

Nuevos métodos de diagnóstico molecular

GENÓMICA *pág. 155* TRANSCRIPTÓMICA (MARNY MIR) *pág. 160* EPIGENÓMICA *pág. 165*

Puntos clave

Las técnicas proteómicas están siendo utilizadas para la identificación de proteínas que tienen una expresión diferencial en las células, tejidos o fluidos biológicos de pacientes con carcinoma hepatocelular respecto a los individuos sanos.

Las técnicas proteómicas más utilizadas para la identificación de biomarcadores son: a) la electroforesis bidimensional combinada con la espectrometría de masas; b) la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, y c) la cromatografía multidimensional.

Para muestras de suero se utiliza frecuentemente la comparación de perfiles proteicos obtenidos mediante MALDI-TOF o SELDI.

Las técnicas proteómicas están permitiendo la clasificación correcta entre individuos sanos y enfermos a partir de los análisis de perfiles proteicos de muestras de suero.

Se han identificado proteínas presentes en el suero de pacientes de hepatocarcinoma que se expresan diferencialmente respecto a los individuos sanos como BDNF, calreticulina y la citoqueratina 8, y que permiten ser utilizados como biomarcadores.

La proteómica como herramienta de diagnóstico y pronóstico: aplicación en el hepatocarcinoma

JOSEP M. ESTANYOL^a y ORIOL BACHS^b

^aUnidad de Proteómica. Servicios Científico-Técnicos. Universidad de Barcelona. España.

^bDepartamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias. Universidad de Barcelona. España.

La proteómica comprende el conjunto de técnicas que se utilizan para el estudio de las proteínas. Sus objetivos son describir el conjunto de proteínas que se expresan en los distintos tipos celulares, tejidos o fluidos biológicos e identificar sus funciones. Actualmente, estas técnicas se utilizan también para dilucidar los mecanismos implicados en el desarrollo de las enfermedades, para descubrir nuevos biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico, así como para la identificación de nuevas dianas terapéuticas¹. En este artículo se revisa brevemente la utilidad de la proteómica en el descubrimiento de biomarcadores en el hepatocarcinoma (HCC).

Biomarcadores del hepatocarcinoma

El HCC es el tipo de cáncer más común en el hígado, siendo su aparición más frecuente en personas que padecen otras patologías graves del hígado, como la cirrosis hepática o las infecciones por los virus de las hepatitis B (VHB) o C (VHC). El desarrollo del HCC suele ser silencioso y sólo cuando éste ya está avanzado se manifiesta alguna disfunción como la ictericia, la pérdida de peso o la saciedad precoz, que suelen ir acompañadas de una masa palpable en exploraciones abdominales. Así pues, el diagnóstico precoz del HCC es una asignatura pendiente y es en este aspecto en el que la proteómica puede ser una herramienta para el descubrimiento de biomarcadores de los estadios precoces del HCC^{2,3}. Para la identificación de biomarcadores se parte de muestras de tejidos (del tumor y sanos), de cultivos celulares y de

fluidos biológicos, especialmente el suero. Este último tipo de muestras tiene el valor añadido de una mayor facilidad de obtención.

Para la identificación de biomarcadores la técnica más utilizada ha sido la electroforesis bidimensional (2D) combinada con la espectrometría de masas (MS)⁴. El protocolo básico es separar las proteínas por electroforesis, seguidamente recortar individualmente cada proteína del gel, digerirla con una proteasa (generalmente tripsina) para obtener péptidos y finalmente analizar éstos mediante MS para identificar la proteína bien por determinación de la huella peptídica, bien por secuenciación de los péptidos⁵.

En general, estos estudios comparan muestras de personas sanas con las de pacientes con HCC, o bien muestras de tumores y tejido sano del mismo paciente. El objetivo siempre es identificar las proteínas que presentan una expresión diferencial entre las muestras control y tumorales. Esta estrategia es muy útil ya que la electroforesis 2D permite separar las proteínas con gran facilidad y también observar sus modificaciones postraduccionales (fosforilaciones, etc.). Esta técnica tiene limitaciones, como la baja sensibilidad y la dificultad para detectar proteínas grandes, muy hidrofóbicas, con puntos isoeléctricos extremos o también proteínas presentes en bajas concentraciones. Recientemente, la introducción de técnicas electroforéticas utilizando proteínas marcadas con fluorocromos (DIGE, 2-D *fluorescence difference gel electrophoresis*)⁶, el enriquecimiento de la muestra con microdissección por láser⁷, o el fraccionamiento subcelular, han permitido mejoras en la detección.

