

Aplicaciones de proteómica en ecología y evolución

A. Cieslak¹, I. Ribera²

(1) Museo Nacional de Ciencias Naturales (CSIC), 28006 Madrid, España.

(2) Institut de Biologia Evolutiva (CSIC-UPF), 08003 Barcelona, Spain

➤ Recibido el 7 de enero de 2009, aceptado el 28 de enero de 2009.

Cieslak, A., Ribera, I. (2009). Aplicaciones de proteómica en ecología y evolución. *Ecosistemas* 18(1):34-43.

La evolución de las características ecológicas de las especies es uno de los temas más intensamente estudiados, pero su complejidad suele limitar estos estudios a evidencias indirectas de las adaptaciones reales de los organismos. Recientemente, métodos moleculares como los "micro-arrays" y la secuenciación a gran escala han incrementado de manera notable el conocimiento de los genomas y las vías metabólicas. Con ello, ha sido posible por primera vez estudiar con detalle la interacción a nivel molecular de los organismos con su medio. Sin embargo, la investigación de los procesos bioquímicos asociados a cuestiones ecológicas y evolutivas relacionando a los organismos con sus hábitats se suele limitar a los llamados "organismos modelo". Los últimos avances en proteómica han permitido un enorme incremento de su uso en ecología y biología evolutiva. Estas metodologías son en muchos aspectos perfectamente aplicables a estudios ecológicos, ofreciendo la posibilidad de trabajar con una amplia gama de organismos. En este trabajo hacemos una breve revisión de las principales metodologías y de cómo la proteómica se ha utilizado hasta la fecha en diferentes estudios ecológicos y evolutivos en organismos no-modelo.

Palabras clave: expresión de proteínas, organismos no-modelo, electroforesis bidimensional, secuenciación de proteínas, diferenciación ecológica, especiación.

Cieslak, A., Ribera, I. (2009). Applications of proteomics in ecology and evolution. *Ecosistemas* 18(1):34-43.

The evolution of ecological traits has been subject to intense research efforts for a long time. The complexity of ecological traits usually limits these studies to indirect evidence on the actual adaptive variations. More recently, molecular methods, such as micro-arrays and large-scale genomic sequencing, considerably increased the knowledge on genomes and metabolic pathways. With this, it became possible for the first time to study in detail the interaction of organisms and their environment at the molecular level. However, the investigation of biochemical processes associated to ecological and evolutionary questions relating organisms to their habitats are typically restricted to so-called model organisms. The latest methodological advances in proteomics led to a strongly increase in their use in ecology and evolutionary biology. These approaches are in many respects suitable for ecological studies, and offer the possibility to work on a wide range of organisms. Here we briefly review the methodology and describe how proteomics has been used to date in different fields of evolutionary biology and ecology in non-model organisms.

Key words: protein expression, non-model organisms, bidimensional electrophoresis, protein sequencing, ecological differentiation, speciation.

Introducción

La utilización de proteínas como herramienta de estudio en ecología y evolución se desarrolló inicialmente con el uso generalizado de los isoenzimas a partir del final de los años 60 (Murphy et al. 1996), pero con el descubrimiento de la técnica de la PCR (Mullis y Faloona 1987) y el método Sanger de secuenciación (Sanger et al. 1977) se abandonó progresivamente ante la posibilidad de obtener directamente la secuencia de ADN. El uso de isoenzimas como marcadores moleculares, o el estudio de proteínas individuales, no puede tampoco considerarse como "proteómica" en el sentido actual del término, que implica el estudio de la expresión global de proteínas de un organismo (o por lo menos de una fracción cuantitativamente significativa) (Brower 2001). Aunque algunas de las técnicas utilizadas en proteómica, y en especial la electroforesis bidimensional, se desarrollaron mucho antes (Henry et al. 1968), inicialmente se utilizaron casi de modo exclusivo en estudios de fisiología y bioquímica humanas, dada la complejidad y el coste económico del método. La metodología se basa en la combinación de dos procesos de separación, el primero ("Iso-Electric Focusing", IEF) segrega las proteínas en base a su

punto isoeléctrico en un gradiente de pH, y el segundo en base a su tamaño molecular. El término “proteómica” se acuñó a principios de los 90, cuando la metodología se mejoró y fue posible obtener resultados altamente reproducibles, permitiendo identificar y caracterizar proteínas con gran precisión. El principal avance metodológico fue la invención de los gradientes de pH inmovilizados (IPGs, de su nombre en inglés, Bjellqvist et al. 1982), y la mejora de los geles de electroforesis de poli-acrilamida, originalmente descritos por Laemmli (1970). La posibilidad de secuenciar de forma automática las proteínas aisladas de los geles (Edman y Begg 1967) potenció el uso de los geles bidimensionales, aunque solo el desarrollo de técnicas de caracterización mediante espectrometría de masas (MALDI-TOF o MALDI-TOF-MS) permitió su uso generalizado, al permitir identificar de un modo más económico muestras pequeñas de proteínas una vez digeridas enzimáticamente (Kumarathasan et al. 2005).

