

Obesidad y análisis proteómico: su utilidad en la búsqueda de biomarcadores y blancos terapéuticos de enfermedades metabólicas.

Mónica Ramírez, Olga Lilia Garibay-Cerdenares, Verónica I. Martínez-Santos e Isela Parra-Rojas.

Laboratorio de Investigación en Obesidad y Diabetes, Facultad de Ciencias Químico Biológicas, Universidad Autónoma de Guerrero, Chilpancingo, Guerrero, México.

Palabras clave: obesidad; alteraciones metabólicas; biomarcadores; proteómica.

Resumen. La obesidad es una enfermedad compleja y multifactorial, caracterizada por un aumento de grasa corporal que puede ser ocasionado por un desequilibrio entre la ingesta de alimentos y el gasto energético. En el proceso de aumento de peso intervienen factores como la susceptibilidad genética, factores ambientales y el estilo de vida. Está bien documentado que la obesidad aumenta el riesgo de padecer numerosas enfermedades y trastornos metabólicos como la resistencia a la insulina, diabetes tipo 2, hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares, hígado graso, inflamación de bajo grado, algunos tipos de cáncer y trastornos psicológicos. Debido al incremento de la obesidad y sus comorbilidades en los últimos años en la población mundial, los gastos médicos erogados para su tratamiento representan un problema grave para los sistemas de salud pública. El análisis proteómico a gran escala, es una herramienta potente y prometedora para el descubrimiento de biomarcadores tempranos y para la comprensión de los mecanismos moleculares que subyacen a las alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad. No obstante, es imprescindible considerar las limitaciones técnicas y el análisis e interpretación de los hallazgos proteómicos, para avanzar en la comprensión funcional integral de la dinámica del proteoma ligado a la obesidad. Adicionalmente, los abordajes con un enfoque proteómico, permitirán el desarrollo de nuevas terapias preventivas, así como el descubrimiento de agentes terapéuticos potenciales en el tratamiento de disfunciones metabólicas. El objetivo de esta revisión es analizar las contribuciones más recientes de la proteómica en la búsqueda de biomarcadores relacionados con la obesidad.

Utility of proteomic analysis in the search for biomarkers and therapeutic targets in metabolic alterations associated with obesity.

Invest Clin 2017; 58(3): 284 - 308

Keywords: obesity; metabolic disorders; biomarkers; proteomics.

Abstract. Obesity is a complex and multifactorial disease characterized by an increase in body fat that can be caused by an imbalance between food intake and energy expenditure. In the process of weight gain, factors such as genetic susceptibility, environmental factors and lifestyle are involved. It is well documented that obesity increases the risk of numerous diseases and metabolic disorders such as insulin resistance, type 2 diabetes, hypercholesterolemia, cardiovascular disease, fatty liver, low grade inflammation, some types of cancer and psychological disorders. Due to the increase in obesity and its comorbidities in recent years at the global level, medical expenses incurred for its treatment represent a serious problem for public health systems. Large-scale proteomic analysis is a powerful and promising tool for the discovery of early biomarkers and for the understanding of the molecular mechanisms underlying the metabolic alterations associated with obesity. Nevertheless, it is essential to consider the technical limitations and the analysis and interpretation of the proteomic findings, to advance in the integral functional understanding of the dynamics of the proteome linked to obesity. In addition, approaches with a proteomic viewpoint will allow the development of new preventive therapies, as well as the discovery of potential therapeutic agents in the treatment of metabolic dysfunctions. The aim of this review is to analyze the most recent contributions of proteomics in the search for biomarkers related to obesity.

Recibido: 21-09-2016 Aceptado: 06-04-2017

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas los índices de sobrepeso y obesidad se han incrementado de forma exponencial. La obesidad aumenta significativamente el riesgo de enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y ciertos tipos de cáncer. A las enfermedades derivadas de la obesidad se les atribuyen alrededor de 2,8 millones de defunciones anualmente a nivel mundial (1). La acumulación de grasa corporal tiene efectos en la regulación del metabolismo, la presión arterial, el perfil lipídico, la sensibilidad a la insulina, los mecanismos inflamatorios y oxidativos,

así como en los patrones de expresión genética (2-4).

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a la obesidad como una acumulación excesiva de grasa corporal. Para superar las dificultades asociadas con la medición y clasificación del porcentaje de grasa corporal, la OMS estableció el índice de masa corporal (IMC) como el parámetro principal para la identificación de sobrepeso y obesidad (5). Este índice calcula el nivel de grasa corporal en relación a la altura y el peso de una persona, sin embargo, no permite la evaluación de la composición corporal, ya que no diferencia la masa muscular

libre de grasa, del tejido adiposo. Por lo tanto, una persona con un IMC normal (18,5-24,9 kg/m²) puede tener un porcentaje de grasa corporal adecuado o un exceso de grasa que podría ser enmascarada por el IMC normal (6,7). Paradójicamente, también existen individuos con obesidad, que no presentan alteraciones metabólicas y se consideran como obesos metabólicamente sanos. Lo anterior hace imprescindible la búsqueda de biomarcadores moleculares más precisos que, en combinación con el IMC, permitan la identificación de forma temprana a los individuos susceptibles de desarrollar comorbilidades.

La obesidad es una enfermedad compleja, crónica y multifactorial, en esta patología la causa principal de la acumulación de grasa es el desbalance entre la ingesta calórica y el gasto energético (8,9). En la obesidad y el sobrepeso, se presentan modificaciones estructurales y fisiológicas en el tejido adiposo (10). Sin embargo, la perspectiva aritmética de que un consumo menor de calorías y una mayor actividad física ocasionarán una reducción de grasa corporal, es demasiado simplista, ya que la regulación fisiológica de la ingesta de alimentos, la acumulación de tejido adiposo y el gasto energético, son procesos regulados de forma compleja (11).

Los cambios de hábitos alimenticios en las sociedades actuales, al sustituir las dietas tradicionales por comida altamente industrializada con un alto contenido en grasas, sodio y azúcares, la falta de ejercicio y la vida sedentaria, así como el estrés y los cambios en los patrones de sueño, son detonantes clave para el incremento notable de la obesidad en el mundo (12-14). La primera estrategia obvia y asequible para combatir esta enfermedad, es la prevención y cambios en el estilo de vida de los pacientes, sin embargo, su eficacia se reduce, ya que la mayoría de las personas con sobrepeso u obesidad que logran disminuir su peso corporal, lo recuperan a mediano plazo. Debido a esto, resulta impres-

cindible la búsqueda de blancos terapéuticos más eficientes para combatir la obesidad, de los que se disponen en la actualidad (15,16).

Aspectos fisiológicos relacionados con la obesidad

Diversos factores genéticos y ambientales están involucrados en el balance energético y la obesidad, al afectar conductas alimentarias y parámetros fisiológicos como la concentración de hormonas y moléculas implicadas en el metabolismo (17). La contribución de la genética al estudio de la obesidad, ha permitido la identificación de genes asociados con una mayor susceptibilidad de padecer la enfermedad. La obesidad es una enfermedad poligénica y sólo se han identificado algunos genes de susceptibilidad relacionados con diversos procesos fisiológicos, como la regulación de la tasa metabólica, el metabolismo de los lípidos, la homeostasis de la glucosa, la adipogénesis, la ingesta energética, la inflamación sistémica y la respuesta inmune (18,19). Recientemente, también se han identificado genes de susceptibilidad implicados en la regulación del apetito y del peso corporal (20-22).

La homeostasis de la energía se modula a nivel central y periférico, mediante la interacción fisiológica del tejido adiposo con órganos periféricos y con el sistema nervioso central. El peso corporal está estrechamente regulado por mecanismos homeostáticos complejos que involucran al hipotálamo y al tallo cerebral, además de los centros corticales superiores, con señales derivadas de órganos periféricos que dependen del estado nutricional y de la energía del organismo (23-25). En las regiones hipotalámicas de los núcleos arcuato (ARC), paraventricular (PVN), ventromedial (VMH), dorsometrial (DMH) y el área lateral (LHA), se integran las diversas señales que regulan la conducta alimentaria (25,26).

Las proyecciones neuronales desde el ARC

al resto de las áreas del hipotálamo son relevantes para la generación de una respuesta a los requerimientos de energía del organismo. En el ARC existen poblaciones neuronales con efectos antagónicos en la regulación de la conducta alimentaria, en este núcleo se expresan neuropéptidos con acciones anorexigénicas como la proopiomelanocortina (POMC) y el transcrito relacionado con la cocaína-anfetamina (CART). Además, también se expresan el neuropéptido Y (NPY) y la proteína relacionada a Agouti (AgRP), ambos con actividad orexigénica. En el ARC también convergen señales periféricas hormonales como la insulina, la leptina y la grelina, que indican al hipotálamo el estado energético en el que se encuentra el organismo y actúan induciendo saciedad o apetito (27-29) (Fig. 1).

En los seres humanos, los centros corticales superiores están implicados en la regulación de los procesos psicológicos y emocionales, que pueden estimular la ingesta de alimentos independientemente de las necesidades homeostáticas. Además, las vías corticolímbicas son responsables del comportamiento de recompensa asociada con la alimentación (30,31).

Proteínas relacionadas con el sobrepeso y la obesidad: Adipocinas

El tejido adiposo no es solamente un reservorio de energía almacenada en forma de triglicéridos, actualmente se le considera como un órgano endocrino, debido a que los adipocitos son capaces de secretar diversas proteínas denominadas precisamente adipocinas.

Las adipocinas provienen principalmente del tejido adiposo blanco (TAB) y tienen un papel primordial en la homeostasis de varios procesos fisiológicos, entre los que se incluyen: la ingesta de alimentos, la regulación del equilibrio energético, la acción de la insulina y el metabolismo de la glucosa. Algunas de las adipocinas que participan en estos procesos son: la proteína estimuladora de la acilación (ASP), el factor de

necrosis tumoral alfa (TNF- α), la interleucina 6 (IL-6), la resistina, la leptina y la adiponectina. También participan en la remodelación de la vascularización, la regulación de la presión arterial y la coagulación, el angiotensinógeno y el inhibidor del activador de plasminógeno (PAI-1) (11, 32). La leptina fue la primera hormona secretada por adipocitos que se identificó, posteriormente se identificaron numerosas adipocinas como la adiponectina, la resistina, la visfatina, la proteína 4 de unión al retinol (RBP4) y la lipocalina 2. Sin embargo, un número reducido de proteínas se han caracterizado como reguladores centrales de la sensibilidad a la insulina, del metabolismo energético corporal y de su homeostasis (33).