La cuantificación de las variaciones de los niveles de proteínas entre muestras ha mejorado

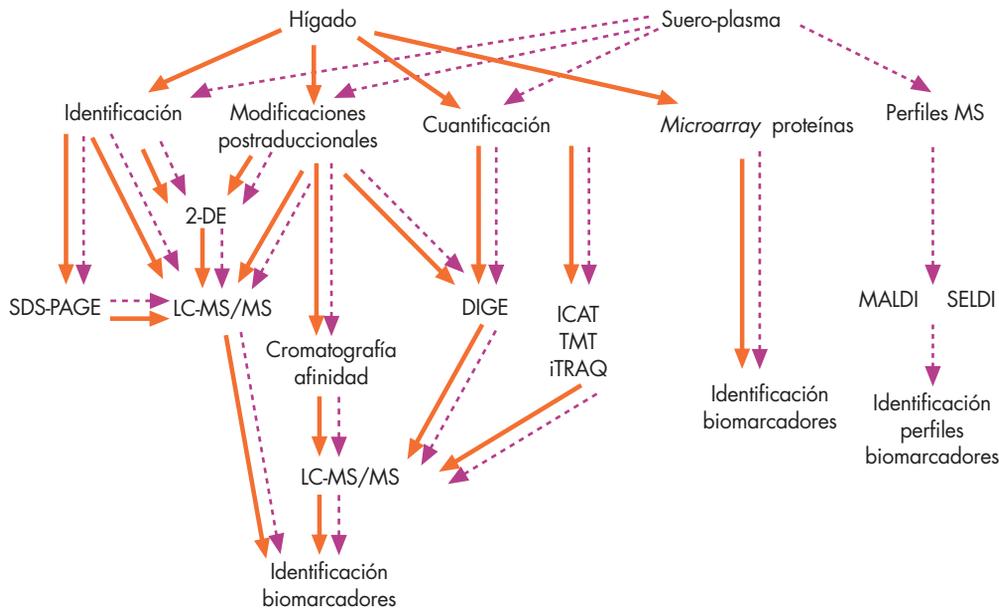


Figura 1. Esquema de los flujos de trabajo dependiendo del tipo de muestra (líquida/sólida) o metodología usada. Líneas continuas: tratamiento de muestras sólidas. Líneas discontinuas: tratamiento de muestras líquidas. 2-DE: Electroforesis bidimensional; DIGE: fluorescencia diferencial en geles bidimensionales; ICAT: marcaje isotópico con afinidad a tags; iTRAQ: tag isobárico para cuantificación absoluta; LC-MS/MS: cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas; MALDI: desorción/ionización láser asistida por matriz; MS: espectrometría de masas; SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico; SELDI: desorción/ionización por láser de superficie; TMT: tandem mass tags.

ostensiblemente con las técnicas cuantitativas como el ICAT (*isotope-coded affinity tags*) u otras. En estas técnicas se marcan los péptidos de las distintas muestras con diferentes moléculas que difieren en uno o varios daltons de masa, lo cual permite detectarlos diferencialmente por MS con resultados más precisos y reproducibles⁸.

La cromatografía líquida utilizando flujos de nanolitros acoplada a MS (HPLC/LC-MS/MS) ha permitido mejorar la detección. Esta técnica no necesita de la separación previa de las proteínas mediante electroforesis 2D, lo cual simplifica el procedimiento de análisis. La incorporación de diferentes separaciones de los péptidos mediante distintas columnas de cromatografía dispuestas de manera secuencial (cromatografía multidimensional, MudPIT MS/MS) ha permitido mejoras sustanciales⁹.

Una estrategia más reciente en la identificación de biomarcadores es la utilización de *microarrays* de proteínas. Se trata de imprimir un número variable de anticuerpos en *microarrays* de vidrio y posteriormente sobre éste se incuban las muestras. Utilizando los protocolos adecuados, se determina la expresión de las proteínas que interaccionan con estos anticuerpos¹⁰.

