necesario aplicar un tratamiento particular a cada una de ellas, dependiendo de su origen. Esto se debe a que no es lo mismo tratar proteínas de plasma sanguíneo o tejidos humanos o animales que muestras que provienen de tejidos vegetales. En el primer caso, la presencia de proteínas de alta abundancia como albúmina e inmunoglobulina enmascaran a la proteína de interés y suele ser un problema importante y difícil de resolver en estudios de tipo clínico principalmente (Ritorto & Borlak, 2011) mientras que la presencia de sales, polisacáridos y fenoles es un problema más característico de tejidos vegetales e incluso algas (Chan, *et al.*, 2002). Retirar impurezas de la muestra no es una trivialidad pues representa buena parte del trabajo total. La tabla 1 muestra las principales interferencias para la separación en 2-DE y sus consecuencias.

Tabla 1. Mayores interferencias en 2DE y sus consecuencias

Interferencias	Consecuencias
Sales, buffer residual y otras pequeñas moléculas con carga	Las sales interrumpen el proceso de electroforesis. Durante el isoelectroenfoque generan alta conductividad en la tira de gel, prolongando el tiempo de separación
Pequeñas moléculas iónicas endógenas (nucleótidos, metabolitos, fosfolípidos)	Estas sustancias son cargadas negativamente y causan una pobre separación en el ánodo
Albúmina y otras proteínas de alta abundancia	Albúmina e IgG son los mayores componentes proteicos del suero humano. Su alta concentración puede enmascarar la presencia de otras proteínas con punto isoelectrónico o peso molecular semejante.
Detergentes iónicos	El SDS normalmente utilizado puede interferir fuertemente con el isoelectroenfoque formando complejos con proteínas donde aquellos negativamente cargados no serán separados
Ácidos nucleicos	El incremento en la viscosidad de la muestra genera la formación de fondo. Los ácidos nucleicos de alto peso molecular pueden ocluir los poros del gel. Se pueden unir a las proteínas formando complejos que no se resuelven
Polisacáridos	Pueden ocluir los poros del gel causando precipitación o extensión de los tiempos de isoelectroenfoque, generan estriado horizontal y causan interacción con proteínas con carga negativa
Lípidos	Reducen solubilidad de la muestra. Pueden afectar el pI y peso molecular aparente de las proteínas. Forman complejos con detergentes reduciendo su efectividad
Compuestos fenólicos	Pueden modificar proteínas por medio de una reacción catalizada por enzima
Material insoluble	Puede ocluir los poros del gel

Sumado a lo anterior, establecer un método adecuado de determinación de proteína en estudios proteómicos puede ser un gran reto cuando la muestra aún no posee la calidad adecuada y presenta componentes diferentes de las proteínas. Esto se debe a que la determinación puede variar en función de las impurezas presentes, de acuerdo con la naturaleza del método de ensayo seleccionado (Okutucu *et al.*, 2007). Fagner, *et al.*, (2008), encontró que la concentración de proteína puede variar dramáticamente dependiendo del método utilizado para su cuantificación. Estos autores usaron tres diferentes técnicas de análisis; Bradford, Lowry y el método del ácido bicinconínico BCA (por sus siglas en inglés) para determinar los niveles de proteína de cultivos de *Coprinopsis cinerea*. Ellos observaron diferencias importantes para la misma muestra de proteína determinada con dichos métodos. Los valores que determinaron oscilaron entre 42.9 ± 2.3 , 738.9 ± 51 y $1701.7 \pm 253 \mu\text{g/mL}$ empleando los protocolos de Bradford, Lowry y BCA, respectivamente. Al observar diferencias tan dispares, optaron por determinar la cantidad de proteína por densitometría en SDS-PAGE, extrapolando su valor a geles de 2-DE, demostrando así que dadas las variaciones halladas en sus determinaciones, ningún método es 100% confiable en casos como este.

En el caso de *Aspergillus*, existe una gran lista de componentes propios de sus cultivos que causan variabilidad en las determinaciones de proteína. Precisamente,

en cultivos de *Aspergillus* sección *nigri* existen al menos 150 metabolitos secundarios y micotoxinas bien descritos en estas especies, 30 de los cuales están espectrofotométricamente caracterizados con máximos de absorción alrededor de los 280 nm (Nielsen *et al.*, 2009). Esto representa un problema debido a que algunos de estos pueden dificultar una adecuada determinación de proteínas con los diferentes métodos, pues cada uno presenta incompatibilidad con diferentes sustancias. El método de Bradford por ejemplo, es uno de los más empleados y tiene como principio la unión de un colorante con aminoácidos básicos o aromáticos. De tal forma que la presencia de interferencias, particularmente de compuestos aromáticos vuelve incierta la determinación precisa de proteínas (Bradford *et al.*, 1976). La tabla 2 muestra los principales métodos de determinación de proteína, fundamento y algunas sustancias incompatibles.

Cuando el tratamiento de la muestra y la determinación de proteínas se han resuelto, puede surgir un nuevo problema: la adecuada solubilización de las proteínas para obtener una buena resolución en la separación. Unos de los pioneros en este tema fueron Nandakumar *et al.* (2002), en cuyo trabajo recuperaron y analizaron proteínas obtenidas a partir de cultivos de *Aspergillus oryzae*. Ellos probaron diferentes métodos de lisis celular; rompimiento mecánico con perlas de vidrio, lisis alcalina y ebullición con NaOH 0.2 N, ebullición de la muestra con SDS y lisis con un reactivo

Tabla 2. Métodos de determinación de proteína, principios e incompatibilidades			
Método	Principio	Características	Incompatibilidades
Lowry	Desarrollo de color por interacción de cobre y aminoácidos aromáticos potencializadas por formación de complejo cobre-proteína reducido por Fosfomolibdato-Fosfotungstico.	Basado en el método de Biüret, pero es 100 veces más sensible. Detecta 1 a 20 µg de proteína. La muestra es medida por cambio de absorbancia a 750 nm.	Depende del contenido de tirosina y triptófano de la muestra. Fenoles (excepto nitrofenol), ácido sulfosalicílico y timol reducen especificidad. Iones como potasio, magnesio, EDTA, Tris, tioles y carbohidratos causan interferencias (Lowry, 1951).
Bradford	Unión específica de azul brillante de Coomassie-R250 y aminoácidos alcalinos como arginina y aminoácidos aromáticos en medio ácido	Este método es más sensible que Lowry. Detecta desde 1 a 10 µg de proteína. La muestra se mide a 595 nm frente a una curva estándar de albúmina de suero-bovino.	Depende del contenido de arginina y aminoácidos aromáticos en la muestra. Fenoles y otros grupos aromáticos presentan interferencia en la determinación, así como la presencia de Tris, glicerol, tritón X-100 y acetona (Bradford 1976), (Compton, 1985).
Ácido Bicinonínico (BCA)	Reducción del ión Cu ²⁺ a ión Cu ¹⁺ con formación del complejo púrpura y formación de complejo de la sal conjugada del ácido bicinonínico en medio alcalino	Es otra mejora al método de Biüret. El ácido bicinonínico se une selectivamente al Cu ¹⁺ , formando un complejo que se determina a 562 nm. y puede detectar desde 5 a 250 µg/mL	Depende también de la presencia de aminoácidos aromáticos, pero es menos susceptible a interferencias. Solo concentraciones superiores a 1% de detergentes pueden reducir la reproducibilidad del método (Smith 1985).
Nano naranja	Formación de complejo entre proteína y reactivo nano naranja	Desarrollo de fluorescencia determinada a 485/590 nm. formación de un complejo muy estable	Sensible a la presencia de DTT, sales, EDTA, CaCl ₂ , y principalmente bajas concentraciones de SDS, Tween 20 y Tritón X100 (García-Arellano y Vázquez-Duhalt 1998).