Es importante destacar, que el tejido adiposo visceral es el tejido que tiene mayor capacidad de secreción de adipocinas, y que su acumulación representa un riesgo mayor para el desarrollo de disfunciones metabólicas y cardiovasculares (33-35). Se especula que el tejido adiposo es capaz de secretar alrededor de 600 proteínas diferentes, implicadas localmente en la modulación de la adipogénesis y el metabolismo de los adipocitos, así como en la migración de células inmunes al tejido graso.

La diversidad de las adipocinas con relación a su estructura proteica y su función es notable. Las adipocinas incluyen citocinas inflamatorias clásicas como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y la interleucina 6 (IL-6); así como quimiocinas, como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1) (36-38), además de las proteínas relacionadas con el metabolismo de lípidos y la homeostasis de la glucosa, como la adiponectina y algunas otras implicadas en la angiogénesis, como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (39-41). Debido a la abundancia de las adipocinas y su importancia en la regulación de numerosos procesos fisiológicos, se las considera como objeto de es-

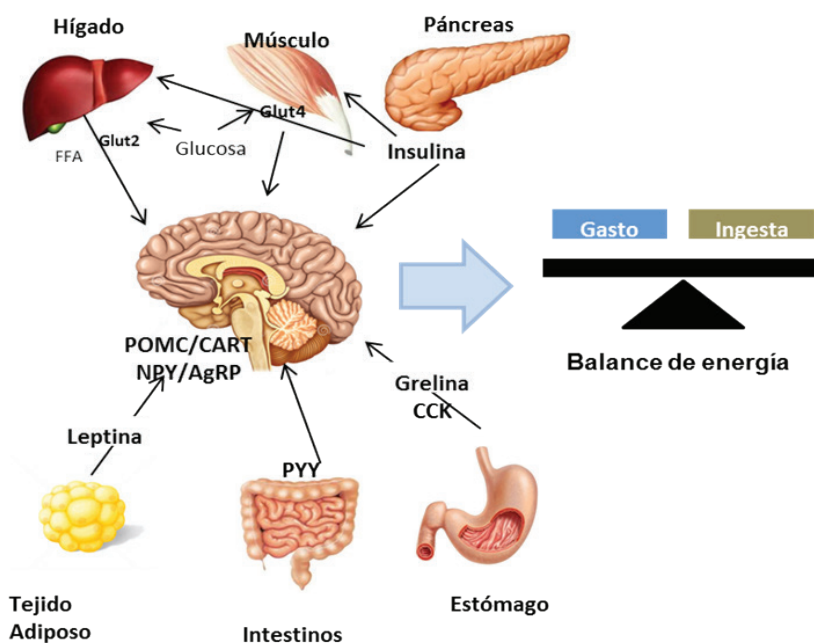


Fig. 1. Regulación de la homeostasis energética. Las señales hormonales regulan la ingesta y el gasto energético, la insulina del páncreas, la colecistoinina secretada por el estómago (CCK) y el péptido YY (PYY) del intestino reducen la ingesta de alimentos al promover la activación de las neuronas POMC/CART e inhibir las neuronas NPY/AgRP. La grelina del estómago y el intestino promueven el consumo de alimentos. La insulina, liberada del páncreas después de una comida, estimula la captación de glucosa en los tejidos periféricos a través de transportadores de glucosa (Glut 2/4) y la captación de ácidos grasos libres (FFA, por sus siglas en inglés) del torrente circulatorio. Al mismo tiempo, la insulina inhibe la producción de glucosa y ácidos grasos libres en el hígado. Las señales centrales también actúan directamente sobre los órganos periféricos.

tudio para la identificación y caracterización de biomarcadores nuevos, así como para la comprensión de los mecanismos moleculares relacionados con la acumulación de tejido adiposo (42-44).

Herramientas proteómicas comúnmente utilizadas en el estudio de la obesidad y el sobrepeso

Las proteínas son las biomoléculas con mayor abundancia y versatilidad funcional en los organismos. La proteómica es el estudio del conjunto de proteínas o proteoma de un organis-

mo o sistema, el cual comprende las diferentes proteínas codificadas por los genes y que se expresan en condiciones determinadas. Debido a esto, la expresión de las proteínas es un proceso altamente dinámico, que responde a los estados fisiopatológicos de las células y los tejidos. El estudio del proteoma, no sólo implica la identificación de las proteínas y sus niveles de expresión, sino también la caracterización de su estructura, de las modificaciones postraduccionales, la función y localización subcelular, así como de las interacciones proteína-proteína y proteína-DNA (45-48).

Debido a la naturaleza multifactorial de la obesidad, se conocen sólo algunos de los mecanismos moleculares relacionados con esta enfermedad, en los que están implicadas diversas proteínas que pueden estar alteradas en su concentración o en su función. Se han descrito tres fenotipos con relación a la obesidad y sus complicaciones metabólicas o cardiovasculares: obesos metabólicamente sanos, obesos con alteraciones metabólicas e individuos de peso normal con alteraciones metabólicas, por lo que es relevante desde el punto de vista clínico, realizar estudios globales de los perfiles proteómicos para la identificación de proteínas diferenciales en personas con y sin obesidad, asociada a disfunciones metabólicas (49).

Es importante destacar que se han realizado numerosos estudios con un abordaje proteómico en muestras de tejido provenientes de modelos animales con obesidad, los cuales han aportado información relevante para esclarecer los mecanismos moleculares implicados en esta enfermedad; sin embargo, es necesario considerar las limitaciones de los modelos animales en la interpretación de los estudios y su extrapolación a la obesidad en los humanos.

En los últimos años, se han desarrollado de forma acelerada nuevas metodologías para el análisis proteómico a gran escala. Uno de los avances más notables en el campo de la proteómica ha sido el uso de la espectrometría de masas (MS), para la identificación de proteínas obtenidas a partir de muestras clínicas analizadas de forma directa, o de muestras en las que las proteínas se separan previamente en un gel, mediante electroforesis bidimensional (2DE) o por cromatografía (46,50).

La técnica 2DE es una de las herramientas más útiles para la separación de proteínas utilizando dos de sus características bioquímicas más representativas: el peso molecular y el punto isoeléctrico. Existen en el mercado tiras pre-fabricadas de acrilamida, las cuales favore-

cen la separación y resolución de proteínas en un rango amplio de pH, a partir de concentraciones variables de proteína (20 a 500 µg), según el tamaño de la tira (7 a 20 cm), por lo que a través de este método pueden resolverse de 200 a 2000 proteínas en promedio, con un grado variable de eficiencia, que depende del tipo de muestra y del protocolo de lisis celular. Además, pueden ser visualizadas isoformas distintas de una proteína y modificaciones postraduccionales como la fosforilación, debido a los cambios en el punto isoeléctrico, que pueden tener las isoformas de una proteína. En la actualidad, existen algunas variaciones al método clásico de O'Farrell y Klose (51), en las cuales se pueden procesar de manera simultánea hasta tres muestras previamente marcadas con fluorocromos, previo a la electroforesis bidimensional y analizadas en el mismo gel, que es denominado 2D-DIGE y posteriormente, mediante el uso de un software especializado (DeCyder, GE Healthcare™), se genera un panel bidimensional de cada muestra, el cual puede superponerse para definir los patrones de expresión diferencial (47, 52).

Otra herramienta para la separación de proteínas, que permite una cuantificación y separación proteica más precisa, es la cromatografía líquida asociada a espectrometría de masas, la cual separa las proteínas químicamente a través del uso de columnas que generan interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas en presencia de un solvente. Después de que la muestra atraviesa la columna, se ioniza e ingresa al espectrómetro de masas, donde el vacío remueve los solventes para que el detector determine la masa y produzca un espectro de alta resolución (53-55).

En la espectrometría de masas para la identificación de una proteína, se realiza previamente la digestión con tripsina, con el objetivo de mejorar las medidas de precisión de la masa en el análisis de MS. Esta técnica permite la ionización de la proteína o péptido y mide sus relaciones masa-carga. Dos métodos de ionización

son empleados comúnmente, el láser de desorción/ionización asistida por matriz (MALDI) y la ionización por electrospray (ESI). El analizador de tiempo de vuelo (TOF), se utiliza más comúnmente en combinación con la fuente MALDI (56-58). En ambas técnicas, la muestra se mezcla con una matriz líquida, en MALDI-TOF ambas se co-cristalizan sobre una superficie sólida, donde la matriz se evapora. En ESI, la matriz y la muestra se inyectan desde el interior de un capilar metálico, al que se aplica un potencial eléctrico que evapora los iones y así, son incididos sobre un detector para la generación de un espectro con valores de masa/carga. Los espectros son posteriormente analizados utilizando un software como Mascot, establecido como un estándar para la identificación de proteínas a partir de los datos obtenidos de la espectrometría de masas (www.matrixscience.com), el cual contiene algoritmos para determinar la secuencia de los péptidos y así permite la identificación de la secuencia primaria de las proteínas (56-58).

La mayoría de los estudios validan la identificación de las proteínas a través de técnicas como western blot, inmunohistoquímica e inmunohistofluorescencia, sin embargo, no hay estándares internos perfectamente validados, lo que podría conducir a una interpretación errónea de los resultados. Por otro lado, la proteómica cuantitativa, como el SILAC (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture), el ICAT (Isotope-Coded Affinity Tags) o los métodos libres de marcaje, utilizan estándares internos o isótopos marcados, los cuales se han utilizado para el análisis de secretomas (59). En la Tabla I se muestran las ventajas y desventajas del uso de las diferentes estrategias proteómicas utilizadas para el estudio de la obesidad.

A partir de los datos obtenidos de la identificación de proteínas, se pueden generar modelos predictivos (análisis *in silico*), utilizando como herramienta las bases de datos internacionales

disponibles para algunos organismos. Utilizando estas bases de datos se han logrado construir redes metabólicas y moleculares que posibilitan explorar e inferir mecanismos celulares fundamentales y su respuesta a diferentes tipos de daño, además de que permiten revelar el funcionamiento dinámico e interactivo de las proteínas. Las etapas principales para la realización de estudios proteómicos se muestran en la Fig. 2.