La proteómica también está empezando a entrar en el ámbito de la visualización de patrones proteicos de los órganos (IMAGING-MS).

Para ello, se realizan cortes histológicos muy finos con criomicrotomos que se analizan por MS. Los análisis nos dan información de qué moléculas varían en el tejido patológico frente al normal y dónde se localizan estas variaciones. A partir de esta información se genera un banco de datos de espectros que permite definir qué moléculas son las que se acumulan o desaparecen en los tejidos y que correlacionan con la enfermedad. Además, la nueva generación de espectrómetros de masas permite su identificación¹¹. Un esquema de las técnicas utilizadas para la identificación de biomarcadores está representado en la figura 1.

Técnicas de identificación de biomarcadores en suero mediante perfiles proteicos

En este caso se trata de generar perfiles proteicos de sueros mediante MS tipo MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight*) o SELDI (*surface-enhanced laser desorption/ionization*) (fig. 1). Los perfiles se comparan y ello permite identificar diferencias

Lectura rápida



La proteómica comprende el conjunto de técnicas que se utilizan para el estudio de las proteínas. Sus objetivos son describir el conjunto de proteínas que se expresan en los distintos tipos celulares, tejidos o fluidos biológicos e identificar sus funciones.

Actualmente, las técnicas proteómicas se utilizan también para dilucidar los mecanismos implicados en el desarrollo de las enfermedades, para descubrir nuevos biomarcadores para el diagnóstico y el pronóstico, así como para la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

El desarrollo del hepatocarcinoma (HCC) suele ser silencioso y sólo cuando éste ya está avanzado se manifiesta alguna disfunción clínica. Así pues, el diagnóstico precoz del HCC es un aspecto importante a resolver. Las diversas técnicas proteómicas son extremadamente útiles para el descubrimiento de biomarcadores de los estados precoces del HCC.

La técnica más utilizada para la identificación de biomarcadores ha sido la electroforesis bidimensional combinada con la espectrometría de masas (MS). El protocolo básico es la separación de las proteínas de la muestra mediante electroforesis, digerir con tripsina cada proteína y, a partir de los péptidos obtenidos, identificar la proteína por MS.



Lectura rápida



En general, se realizan estudios comparativos entre muestras de pacientes con HCC y muestras de individuos sanos con el objetivo de identificar proteínas que se expresen diferencialmente en las muestras de los pacientes. Estas proteínas serán consideradas biomarcadores para la enfermedad.

Más recientemente se han desarrollado técnicas como el ICAT, que permiten una mejor cuantificación de los niveles de expresión de las proteínas en las distintas muestras biológicas. Estas técnicas consisten en el marcaje con distintas moléculas que difieren en un dalton de las muestras de los pacientes y las muestras control.

La cromatografía líquida acoplada a MS (HPLC/LC-MSMS) no necesita de la separación previa de las proteínas mediante electroforesis 2D, lo cual simplifica el procedimiento de identificación de biomarcadores.

La cromatografía multidimensional, que consiste en la separación de los péptidos mediante distintas columnas de cromatografía dispuestas de manera secuencial antes de ser analizados por MS, ha permitido incrementar sustancialmente la resolución.

Los *microarrays* de proteínas que consisten en la hibridación de las muestras sobre un chip de anticuerpos específicos permiten determinar la expresión diferencial de proteínas entre muestras de pacientes y controles de manera muy efectiva.



que, mediante un análisis estadístico, definen patrones concretos para pacientes que presentan una patología respecto a los controles. Esta técnica tiene la ventaja de poder hacer análisis masivos en un periodo de tiempo relativamente corto, con lo que se plantea como una herramienta técnicamente aplicable en hospitales. Una desventaja es que el patrón sólo da una idea de los posibles biomarcadores, pero no los identifica^{12,13}. Así pues, hay que diseñar metodologías proteómicas para su identificación, utilizando las herramientas descritas anteriormente.