La posibilidad de aislar, cuantificar y secuenciar proteínas mediante geles bidimensionales de alta resolución es una herramienta muy poderosa para el estudio de un amplio espectro de procesos ecológicos y evolutivos abordables desde una perspectiva comparativa. La posibilidad de estudiar los cambios en la expresión de proteínas causados por cualquier tipo de estímulo en cualquier organismo siempre estuvo presente, aunque su aplicación en ecología o evolución, además de las dificultades técnicas y el elevado coste, no habría permitido ir mucho más allá de la información que ya se podía obtener mediante las técnicas de estudio tradicionales para procesos fisiológicos o del desarrollo. Con el advenimiento de la era genómica, el crecimiento exponencial de las secuencias conocidas y la posibilidad de identificar las proteínas obtenidas produjeron un efecto sinérgico entre los estudios genómicos y los estudios de expresión de genes (Brower 2001). Por primera vez fue posible identificar las proteínas de modo relativamente fácil y económico, y asociar estas identificaciones a procesos fisiológicos y vías metabólicas. En su inicio estas posibilidades estaban muy restringidas a un pequeño número de organismos modelo, supuestamente representativos de grandes grupos de animales. Dos factores han ayudado a superar este problema: (1) el reconocimiento de la homología entre los mecanismos moleculares básicos de todos los organismos, tanto a nivel de secuencia de proteínas como de procesos metabólicos (ver Karr 2008 para una revisión reciente), y (2) la identificación de virtualmente todos los cADNs expresados en algunos organismos modelo y sus transcripciones putativas en proteína (los ORF, “open reading frame”). A pesar del crecimiento continuo de las bases de datos públicas, de su interconectividad y de la posibilidad de hacer análisis comparativos de procesos del desarrollo y de vías fisiológicas de modo relativamente sencillo, el análisis de procesos complejos en organismos no-modelo sigue comportando grandes dificultades tanto técnicas como conceptuales.

En este trabajo nos centraremos en las aplicaciones en ecología y evolución de una de las técnicas proteómicas más utilizadas y accesibles, la electroforesis bidimensional (2-DE). Existen numerosos trabajos especializados detallando los aspectos más técnicos del método (ver por ejemplo Görg y Weiss 2006; Kraj y Silberring 2008; o Westermeier et al. 2008), así como algunas revisiones recientes sobre el uso de 2-DE en ecología y evolución (Anderson et al. 2000; Navás y Albar 2003; López 2007; Karr 2008; ver [Tabla 1](#) y [Apéndice](#)). Aquí expondremos sólo los aspectos más generales de la metodología, para centrarnos a continuación en algunas de las aplicaciones que consideramos más prometedoras, así como en dar una visión general de las principales tendencias en los estudios publicados hasta la fecha.

Procedimiento metodológico

Electroforesis bidimensional

El principio básico de la electroforesis bidimensional (2-DE) es la separación en dos gradientes perpendiculares de una muestra de proteína aislada del organismo (habitualmente proteína total), bien sea del organismo entero, de una muestra de tejido o de fluido, o de un cultivo celular. En general, las proteínas se denaturalizan, aunque es posible aislarlas en su forma activa nativa. El primer paso es separar la mezcla de proteínas de acuerdo a su punto isoeléctrico en un gradiente de pH fijo. El gradiente de pH se puede variar, dependiendo del tipo de proteínas que se desea separar con más precisión, o de si se tiene conocimiento previo de la proporción de proteínas básicas o ácidas en la muestra inicial. En el segundo paso las proteínas, ya separadas en el gradiente de pH de acuerdo a su punto isoeléctrico, se separan de acuerdo a su masa molecular. La capacidad de resolución dependerá de la densidad del polímero utilizado, y de la longitud del gel. Los geles con las proteínas separadas en los dos gradientes perpendiculares se tiñen, habitualmente con plata (**Fig. 1**), y la distribución de las manchas con las proteínas individuales se fotografía o se escanea (Görg y Weiss 2006; Kraj y Silberring 2008).