Tipo de muestras

Actualmente, es posible realizar estudios proteómicos de prácticamente cualquier tipo de muestra biológica. Se han realizado estudios proteómicos en muestras de tejido adiposo visceral y subcutáneo, de células de sangre periférica, suero, plasma e incluso orina, provenientes de individuos obesos y con peso normal (52). Independientemente del tipo de muestra a analizar por proteómica, es imprescindible almacenar las muestras de forma correcta, sobre todo si se desea evaluar modificaciones postraduccionales. Normalmente, las muestras biológicas se almacenan para su preservación a -80°C , preferentemente en medios con inhibidores de proteasas. Debido a que el acceso a muestras biológicas de pacientes es limitado, es deseable contar con biobancos que cumplan con la normativa establecida para garantizar la correcta clasificación y preservación de las muestras (60).

Para que la realización de estudios proteómicos en la clínica sea factible y extensiva, es preferible usar fluidos como la sangre, ya que son muestras biológicas de obtención rutinaria y que no implican procedimientos invasivos o costosos. Sin embargo, la desventaja principal de utilizar una muestra sanguínea para separar el plasma o el suero, es que estos fluidos contienen una gran cantidad de albúmina e inmunoglobulinas. Estas proteínas corresponden al 95% del total de la muestra, mientras que el 5% restante pertenece a una variedad amplia de proteínas como citocinas, hormonas, enzimas y proteínas

TABLA I
TÉCNICAS COMÚNMENTE EMPLEADAS PARA EL ANÁLISIS PROTEÓMICO
EN ESTUDIOS RELACIONADOS CON EL SOBREPESO Y LA OBESIDAD

Estrategia metodológica	Características	Ventajas	Desventajas
Electroforesis bidimensional	<p>Separación de proteínas con base en su peso molecular y punto isoelectrico.</p> <p>Dos alternativas de procesamiento de la muestra:</p> <p>Tiras de acrilamida comerciales pre-fabricadas con rangos de pH y tamaño variables.</p> <p>Elaboración artesanal de capilares con acrilamida-bis acrilamida con gradiente de pH.</p>	<p>Útil para casi cualquier tipo de muestra.</p> <p>Se requiere un software para el análisis de expresión global entre condiciones.</p> <p>Identificación de proteínas en función de la reproducibilidad, concentración y resolución de las proteínas.</p> <p>Detección de isoformas con diferente punto isoelectrico, asociado a diferentes niveles de fosforilación.</p>	<p>Concentraciones requeridas de proteína de 50-2000 mg.</p> <p>Número reducido de proteínas identificadas.</p> <p>Proteínas poco solubles o con rangos extremos de pH no se visualizan.</p> <p>Lisis celular con alto contenido de sales que no se puede procesar.</p>
2D-DIGE 2-D <i>Fluorescence Difference Gel Electrophoresis</i>	<p>Separación de proteínas con base en su peso molecular y punto isoelectrico con la utilización de fluorescencia diferencial.</p> <p>Dos alternativas de procesamiento de la muestra:</p> <p>Tiras de acrilamida comerciales pre-fabricadas con rangos de pH y tamaño variables.</p> <p>Elaboración artesanal de capilares con acrilamida-bis acrilamida con gradiente de pH.</p> <p>Fluorocromos utilizados para marcar las proteínas en cada condición, se utilizan fluoróforos CyDye DIGE.</p>	<p>Se utiliza un estándar interno que elimina la variación entre geles.</p> <p>No requiere réplicas técnicas para confirmar diferencias, ya que usa como estándar interno la mezcla conjunta de las muestras.</p> <p>Pueden ser procesadas muestras de dos condiciones diferentes de manera simultánea en un mismo gel.</p> <p>Se puede obtener una cuantificación relativa.</p>	<p>Costosa.</p> <p>Requiere escáner y software específico (Decyder).</p> <p>Las mediciones cuantitativas son un factor de error, debido a la sobrecarga de estándares internos y a la sobrenormalización, debido a la calidad del gel, la transferencia incompleta de proteínas y al escaneo incorrecto de los geles.</p>
LC-MS <i>Shotgun Liquid chromatography mass spectrometry</i>	<p>Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem</p>	<p>Combina la separación líquida de proteínas y el análisis por espectrometría de masas.</p> <p>Análisis de muestras con baja concentración de proteínas.</p>	<p>Costosa.</p> <p>Muestras sumamente complejas en contenido de proteínas, en los espectrogramas es difícil de determinar m/z.</p> <p>La separación de las proteínas es relevante para la identificación.</p>

Continuación: TABLA I

Estrategia metodológica	Características	Ventajas	Desventajas
iTRAQ <i>Stable isotope labeling Isobaric Tags for Relative and Absolute Quantification</i>	Proteómica cuantitativa	Información cuantitativa. Análisis múltiple de hasta 4-8 muestras simultáneas. Puede identificar proteínas con alta, mediana y baja abundancia. Se puede obtener la identificación simultánea de cientos de proteínas. Se pueden detectar modificaciones postraduccionales. Se identifican proteínas ácidas o básicas. En la identificación de proteínas se requiere un software convencional.	Costoso. La cuantificación requiere un software especializado (ProQuant). Se utiliza un software especializado para el análisis del control interno (I-tracker). La cuantificación se basa en la abundancia relativa de la proteína en la muestra.
iTRAQ2D-LC-nESI-FTMS <i>Electrospray ionization/Liquid chromatography-mass spectrometry</i>	Cromatografía líquida multidimensional acoplada a espectrometría de masas. Proteómica relativa	Con esta estrategia se potencia la capacidad para eliminar interferencias, aumentando la capacidad de resolución de los espectrogramas, mejorando la caracterización de muestras complejas. Se manejan dos columnas de separación con diferente temperatura y composición, controladas de forma independiente. En la identificación de proteínas se requiere un software convencional.	Costoso. La cuantificación requiere un software especializado (ProQuant). Se utiliza un software especializado para el análisis del control interno (I-tracker). La cuantificación se basa en la abundancia relativa de la proteína en la muestra.
SILAC <i>Stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>	Incorporación biológica de nutrientes marcados isotópicamente para el análisis cuantitativo de muestras. Incorporan nitrógeno de aminoácidos marcados isotópicamente para su unión a proteínas durante el proceso de síntesis.	Las células deben ser cultivadas para permitir la división celular, de manera que sean incorporados los aminoácidos isotópicos. Útil en el análisis del secretoma de adipocitos en cultivo.	Análisis sólo aplicable a cultivos celulares. Fluidos corporales no pueden ser analizados. Costoso.

Continuación: TABLA I

Estrategia metodológica	Características	Ventajas	Desventajas
Bioinformática	Para análisis teórico de las proteínas identificadas (Análisis <i>in silico</i>).	Disponibles bases de datos gratuitas. Permite hacer inferencias a partir de información con validez experimental sobre la estructura, función, localización subcelular, cambios en la expresión, interacción molecular, así como participación en vías de señalización.	No se dispone de información experimental validada de todas las proteínas descritas en las plataformas bioinformáticas, por lo que la asociación con el proceso a analizar es limitada.

citoplasmáticas y nucleares (61).

La abundancia de la albúmina y las inmunoglobulinas puede generar fondo en cualquier análisis proteómico y enmascarar los cambios significativos en las proteínas de interés. Estas proteínas se pueden eliminar del suero usando diversas metodologías, como la cromatografía por columna, para favorecer la identificación de biomarcadores proteicos que tienen menor nivel de expresión. No obstante, ya que la albúmina acarrea diversas proteínas, es posible que, mediante la eliminación de ésta, también se eliminen de forma no intencional, proteínas de interés relacionadas con la obesidad. Por otro lado, los lípidos contenidos en el suero, frecuentemente están aumentados en personas obesas y pueden enmascarar proteínas que pueden ser potenciales biomarcadores. En algunos casos, es necesario también eliminar los lípidos de las muestras séricas (61,62).

Los resultados de los análisis proteómicos comparativos de personas obesas en las diferentes etapas de la enfermedad con respecto a individuos con peso normal, pueden identificar blancos terapéuticos potenciales, así como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico. Se ha sugerido que la identificación de proteínas y la

caracterización de sus niveles de expresión en suero, pueden ser útiles para la detección precoz de alteraciones metabólicas, incluso antes de la aparición de los síntomas. Por lo tanto, la identificación de proteínas en suero expresadas diferencialmente, podría ser relevante para la prevención y el tratamiento de la obesidad, así como de las patologías asociadas con esta enfermedad.

Estudios de los cambios del perfil proteómico relacionados con la obesidad y el sobrepeso

En los últimos años se han publicado diversos trabajos con abordajes proteómicos en el campo de la obesidad, estos estudios han permitido identificar numerosas proteínas con niveles de expresión diferentes en individuos obesos, con respecto a individuos con peso normal. Los trabajos más destacados se describen a continuación y se resumen en la Tabla II.