comercial llamado Y-PER (Thermo Fischer Scientific Inc. Rockford, IL, USA). Las proteínas fueron separadas por SDS-PAGE y 2-DE, hallando que en tres de los cuatro casos (solución alcalina, Y-PER and SDS) algunas de las proteínas se perdían durante el tratamiento. En muestras tratadas con Y-PER particularmente se perdían aquellas con peso molecular menor a 30 kDa, con solución alcalina caliente las bandas de proteínas se distribuían en todos los pesos moleculares, pero perdían mucha proteína, mientras que con detergente caliente perdieron bandas de proteínas con peso molecular superior a 90 KDa. El tratamiento mecánico resultó aportar mayores beneficios, pues no solo se obtenía una

concentración mayor sino que se distribuían en todos los pesos moleculares. No obstante, la calidad de las proteínas que obtenían no era suficiente para realizar una adecuada separación en SDS-PAGE o 2-DE. Al año siguiente, (Nandakumar *et al.*, 2003) propusieron una técnica complementaria en la que el extracto proteico era precipitado usando una solución de TCA y solubilizado en una solución de NaOH 0.2 N antes de realizar la separación electroforética. Al solubilizar directamente en solución de NaOH, evitaban la serie de lavados con acetona post-precipitación recomendado en el método tradicional y además mejoraron la solubilidad de su muestra en buffers

desnaturalizantes tanto para emplear protocolos de SDS-PAGE como para 2-DE.

Problemas semejantes se han observado con muestras de cultivos de otros hongos, como el basidiomiceto *Coprinopsis cinérea* crecido en medio líquido con glucosa. En un estudio en el que probaron al menos tres diferentes métodos de precipitación, seleccionaron una solución de TCA/acetona como el método más adecuado. Sin embargo, observaron que el principal inconveniente, fue la mala solubilización del precipitado, que ni la adición NaOH antes propuesta por Nandakumar *et al.* (2003) ni la sonicación de la muestra fue suficiente lograr su adecuada solubilización. Optaron por ajustar el pH del precipitado con solución amortiguadora de Tris para solubilizarla (Fragner *et al.*, 2009), demostrando una vez más que en protocolos de proteómica no hay nada escrito y todo depende de las características de la muestra.

La diversidad de la investigación proteómica

A pesar de las limitantes que puede presentar la proteómica, como la dificultad para establecer protocolos estándar para el tratamiento de muestras, la considerable variación por las técnicas de determinación de proteínas o la elección del método de secuenciación empleado, se le reconoce como una compleja y poderosa herramienta de análisis. Esto es porque permite ampliar el espectro de estudio, desde proteínas puntuales como se había hecho todavía en años recientes, hasta grupos completos de proteínas, multiplicando así la información

que se obtiene en cada experimento. Es tanta la información que puede generarse incluso dentro en el estudio de un solo organismo, que existe un número ilimitado de enfoques posibles. Recientemente se han publicado trabajos que se especializan en el análisis del proteoma de fracciones subcelulares u organelos específicos, la fracción intracelular citoplasmática haciendo especial énfasis en las relaciones que estas proteínas tienen en vías metabólicas. Así, podemos encontrar estudios proteómicos especializados en proteínas de secreción, que reciben el nombre de secretomas o estudios relacionados con proteínas de pared celular, proteínas intracelulares, o de organelos particulares. Estos estudios se han denominado sub-proteomas y la información que se genera se relaciona con estudios del genoma, transcriptoma o metaboloma de las especies estudiadas, ampliando así la comprensión de los mecanismos y estrategias utilizadas por el sistema de estudio. De hecho, la asociación de las diferentes áreas de la proteómica y su vinculación con el genoma y transcriptoma han hecho posibles grandes avances en la integración del conocimiento. A continuación se presenta una descripción de los estudios más relevantes en proteómica de *Aspergillus*, que han sido divididos en áreas de acuerdo con el origen las proteínas de interés.

Secretoma

El pionero en el estudio de un secretoma de *Aspergillus* fue Medina (Medina *et al.*, 2004), que estudió el efecto

de la rutina, un flavonoide usado desde principios del siglo pasado para tratar la “debilidad” capilar, asociada con la hipertensión (Bustinzá & Caballero 1948) en la secreción de proteínas por *Aspergillus flavus*. El estudio de Medina, se basó en el tipo de proteínas secretadas por *A. flavus* en medio agar papa-dextrosa con y sin rutina. Observaron importantes cambios en la morfología del micelio de *A. flavus* en ambas condiciones. A pesar de que en estudios preliminares habían observado que en medios inducidos con rutina se producían, concentraciones de proteína tres veces mayores, al determinar nuevamente la concentración de proteína en ambas condiciones, no obtuvieron datos contundentes que indicaran que la rutina estimulara de manera importante la secreción. Sin embargo, las diferencias fueron asociadas con en el tipo más que con la cantidad de proteínas producidas en cada condición. Utilizaron un sistema acoplado de 2-DE y MALDI-TOF/MS con el que identificaron 22 proteínas secretadas en medio con rutina y que estuvieron ausentes en los cultivos sin rutina. Entre las proteínas más abundantes hallaron enzimas de tipo glucosilhidrolasas como α -amilasas, α -L arabinofuranosidasa, α -manosidasa y β -galactosidasa, además de proteasas y enzimas que intervienen en el metabolismo oxidativo. Un año más tarde, extendieron su trabajo al incluir la comparación de proteínas obtenidas en cultivos con glucosa (Medina *et al.*, 2005), hallando 16 proteínas extracelulares comunes en los cultivos con glucosa y agar papa dextrosa con o sin

rutina, 18 proteínas que se hallan solo en presencia de rutina, 10 únicamente en glucosa y dos solo en PDA. Tanto las proteínas exclusivas de una condición como las demás fueron clasificadas en tres grupos principales: Enzimas del metabolismo de carbohidratos, enzimas relacionadas con proteólisis o peptidólisis y enzimas con actividad oxido-reducción. A pesar del extenso estudio, la información que obtuvieron indica que las proteínas producidas en las tres condiciones son tan diversas que no fue posible relacionarlas para establecer un patrón particular de proteínas para cada condición.