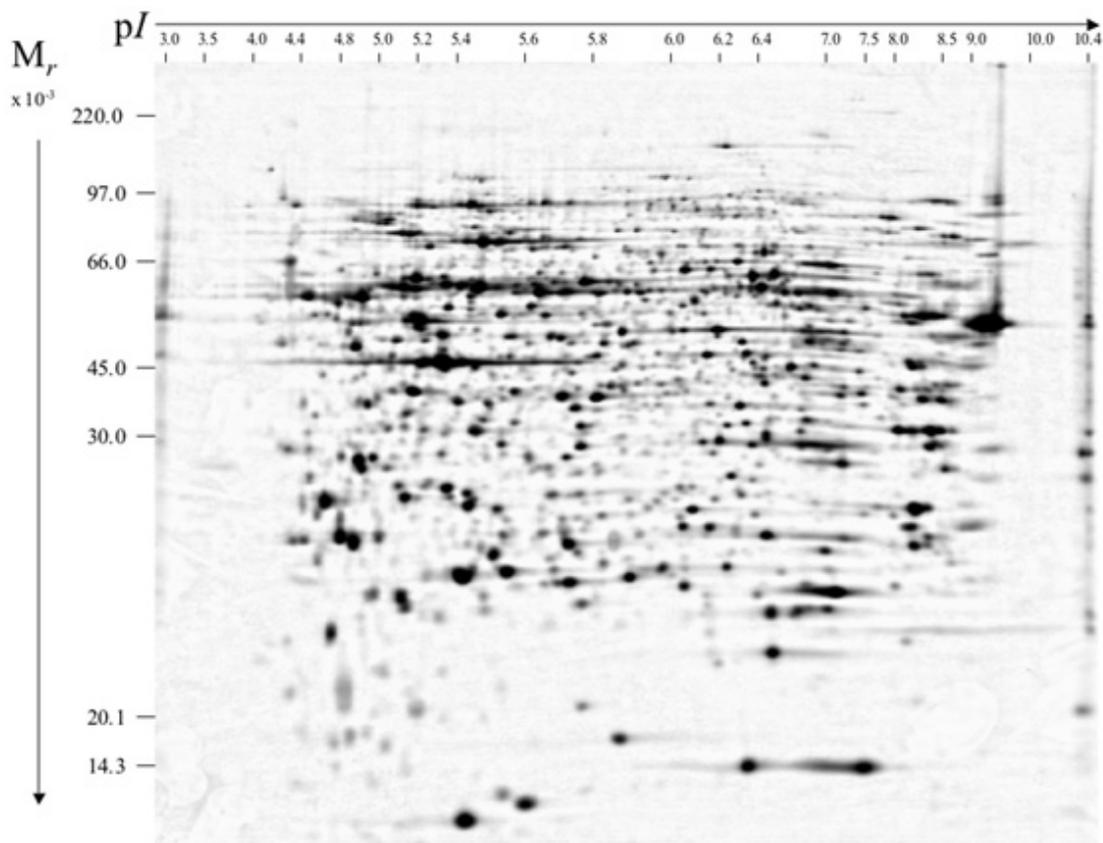


Figura 1. Imagen típica de un gel bidimensional. El gradiente de pH está en el eje horizontal, incrementándose de derecha a izquierda, en este caso de 3 a 11. El gradiente vertical es de tamaño (peso molecular), de 220 a 14.3×10^{-3} kDa (tomado de Cieslak et al. 2007).

La técnica de electroforesis bidimensional se utiliza habitualmente para comparar los patrones de expresión de proteínas en dos o más muestras, bien sea de ejemplares de diferentes especies, diferentes poblaciones, sometidos a diferentes tratamientos, o de diferentes tejidos del mismo individuo. Normalmente se comprueba la reproducibilidad de los resultados mediante réplicas de la misma muestra, y mediante variaciones en el procedimiento experimental. Existen una serie de normas de “buena praxis” consensuadas entre los especialistas, que se considera deben cumplir los estudios que utilicen esta técnica (Taylor et al. 2007; “Proteomics standards initiative”, ver www.psidev.info, www.fixingproteomics.org).

El análisis comparativo de los geles se realiza mediante programas de análisis de imagen. Los programas más avanzados no sólo comparan imágenes digitales calibradas con los puntos de referencia establecidos por el investigador, sino que son capaces de calcular la torsión y la deformación de un gel en comparación a otro tomado como referencia, de modo que se compensan en parte los errores experimentales. Para evitar en lo posible este error experimental es posible también utilizar la técnica DIGE (“Differential In-Gel Electrophoresis”, Ünlü et al. 1997), que permite analizar hasta tres muestras simultáneamente mediante la utilización de tres pigmentos distintos para marcar las proteínas, que se visualizan a distintas longitudes de onda. En principio esta técnica permite evitar completamente los artefactos experimentales introducidos por la electroforesis, aunque la utilización de pigmentos distintos puede afectar a la estimación cuantitativa de la expresión (Krogh et al. 2007).

En los análisis se compara no solo la presencia o ausencia de determinadas proteínas, sino los cambios en la intensidad de la expresión. En la **Figura 2** se muestran los resultados de la comparación de patrones de expresión de tejido de una especie de mariposa antes y después de un determinado tratamiento hormonal (Cieslak et al. 2007). En este ejemplo, se ve como la expresión de algunas proteínas se ve alterada por el tratamiento, mientras que otras no se ven afectadas. La identificación de tres o más proteínas afectadas de modo paralelo sugiere la existencia de un “cluster” que responde de modo simultáneo a un mismo estímulo, permitiendo el estudio de vías o redes metabólicas. La caracterización de estas vías requiere identificar la proteínas y, eventualmente, confirmar los cambios de expresión mediante, por ejemplo, PCR cuantitativas o Western-blotting, caso de que se disponga de anticuerpos de las proteínas correspondientes.