La obesidad y el incremento en los niveles de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), son factores de riesgo conocidos para las enfermedades cardiovasculares, aunque el papel preciso de los diferentes constituyentes de las LDL en la obesidad no ha sido muy estudiado. En un trabajo publicado por Karlsson y col. (63), se

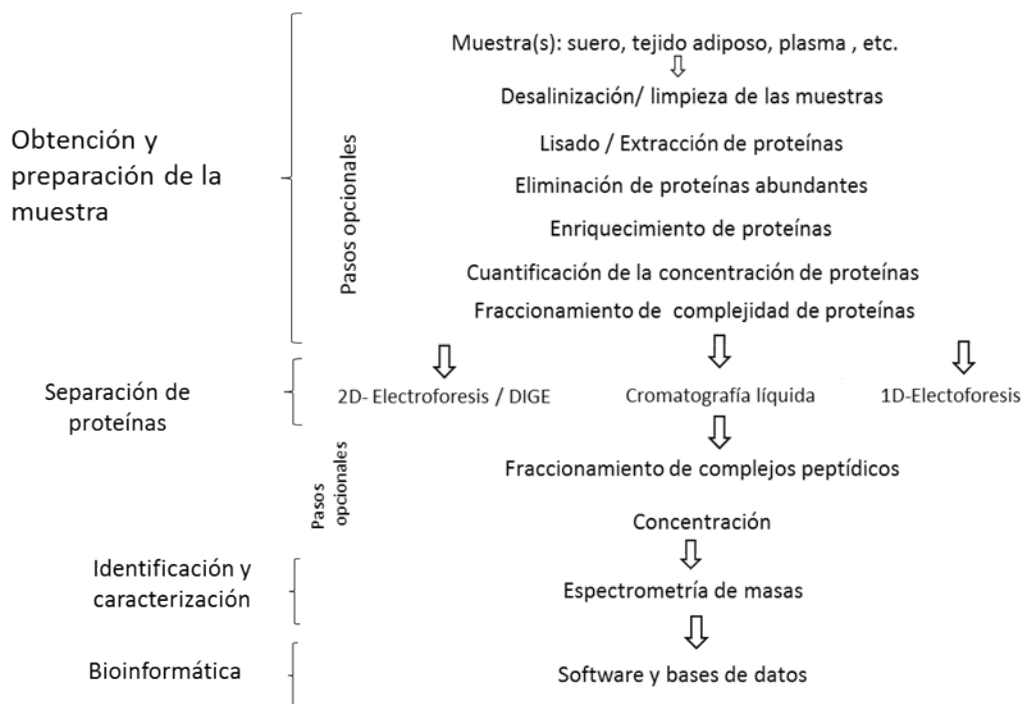


Fig.2. Esquema representativo de los principales pasos para desarrollar un estudio proteómico desde la preparación de la muestra, hasta el análisis bioinformático de los resultados obtenidos.

analizó el proteoma de las LDL de adultos con peso normal ($IMC \leq 25$) y obesos ($IMC \geq 30$). Las LDL fueron aisladas por ultracentrifugación en gradientes de densidad y las proteínas separadas mediante 2D PAGE y posteriormente identificadas por MS y MALDI-TOF. Identificaron a la transtiretina como una proteína relacionada con las LDL y se encontró en mayor abundancia en sujetos obesos. Además, las LDL de las personas obesas contenían relativamente más A1-antitripsina, apoJ y apoC-II que las de personas con peso normal. Por otro lado, las cantidades relativas de apoA4 y de la isoforma mayor de apoAI, así como apoE, se encontraron en menor proporción en las LDL de los sujetos obesos; sin embargo, esta diferencia sólo se observó en sujetos del género masculino. Estos hallazgos sugieren que la obesidad no sólo está asociada con un aumento de los niveles de colesterol LDL,

sino también con alteraciones en la composición de las proteínas de tipo LDL. La presencia de transtiretina en las LDL de sujetos obesos puede reflejar una nutrición excesiva y afectar el metabolismo de lípidos.

La obesidad infantil es de los problemas más urgentes a resolver, ya que en las personas que presentan obesidad en edades tempranas, aumenta de forma significativa el riesgo para el desarrollo de comorbilidades relacionadas con la obesidad en la edad adulta. En el año 2011, Galata y col., publicaron un estudio (64) en niños preadolescentes obesos, en el que analizaron el perfil proteómico de muestras séricas. Encontraron que la expresión de las apolipoproteínas apoAI y apoE, fue significativamente menor en niños obesos y con sobrepeso en comparación con los niños con un IMC normal, mientras que la expresión de ApoA4 fue mayor

TABLA II
ESTUDIOS PROTEÓMICOS CLASIFICADOS SEGÚN EL TIPO DE MUESTRA
EMPLEADO PARA EL ANÁLISIS

Tipo de muestra	Herramientas proteómicas	Hallazgos principales	Ref
Tejido adiposo	2-DIGE PAGE, MALDI MS/MS.	El análisis proteómico del tejido adiposo subcutáneo y omental de obesos metabólicamente sanos y con alteraciones metabólicas, muestra cambios en proteínas relacionadas con sistemas de defensa antioxidante, así como de proteínas chaperoninas y las relacionadas con el estrés del retículo endoplasmático.	(65)
	2D-DIGE, MALDI-TOF/TOF.	Las muestras de tejido adiposo subcutáneo y visceral de individuos obesos y con peso normal, tienen una expresión diferencial entre ambos grupos de individuos, encontrándose diferencias en la carboxilesterasa 1, la ubiquitina carboxilhidroxilasa L3, anexina 5 y α -cristalina, que muestran un aumento en expresión. Las proteínas circulantes que disminuyen en las personas obesas son la albúmina, fibrinógeno, α -1 antitripsina, proteína del complemento C3 y transferrina.	(69)
	2D-DIGE/MS	El análisis proteómico del tejido adiposo visceral u omental de personas obesas muestra una disminución en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo oxidativo celular, como la transcetolasa y la aminoacilasa-1 (ACY-1).	(70)
	2D-DIGE/ MALDI-TOF	Se identificaron 30 proteínas expresadas de forma diferencial, 9 presentaron una mayor expresión de forma comparativa entre obesos de diferentes edades. Las proteínas identificadas fueron prohibitina 1, proteína disulfuroisomerasa, β -actina, profilina, aldo-cetorreductasa 1, α -cristalina, y las anexinas A1, A5 y A6.	(71)
	2D-DIGE, MALDI-TOF/TOF	Se sometió a individuos obesos y con sobrepeso a restricción calórica por 5 semanas, las muestras de tejido adiposo subcutáneo abdominal antes y después de la intervención tuvieron diferencias en los niveles de expresión de las proteínas ApoA1, tubulina β 5, anexina A2, la proteína antioxidante 1(AOP1), FABP4 y vimentina.	(72)

Continuación: TABLA II

Tipo de muestra	Herramientas proteómicas	Hallazgos principales	Ref
	1D-PAGE/MS/ MALDI-TOF	El ejercicio físico intenso de 2 semanas puede inducir cambios en el perfil proteómico en individuos obesos y con sobrepeso; las proteínas relacionadas con inflamación crónica como IL-6, MCP-1, TNF- α , ICAM-1 e IL-10, disminuyeron, sin embargo, no se detectaron modificaciones en el IMC de los individuos analizados o en la sensibilidad a la insulina.	(74)
Células mononucleares de sangre periférica.	NanoLC-MS/MS	En este estudio se analizaron los mecanismos subyacentes a la progresión de la obesidad y la posibilidad de disminuirla con actividad física. Se identificaron 47 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales, la trombospondina 1 (TSP1) aumentó su expresión, mientras que la enzima histona deacetilasa 4 (HDAC4) presentó una reducción.	(75)
Suero	2-D PAGE, MS/ MALDI-TOF	La transtiretina, la A1-antitripsina, la Apo J, y la Apo C-II están elevadas en individuos obesos. En la obesidad se aumentan los niveles de colesterol LDL y se modifica la composición de las proteínas de tipo LDL.	(63)
	2-D PAGE, MS/ MALDI-TOF	Reducción de la expresión de la ApoAI y de la ApoE en niños obesos y aumento de la ApoA4, por lo tanto, se presentaron cambios en el perfil proteómico de apolipoproteínas séricas en niños con sobrepeso y obesos.	(64)
	MARS/ mR- PLC-MS/M	Veinte proteínas se expresaron diferencialmente entre mujeres metabólicamente sanas y con alteraciones metabólicas; algunas proteínas diferenciales fueron las subunidades de hemoglobina (HBA1, P5), la proteína relacionada con haptoglobina (HPR) y las apolipoproteínas APOB100, APOA4, RBP4 y CRP.	(66)
	SuPrE-SEC/iTRAQ 2D-LC-nESI- FTMS	Se analizaron muestras de hombres y mujeres con sobrepeso y obesidad. Un total de 248 proteínas mostraron una modulación significativa entre hombres y mujeres, que se correlacionaron con vías asociadas con β -estradiol, lípidos y metabolismo prostanoides, función de la vitamina D, inmunidad e inflamación y con las cascadas de coagulación y del complemento, que sugieren un dimorfismo sexual a nivel molecular relacionado con la obesidad	(68)

Continuación: TABLA II

Tipo de muestra	Herramientas proteómicas	Hallazgos principales	Ref
	2D-PAGE y Western Blot	Se determinó una correlación entre los niveles de deficiencia de vitamina D con la obesidad, la resistencia a la insulina, los niveles de glucosa en ayunas y la presión arterial de niños obesos, en comparación con niños sin deficiencia de vitamina D. Estas alteraciones metabólicas coincidieron con la expresión diferencial de distintas isoformas de las proteínas adiponectina y haptoglobina β . La isoforma de mayor peso molecular de la adiponectina tiene una expresión menor en niños obesos deficientes de vitamina D; notablemente, la suplementación con esta vitamina, mejora la sensibilidad a la insulina en estos niños.	(76)
	2D-MS/MALDI-TOF	Se analizó el suero de preadolescentes obesos para detectar las alteraciones metabólicas e identificar nuevos biomarcadores potenciales y de expresión precoz. Los hallazgos más importantes indican que las isoformas de la apoA1, y las proteínas apo-J/clusterina, la proteína de unión a vitamina D y la transtiretina tienen una expresión reducida en obesos con resistencia a la insulina. También se observó que las isoformas de bajo peso molecular de la haptoglobina se incrementan en niños obesos. En este estudio se identificó a la haptoglobina como un biomarcador potencial en obesidad y resistencia a la insulina, y a la apoA1 de resistencia a la insulina.	(77)
Plasma	Derivación con O-hidroxilamina/RPC-MS/MS/LC-MS/MS	Las proteínas VEGFR-2, MMP-1, MKK4 y la proteína del complemento C5 se encuentran carboniladas en personas obesas, lo que indica la existencia de procesos relacionados con estrés oxidante.	(67)
Orina	IEF/ SDS-PAGE/MS	La cirugía bariátrica y la restricción calórica ocasionan cambios en la excreción de las proteínas albúmina, transferrina, VAMP3 y RBP4.	(73)

en obesos en comparación con los de peso normal. Esto sugiere que en niños con sobrepeso y obesos, los cambios en el perfil proteómico de las apolipoproteínas séricas pueden identificarse aún antes de que las alteraciones metabólicas se manifiesten.