El mismo año, un grupo de investigación japonés (Zhu *et al.*, 2005) realizaba el análisis de las proteínas secretadas durante la germinación de las conidias de *A. oryzae* en medio con glucosa. Ellos estudiaron la relación entre la aparición de los túbulos germinales y las proteínas que son secretadas durante el proceso. Entre las proteínas más abundantes que identificaron se encontraba una Taka-amilasa A (TAA), seguida de Glucoamilasa A (GLAA) y Aspergillopepsina A (PEPA). Durante la revisión informática de las proteínas encontraron que su identidad podía variar entre ellas, es decir; una de las proteínas podía ser identificada como Taka amylasa A o como Aspergillopepsina con porcentajes de identidad muy semejantes en las diferentes bases de datos consultadas, haciendo más difícil su confiable identificación. Esta discrepancia se explica por la naturaleza del análisis, ya que las proteínas fueron identificadas por huella

digital o Peptide Mass Finger Printing (PMFP), una técnica ampliamente difundida durante los inicios de la investigación en proteómica, que si bien sigue siendo utilizada, es más recomendada para la identificación de mezclas simples o proteínas puras y no para mezclas complejas, ya que depende en gran medida del azar al analizar un péptido aleatorio, razón por la cual se requiere un porcentaje alto de cobertura en el análisis (Mann *et al.*, 2001). Esta característica ha hecho que el análisis de huella digital fuera desplazado como método de análisis, tan pronto como se implementaron los sistemas de espectrometría de masas acoplado a masas (MS/MS) que mejoraron la capacidad de identificación de secuencias por medio del análisis simultáneo de péptidos múltiples. Este sistema no está sujeto al análisis aleatorio de un solo péptido como con PMFP (Heakman *et al.*, 2007), evidenciando que hace falta considerar también el método de análisis y secuenciación como una variable más en el análisis proteómico.

Por otra parte, también un grupo de investigación japonés (Nguyen *et al.*, 2005) complementó el trabajo anterior, demostrando que la enzima Taka amilasa está presente incluso mucho antes de la germinación de las conidias, independientemente de la fuente de carbono utilizada. Cuando probaron almidón, glucosa y glicerol, observaron que la secreción de esta enzima se daba independientemente de la fuente de carbono utilizada por las conidias, indicando que podría tratarse de una enzima

constitutiva y que posee gran importancia como parte de los mecanismos de germinación conidial.

Por otra parte, en un estudio en el que se empleó salvado de trigo en medio líquido y sólido (Biesebeke *et al.*, 2006) se identificaron 5 diferentes proteínas procedentes del cultivo de *A. oryzae*. Las proteínas obtenidas en ambas condiciones fueron separadas por SDS-PAGE y sus secuencias fueron obtenidas por análisis del amino terminal por degradación de Edman. Las diferencias observadas en los patrones de proteínas fueron escasas pero lograron identificar una α -amilasa, una arabinosidasa A y una xilanasas en medio líquido, mientras que en medio sólido solo identificaron una quitinasa y una formato deshidrogenasa, mientras que tres proteínas más no fueron identificadas. El mismo año se publicó uno de los trabajos más completos en lo que se refiere a proteínas de secreción en cultivos de *Aspergillus* (Oda *et al.*, 2006) pues está centrado en el análisis de proteínas de *A. oryzae* en cultivo sumergido y sólido. En este trabajo observaron una diferencia dramática en el número y concentración de proteínas secretadas en cultivo sólido y sumergido, obteniendo 53 y 77 mg de proteína/g de micelio en medio sólido en 32 y 40 horas de cultivo respectivamente, mientras que en medio líquido se alcanzaron solo 13 y 11.9 mg de proteína/g de micelio en los mismos tiempos de cultivo. Al analizar los patrones de proteínas, observaron que para 0-12 h existen proteínas de bajo peso molecular distribuidas en puntos isoeléctricos de 4.5-

5.5. A las 12 h la imagen de 2DE muestra una mancha de proteína que fue identificada como α -amilasa y que permaneció hasta el final del cultivo (40 h), incluso cuando todos los patrones de proteínas cambiaron mostrando proteínas de alto peso molecular mayoritariamente distribuidas en puntos isoelectrónicos ácidos. Observaron también 8 proteínas comunes al cultivo líquido y sólido que fueron: Taka amilasa A, β -glucosidasa, precursor de proteasa alcalina, xilanasas F3, α -L-arabinofuranosidasa, xilanasas G1, catalasa B y una proteína identificada como xilosidasa/arabinosidasa. Estos resultados fueron congruentes no solo con los de Biesebeke (Biesebeke *et al.*, 2006) sino con los de Zhu (Zhu *et al.*, 2005) ambos mencionados antes, en los que la Taka amilasa tiene un papel importante incluso desde la aparición del túbulo germinal durante la germinación de las esporas. Taka amilasa A, fue ubicada por Oda como una proteína de unión a pared celular que se presenta en condiciones de cultivo sumergido pero que es principalmente de secreción en cultivo sólido.

Un nuevo estudio sobre las proteínas de *A. oryzae* obtenidas en cultivos para la producción de salsa de soya (Liang *et al.*, 2009) reveló información interesante relativa a la similitud entre las proteínas aquí halladas y las identificadas en el trabajo de Oda (Oda *et al.*, 2006), incluso cuando las condiciones de cultivo fueron completamente diferentes. Observaron que a pesar de que la salsa de soya es un medio sumamente abundante en proteínas en el que esperaban un perfil de expresión

diferencial rico en proteasas, solo tres de las proteínas que lograron identificar lo eran: alanil dipeptidil peptidasa, glutaminasa, que habían sido descritas ya por Oda en cultivos con salvado de trigo, y aspergillopepsina que al igual que taka amilasa A habían sido previamente descrita por Zhu (Zhu *et al.*, 2005) en cultivos con glucosa. Esto es indicativo de que algunas proteínas son producidas independientemente del medio de cultivo y que podrían cumplir funciones vitales para el crecimiento del hongo.

La proteómica de hongos ha tenido giros diversos, uno de ellos fue la tendencia a centrar la investigación en el análisis de la expresión diferencial de proteínas durante interacciones biológicas. Estas interacciones son abundantes en la naturaleza entre organismos de diferentes ecosistemas, y pueden darse también entre hongos y otros organismos. Schneider *et al.* (2010) estudiaron la respuesta biológica de la degradación de hojarasca por el ascomiceto *Aspergillus nidulans*, observando la variación cinética de la actividad enzimática de proteasas, celulasas y pectinasas, así como el crecimiento celular comparado entre cultivos independientes y en interacción con la bacteria mesófila gram-negativa *Pectobacterium carotovorum*. En primer lugar identificaron que el crecimiento de *A. nidulans* fue menor en presencia de *P. carotovorum*, mientras que *P. carotovorum* creció mejor en presencia de *A. nidulans*. Dado que crece más rápido y es incapaz de secretar muchas de las enzimas, se identificó que *P. carotovorum* crece a costa de *A. nidulans* como lo revelaron los

patrones de actividad proteolítica, celulolítica y pectinolítica, dándonos un ejemplo más de comportamiento engañoso en la naturaleza, puesto que *P. carotovorum* obtiene ventajas para su crecimiento sin pagar ningún precio.