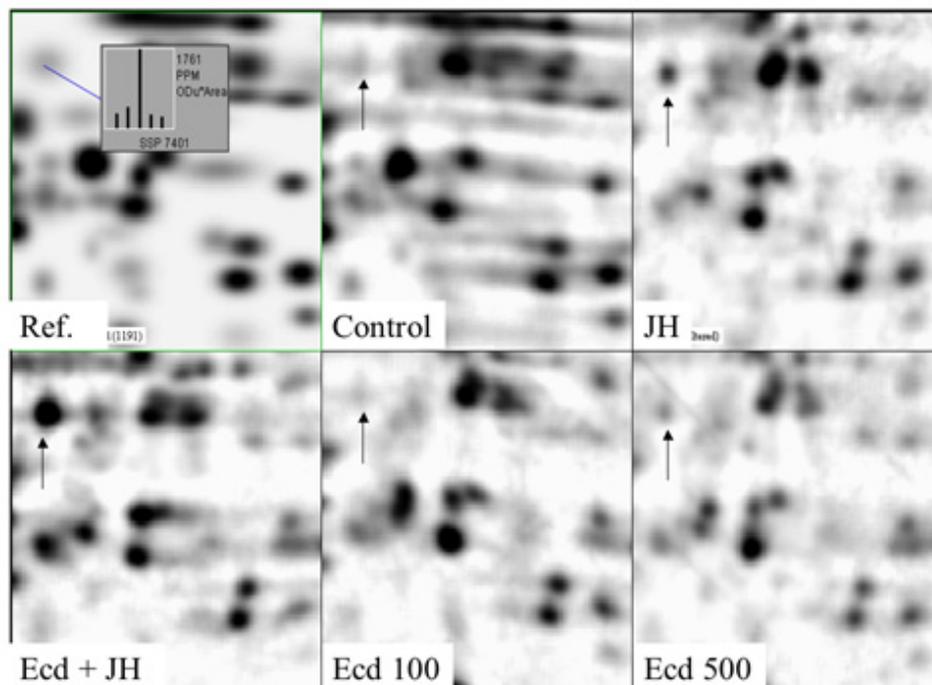


Figura 2. Ejemplo de cambios cuantitativos en la expresión de algunas proteínas identificados mediante 2-DE. Las seis imágenes corresponden a un mismo grupo de proteínas en un extracto de los discos de las alas de la larva de la mariposa *Papilio dardanus*, tras someterse *in vitro* a diferentes tratamientos hormonales con hormona juvenil (JH) y Ecdisona (Ecd). Cada una de las barras verticales en la gráfica del gel Ref. indica el nivel de expresión de una proteína determinada en un experimento. Este nivel de expresión ha sido determinado por una medida de densitometría de la mancha en el gel (tomado de Cieslak et al. 2007).

Secuenciación de proteínas y análisis de fragmentos

Una vez localizada una proteína de interés se puede extraer directamente del gel, e identificarla secuenciando la cadena de amino-ácidos, o mediante espectrometría de masas (MS) de los fragmentos resultantes de una digestión enzimática. La secuenciación se realiza normalmente por el extremo N, mediante el método descrito por Edman y Begg (1967), que aunque fiable es relativamente caro si se quiere secuenciar toda la proteína. Además, es posible que la secuenciación se bloquee por la presencia de grupos químicos como azúcares, acetilos u otras modificaciones del amino-ácido terminal, lo que requiere un tratamiento especial para eliminarlos y poder iniciar la secuenciación. Este procedimiento requiere una cantidad mínima de proteína (de 0.5 a 1.5 pmol), lo que dificulta la secuenciación de proteínas con niveles de expresión muy bajos. Mediante espectrometría de masas se determina el peso molecular de los fragmentos resultantes de la digestión enzimática con una proteasa, en lo que se conoce como "peptide mass fingerprint" (PMF). Conociendo los puntos de digestión de la proteína, se puede comparar el patrón resultante con el de otras proteínas conocidas, para obtener una identificación aproximada. Existen programas informáticos que asignan probabilidades de identificación para un patrón de fragmentos, como Mascote (Perkins et al. 1999), Aldente (<http://www.expasy.org/tools/aldente>) o ProFound (Zhang y Chait, 2000). El principal problema de este método es la falta de datos de referencia de organismos no-modelo (Panchaud et al. 2008). Existen otros procedimientos más recientes que permiten identificar con mayor precisión proteínas de organismos no-modelo, sin necesidad de disponer de información genómica o proteómica. Así, es posible identificar sin ambigüedades la secuencia de un péptido o un fragmento a partir de su masa molecular, mediante lo que se conoce como "peptide sequence tag" (PST). El espectro de masas así obtenido se puede asociar a una proteína concreta presente en las bases de datos públicas. Programas que utilizan estos métodos son, por ejemplo, GutenTag (Tabb et al. 2003) y MultiTag (Sunyaev et al. 2003) para la secuenciación de péptidos; y Sequest (Eng et al. 1994) o SALSA (Hansen et al. 2001) para el PST. Para muchas aplicaciones no es necesaria una identificación precisa de la proteína, y con una aproximación que identifique la familia, o el grupo funcional, es suficiente.