Está bien documentado que la obesidad se caracteriza por un estado inflamatorio sistémico de bajo grado y por la disfunción del tejido adiposo, factores que predisponen a los individuos al desarrollo de resistencia a la insulina y a las alteraciones metabólicas. Sin embargo, existen

personas obesas metabólicamente sanas (MHO, por sus siglas en inglés). En la actualidad, se desconocen los mecanismos moleculares responsables de la progresión de la resistencia a la insulina en los adipocitos y que culminan en un fenotipo de obesidad no saludable. En el año 2015, Díaz-Ruiz y col. (65), realizaron un estudio proteómico en tejido adiposo subcutáneo y omental de obesos metabólicamente sanos y con alteraciones metabólicas. El análisis proteómico demostró que el perfil de proteínas en ambos depósitos de adipocitos es diferente, específicamente, los grupos de proteínas que se encontraban alterados, estaban relacionados con el ciclo redox del glutatión y otros sistemas de defensa antioxidante, así como las proteínas de la maquinaria de plegamiento de polipéptidos y las relacionadas con el estrés del retículo endoplásmico. En las personas con resistencia a la insulina, las proteínas involucradas con la regulación proteosómica (vía de degradación proteica), también se encuentran alteradas. Este estudio proporciona evidencias de la desregulación de la homeostasis de las proteínas en los adipocitos, que junto con el daño oxidativo, interfieren con la señalización de la insulina en el tejido adiposo.

Recientemente, en el año 2016, Doumatey y col. (66), publicaron un estudio que comparó el proteoma sérico de mujeres obesas con alteraciones metabólicas y con obesas metabólicamente sanas (MHO). Sus hallazgos mostraron 20 proteínas expresadas diferencialmente en mujeres con alteraciones metabólicas; se encontró la sobreexpresión de diversas subunidades de hemoglobina (HBA1, P5), la proteína relacionada con haptoglobina (HPR), las apolipoproteínas APOB100 y APOA4, la proteína RBP4 y la proteína CRP, mientras que el fenotipo MHO se asoció con niveles bajos de moléculas proinflamatorias y mayores niveles de biomarcadores antiinflamatorios. Estos hallazgos sugieren que un estado antiinflamatorio y la protección a la

desregulación del metabolismo de lípidos fueron las principales características moleculares del fenotipo MHO. Los biomarcadores candidatos para identificar el fenotipo MHO son los niveles de expresión de las proteínas glicoproteína α -2HS (AHSG), la RBP4 y la APOA4 (66).

La determinación de cambios en las modificaciones postraduccionales, relacionados con estados fisiopatológicos, es una de las áreas de mayor interés en el campo de la proteómica. La carbonilación de proteínas se considera como un marcador de estrés oxidante. Además, existen evidencias que sugieren una vinculación de la carbonilación de proteínas con la obesidad y la diabetes mellitus tipo 2 (DM2). Bollineni y col. (67), en el año 2014, realizaron un estudio de proteínas carboniladas en el plasma de individuos con peso normal y en obesos con y sin diabetes. Se identificaron un total de 158 proteínas carboniladas, de las cuales 52 fueron detectadas en muestras de los tres grupos de estudio. Notablemente, 36 proteínas carboniladas se detectaron sólo en individuos obesos con DM2, mientras que 18 fueron detectadas en ambos grupos de no diabéticos. Las proteínas carboniladas identificadas se originan principalmente en hígado, plasma, plaquetas y endotelio; éstas participan principalmente en la adherencia celular, señalización, angiogénesis y remodelación citoesquelética. Entre las proteínas carboniladas identificadas se encuentran el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial tipo 2 (VEGFR-2), la metaloproteasa-1 (MMP-1), la proteína cinasa activada por mitógenos tipo 4 (MKK4) y la proteína del complemento C5.

Se piensa que los perfiles proteómicos deben mostrar las diferencias específicas de género, considerando la etiología molecular de la obesidad. Para abordar esta interrogante, Al-Daghri y col. en el año 2014 (68), estudiaron el perfil de proteínas séricas de individuos con sobrepeso y en obesos, tanto de género masculino como femenino. Un total de 248 proteínas mos-

traron una modulación diferencial significativa entre hombres y mujeres, que se incluyen en las vías asociadas con β -estradiol, metabolismo de lípidos y prostanoides, función de la vitamina D, inmunidad e inflamación y en las cascadas de coagulación y del complemento. Este nuevo perfil proteómico endofenotípico muestra diferencias específicas asociadas al género, confirmando los resultados de estudios fisiológicos y farmacológicos previos, que exploran al dimorfismo sexual a nivel genómico y transcriptómico en células y tejidos. Debido a la naturaleza multifactorial y pleiotrópica de la obesidad, que muestra un dimorfismo sexual en el proteoma circulante, es importante considerar el dimorfismo sexual en el diseño de estudios clínicos (68).

Se ha descrito que existen diferencias mínimas en el perfil proteómico del tejido adiposo obtenido de depósitos subcutáneo o visceral de pacientes obesos. Insenser y col. en el año 2012 (69), describieron que las proteínas fibrinógeno y osteoglicina tienen una expresión diferencial entre ambos depósitos. Sin embargo, las diferencias en el perfil proteómico del tejido adiposo son evidentes independientemente de su distribución corporal, cuando se comparan individuos obesos con respecto a los de peso normal. Las principales proteínas expresadas de forma diferencial entre ambos grupos de individuos son la carboxilesterasa 1, la ubiquitina carboxilhidroxilasa L3, la anexina 5 y la α -cristalina, que muestran un aumento en su expresión. En contraste, las proteínas circulantes que disminuyen en las personas obesas son la albúmina, el fibrinógeno, la α -1 antitripsina, la proteína del complemento C3 y la transferrina (69).

En el año 2012, Pérez-Pérez y col. (70), realizaron un análisis proteómico del tejido adiposo visceral u omental de personas obesas y encontraron una disminución en la expresión de proteínas relacionadas con el metabolismo oxidativo celular. Las proteínas mitocondriales que disminuyen son las relacionadas con la oxi-

dación de ácidos grasos, el ciclo de Krebs y de la cadena respiratoria. Además, también existen cambios en la expresión de citoqueratinas, que podrían ser explicados por la remodelación y cambios morfológicos que ocurren en el tejido adiposo, como consecuencia de la obesidad. De este análisis, se concluye que dos proteínas muestran una expresión diferencial evidente: la transcetolasa y la aminoacilasa-1 (ACY-1).

La obesidad y el envejecimiento afectan el metabolismo de los adipocitos y la distribución de grasa en los depósitos subcutáneos y viscerales. Además, de que ambos efectos pueden conducir a la resistencia a la insulina, las enfermedades cardiovasculares y la aterosclerosis. En el año 2013 Alfadda y col. (71), analizaron el perfil de expresión de proteínas en el tejido adiposo subcutáneo de personas obesas y lo correlacionaron con la edad. A través del análisis en 2D-DIGE acoplado a MALDI-TOF, estos autores identificaron 30 proteínas expresadas de forma diferencial, de las cuales 13 fueron analizadas y de éstas, 9 presentaron una mayor expresión de forma comparativa entre obesos de diferentes edades. Las proteínas identificadas fueron prohibitina 1, proteína disulfuroisomerasa, β -actina, profilina, aldo-cetorreductasa 1, α -cristalina, y las anexinas A1, A5 y A6. Notablemente, estas proteínas están involucradas en la regulación de la apoptosis, senescencia celular y en la respuesta inflamatoria, procesos patológicos comunes en la obesidad y el envejecimiento.

Es indudable que el perfil proteómico de los individuos se modifica dependiendo de su estado de salud-enfermedad, como ocurre con la obesidad. Sin embargo, resulta interesante evaluar si las intervenciones para disminuir el peso en las personas con obesidad, pueden revertir las alteraciones en la expresión de ciertas proteínas o bien determinar si estos cambios son más duraderos, debido a la memoria metabólica ocasionada por cambios epigenéticos.

En un estudio realizado en el año 2009 (72) Bouwman y col. sometieron a individuos obesos y con sobrepeso a una restricción calórica durante 5 semanas. Al analizar el tejido adiposo subcutáneo abdominal, se observaron diferencias en los niveles de expresión de las proteínas apoA1, tubulina β 5, anexina A2, la proteína antioxidante 1 (AOP1), la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4) y vimentina.

Uno de los tratamientos disponibles en la actualidad para la obesidad mórbida es la cirugía bariátrica. Esta intervención es capaz de disminuir de forma drástica el IMC, el riesgo de padecer diabetes tipo 2 y las alteraciones cardiovasculares. Sin embargo, debido al costo de la cirugía y a las posibles complicaciones quirúrgicas, la primera estrategia utilizada para combatir la obesidad es la restricción calórica. En un estudio publicado por Alfadda y col. (73), se encontró que ambas estrategias utilizadas para disminuir el IMC ocasionan cambios en la excreción de las proteínas albúmina, transferrina, la proteína vesicular asociada a membrana 3 (VAMP3) y la RBP4, las cuales fueron evaluadas en la orina.

Se ha reportado que un esquema de ejercicio físico intenso de tan sólo 2 semanas, puede inducir cambios en el perfil proteómico en individuos obesos y con sobrepeso, aunque es importante evaluar el tiempo de permanencia de estos cambios. En este estudio se determinó que después de 6 o 7 sesiones de ejercicio intenso, las proteínas relacionadas con inflamación crónica como IL-6, MCP-1, TNF- α , ICAM-1 e IL-10, tienen una disminución notable, al igual que la sintetasa de ácidos grasos (FAS). Por otro lado, la proteína anexina 2 en el tejido adiposo, también presentó un patrón de expresión distinto antes y después de la activación física. A pesar de estos cambios, no se detectaron modificaciones en el IMC de los individuos analizados o en la sensibilidad a la insulina (74).

En el año 2013, Abu-Farha y col. (75), pu-

blicaron un estudio en el que realizaron análisis proteómico de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Las muestras de CMSP se obtuvieron de individuos con peso normal y obesos, con la finalidad de identificar y cuantificar las proteínas expresadas diferencialmente entre ambos grupos. En este estudio se analizaron los mecanismos subyacentes a la progresión de la obesidad y la posibilidad de disminuirla con actividad física. Se identificaron 47 proteínas expresadas diferencialmente, de las cuales, la trombospondina 1 (TSP1) aumentó su expresión, mientras que la enzima histona deacetilasa 4 (HDAC4) presentó una reducción. Los pacientes fueron nuevamente evaluados después de 3 meses de actividad física supervisada, y encontraron que los niveles de expresión de TSP1 y HDAC4 se revirtieron, observándose niveles de expresión similares a los presentes en sujetos con peso normal. Derivada de este hallazgo, surge la posibilidad de utilizar fármacos que modulen la actividad de la HDAC4 para combatir la obesidad.