Biomarcadores específicos obtenidos a partir de muestras de tumores

Actualmente se ha descrito un número significativo de proteínas cuya expresión está modificada en las muestras de tejidos tumorales. Estas proteínas se pueden agrupar en relación con las funciones fisiológicas que realizan. Algunos ejemplos son:

Proteínas implicadas en biotransformación

Recientemente, se ha descrito que varios miembros de la familia de las *chlordecone* reductasas, concretamente las *aldo-keto* reductasas C2, C3 y B10, se encuentran sobreexpresadas en muestras de HCC. Estas proteínas pueden desempeñar un papel protector contra los aldehídos tóxicos derivados de la peroxidación lipídica y pueden afectar la proliferación y la diferenciación cuando se acumulan en la célula^{14,15}.

Proteínas del metabolismo de los carbohidratos

Diversos estudios han encontrado una baja expresión de la fructosa-bifosfato aldolasa B, una enzima reguladora del metabolismo de la fructosa, en HCC poco diferenciados¹⁵.

Proteínas implicadas en la proliferación celular

Se ha descrito que la proteína PCNA (antígeno nuclear de células en proliferación) y la *stathmin 1* se encuentran sobreexpresadas en el HCC^{14,16}. El PCNA es una proteína que ya se utiliza como marcador de proliferación en oncogénesis debido a su participación en la replicación del ADN. La *stathmin 1* también participa en la proliferación a través de su interacción con la tubulina.

Proteínas implicadas en transporte

Dentro de este grupo se han detectado dos proteínas cuya expresión está elevada en el HCC.

Por un lado, la proteína CLIC-1 (*chloride intracellular channel 1*), un miembro de la familia de los canales de cloro implicados en el transporte iónico, pero también en la proliferación celular y la apoptosis¹⁷; por otro lado, el receptor de la transferrina (TfR), implicada en el transporte y el almacenaje de hierro¹⁸. Este hecho puede estar relacionado con la evidencia de que un exceso de hierro en el hepatocito está asociado con un mayor riesgo de HCC¹⁹.

Biomarcadores específicos obtenidos a partir de muestras de suero

Los análisis proteómicos de muestras de suero de pacientes afectados de HCC han permitido identificar un cierto número de biomarcadores. Aquí presentamos algunos ejemplos:

Factores de crecimiento y citoquinas

El factor trófico BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro), un miembro de la familia del factor de crecimiento nervioso, se encuentra sobreexpresado no sólo en suero, sino también en el tejido tumoral de pacientes con HCC^{20,21}. Otra proteína candidata a biomarcador es el *glypican-3* (GPC3), un miembro de la familia de los heparan sulfatos que participa en la proliferación y diferenciación celulares, así como en la migración^{22,23}.

Autoanticuerpos y proteínas relacionadas con el sistema inmunitario

En sueros de pacientes con HCC se han encontrado anticuerpos contra la calreticulina y contra la citoqueratina 8 que pueden ser utilizados como biomarcadores^{24,25}. La proteína del complemento C3a se encuentra también sobreexpresada en el suero de pacientes con HCC relacionada con el VHC, pero no en aquellos pacientes con VHB²⁶.

Detoxificación y oxidorreducción

Los niveles del inhibidor de proteasas $\alpha 1$ antitripsina se han encontrado incrementados en sueros de pacientes con HCC y se postula como biomarcador de esta enfermedad²⁷.

La identificación de éstos y otros biomarcadores mediante técnicas proteómicas nos ha de permitir en un tiempo cercano la mejora de los procesos de diagnóstico y pronóstico, así como la identificación de nuevas dianas terapéuticas que permitan el diseño de nuevas estrategias antitumorales.