Estudio de alteraciones metabólicas y fisiológicas

En algunos casos es suficiente con identificar la presencia de determinadas proteínas como respuesta a un tratamiento, o como marcadores biológicos (por ejemplo, para identificar la presencia de un parásito en una muestra, Calvo et al. 2005; o para caracterizar la composición de los venenos de serpiente, Fox y Serrano 2008). Sin embargo, el estudio de respuestas fisiológicas normalmente requiere la identificación de vías metabólicas con más de una proteína. En estos casos se requiere

no solo determinar qué proteínas están presentes, sino si están sobre- o infrareguladas, así como la secuencia temporal de su expresión. Aunque en estos casos la utilización de las técnicas de proteómica es más complicada, su uso abre una enorme variedad de posibilidades para abordar todo tipo de problemas biológicos en prácticamente cualquier organismo. El conocimiento cada vez más detallado del metabolismo básico común a todos los organismos, la posibilidad de establecer homologías entre secuencias de genes de linajes muy distantes, y la estimación más precisa de las relaciones filogenéticas entre los grandes grupos facilita la elaboración de hipótesis acerca de los cambios esperados y la interpretación de los cambios observados. Cualquier información generada en los experimentos es susceptible de ser utilizada en estudios fisiológicos, ya que las bases de datos públicas no solo permiten la identificación de las proteínas y los genes involucrados, sino que las enmarcan en vías metabólicas específicas que permiten deducir su papel fisiológico en el organismo. Algunas de estas bases de datos son, por ejemplo, KEGG (www.genome.jp/kegg) o PANTHER (www.pantherdb.org), que incluyen una gran cantidad de vías metabólicas junto con sus interconexiones. Una vez identificadas las vías metabólicas implicadas, y los mecanismos fisiológicos generales, de ser necesario siempre es posible diseñar experimentos más específicos que permitan un conocimiento más profundo de los cambios estudiados.

Además de las dificultades inherentes a la falta de información genómica y proteómica específica de la mayoría de organismos no-modelo, hay que tener siempre en cuenta la posibilidad de que las diferencias observadas se deban a alteraciones no relacionadas directamente con el tratamiento que se quiere testar, sino que sean respuestas inespecíficas al estrés, alteraciones experimentales, o a factores colaterales desconocidos. En una revisión reciente, Petrak et al. (2008) encontraron que en una elevada proporción de estudios de expresión diferencial con 2-DE se repetían las mismas proteínas, aunque los procesos o los tratamientos a comparar eran muy distintos. Incluso algunas proteínas que habitualmente se consideran de un nivel de expresión muy constante ("house-keeping"), y que de hecho se utilizan a menudo como referencia para comparar alteraciones en el nivel de expresión (como GAPDH, actina o tubulina), presentan frecuentemente alteraciones no específicas (Petrak et al. 2008).

Un problema adicional del uso de organismos no-modelo, con ejemplares capturados en su medio natural y no criados en cautividad en condiciones controladas, son las fuentes de variabilidad no controladas, como su configuración genética, su edad o estado fisiológico, o la presencia de patógenos o parásitos. La presencia de esta variabilidad adicional requiere asegurar la repetibilidad y representatividad de los resultados. A pesar de todo, existen multitud de cuestiones de interés que no se pueden resolver con organismos modelo, de modo que el uso de organismos en su medio natural es imprescindible si se quiere que las técnicas proteómicas se extiendan hasta convertirse en una herramienta más en el arsenal metodológico de ecólogos y biólogos evolutivos.

Ejemplos del uso de proteómica en organismos no-modelo

El uso de geles bidimensionales aplicado a cuestiones ecológicas y evolutivas en organismos no-modelo se ha desarrollado de forma significativa en los últimos cinco o seis años. Sin pretender ser exhaustivos, del cerca del centenar de trabajos considerados en esta revisión más de la mitad (57) se han publicado desde 2005 ([Tabla 1](#)), con un crecimiento prácticamente exponencial. Como ya se ha mencionado, el uso de proteómica en organismos no modelo se ha desarrollado paralelamente al desarrollo de la genómica, y a la posibilidad de interpretar los resultados (esto es, la identificación de proteínas expresadas de modo diferencial) en clave ecológica o evolutiva.

Muchos de los trabajos anteriores a la era genómica son básicamente descriptivos, centrados en la caracterización de proteínas en organismos con interés comercial (como el mejillón, López 2005) o sanitario, tanto plagas vegetales (nematodos, Van der Beek et al. 1997; Navás et al. 2002; Calvo et al. 2005) como venenos (serpientes, Mackessy 2002; Fox y Serrano 2008; escorpiones, Nascimento et al. 2006; o arañas, Yuan et al. 2007) (no se han incluido trabajos específicos de patógenos humanos). En algunas ocasiones las proteínas así caracterizadas se han utilizado para establecer relaciones filogenéticas entre especies próximas (Aquadro y Avise 1981; Miyazaki et al. 2004), variabilidad genética entre poblaciones (Fullaondo et al. 2001; Blank et al. 2005; Biron et al. 2006), o la dinámica de zonas híbridas (Diz y Skibinski 2007) (ver la [Tabla 1](#) para ejemplos adicionales).