Es indiscutible que el estado nutricional tiene un papel relevante en las alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad. En el año 2013, Walker y col. (76), publicaron un estudio que relaciona la deficiencia de vitamina D con alteraciones en el perfil proteómico de niños obesos. De manera interesante, encontraron una correlación entre los niveles de vitamina D con la obesidad, la resistencia a la insulina, los niveles de glucosa en ayunas y la presión arterial de niños obesos, en comparación con niños con niveles normales de vitamina D. Estas alteraciones metabólicas coinciden con la expresión diferencial de distintas isoformas de las proteínas adiponectina y haptoglobina β . La isoforma de mayor peso molecular de la adiponectina tiene una expresión menor en niños obesos con deficiencia de vitamina D; notablemente la suplementación con esta vitamina, mejora la sensibilidad a la insulina en estos niños (76).

Uno de los objetivos primordiales de las investigaciones en el área de la obesidad, es identificar biomarcadores precoces de síndrome metabólico u otras complicaciones metabólicas y cardiovasculares, con la finalidad de diseñar estrategias preventivas y terapéuticas novedosas.

Con respecto a abordajes proteómicos para la búsqueda de biomarcadores, Martos-Moreno y col. en el año 2014 (77), analizaron el suero de preadolescentes obesos para detectar las alteraciones metabólicas e identificar nuevos biomarcadores potenciales y de expresión precoz. Los hallazgos más importantes indicaron que las isoformas de la apolipoproteína A1, y las proteínas apo-J/clusterina, la proteína de unión a vitamina D y la transtiretina tienen una expresión reducida en obesos con resistencia a la insulina. La resistencia a la insulina se revirtió parcialmente después de la pérdida de peso en estos pacientes. También observaron que las isoformas de bajo peso molecular de la haptoglobina se incrementan en niños obesos. En este estudio se identificó a la haptoglobina como un biomarcador potencial en obesidad y resistencia a la insulina, y a la apoA1 de resistencia a la insulina. De hecho, la apoA1 y la haptoglobina se validaron mediante un ensayo inmunoenzimático (ELISA), para confirmar su importancia clínica como potenciales biomarcadores, para determinar alteraciones metabólicas de inicio temprano en la obesidad y de resistencia a la insulina en la infancia.

En el campo de la obesidad, los estudios proteómicos globales realizados en los últimos años aún son escasos, con la desventaja de que los análisis han sido realizados en un número reducido de muestras. Las muestras más utilizadas provienen de tejido adiposo y suero, por la facilidad de su obtención. A pesar de la diversidad en los grupos poblacionales estudiados, la edad de los participantes en los protocolos y las intervenciones para disminuir el IMC o para aminorar la resistencia a la insulina, existen

proteínas que tienen una expresión consistente entre los individuos con sobrepeso y obesidad. Los estudios revisados indican que las proteínas anexina A2 y la ApoA1, tienen una distribución más generalizada y una expresión diferencial en los individuos con obesidad, con respecto a los sometidos a intervenciones para disminuir el IMC o sujetos con peso normal.

La anexina A2 (ANX2) es una proteína que pertenece a una familia de proteínas de unión a membrana, con la capacidad de asociarse con fosfolípidos aniónicos en presencia de Ca^{2+} y contribuye a la formación de los canales de iones, proporcionando así un vínculo entre la señalización de Ca^{2+} y la membrana celular (78). Así como otros miembros de la familia de las anexinas, la ANX2 regula diversas funciones dentro de diferentes compartimientos celulares y también puede ser secretada (79,80). Se ha demostrado que la ANX2 de la membrana celular forma complejos con otras proteínas, que a su vez están implicadas en la fibrinólisis, la coagulación y la inflamación (81,82). Recientemente, se demostró que ANX2, en conjunto con la prohibitina, pueden formar complejos que favorecen el transporte de ácidos grasos desde el endotelio vascular a los adipocitos (83).

En lo que respecta a la apolipoproteína AI (ApoAI), ésta es la proteína más abundante de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). Se ha descrito que la disminución en los niveles de HDL y apoAI se asocia con la obesidad y el síndrome metabólico en humanos. Esta proteína también funciona como un factor antiinflamatorio (84,85).

Notablemente, las proteínas anexina 2 y ApoA1 están relacionadas con procesos inflamatorios; esto es consistente con la noción general de que la obesidad es una enfermedad que se caracteriza por una inflamación crónica de bajo grado. Ambas proteínas también están implicadas en la regulación y transporte de lípidos, lo que favorece la acumulación excesiva de

tejido adiposo que conduce a la obesidad.

Conclusiones y perspectivas

Debido a que la obesidad es una enfermedad multifactorial y compleja que se asocia con diferentes comorbilidades, es importante conocer los diferentes perfiles de expresión de proteínas que pueden estar implicadas en el metabolismo y gasto energético: las relacionadas con la inflamación crónica, las que participan en la señalización y los receptores involucrados en la regulación del apetito y la saciedad, entre otras.

Los abordajes proteómicos se utilizan cada vez más en un mayor número de estudios básicos y clínicos, ya que, debido a su enfoque global, permiten obtener de forma simultánea una enorme cantidad de información. Por otro lado, presentan ventajas sobre otro tipo de estudios, como los genómicos o transcriptómicos, ya que permiten evaluar cambios no codificados en el DNA, como las modificaciones post-traduccionales. El estudio comparativo de los perfiles proteómicos de pacientes obesos con respecto a individuos con peso normal, indudablemente permitirá el hallazgo de nuevos biomarcadores y posibles blancos terapéuticos.

El descubrimiento de biomarcadores tempranos relacionados con el desarrollo de alteraciones metabólicas asociadas con la obesidad, es difícil y sigue siendo un reto a superar, debido a la complejidad y diversidad de las muestras empleadas, como el suero, otros fluidos corporales o tejido adiposo, así como al amplio rango dinámico de las concentraciones de proteínas. La mayoría de los estudios de biomarcadores realizados hasta el momento, convergen en un conjunto reducido de proteínas que se identifican repetidamente en la mayoría de los estudios y que representan sólo una proporción pequeña, pero de mayor abundancia de todo el proteoma. Para eliminar este problema, se requiere una preparación eficiente de la muestra para reducir la complejidad y enriquecer los componentes

de menor abundancia, mientras se eliminan los más abundantes. El procesamiento y análisis de datos proteómicos es un procedimiento complejo que incluye numerosos pasos. Las técnicas proteómicas acopladas al análisis por MS se utilizan ampliamente, pero la MS continúa siendo el principal problema para muchos estudios de proteómica con muestras numerosas.

A pesar del progreso notable de la proteómica en los últimos 15 años, con el desarrollo de técnicas más sensibles y rápidas, en lo que respecta a la proteómica clínica cuantitativa, que tiene como objetivo principal el descubrimiento de biomarcadores, no se ha logrado un avance significativo. Se han descrito cientos de proteínas o péptidos como biomarcadores potenciales, sin embargo, sólo un número reducido de estos biomarcadores candidatos son validados finalmente. Este problema se extiende a toda el área biomédica y no es exclusivo de la investigación relacionada con la obesidad.

Los estudios proteómicos, ya sea con el objetivo de identificar nuevos biomarcadores o para la caracterización de complejos de proteínas involucradas en una enfermedad, generan información a gran escala que posteriormente es necesario analizar por medio de herramientas bioinformáticas. Mediante éstas se pueden generar modelos de predicción de los cambios en la secuencia, estructura, función, localización subcelular, así como de las interacciones moleculares que pueden estar asociadas a procesos celulares relacionados con las alteraciones metabólicas. Para determinar su utilidad clínica, es imprescindible que sean validados funcionalmente usando modelos adicionales o analizando poblaciones vulnerables o control. La validación funcional de las proteínas previamente identificadas por medio de técnicas proteómicas, ya sea *in vitro* y/o con el uso de modelos animales de obesidad, permitirá la caracterización de interacciones entre grupos de proteínas y una mejor comprensión de los mecanismos moleculares

que subyacen a una enfermedad multifactorial y compleja como la obesidad. Sin embargo, en la actualidad la mayoría de los estudios proteómicos son solamente descriptivos y se reducen a la identificación de nuevas proteínas y a la validación de su identificación.

La principal limitante en la caracterización de los mecanismos moleculares relacionados con disfunciones metabólicas, es la ausencia de un enfoque integral que pueda correlacionar los hallazgos proteómicos con el resto de las disciplinas y técnicas “ómicas”: la transcriptómica (estudio de la totalidad de RNA mensajero o transcritos en un organismo), la genómica (estudio del conjunto de genes en un sistema biológico) y la metabolómica (estudio de los procesos químicos que involucran metabolitos). Es imprescindible un análisis global con la finalidad de tener una perspectiva funcional integral, pero, para conseguir este objetivo se requiere un trabajo interdisciplinario y herramientas bioinformáticas más eficientes.

Es incuestionable que el análisis proteómico permite la apertura de directrices novedosas para el entendimiento de mecanismos moleculares relacionados con alteraciones metabólicas, los datos derivados de la identificación de proteínas serán la plataforma que posibilitará inferir el funcionamiento dinámico e interactivo de las proteínas asociadas con la obesidad y sus comorbilidades.

AGRADECIMIENTOS

Las autoras agradecen a CONACYT por la aprobación del proyecto 2595 de Cátedras para Jóvenes Investigadores.