Otros estudios sobre la proteómica de *Aspergillus* se han enfocado en identificar los cambios que se reflejan en el patrón de proteínas por efecto de diferentes fuentes de carbono. Han *et al.* (2010) analizaron el proteoma de *Aspergillus terreus* cultivado en sacarosa, glucosa y almidón. Identificaron exitosamente 82 manchas a partir de geles 2-DE y nano-LC-MS/MS, 16 de estas proteínas fueron halladas exclusivamente en sacarosa, 3 en glucosa y ocho en almidón. Doce proteínas fueron comunes en al menos dos medios de cultivo; la mayoría tenían actividad proteolítica y glucósido-hidrolasa. Sin embargo, el hallazgo más interesante en este trabajo fue el descubrimiento de algunas enzimas polisacárido-hidrolasa en cultivos con sacarosa. Muchas enzimas glucosidasas están usualmente sujetas a represión por carbono en presencia de azúcares monoméricos como glucosa, que ejerce regulación sobre el promotor *xlnR* previamente descrito en *A. nidulans* y otros *Aspergilli* (Tamayo *et al.*, 2008). Entonces, hallar glucosidasas en un medio con sacarosa, no es nada anormal, pero encontrar precursores de endo-1,4- β -xilanasas y 1,5- α -L-arabinosidasas A, es poco probable debido a que este tipo de proteínas son reprimidas en presencia de glucosa (van Peij, 1999). Por otra parte, Lu

et al. (2010) cultivaron *Aspergillus niger* en medio definido con xilosa o maltosa como fuente de carbono y observaron que en los medios con xilosa, las proteínas extracelulares identificadas fueron xilanasas, β -xilosidasas, arabinofuranosidasas, arabino furanohidrolasas, endoglucanasas, β -glucosidasa, glucoamilasa, α -galactosidasa, feruloil esterasa, glucanosil transferasa y quitinasas incluso cuando algunas de estas enzimas pueden estar reguladas por represión por carbono que se efectúa también en presencia de xilosa. En los cultivos con maltosa por otra parte, las proteínas que fueron identificadas corresponden mayoritariamente a glucoamilasas halladas en manchas de geles 2 DE en diferentes posiciones, indicando que es posible que se trate de isoenzimas. Así mismo, las proteínas normalmente reguladas por el gen *XlnR* como xilanasas A, xilanasas B o feruloil esterasa estuvieron totalmente ausentes, dando evidencia de cada fuente de carbono estimulan al hongo a echar a andar mecanismos diferentes para su asimilación.

Para identificar la presencia de enzimas con actividad glucósido hidrolasa como las arriba mencionadas Kim *et al.* (2007) propusieron una estrategia para identificar enzimas con actividad β -glucosidasa directamente sobre geles 2-DE, utilizando sustratos fluorescentes como 4-metilumbeliferil- β -D-glucósido, a partir de cultivos de *A. nidulans*. El uso de sustratos fluorescentes no es tan novedoso, puesto que este tipo de sustratos fueron usados varios años atrás con el mismo propósito

(van Tielburgh *et al.*, 1982). No obstante, el aspecto más innovador fue su aplicación en 2-DE, puesto que recuperar la actividad enzimática después del tratamiento desnaturalizante, con altas concentraciones de urea, que rompe las interacciones entre proteínas o el uso de ditiotreitol y detergentes como CHAPS hace prácticamente imposible la renaturalización de las proteínas. Además, la selección de la especie de estudio: *A. fumigatus* es *per se* novedoso, ya que la mayor parte de las investigaciones que se realizan con esta especie tienen aplicaciones clínicas.

Buena parte del trabajo realizado en el campo de la proteómica involucra técnicas de separación de proteínas por electroforesis en dos dimensiones con análisis de secuencias por huella digital de péptidos, MALDI-TOF u otros arreglos de espectrometría de masas. Sin embargo, con el fin de mejorar la identificación de péptidos fueron implementados con bastante éxito, nuevos métodos de separación de proteínas. Sin embargo, el creciente aumento en el número de estudios de proteómica se debe no solo a la mejora de las técnicas analíticas, sino que va de la mano de las nuevas tecnologías como la bioinformática, que también ha respaldado los estudios en genómica, permitiendo la predicción de proteínas no descritas previamente y cuya presencia ha sido comprobada posteriormente utilizando la proteómica. Braaksma *et al.* (2010) realizaron la predicción *in silico* de proteínas de secreción en cultivos de *A. niger* y posteriormente compararon sus

predicciones con las secuencias de proteínas que obtuvieron por análisis en "shotgun", un tipo de secuenciación que emplea cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas no requiere una separación previa por 2-DE. Al comparar las proteínas que hallaron en cultivos con sorbitol y ácido galacturónico, observaron que la mayoría de las proteínas con conocida acción sobre carbohidratos se encontraban con ambas fuentes de carbono y con ayuda de información del transcriptoma de *A. niger* en ambas condiciones, observaron que el sistema pectinolítico era fuertemente inducido en presencia de ácido galacturónico. Por otra parte, las secuencias de péptidos identificados como proteínas hipotéticas sin homología previamente descrita en otras especies pudieron ser predichas solo en un 85% de los casos, evidenciando que aunque su propuesta de predicción puede ser muy acertada, está sujeta a la existencia de secuencias de gen y las anotaciones previamente realizadas para una secuencia particular.

En los últimos 10 años, se ha publicado un número considerable de trabajos relativos al proteoma de *Aspergillus*, sin embargo, un porcentaje muy elevado está dirigido solamente al estudio de *A. fumigatus* debido en gran medida a la trascendencia que posee la identificación de sus proteínas en el área médica, por lo que una breve reseña de la investigación que se ha realizado sobre su proteoma merece una mención aparte.

A. fumigatus es un conocido agente infeccioso de gran relevancia en el campo de la medicina. Al igual que otros hongos, es capaz de establecer contacto con su hospedero mediante sus conidias, causando daños principalmente en pacientes inmunodeprimidos, por lo que entender sus mecanismos de invasión y virulencia es un asunto de gran importancia. Asif *et al.* (2005) realizaron el análisis de proteínas superficiales de conidias de *A. fumigatus*, para identificar algunas de las proteínas que están directamente relacionadas con su invasión y virulencia. De acuerdo con los modelos clásicos de inmunología, para que las células T- intervengan en la reacción inmune, los macrófagos deben primero envolver al agente infeccioso y entonces liberar un péptido antígeno vía moléculas tipo MHCII a las células T con receptores específicos y así algunas proteínas de la superficie conidial podrían ser candidatas a antígenos de vacunas. En total lograron identificar 26 proteínas de superficie conidial, pero la más importante fue la hidrofobina Hyp1. Además de la hidrofobina, el resto de las proteínas halladas fueron lipasa, disulfuro isomerasa, y endopeptidasa. Concluyeron que tanto la lipasa como disulfuro isomerasa pudieran jugar un rol importante en el proceso invasivo debido a que son capaces de inducir daños celulares para facilitar la adherencia de las conidias, así como intervenir en los mecanismos de plegamiento de proteínas antígeno/alergeno de *A. fumigatus*. Otros estudios importantes son los trabajos realizados por Kniemeyer *et*

al. (2008) en el que realizaron la búsqueda de proteínas características de los procesos infecciosos de *A. fumigatus*, también el trabajo de Vödischet *al.* (2009) en el cual construyeron un mapa proteómico de las proteínas intracelulares y mitocondriales de *A. fumigatus* a partir de cultivos con glucosa, o el trabajo de Wartenberg *et al.* (2011) en el que demuestran que la proteína con mayor nivel de secreción es la Asp-hemolisina, que se produce independientemente del medio de cultivo aunque no sea una proteína relacionada directamente con la virulencia de la cepa. Más trabajos en la misma línea, incluyen el análisis de proteínas involucradas con la respuesta del hongo al choque térmico (Albretch *et al.*, 2010) y la identificación de factores de virulencia útiles como marcadores moleculares para la identificación de los procesos de infección (Kumar *et al.*, 2011).