Con la generalización del uso de la técnica de la PCR y la secuenciación directa del DNA, la aplicación de datos proteómicos para establecer relaciones filogenéticas ha desaparecido casi por completo, y solo está justificado cuando el interés no es simplemente reconstruir la filogenia del grupo sino estudiar la evolución de las proteínas o las vías metabólicas implicadas (por ejemplo, Toni y Aliberdi 2007; Singh y Matta 2008; Valcu et al. 2008). Solo recientemente se han empezado a utilizar técnicas de proteómica para responder cuestiones ecológicas o evolutivas que difícilmente podrían resolverse de otro modo. Muchas de ellas implican el estudio de las diferencias en adaptaciones ecológicas o fisiológicas, tanto de especies próximas como de poblaciones de una misma especie. Ejemplos son el estudio de la tolerancia térmica y los efectos del cambio climático (Roush et al. 2004; Gardestrom et al. 2007; Pörtner y Farrell 2008); cambios asociados al estrés osmótico (salinidad) (Blank et al. 2006; Wang et al. 2008), al establecimiento de simbiosis o el efecto del parasitismo (Biron et al. 2005 para cambios de comportamiento producidos por un parásito; o Barneath et al. 2006 para la simbiosis coral-alga), o cambios asociados a la especialización ecológica y la especiación (Martínez-Fernández et al. 2008; Ramm et al. 2009). La última generación de métodos de espectrometría permite secuenciar el proteoma de forma masiva e indiscriminada, sin selección

previa. Se hace posible así el análisis de la expresión de proteínas de comunidades o ecosistemas en su totalidad (Nunn y Timperman 2007 para sistemas marinos, o Banfield et al. 2005 y Deneff et al. 2007 para estudios de biofilms de procariontes), estudiar respuestas fisiológicas generales (e.g. al estrés osmótico, Kültz et al. 2007; Wang et al. 2008), o procesos en biología del desarrollo (Chan y Foster 2008).

En última instancia, los métodos descritos aquí son una herramienta potencialmente muy útil para estudiar procesos de especiación, y en particular para identificar y caracterizar las proteínas, y los genes, involucrados en los procesos de diferenciación adaptativa que conducen a la especiación (Ramm et al. 2009). En contraste con los métodos de secuenciación genómica indiscriminada, el uso de geles bidimensionales permite identificar directamente las proteínas que se expresan de modo diferencial, lo que reduce enormemente el número de candidatos cuando se quieren caracterizar las diferencias adaptativas o funcionales entre individuos sometidos a diferentes condiciones, entre poblaciones supuestamente divergentes genéticamente, o entre especies próximas. En la actualidad es posible obtener mediante el estudio de la expresión de proteínas con geles bidimensionales una gran cantidad de información sobre la base molecular de muchos procesos fisiológicos en organismos no-modelo, a pesar de las dificultades inherentes a la falta de información genómica y proteómica específica.

Agradecimientos

Los trabajos de proteómica de AC e IR se financian con los proyectos CGL2007-61943 y CGL2007-61665 respectivamente.

Referencias

- Anderson, N.L., Matheson, A.D., Steiner, S., 2000. Proteomics: applications in basic and applied biology. *Current Opinion in Biotechnology* 11:408-412.
- Aquadro, C.F., Avise, J.C., 1981. Genetic-divergence between rodent species assessed by using two-dimensional electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences* 78: 3784-3788.
- Banfield, J.F., Verberkmoes, N.C., Hettich, R.L., Thelen, M.P., 2005. Proteogenomic approaches for the molecular characterization of natural microbial communities. *Omics - a Journal of Integrative Biology* 9:301-333.
- Barneah, O., Benayahu, Y., Weis, V., 2006. Comparative proteomics of symbiotic and aposymbiotic juvenile soft corals. *Marine Biotechnology* 8:11-16.
- Biron, D.G., Loxdale, H.D., Ponton, F., Moura, H., Marche, L., Brugidou, C., Thomas, F., 2006. Population proteomics: An emerging discipline to study metapopulation ecology. *Proteomics* 6:1712-1715.
- Biron, D.G., Marche, L., Ponton, F., Loxdale, H.D., Galeotti, N., Renault, L., Joly, C., Thomas, F., 2005. Behavioural manipulation in a grasshopper harbouring hairworm: a proteomics approach. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 272:2117-2126.
- Bjellqvist B, Ek K, Righetti PG, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. 1982. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology and some applications. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 6(4):317-339.
- Blank, M., Bastrop, R., Jurss, K., 2006. Stress protein response in two sibling species of *Marenzelleria* (Polychaeta, Spionidae) Is there an influence of acclimation salinity? *Comparative Biochemistry and Physiology B-Biochemistry y Molecular Biology* 144:451-462.
- Blank, M., Fulda, S., Bastrop, R., Jurss, K., 2005. Variation in protein patterns within and among polychaete sibling species of the genus *Marenzelleria* (Spionidae): a preliminary survey. *Marine Biology* 146:943-950.
- Brower, V. 2001. Proteomics: biology in the post-genomic era. *EMBO reports* 21:558-560.
- Calvo, E., Flores-Romero, P., López, J.A., Navás, A., 2005. Identification of proteins expressing differences among isolates of *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) by nano-liquid chromatography coupled to ion-trap mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 4:1017-1021.