REFERENCIAS

1. **World Health Organization.** Global status report on noncommunicable diseases 2010. Geneva: World Health Organization; 2014:1-280.
2. **do Carmo JM, da Silva AA, Wang Z, Fang T, Aberdein N, de Lara Rodriguez CE, Hall JE.** Obesity-induced hypertension: brain signaling pathways. *Curr Hypertens Rep* 2016; 18(7):58.
3. **Veilleux A, Mayeur S, Bérubé JC, Beaulieu JF, Tremblay E, Hould FS, Bossé Y, Richard D, Levy E.** Altered intestinal functions and increased local inflammation in insulin-resistant obese subjects: a gene-expression profile analysis. *BMC Gastroenterol* 2015; 15: 119.
4. **Polsky S, Ellis SL.** Obesity, insulin resistance, and type 1 diabetes mellitus. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2015; 22(4): 277-282.
5. **World Health Organization.** Physical Status: the use and interpretation of anthropometry. Geneva: World Health Organization; 1995:1-452. WHO Technical Report Series no. 854.
6. **Antonopoulos AS, Oikonomou EK, Antoniadis C, Tousoulis D.** From the BMI paradox to the obesity paradox: the obesity-mortality association in coronary heart disease. *Obes Rev* 2016; 17(10): 989-1000.
7. **Ding C, Chan Z, Magkos F.** Lean, but not healthy: the ‘metabolically obese, normal-weight’ phenotype. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2016; 19(6): 408-417.
8. **Kopelman PG.** Obesity as a medical problem. *Nature* 2000; 404(6778): 635-643.
9. **Richard D.** Cognitive and autonomic determinants of energy homeostasis in obesity. *Nat Rev Endocrinol* 2015; 11(8): 489-501.
10. **Choe SS, Huh JY, Hwang IJ, Kim J I, Kim JB.** Adipose tissue remodeling: its role in energy metabolism and metabolic disorders. *Front in Endocrinol (Lausanne)* 2016; 7: 30.
11. **Cohena P, Spiegelmanb BM.** Cell biology of fat storage. *Mol Biol Cell* 2016; 27(16):

- 2523-2527.
12. **Hruby A, Manson JE, Qi L, Malik VS, Rimm EB, Sun Q, Willett WC, Hu FB.** Determinants and consequences of obesity. *Am J Public Health* 2016; 106(9): 1656-1662.
 13. **Swinburn BA, Sacks G, Hall KD, McPherson K, Finegood DT, Moodie ML, Gortmaker SL.** The global obesity pandemic: shaped by global drivers and local environments. *Lancet* 2011; 378(9793): 804-814.
 14. **Gangwisch JE, Malaspina D, Boden-Albala B, Heymsfield SB.** Inadequate sleep as a risk factor for obesity: analyses of the NHANES I. *Sleep* 2005; 28(10): 1289-1296.
 15. **Manning S, Pucci A, Finer N.** Pharmacotherapy for obesity: novel agents and paradigms. *Ther Adv Chronic Dis* 2014; 5(3): 135-148.
 16. **Goswami G, Shinkazh N, Davis N.** Optimal pharmacologic treatment strategies in obesity and type 2 diabetes. *J Clin Med* 2014; 3(2): 595-613.
 17. **Doo M, Kim Y.** Obesity: interactions of genome and nutrients intake. *Prev Nutr Food Sci* 2015; 20(1): 1-7.
 18. **Pigeyre M, Yazdi FT, Kaur Y, Meyre D.** Recent progress in genetics, epigenetics and metagenomics unveils the pathophysiology of human obesity. *Clin Sci (Lond)* 2016; 130(12): 943-986.
 19. **León-Mimila P, Villamil-Ramírez H, Villalobos-Comparán M, Villarreal-Molina T, Romero-Hidalgo S, López-Contreras B, Gutiérrez-Vidal R, Vega-Badillo J, Jacobo-Albavera L, Posadas-Romeros C, Canizalez-Román A, Río-Navarro BD, Campos-Pérez F, Acuña-Alonzo V, Aguilar-Salinas C, Canizales-Quinteros S.** Contribution of common genetic variants to obesity and obesity-related traits in Mexican children and adults. *PLoS One* 2013; 8(8): e70640.
 20. **de Heredia FP, Gómez-Martínez S, Marcos A.** Obesity, inflammation and the immune system. *Proc Nutr Soc* 2012; 71(2): 332-338.
 21. **Telle-Hansen VH, Halvorsen B, Dalen KT, Narverud I, Wesseltuft-Rao N, Granlund L, Ulven SM, Holven KB.** Altered expression of genes involved in lipid metabolism in obese subjects with unfavorable phenotype. *Genes Nutr* 2013; 8(4): 425-434.
 22. **MacLaren R, Cui W, Simard S, Cianflo- ne K.** Influence of obesity and insulin sensitivity on insulin signaling genes in human omental and subcutaneous adipose tissue. *J Lipid Res* 2008; 49(2): 308-323.
 23. **Farr OM, Li CS, Mantzoros CS.** Central nervous system regulation of eating: insights from human brain imaging. *Metabolism* 2016; 65(5): 699-713.
 24. **Després JP.** Exercise and energy balance: going to extremes to show that body weight is not the best outcome. *Am J Clin Nutr* 2015; 102(6): 1303-1304.
 25. **Schneeberger M, Gomis R, Claret M.** Hypothalamic and brainstem neuronal circuits controlling homeostatic energy balance. *J Endocrinol* 2014; 220(2): T25-T46.
 26. **Sam AH, Troke RC, Tan TM, Bewick GA.** The role of the gut/brain axis in modulating food intake. *Neuropharmacology* 2012; 63(1): 46-56.
 27. **Goldstone AP, Prechtel CG, Scholtz S, Miras AD, Chhina N, Durighel G, Deliran SS, Beckmann C, Ghatei MA, Ashby DR, Waldman AD, Gaylenn BD, Thorner MO, Frost GS, Bloom SR, Bell JD.** Ghrelin mimics fasting to enhance human hedonic, orbitofrontal cortex, and hippocampal responses to food. *Am J Clin Nutr* 2014; 99(6): 1319-1330.

28. **Cornier MA, McFadden KL, Thomas EA, Bechtell JL, Eichman LS, Bessesen DH, Tregellas JR.** Differences in the neuronal response to food in obesity-resistant as compared to obesity-prone individuals. *Physiol Behav* 2013; 110-111:122-128.
29. **Scharmüller W, Übel S, Ebner F, Schienle.** An appetite regulation during food cue exposure: a comparison of normal-weight and obese women. *Neurosci Lett* 2012; 518(2): 106-110.
30. **Janke EA, Jones E, Hopkins CM, Ruggieri M, Hruska A.** Catastrophizing and anxiety sensitivity mediate the relationship between persistent pain and emotional eating. *Appetite* 2016; 103:64-71.
31. **Figlewicz DP.** Modulation of food reward by endocrine and environmental factors: update and perspective. *Psychosom Med* 2015; 77(6): 664-670.
32. **Echan LA, Tang HY, Ali-Khan N, Lee K, Speicher DW.** Depletion of multiple high-abundance proteins improves protein profiling capacities of human serum and plasma. *Proteomics* 2005; 5(13): 3292-3303.
33. **Viswanath V, Danda D.** Inflammation, metabolism and adipokines: toward a unified theory. *Int J Rheum Dis* 2016; 19(7): 633-636.
34. **Medina-Urrutia A, Posadas-Romero C, Posadas-Sánchez R, Jorge-Galarza E, Villarreal-Molina T, González-Salazar M del C, Cardoso-Saldaña G, Vargas-Alarcón G, Torres-Tamayo M, Juárez-Rojas JG.** Role of adiponectin and free fatty acids on the association between abdominal visceral fat and insulin resistance. *Cardiovasc Diabetol* 2015; 14: 20. doi: 10.1186/s12933-015-0184-5.
35. **Ritchie SA, Connell JM.** The link between abdominal obesity, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2007; 17(4): 319-326.
36. **Mancuso P.** The role of adipokines in chronic inflammation. *Immunotargets Ther* 2016; 5: 47-56.
37. **Ouchi N, Parker JL, Lugus JJ, Walsh K.** Adipokines in inflammation and metabolic disease. *Nat Rev Immunol* 2011; 11(2): 85-97.
38. **Matia-García I, Salgado-Goytia L, Muñoz-Valle JF, García-Arellano S, Hernández-Bello J, Salgado-Bernabé AB, Parra-Rojas I.** Macrophage migration inhibitory factor promoter polymorphisms (-794 CATT 5-8 and -173 G>C): relationship with mRNA expression and soluble MIF levels in young obese subjects. *Dis Markers* 2015; 2015:461208. doi: 10.1155/2015/461208. Epub 2015 Apr 20.
39. **Bastard JP, Maachi M, Van Nhieu JT, Jardel C, Bruckert E, Grimaldi A, Robert JJ, Capeau J, Hainque B.** Adipose tissue IL-6 content correlates with resistance to insulin activation of glucose uptake both in vivo and in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(5): 2084-2089.
40. **Gögebakan Ö, Osterhoff MA, Schüler R, Pivovarov O, Kruse M, Seltmann AC, Mosig AS, Rudovich N, Nauck M, Pfeiffer AF.** GIP increases adipose tissue expression and blood levels of MCP-1 in humans and links high energy diets to inflammation: a randomized trial. *Diabetologia* 2015; 58(8): 1759-1768.
41. **Kalupahana NS, Massiera F, Quignard-Boulangé A, Ailhaud G, Voy BH, Wasserman DH, Moustaid-Moussa N.** Overproduction of angiotensinogen from adipose tissue induces adipose inflammation, glucose intolerance, and insulin resistance. *Obesity* 2012; 20(1): 48-56.
42. **Ahl S, Guenther M, Zhao S, James R, Marks J, Szabo A, Kidambi S.** Adiponectin levels differentiate metabolically heal-