Subproteoma y proteoma intracelular

Mientras algunas de las investigaciones sobre el proteoma se concentran en el estudio de las proteínas de secreción, otros se especializan en el estudio de proteínas intracelulares, estableciendo la relación que la presencia de éstas proteínas tiene con el desarrollo de diversas enfermedades, la patogenicidad de cepas y la respuesta a fármacos o a variables ambientales. En algunos casos, estos estudios deben ser más específicos, centrándose en las proteínas que forman parte de estructuras subcelulares, estudios que se denominan subproteomas. Un ejemplo de subproteoma

de *Aspergillus* fue obtenido por Bruneau *et al.* (2001). Ellos buscaron proteínas unidas a residuos de glicosilfosfatidil-inositol y que tienen como función la síntesis de pared celular, así como la incorporación de β 1-6 glucano a la misma, fenómeno asociado con la elongación del micelio, floculación y adhesión a superficies. Utilizando una ingeniosa combinación de hidrólisis enzimática, anticuerpos policlonales, 2-DE y espectrometría de masas, compararon las secuencias de proteínas de *A. fumigatus* con el genoma de *S. cerevisiae*, puesto que el genoma del primero no fue publicado sino hasta 2005 (Nierman *et al.*, 2005). Así, hallaron que seis proteínas tenían una función predicha como β -1,3-glucanosiltransferasa, fosfatasa, fosfolipasa y β -1,3 o β -1-4 glucanasa.

Al año siguiente, Melin *et al.* (2002), publicaron el proteoma de *A. nidulans* asociado con la respuesta a la presencia de concanamicina A. En primer lugar, observaron cambios en la morfología del micelio acompañado por diferencias en los patrones de proteína 2-DE que se asociaron con la presencia del antibiótico, así como la regulación positiva y negativa de algunas proteínas. Las proteínas desreguladas (regulación negativa) fueron identificadas gracias a su semejanza con dos proteínas previamente descritas en *A. nidulans*. Una de estas proteínas está relacionada con el control of global síntesis de aminoácidos, y la diferenciación sexual del hongo. La otra, fue identificada como gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, una importante enzima de la glucólisis. Las secuencias de

las proteínas con regulación positiva no fueron claramente asociadas con ninguna otra existente en bases de datos, por lo que la limitada información existente hasta ese momento fue el principal obstáculo para la plena identificación de tales proteínas. A pesar de esto, se identificaron como proteínas parecidas a otras inducidas por cadmio previamente descritas en *Candida* sp.

Ström *et al.* (2005) realizaron cultivos mixtos de *A. nidulans* y *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 para evaluar el efecto del cultivo mixto en el crecimiento del hongo. Adicionalmente, probaron el crecimiento de *A. nidulans* en presencia de ácido láctico, ácido 3-fenil láctico y ciclo (L-Phe-L-Pro) sustancias con conocido efecto anti fúngico y que son producidas por *L. plantarum*. Además de encontrar diferencias en la morfología de *A. nidulans* durante el crecimiento, observaron el cambio de cinco proteínas específicas en los patrones de proteína obtenidos, no solo por la intensidad de las manchas en los análisis de 2-DE, sino por la posición que ocupaban. Cuando estas manchas fueron secuenciadas, encontraron que tres de cinco proteínas tenían la misma secuencia, y las dos restantes eran semejantes entre ellas, incluso cuando tenían posiciones diferentes de acuerdo con su punto isoeléctrico y peso molecular. Esas proteínas fueron denominadas Lbu A y Lbs A y ambas tenían regulación positiva en el cultivo mixto en presencia de las tres sustancias, y una de ellas, la Lbs A mostró un elevado grado de

similitud con la proteína anotada NADH-ubiquinona oxidoreductasa.

Kniemeyer *et al.*, (2006) publicaron la optimización de un protocolo 2DE para proteínas intracelulares de *A. fumigatus*, en el que tras romper el micelio, precipitaron la proteína recuperada probando dos métodos: el producto comercial "2D-Clean Up (GE Health care life sciences) y precipitación con TCA/acetona. Probaron también diferentes buffers de lisis en donde modificaron la concentración de Urea, tiourea y CHAPS. Compararon los patrones obtenidos con los diferentes métodos sin encontrar diferencias importantes en los geles 2D, pero la cantidad de proteína recuperada con TCA/acetona era superior al doble de la que obtenían con el producto comercial de lisis. Encontraron que incluso cuando el número e intensidad de las manchas halladas con el tratamiento con Clean up fue mayor que usando buffer de lisis, SDS/2D clean up y TCA/acetona, la definición de manchas fue mayor con TCA/acetona. Aun así asumieron que los patrones resultantes fueron similares. Por otra parte, cuando compararon la efectividad de los cinco buffers de lisis, hallaron que el buffer con 7 M Urea, 2 M tiourea, 4% CHAPS, 0.8% anfolitas, 20 mM DTT y 20 mM Tris dio los mejores resultados. También probaron dos fuentes de carbono distintas para buscar diferencias en los patrones de proteína y el efecto de la represión por carbono, hallando que en presencia de etanol *A. fumigatus* presentaba un fuerte efecto de regulación positiva sobre las enzimas necesarias en el ciclo del glioxilato, gluconeogénesis y

oxidación de etanol, mientras que en presencia de glucosa, un menor número de proteínas mostraban un incremento importante. No fue sorprendente encontrar que las enzimas de la ruta glucolítica fueran reguladas positivamente.

Kim *et al.* (2007) obtuvieron el proteoma que *A. nidulans* genera en respuesta a la osmoadaptación en un cultivo con KCl. Identificaron un total de 30 proteínas utilizando huella digital de péptidos y encontraron que la mayoría de estas proteínas estaban involucradas en la ruta glucolítica, lo que resultaba congruente con los resultados hallados también en estudios proteómicos realizados previamente en *Arabidopsis*, *S. cerevisiae* y otros organismos. Una de las proteínas más importantes durante su estudio fue identificada como Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GDP), una enzima clave en la glucolisis, pero que también está involucrada en la apoptosis y la respuesta al estrés oxidativo.

Por otra parte, Shimizu *et al.* (2009) obtuvieron el mapa proteómico comparativo de *A. nidulans* en condiciones normales de oxigenación y bajo hipoxia. Lograron identificar un total de 332 proteínas, las cuales pertenecen a las principales vías metabólicas como gluconeogénesis, y el ciclo del glioxalato. En condiciones de hipoxia, las proteínas pertenecientes a tales vías regulan negativamente su expresión y por el contrario la ruta de pentosas fosfato se veía favorecida bajo estas mismas condiciones.

En 2011 fue publicado un trabajo (Crespo *et al.*, 2011) en el que se utilizaron herramientas de proteómica y PCR en tiempo real, para identificar las proteínas que a manera de marcadores moleculares están involucradas en la síntesis de ocratoxina de *Aspergillus carbonarius*. Apoyándose en el genoma de *A. niger* para comparar las secuencias que obtuvieron, identificaron siete proteínas sobre expresadas durante la producción de ocratoxina: una hidrolasa, una aminotransferasa, CipC ubiquinona reductasa, peroxirredoxina mitocondrial, una proteína acoB y otra relacionada con un factor de iniciación de la traducción, mientras que dos proteínas eran sub expresadas. En conjunto, las proteínas identificadas forman parte de mecanismos de regulación, metabolismo de aminoácidos, estrés oxidativo y esporulación.