- Chan, Q.W.T., Foster, L.J., 2008. Changes in protein expression during honey bee larval development. *Genome Biology* 9:R156.
- Cieslak, A., Vogler, A.P., Lafranchi-Tristem, N., Dunn, M.J., Westbrook, J.A., 2007. Investigation of hormone activity in butterfly imaginal wing discs by protein expression pattern changes. *Electrophoresis* 28:535-544.
- Denef, V.J., Shah, M.B., VerBerkmoes, N.C., Hettich, R.L., Banfield, J.F., 2007. Implications of strain- and species-level sequence divergence for community and isolate shotgun proteomic analysis. *Journal of Proteome Research* 6:3152-3161.
- Diz, A.P., Skibinski, D.O.F., 2007. Evolution of 2-DE protein patterns in a mussel hybrid zone. *Proteomics* 7:2111-2120.
- Edman P. and Begg G. 1967. A protein sequenator. *European Journal of Biochemistry* 1:80-91.
- Eng, J.K., McCormack, A.L., Yates, J.R. 1994. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 5:976-89.
- Fox, J.W., Serrano, S.M.T., 2008. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. *Proteomics* 8:909-920.
- Fullaondo, A., Vicario, A., Aguirre, A., Barrena, I., Salazar, A., 2001. Quantitative analysis of two-dimensional gel electrophoresis protein patterns: a method for studying genetic relationships among *Globodera pallida* populations. *Heredity* 87:266-272.
- Gardstrom, J., Elfving, T., Lof, M., Tedengren, M., Davenport, J.L., Davenport, J., 2007. The effect of thermal stress on protein composition in dogwhelks (*Nucella lapillus*) under non-normoxic and hyperoxic conditions. *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular y Integrative Physiology* 148:869-875.
- Görg, A., y Weiss, W. 2006. High resolution two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients for proteome analysis. En: J.E. Celis, (Ed.), *Cell Biology. A Laboratory Manual, Vol. IV, Ch. 23*, 3rd edition, pp. 175-188. Elsevier Science y Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.
- Hansen, B.T., Jones, J.A., Mason, D.E. and Liebler, D.C. 2001. SALSA: a pattern recognition algorithm to detect electrophile-adducted peptides by automated evaluation of CIDspectra in LC-MS-MS analyses. *Analytical Chemistry* 73:1676-83.
- Henry, C., Bernard, D. and Depieds, R. 1968. 2 dimensional electrophoresis in agar and acrylamide-agar. *Comptes Rendus des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales* 162(2):494-497.
- Karr, T.L., 2008. Application of proteomics to ecology and population biology. *Heredity* 100:200-206.
- Kraj, A. y Silberring, J. 2008. *Introduction to Proteomics*. pp. 352. Wiley-Interscience Series on Mass Spectrometry, Hoboken, New Jersey. USA.
- Krogh, M., Liu, Y., Waldemarson, S., Valastro, B., James, P., 2007. Analysis of DIGE data using a linear mixed model allowing for protein-specific dye effects. *Proteomics* 7:4235-4244.
- Kültz, D., Fiol, D., Valkova, N., Gomez-Jimenez, S., Chan, S.Y., Lee, J., 2007. Functional genomics and proteomics of the cellular osmotic stress response in 'non-model' organisms. *Journal of Experimental Biology* 210:1593-1601.
- Kumarathasan, P., Mohottalage, S., Goegan, P. and Vincent, R. 2005. An optimized protein in-gel digest method for reliable proteome characterization by MALDI-TOF-MS analysis. *Analytical Biochemistry* 346:85-89.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227 (5259):680-685.
- López, J.L., 2005. Role of proteomics in taxonomy: the *Mytilus* complex as a model of study. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* 815:261-274.