- thy vs unhealthy among obese and nonobese white individuals. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(11): 4172-4180.
43. **Karaman S, Hollmén M, Robciuc MR, Alitalo A, Nurmi H, Morf B, Buschle D, Alkan HF, Ochsenbein AM, Alitalo K, Wolfrum C, Detmar M.** Blockade of VEGF-C and VEGF-D modulates adipose tissue inflammation and improves metabolic parameters under high-fat diet. *Mol Metab* 2014; 4(2): 93-105.
 44. **Kang YE, Kim JM, Joung KH, Lee JH, You BR, Choi MJ, Ryu MJ, Ko YB, Lee MA, Lee J, Ku BJ, Shong M, Lee KH, Kim HJ.** The roles of adipokines, proinflammatory cytokines, and adipose tissue macrophages in obesity-associated insulin resistance in modest obesity and early metabolic dysfunction. *PLoS One* 2016; 11(4): e0154003. doi: 10.1371/journal.pone.0154003.
 45. **Csász É, Kalló G, Márkus B, Deák E, Csutak A, Tózsér J.** Quantitative body fluid proteomics in medicine - a focus on minimal invasiveness. *J Proteomics* 2017; 153: 30-43.
 46. **Rampitsch C, Bykova NV.** Methods for functional proteomic analyses. *Methods Mol Biol* 2009; 513: 93-110.
 47. **Percy AJ, Byrns S, Pennington SR, Holmes DT, Anderson NL, Agreste TM, Duffy MA.** Clinical translation of MS-based, quantitative plasma proteomics: status, challenges, requirements, and potential. *Expert Rev Proteomics* 2016; 13(7): 673-684.
 48. **Calvo KR, Liotta LA, Petricoin EF.** Clinical proteomics: from biomarker discovery and cell signaling profiles to individualized personal therapy. *Biosci Rep* 2005; 25(1-2): 107-125.
 49. **Brockman D, Chen X.** Proteomics in the characterization of adipose dysfunction in obesity. *Adipocyte* 2012; 1(1): 25-37.
 50. **Savaryn JP, Toby TK, Kelleher NL.** A researcher's guide to mass spectrometry-based proteomics. *Proteomics*. 2016; 16(18): 435-443.
 51. **O'Farrel PH: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins.** *J Biol Chem* 1975, 250(10): 4007-4021.
 52. **López-Villar E, Martos-Moreno GÁ, Chowen JA, Okada S, Kopchick JJ, Argente J.** A proteomic approach to obesity and type 2 diabetes. *Cell Mol Med* 2015; 19(7): 1455-1470.
 53. **Kondo T, Hirohashi S.** Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics. *Nat Protoc* 2006; 1(6):2940-2956.
 54. **O'Rourke MB, Djordjevic SP, Padula MP.** The quest for improved reproducibility in MALDI mass spectrometry. *Mass Spectrom Rev* 2016; doi: 10.1002/mas.21515.
 55. **Camerini S, Mauri P.** The role of protein and peptide separation before mass spectrometry analysis in clinical proteomics. *J Chromatogr A* 2015; 1381:1-12.
 56. **Aebersold R, Mann M.** Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. *Nature* 2016; 537(7620): 347-355.
 57. **Sabbagh B, Mindt S, Neumaier M, Findeisen P.** Clinical applications of MS-based protein quantification. *Proteomics Clin Appl* 2016; 10(4): 323-345.
 58. **Perez-Riverol Y, Wang R, Hermjakob H, Müller M, Vesada V, Vizcaíno JA.** Open source libraries and frameworks for mass spectrometry based proteomics: a developer's perspective. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1844(1 Pt A): 63-76.
 59. **Chahrour O, Cobice D, Malone J.** Stable

- isotope labelling methods in mass spectrometry-based quantitative proteomics. *J Pharm Biomed Anal* 2015; 113: 2-20.
60. **Jambunathan K, Galande AK.** Sample collection in clinical proteomics-proteolytic activity profile of serum and plasma. *Proteomics Clin Appl* 2014; 8(5-6): 299-307.
 61. **Ahmed N, Barker G, Oliva K, Garfin D, Talmadge K, Georgiou H, Quinn M, Rice G.** An approach to remove albumin for the proteomic analysis of low abundance biomarkers in human serum. *Proteomics* 2003; 3(10):1980-1987.
 62. **Stastna M, Van Eyk JE.** Secreted proteins as a fundamental source for biomarker discovery. *Proteomics* 2012; 12(4-5): 722-735.
 63. **Karlsson H, Mörtstedt H, Lindqvist H, Tagesson C, Lindahl M.** Protein profiling of low-density lipoprotein from obese subjects. *Proteomics Clin Appl* 2009; 3(6): 663-671.
 64. **Galata Z, Moschonis G, Makridakis M, Dimitraki P, Nicolaidis NC, Manios Y, Bartzeliotou A, Chrousos GP, Charmandari E.** Plasma proteomic analysis in obese and overweight prepubertal children. *Eur J Clin Invest* 2011; 41(12): 1275-1283.
 65. **Díaz-Ruiz A, Guzmán-Ruiz R, Moreno NR, García-Rios A, Delgado-Casado N, Membrives A, Túnez I, El Bekay R, Fernández-Real JM, Tovar S, Diéguez C, Tinahones FJ, Vázquez-Martínez R, López-Miranda J, Malagón MM.** Proteasome dysfunction associated to oxidative stress and proteotoxicity in adipocytes compromises insulin sensitivity in human obesity. *Antioxid Redox Signal* 2015; 23(7): 597-612.
 66. **Doumatey AP, Zhou J, Zhou M, Prieto D, Rotimi CN, Adeyemo A.** Proinflammatory and lipid biomarkers mediate metabolically healthy obesity: a proteomics study. *Obesity* 2016; 24(6): 1257-1265.
 67. **Bollineni RC, Fedorova M, Blüher M, Hoffmann R.** Carbonylated plasma proteins as potential biomarkers of obesity induced type 2 diabetes mellitus. *J Proteome Res* 2014, 13(11): 50801-5093.
 68. **Al-Daghri NM, Al-Attas OS, Johnston HE, Singhanian A, Alokail MS, Alkharfy KM, Abd-Alrahman SH, Sabico SL, Roumeliotis TI, Manousopoulou-Garbis A, Townsend PA, Woelk CH, Chrousos GP, Garbis SD.** Whole serum 3D LC-nESI-FTMS quantitative proteomics reveals sexual dimorphism in the milieu intérieur of overweight and obese adults. *J Proteome Res* 2014; 13(11): 5094-5105.
 69. **Insenser M, Montes-Nieto R, Vilarrasa N, Lecube A, Simó R, Vendrell J, Escobar-Morreale HF.** A nontargeted proteomic approach to the study of visceral and subcutaneous adipose tissue in human obesity. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 363(1-2): 10-19.
 70. **Pérez-Pérez R, García-Santos E, Ortega-Delgado FJ, López JA, Camafeita E, Ricart W, Fernández-Real JM, Peral B.** Attenuated metabolism is a hallmark of obesity as revealed by comparative proteomic analysis of human omental adipose tissue. *J Proteomics* 2012; 75(3): 783-795.
 71. **Alfadda AA, Benabdelkamel H, Maseed A, Moustafa A, Sallam R, Bassas A, Duncan M.** Proteomic analysis of mature adipocytes from obese patients in relation to aging. *Exp Gerontol* 2013; 48(11): 1196-1203.
 72. **Bouwman FG, Claessens M, van Baak MA, Noben JP, Wang P, Saris WH, Mariman EC.** The physiologic effects of caloric restriction are reflected in the in vivo adipocyte-enriched proteome of overweight/obese subjects. *J Proteome Res* 2009;

- 8(12): 5532-5540.
73. **Alfadda AA, Turjoman AA, Moustafa AS, Al-Naami MY, Chishti MA, Sallam RM, Gibson D, Duncan MW.** A proteomic analysis of excreted and circulating proteins from obese patients following two different weight-loss strategies. *Exp Biol Med (Maywood)* 2014; 239(5): 568-580.
 74. **Leggate M, Carter WG, Evans MJ, Venard RA, Sribala-Sundaram S, Nimmo MA.** Determination of inflammatory and prominent proteomic changes in plasma and adipose tissue after high-intensity intermittent training in overweight and obese males. *J Appl Physiol (Bethesda, Md.1985)* 2012; 112(8): 1353-1360.
 75. **Abu-Farha M, Tiss A, Abubaker J, Khadir A, Al-Ghimlas F, Al-Khairi I, Baturcam E, Cherian P, Elkum N, Hammad M, John J, Kavalakatt S, Warsame S, Behbehani K, Dermime S, Dehbi M.** Proteomics analysis of human obesity reveals the epigenetic factor HDAC4 as a potential target for obesity. *PLoS One* 2013; 8(9): e75342. doi: 10.1371/journal.pone.0075342.
 76. **Walker GE, Ricotti R, Roccio M, Moia S, Bellone S, Prodam F, Bona G.** Pediatric obesity and vitamin D deficiency: a proteomic approach identifies multimeric adiponectin as a key link between these conditions. *PLoS One* 2014; 9(1): e83685. doi: 10.1371/journal.pone.0083685.
 77. **Martos-Moreno GÁ, Sackmann-Sala L, Barrios V, Berrymann DE, Okada S, Argente J, Kopchick JJ.** Proteomic analysis allows for early detection of potential markers of metabolic impairment in very young obese children. *Int J Pediatr Endocrinol* 2014; 2014(1): 9.
 78. **Bharadwaj A, Bydoun M, Holloway R, Waisman D.** Annexin A2 heterotetramer: structure and function. *Int J Mol Sci* 2013; 14(3): 6259-6305.
 79. **Gerke V, Creutz CE, Moss SE.** Annexins: linking Ca²⁺ signalling to membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6(6): 449-461.
 80. **Siever DA, Erickson HP.** Extracellular annexin II. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29(11): 1219-1223.
 81. **Ling Q, Jacovina AT, Deora A, Febbraio M, Simantov R, Silverstein RL, Hempstead B, Mark WH, Hajjar KA.** Annexin II regulates fibrin homeostasis and neangiogenesis in vivo. *J Clin Invest* 2004; 113(1): 38-48.
 82. **Luo M, Hajjar KA.** Annexin A2 system in human biology: cell surface and beyond. *Semin Thromb Hemost* 2013; 39(4): 338-346.
 83. **Salameh A, Daquinag AC, Staquicini DI, An Z, Hajjar KA, Pasqualini R, Arap W, Kolonin MG.** Prohibitin/annexin 2 interaction regulates fatty acid transport in adipose tissue. *JCI Insight.* 2016; 1(10). pii: e86351.
 84. **Fong BS, Rodrigues PO, Salter AM, Yip BP, Despres JP, Angel A, Gregg RE.** Characterization of high density lipoprotein binding to human adipocyte plasma membranes. *J Clin Invest* 1985; 75(6): 1804-1812.
 85. **Van Lenten BJ, Wagner AC, Jung CL, Ruchala P, Waring AJ, Lehrer RI, Watson AD, Hama S, Navab M, Anantharamaiah GM, Fogelman AM.** Anti-inflammatory apoA-I-mimetic peptides bind oxidized lipids with much higher affinity than human apoA-I. *J Lipid Res* 2008; 49(11): 2302-2311.