Integración de la información

Algunos de los estudios más recientes realizados en el campo de la proteómica están dirigidos a integrar la información generada por el genoma, transcriptoma y proteoma. Una ventaja importante es la disponibilidad que actualmente tienen las secuencias de algunos *Aspergilli* como *A. oryzae* (Machida *et al.*, 2005), *A. nidulans* (Galagan *et al.*, 2005) y *A. fumigatus* (Nierman *et al.*, 2005). El trabajo de Albrecht *et al.* (2010) intenta ya relacionar la respuesta de *A. fumigatus* al choque térmico por medio de la comparación de su patrón de proteínas, las secuencias putativas de genes de *A. fumigatus* así como la

información de los transcritos obtenidos por medio de micro arreglos. A su vez, compararon la información experimental de micro arreglos con perfiles de expresión genética disponibles en bases de datos. Sus resultados fueron comparados con los de un hongo mesófilo termotolerante como *S. cerevisiae* hallando un total de 1886 manchas que fueron detectados en el cultivo a 48°C, pero solo 183 de ellas fueron analizadas. La función putativa para estas proteínas se dividió en las categorías: proteínas involucradas con el plegamiento de otras proteínas, organización del citoesqueleto, transcripción, traducción y respuesta a estrés oxidativo. Cincuenta y cuatro de estas parecen estar positivamente reguladas, mientras que solo 10 están desreguladas. Comparando la respuesta al choque térmico de *A. fumigatus* con la respuesta al mismo daño por parte de *S. cerevisiae* encontraron que no había un cambio importante entre los mecanismos echados a andar para la reparación de daños en ambos sistemas biológicos. Finalmente, cuando realizaron la comparación global entre el transcriptoma, proteoma y genoma, encontraron que no era posible establecer una relación clara entre genoma y transcriptoma, puesto que solo 32 transcritos se hallaron diferencialmente regulados en ambos casos. Aunque la comparación del proteoma y transcriptoma mostró también una baja correlación entre muchos de los transcritos y las proteínas asociadas, es un fenómeno que posee explicaciones diferentes, sin que por esto pueda ser asumida totalmente

alguna de ellas. Todo esto sin duda corresponde a un esfuerzo importante por integrar el trabajo de tres enfoques moleculares distintos partiendo de las evidencias experimentales obtenidas.

Trabajos recientes plantean un nuevo rumbo en la investigación: el uso de herramientas informáticas de predicción. Chang *et al.* (2009) publicaron un trabajo en el que usando las secuencias generadas en la construcción del genoma de *A. flavus* hicieron computacionalmente la predicción de múltiples sitios de edición del RNA que se genera durante la transcripción. Construyeron así una base de datos con los sitios de edición y una lista de posibles isoformas de proteína que fueron posteriormente comparadas con la lista de espectros de masas generados durante el análisis SILAC de proteínas previamente obtenidas a partir de cultivos de *A. flavus* (Georgianna *et al.*, 2008). El resultado fue la generación de 9,807 nuevas secuencias adicionales a las 12,832 proteínas anotadas para *A. flavus* que no consideraba la presencia de isoformas, así como 29 nuevas proteínas identificadas con la base de datos construida y validados por medio de la construcción de péptidos sintéticos como evidencia del éxito del método. Sin embargo, publicaciones recientes omiten la demostración experimental, apoyándose únicamente en la información disponible en las bases de datos, generando rutinas de predicción de sitios de edición específicos para ciertos organismos. Wang *et al.* (2009) crearon NetAspGene, una herramienta informática que se encuentra disponible

públicamente y que fue construida utilizando la secuencia del genoma de *A. fumigatus* como modelo. Esta herramienta a su vez les permitió realizar la comparación del genoma de cuatro especies del género *Aspergillus*. Los genomas de *A. nidulans*, *A. oryzae* y *A. niger*, que también son públicos desde varios años les permitieron buscar sitios consenso de reconocimiento para la edición de RNA. A diferencia de los programas de búsqueda de genes, que típicamente rastrean sitios de inicio y terminación de codones por par, el programa que crearon busca independientemente múltiples secuencias de inicio de edición, así como múltiples secuencias de fin de edición y las combina para formar una infinidad de secuencias de RNA codificantes. No obstante, como este existen también el FSPLICE y GeneID que son programas de predicción para la identificación de sitios de edición en secuencias específicas de *Aspergillus*, y como programas de predicción generales existen también HMMgene, NetGene2, HSPL, NNSPLICE, Splice View y GeneID-3 (Thanaraj *et al.*, 2000).

La era de la bioinformática

El auge de la genómica en los años 90 y su acelerada expansión generó una necesidad no contemplada hasta entonces: la creación de bases de datos que permitieran almacenar grandes cantidades de información y que a su vez, fueran de dominio público. Así, NCBI, EMBL-EBI y Protein DataBank (PDB) se convirtieron en las principales bases de datos de libre

acceso. No obstante el aumento en la generación masiva de secuencias de genes y proteínas demandaba la creación de sitios que pudieran almacenar más información, pero también más específica de las secuencias codificantes para organismos particulares. Sitios como Eurofung, Fungal Secretome Database (Choi *et al.*, 2010), CADRE (Mabey *et al.*, 2004) y FunSeckB (Lumet *et al.*, 2011) nacieron con el propósito de almacenar secuencias pertenecientes exclusivamente a hongos, mientras que sitios como CAZy (Cantarel *et al.*, 2009) se especializan en almacenar secuencias de enzimas glucósido hidrolasas de diferentes organismos y se encuentra en continua revisión, gracias a la curación constante de las secuencias que ahí están disponibles (Murphy *et al.*, 2011).

CONCLUSIONES

Los estudios proteómicos de *Aspergilli* han tenido un desarrollo importante durante los últimos años desde el establecimiento de protocolos de trabajo y la mejora de las técnicas de separación, al creciente y cada vez más necesario análisis de secuencias apoyadas en el uso de bases de datos. Aún hace falta más, pues es necesario ampliar el horizonte hacia otros miembros del género, ya que en su mayoría las investigaciones se han centrado en el estudio de especies como *A. flavus*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. fumigatus*, *A. nidulans* y *A. terreus*, pero no incluye a otras especies menos populares como *A. carbonarius*, *Aspergillus nigricans*, *Aspergillus japonicus*, *Aspergillus flavipes* y

muchas otras, que sin duda poseen un gran potencial de estudio. La limitada información, que sobre estos organismos, particularmente de estas últimas especies, se halla en bases de datos, restringen aún más el margen de trabajo. Por ello es necesario el desarrollo de estudios proteómicos de diferentes especies, incluso si no existen las bases de datos necesarias, pues es posible interpretar información extrapolando la de otros organismos, solo de esta manera será posible incrementar el acervo y hacer que miremos más allá, hacia profundizar el conocimiento de especies con gran potencial.