- López, J.L., 2007. Applications of proteomics in marine ecology. *Marine Ecology-Progress Series* 332:275-279.
- Mackessy, S.P., 2002. Biochemistry and pharmacology of colubrid snake venoms. *Journal of Toxicology-Toxin Reviews* 21:43-83.
- Martinez-Fernandez, M., Rodriguez-Pineiro, A.M., Oliveira, E., de la Cadena, M.P., Rolan-Alvarez, E., 2008. Proteomic comparison between two marine snail ecotypes reveals details about the biochemistry of adaptation. *Journal of Proteome Research* 7:4926-4934.
- Miyazaki, J.I., Shintaku, M., Kyuno, A., Fujiwara, Y., Hashimoto, J., Iwasaki, H., 2004. Phylogenetic relationships of deep-sea mussels of the genus *Bathymodiolus* (Bivalvia: Mytilidae). *Marine Biology* 144:527-535.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H., 1986. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro - the Polymerase Chain-Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51:263-273.
- Murphy, W., Sites, J.W., Buth, D.G. y Hauffer, C.H. 1996. Proteins: Siozyme electrophoresis. En: Hillis, D.M., Mortiz, C. y Mable, B.K. (eds.) *Molecular systematics*, 2nd ed., pp. 51-120. Sinauer Associates, Sunderland MA, USA.
- Nascimento, D.G., Rates, B., Santos, D.M., Verano-Braga, T., Barbosa-Silva, A., Dutra, A.A.A., Biondi, I., Martin-Eauclaire, M.F., De Lima, M.E., Pimenta, A.M.C., 2006. Moving pieces in a taxonomic puzzle: Venom 2D-LC/MS and data clustering analyses to infer phylogenetic relationships in some scorpions from the Buthidae family (Scorpiones). *Toxicon* 47:628-639.
- Navás, A., Albar, J.P., 2003. Application of proteomics in phylogenetic and evolutionary studies, En: *Seminar in Proteomics UCO-2003*, pp. 299-302, Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain.
- Navás, A., Lopez, J.A., Esparrago, G., Camafeita, E., Albar, J.P., 2002. Protein variability in *Meloidogyne* spp. (Nematoda: Meloidogynidae) revealed by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *Journal of Proteome Research* 1:421-427.
- Nunn, B.L., Timperman, A.T., 2007. Marine proteomics. *Marine Ecology-Progress Series* 332, 281-289.
- Panchaud, A., Affolder, M., Moreillon, P. and Kussmann, M. 2008. Experimental and computational approaches to quantitative proteomics: Status quo and outlook. *Journal of Proteomics* 71:19-33.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J. and Creasy, D.M. 1999. Cottrell JS. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20:3551-67.
- Petrak, J., Ivanek, R., Toman, O., Cmejla, R., Cmejlova, J., Vyoral, D., Zivny, J., Vulpe, C.D., 2008. Deja vu in proteomics. A hit parade of repeatedly identified differentially expressed proteins. *Proteomics* 8:1744-1749.
- Pörtner, H.O., Farrell, A.P., 2008. Physiology and Climate Change. *Science* 322:690-692.
- Ramm, S.A., McDonald, L., Hurst, J.L., Beynon, R.J., Stockley, P., 2009. Comparative proteomics reveals evidence for evolutionary diversification of rodent seminal fluid and its functional significance in sperm competition. *Molecular Biology and Evolution* 26:189-198.
- Rousch, J.M., Bingham, S.E., Sommerfeld, M.R., 2004. Protein expression during heat stress in thermo-intolerant and thermo-tolerant diatoms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 306:231-243.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74:5463-5467.
- Singh, N.P., Matta, N.K., 2008. Variation studies on seed storage proteins and phylogenetics of the genus *Cucumis*. *Plant Systematics and Evolution* 275:209-218.
- Sunyaev, S., Liska, A.J., Golod, A., Shevchenko, A. and Shevchenko A. 2003. MultiTag: multiple error-tolerant sequence tag search for the sequence-similarity identification of proteins by mass spectrometry. *Analytical Chemistry* 75:1307-15.

Tabb, D.L., Saraf, A. and Yates, III J.R. 2003. GutenTag: high-throughput sequence tagging via an empirically derived fragmentation model. *Analytical Chemistry* 75:6415-21.

Taylor, C.F. et al. [29 autores]. 2007. The minimum information about proteomics experiment (MIAPE). *Nature biotechnology* 25:887-893.

Toni, M., Alibardi, L., 2007. Alpha-and beta-keratins of the snake epidermis. *Zoology* 110:41-47.

Ünlü, M., Morgan, M.E., Minden, J.S., 1997. Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18:2071-2077.

Valcu, C.M., Lalanne, C., Muller-Starck, G., Plomion, C., Schlink, K., 2008. Protein polymorphism between 2 Picea abies populations revealed by 2-dimensional gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Journal of Heredity* 99:364-375.

Van der Beek, J.G., Folkertsma, R., Poleij, L.M., vanKoert, P.H.G., Bakker, J., 1997. Molecular evidence that Meloidogyne hapla, M. chitwoodi, and M. fallax are distinct biological entities. *Fundamental and Applied Nematology* 20:513-520.

Wang, X.Q., Yang, P.F., Gao, Q., Liu, X.L., Kuang, T.Y., Shen, S.H., He, Y.K., 2008. Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in Physcomitrella patens. *Planta* 228:167-177.

Westermeier, R., Naven, T. y Höpker, H.R. 2008. *Proteomics in practice: a guide to successful experimental design*, 2nd ed. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.

Yuan, C.H., Jin, Q.H., Tang, X., Hu, W.J., Cao, R., Yang, S.Q., Xiong, J.X., Xie, C.L., Xie, J.Y., Liang, S.P., 2007. Proteomic and peptidomic characterization of the venom from the Chinese bird spider, Ornithoctonus huwena Wang. *Journal of Proteome Research* 6:2792-2801.

Zhang, W. and Chait, B.T. 2000. ProFound an expert system for protein identification using mass spectrometric peptide mapping information. *Analytical Chemistry* 72:2482-9.

Apéndice

Número de trabajos publicados por año utilizando métodos de proteómica en estudios ecológicos y evolutivos con organismos no-modelo, incluidos en esta revisión (ver **Tabla 1**).