REFERENCIAS

- Albrecht D, Guthke R, Brahae A & Kniemeyer O (2010) Integrative analysis of the heat shock response in *Aspergillus fumigatus*. *BMC genomics* 11: 32.
- Angel T, Jacons J, Spudich S, Gritsenko M, Fuchs D, Liegler T, Zetterberg H, Camp D. Price R & Smith R (2012) The cerebrospinal fluid proteome in HIV infection: change associated with disease severity. *Clin. Proteom.* 9: 3.
- Asif A, Oellerich M, Armstrong V, Riemenschneider B, Monod M & Reichard U (2005) Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens. *J Prot Res* 5: 954-962.
- Bennett J (1998) Mycotechnology: the role of fungi in biotechnology. *J. Biotech.* 66: 101-107.
- Bieseke R, Boussier A, van Biezen N, van

- van den Hondel C & Punt P (2006) Identification of secreted proteins of *Aspergillus oryzae* associated with growth on solid cereal substrates. *J. Biotech.* 121: 482-485
- Braaksma M, Uzunova E, Punt P & Schaap P (2010) An inventory of the *in silico* predictions with shotgun proteomics data. *BMC genomics.* 11:584
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254
- Bruneau J, Magnin T, Tagat E, Legrand R, Bernard M, Diaquin M, Fudali C & Latgé JP (2001) Proteome analysis of *Aspergillus fumigatus* identifies glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins associated to the cell wall biosynthesis. *Electrophoresis* 22: 2812-2823
- Bustanza F & Caballero A (1948) Obtención de rutina y quercetina y contribución al estudio de sus propiedades antibacterianas. *Anales del Jardín Botánico de Madrid* 7: 549-559.
- Camacho N & Aguilar G (2003) Production, Purification and Characterization of a low-molecular-mass xylanase from *Aspergillus sp* and its application in baking. *Appl. Biochem. Biotech.* 104: 159-171.
- Cantarel B, Coutinho P, Rancurel C, Lombard T & Henrissat B (2009) The Carbohydrate- Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucl. Acids Res.* 37: D233-D238.
- Carberry S & Doyle, S (2007) Proteomic studies in biomedically and industrially relevant fungi. *Cytotech.* 53: 95-100.
- Chaerkady R, Pandey A (2008) Applications of Proteomics to Lab Diagnosis. *Ann. Rev. Path.* 3: 485-498
- Chan LL, Chun LLS, Hodgkiss IJ (2002) Proteomic study of a model causative agent of harmful red tide, *Procentrum triestinum* 1: Optimization of sample preparation methodologies for analyzing with two-dimensional electrophoresis. *Proteomics* 2: 1169-1186
- Choi J, Park J, Kim D, Jung K, Kang S & Lee, Y (2010) Fungal Secretome Database: Integrated platform for annotated of fungal secretomes. *BMC Genomics*, 11: 105
- Compton, S. & Jones, C (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford Protein assay. *Anal. Biochem.* 151: 369-374
- Crespo A, Gil J & Martínez P (2011) Proteome analysis of the fungus *Aspergillus carbonarius* under ochratoxin A producing conditions. *Int. J. Food Microbiol.* 147: 162-169.
- Encarnación S, Hernández M, Martínez G, Contreras S, Vargas M & Mora J (2005) Comparative proteomics using 2D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to dissect stimulons and regulons in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Biol. Proced.* 7: 117-135.
- Fragner D, Zomorodi M, Kues U &

- Majcherczyk A (2009) Optimized protocol for the 2-DE of extracellular proteins from higher basidiomycetes inhabiting lignocellulose. *Electrophoresis*. 30: 2431-2441
- Galagan J & Calvo S (2005) Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature* 438: 105-1115
- García-Arellano H. & Vazquez-Duhalt R (1998) Cuantificación de proteínas. Una revisión. *BioTecnología*. 3: 78-87.
- Georgianna D, Hawkridge A, Muddiman D & Payne G (2008) Temperature-dependent regulation of proteins in *Aspergillus flavus* whole organism stable isotope labeling by amino acids. *J. Prot. Res.* 7: 2973-2979.
- Glazer A (2007) Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. Cambridge University Press 2nd ed. United Kingdom
- Görg A, Obermaier Ch, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R & Weis W (2000) The current state of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*. 21: 1037-1053.
- Grinyer J, Kautto L, Traini M, Willows R, Te'o J, Bergquist P & Nevalainen H (2007) Proteome mapping of the *Trichoderma reesei* 20S proteasome. *Curr. Gen.* 51: 79-88
- Grinyer J, McKay M, Herbert B & Nevalainen H (2004) Fungal proteomics: mapping the mitochondrial proteins of a *Trichoderma harzarium* strain applied for biological control. *Curr. Gen.* 45: 170-175
- Gygi SP, Rist B, Gerber SA, Turecek F, Gelb MH & Aebersold R (1999) Quantitative analysis of protein complex protein mixtures using isotope coded affinity tags. *Nature Biotech.* 17: 994-999
- Han M, Kim N, Lee S & Chang H (2010) Extracellular proteome of *Aspergillus terreus* grown on different carbon sources. *Curr. Genet.* 56: 369-382
- Hekmat O, Florizone Ch, Kim Y, Eltis L, Warren R & Withers S (2007) Specificity Fingerprinting of retaining α -1,4-glycanases in the *Cellulomonas fimi* secretome using two fluorescent mechanisms-based probes. *Chem. Biochem.* 8: 2125-2132
- Hekmat, O, He S, Warren R & Withers S (2008) A mechanism based ICAT strategy for comparing relative expression and activity levels of glycosidases in biological systems. *J Proteome Res.* 7: 3282-3292
- Kim K, Brown K, Harris P, Langston J & Cherry J (2007) A proteomics strategy to discover α -glucosidases from *Aspergillus fumigatus* with two-dimensional page in-gel activity assay and tandem mass spectrometry. *J. Proteome Res.* 6: 4749-4757
- Kim Y, Nandakumar M & Marten M (2007) Proteome map of *Aspergillus nidulans* during osmoadaptation. *Fung. Gen. Biol.* 44: 886-895
- Klein J & Thongboonkerd V (2004) Overview of Proteomics. *Contrib. Nephrol. Basel Karger* 141: 1-10
- Kniemeyer O, Lessing F & Brakhage A (2009) Proteome analysis for

- pathogenicity and new diagnostic markers for *Aspergillus fumigatus*. *Med. Myc.* 47 Suppl 1: S248-54.
- Kniemeyer O, Lessing F, Scheiner O, Hertweck Ch & Brakhage A (2006) Optimisation of a 2-D gel electrophoresis protocol for the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Curr. Gen.* 49: 178-189
- Kumar A, Ahmed R, Singh P & Shukla P (2011) Identification of virulence factors and diagnostic markers using immunosecretome of *Aspergillus fumigatus*. *J. Prot.* 74: 1104-1112
- Liang Y, Pan L & Lin Y (2009) Analysis of extracellular proteins of *Aspergillus oryzae* grown on soy sauce Koji. *Biosc. Biotech. Biochem.* 73: 192-195.
- Lilburn T, Cai H, Zhou Z, Wang Y (2010) Protease-associated cellular networks in malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *BMC Genomics* 12:S9
- Lowry O, Rosebrough, N., Farr, L. & Randall, R (1951) Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 75: 193-265.
- Lu X, Nimtz M, Wissing J, Zeng A & Rinas U (2010) The intra and extracellular proteome of *Aspergillus niger* growing on defined medium with xylose or maltose as carbon substrate. *Microb. Cell. Fact.* 9: 23
- Lum G & Min X (2011) FunSeckB: the Fungal Secretome Knowledge Base. DATABASE, 2011: bar001
- Mabey J, Anderson M, Giles P, Miller C, Attwood T, Paton N, Bornberg E, Robson G, Oliver S & Denning D (2004) CADRE: the Central *Aspergillus* Data Repository. *Nucl. Acid. Res.* 32: D401-D405.
- Machida M & Asai K (2005) Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature* 438: 1157-1161.
- Mann M, Hendrickson R & Pandey A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 437-473.
- Medina M, Haynes P, Breci L & Francisco W (2005) Analysis of secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Proteome.* 5: 3153-3161
- Medina M, Kiernan U. & Francisco W (2004) Proteomic analysis of rutin-induced secreted proteins from *Aspergillus flavus*. *Fung. Gen. Biol.* 41: 327-335
- Melin P, Schnürer J & Wagner E (2002) Proteome analysis of *Aspergillus nidulans* proteins associated with the response to the antibiotic concanamycin A, produced by *Streptomyces* species. *Molec. Gen. Genom.* 267: 695-702
- Murphy C, Powlowski J, Wu M, Butler G & Tsang A (2011) Curation of characterized glycoside hydrolases of Fungal origin. DATABASE, 2011: bar020
- Nandakumar M & Marten M (2002) Comparison of lysis methods and preparation protocols for one and two dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins. *Electrophoresis.* 23: 2216-2222.
- Nandakumar M, Shen J, Raman B & Marten M (2003) Solubilization of Trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two dimensional electrophoresis. *J. Prot. Res.* 2: 89-93.

- Nguyen C, Tsurumitsu R, Sato T & Takeuchi M (2005) Taka amylase A in the conidia of *Aspergillus oryzae* RIB40. *Biosci. Biotech. Biochem.* 69: 2035-2041.
- Nielsen F, Morgensen J, Johansen M, Larsen T & Frisvad J (2009) Review of secondary metabolites and mycotoxins from the *Aspergillus niger* group. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 1225-1242
- Nierman W. & Pain A (2005) Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 428: 1151-1156.
- O'Farrell P (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250:4007-4021
- Oda K, Kakizono D, Yamada O, Iefuji H, Akita O & Iwashita K (2006) Proteomic analysis of extracellular proteins from *Aspergillus oryzae* grown under submerged and solid-state culture conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 3448-3457
- Okutucu B, Dinçer A, Habib Ö & Zihmoglu F (2007) Comparison of five methods for determination of total plasma protein concentration. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 70: 709-711
- Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, Kristensen D, Steen H, Pandey A & Mann M (2002) Stable isotope labeling by amino acid in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol. Cell Proteomics.* 1: 376-386.
- Pandey A & Mann M (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* 405: 837-846.
- Payne G, Nierman W, Wortman J, Pritchard B, Brown D, Dean R, Bhatnagar D, Cleveland T, Machida M & Yu J (2006) Whole Genome comparison of *Aspergillus flavus* and *A. oryzae*. *Med. Mycol.* 44: 9-11,
- Polizeli M, Rizzatti A, Monti R, Terenzi H, Jorge JA & Amorim D (2005) Xylanases from fungi: properties and industrial applications. *App. Microb. Technol.* 67: 577-591.
- Ritorto MS, Borlak J (2011) Combined serum and tissue proteomic study applied to a c-Myc transgenic mouse model of hepatocellular carcinoma identified novel disease regulated proteins suitable for diagnosis and therapeutic intervention strategies. *J. Proteome Res.* 12: 3012-3030
- Shimizu M, Fujii T, Masuo S, Fujita K & Takaya N (2009) Proteomic analysis of *Aspergillus nidulans* cultured under hypoxic conditions. *Proteome.* 9: 7-19.
- Shneider T, Gerrits B, Gassmann R, Schmid E, Gessner M, Richter A, Battin T, Eberl L & Riedel Kathrin (2010) Proteome analysis of fungal and bacterial involvement in leaf litter decomposition. *Proteome.* 10: 1819-1830
- Smith P, Krohn R, Hermanson G, Mallia A, Gartner F, Provenzano M, Fujimoto E, Goeke N, Olson B & Klenk D (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150: 76-85.
- Song X, Bandow J, Sherman J, Baker D, Brown P, Mc Dowell M & Molloy M (2008) iTRAQ experimental design for

- plasma biomarker discovery. *J. Prot. Res.* 7: 2952-2958.
- Ström K, Schürer J & Melin P (2005) Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. *FEMS Microb. Lett.* 246: 119-124
- Tamayo E, Villanueva A, Hasper A, Graaff L, Ramón D & Orejas M (2008) CreA mediates repression of the regulatory gene *xlnR* which controls the production of xylanolytic enzymes in *Aspergillus nidulans*. *Fung. Gen. Biol.* 45: 984-993
- Tekaia F, Latgé JP (2005) *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Curr. Op. Microbiol.* 8: 385-392
- Thanaraj T (2000) Positional characterization of false positives from computational prediction of human splice sites. *Nucl. Acid. Res.* 28: 744-754.
- Thomas C, Ehrhardt A & Kay M (2003) Progress and problems with the use of viral vectors for gene therapy. *Nature Rev. Gen.* 4: 346-358.
- Van Peij N (1999) Transcriptional regulation of *Aspergillus* involved in xylan and pectin degradation. Ph thesis. Wageningen Agriculture University Netherland
- van Tilbeurgh H, Clayssens M & Bruyne C (1982) The use of 4-methylumbelliferyl and other chromophoric glycosides in the study of cellulolytic enzymes. *FEBS Lett.* 149: 152-156.
- Vödisch M, Albretch A, Lebing F, Schimdt A, Winkler R, Guthke R, Brakhage A & Kniemeyer O (2009) Two dimensional reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Proteome.* 9: 1407-1415.
- Wang K, Ussery DW & Brunak S (2009) Analysis and prediction of gene splice sites in four *Aspergillus* genomes. *Fung. Gen. Biol.* 46: S14-S18.
- Wartenberg D, Lapp K, Jacobsen I, Martin H, Kniemeyer O, Heinekamp T & Brakhage A (2011) Secretome analysis of *Aspergillus fumigatus* reveals Asp-hemolysin as a mayor secreted protein. *Int. J. Med. Microbiol.* 301: 602- 611.
- Washburn M, Wolters D & Yates, J (2001) Large scale analysis of the yeast proteome by Multidimensional Protein Identification Technology. *Nature Biotech.* 19: 242-247
- Witteveen C & Visser, J (1995) Polyol pools in *Aspergillus niger*. *FEMS Microbiol. Lett.* 134: 57-62.
- www.ebi.ac.uk/; www.ncbi.nlm.nih.gov/; www.wwpdb.org/; www://eurofung.net/
- Zhu H, Bilgin M, Bangham R, Hall D, Casamayor A, Bertone P, Lan N, Jansen R, Bidlingmaier S, Houfek T, Mitchell T, Miller P, Dean RA, Gerstein M & Snyder M (2001) Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science* 293: 2101-2105
- Zhu L, Nguyen C, Sato T & Takeuchi M (2004) Analysis of secreted proteins during conidial germination of *Aspergillus oryzae* RIB40. *Biosc. Biotech. Biochem.* 68: 2607-2612