Bibliografía



www.ghcontinuada.com
Encontrará enlaces a los
resúmenes de esta bibliografía

● Importante ●● Muy importante

- Hüttenhain R, Malmström J, Picotti P, Aebersold R. Perspectives of targeted mass spectrometry for protein biomarker verification. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13:518-25.
- Chignard N, Beretta L. Proteomics for hepatocellular carcinoma marker discovery. *Gastroenterology.* 2004;127 5 Suppl 1:S120-5.
- Yokoyama Y, Kuramitsu Y, Takashima M, Iizuka M, Toda T, Terai S, et al. Proteomic profiling of proteins decreased in hepatocellular carcinoma from patients infected with hepatitis C virus. *Proteomics.* 2004;4:2111-6.
- Beranova-Giorgianni S. Proteome analysis by two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry: strengths and limitations. *Trends Anal Chem.* 2003;22:273-81.
- Zhu H, Bilgin M, Snyder M. *Proteomics.* Annu Rev Biochem. 2003;72:783-812.
- Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology. *Anal Bioanal Chem.* 2005;382:669-78.
- Curran S, McKay JA, McLeod HL, Murray GI. Laser capture microscopy. *Mol Pathol.* 2000;53:64-8.
- Yan W, Lee H, Deutsch EW, Lazaro CA, Tang W, Chen E, et al. A dataset of human liver proteins identified by protein profiling via isotope-coded affinity tag (ICAT) and tandem mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics.* 2004;3:1039-41.
- Florens L, Washburn MP. Proteomic analysis by multidimensional protein identification technology. *Methods Mol Biol.* 2006;328:159-75.
- Zhang JY, Megliorino R, Peng XX, Tan EM, Chen Y, Chan EK. Antibody detection using tumor-associated antigen miniarray in immunodiagnosing human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2007;46:107-14.
- Akhmetov A, Moore JF, Gasper GL, Koin PJ, Hanley L. Laser desorption postionization for imaging MS of biological material. *J Mass Spectrom.* 2010;45:137-45.
- Poon TC, Yip TT, Chan AT, Yip C, Yip V, Mok TS, et al. Comprehensive proteomic profiling identifies serum proteomic signatures for detection of hepatocellular carcinoma and its subtypes. *Clin Chem.* 2003;49:752-60.
- Kanmura S, Uto H, Kusumoto K, Ishida Y, Hasuike S, Nagata K, et al. Early diagnostic potential for hepatocellular carcinoma using the SELDI ProteinChip system. *Hepatology.* 2007;45:948-56.
- Li C, Tan YX, Zhou H, Ding SJ, Li SJ, Ma DJ, et al. Proteomic analysis of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma: identification of potential tumor markers. *Proteomics.* 2005;5:1125-39.
- Liang CR, Leow CK, Neo JC, Tan GS, Lo SL, Lim JW, et al. Proteome analysis of human hepatocellular carcinoma tissues by two-dimensional difference gel electrophoresis and mass spectrometry. *Proteomics.* 2005;5:2258-71.
- Sun S, Lee NP, Poon RT, Fan ST, He QY, Lau GK, et al. Oncoproteomics of hepatocellular carcinoma: from cancer markers' discovery to functional pathways. *Liver Int.* 2007;27:1021-38.
- Blanc JF, Lalanne C, Plomion C, Schmitter JM, Bathany K, Gion JM, et al. Proteomic analysis of differentially expressed proteins in hepatocellular carcinoma developed in patients with chronic viral hepatitis C. *Proteomics.* 2005;5:3778-89.
- Park KS, Kim H, Kim NG, Cho SY, Choi KH, Seong JK, et al. Proteomic analysis and molecular characterization of tissue ferritin light chain in hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2002;35:1459-66.
- Brittenham GM, Weiss G, Brissot P, Lainé F, Guillygomarc'h A, Guyader D, et al. Clinical Consequences of New Insights in the Pathophysiology of Disorders of Iron and Heme Metabolism. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2000;4:39-50.
- Yang ZF, Ho DW, Lam CT, Luk JM, Lum CT, Yu WC, et al. Identification of brain-derived neurotrophic factor as a novel functional protein in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2005;65:219-25.
- Xiao ZY, Wang YD, Chen XP. Effect of brain-derived neurotrophic factor on in vitro metastasis of hepatocellular carcinoma cell line HepG2. *Ai Zheng.* 2006;25:287-91.
- Wang XY, Degos F, Dubois S, Tessitore S, Allegretta M, Guttmann RD, et al. Glypican-3 expression in hepatocellular tumors: diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas. *Hum Pathol.* 2006;37:1435-41.
- Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, Midorikawa Y, Yamamoto S, Ihara S, et al. Identification of soluble NH2-terminal fragment of glypican-3 as a serological marker for early-stage hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2004;64:2418-23.
- Le Naour F, Brichory F, Misek DE, Brechot C, Hanash SM, Beretta L. A distinct repertoire of autoantibodies in hepatocellular carcinoma identified by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics.* 2002;1:197-203.
- Yoon GS, Lee H, Jung Y, Yu E, Moon HB, Song K, et al. Nuclear matrix of calreticulin in hepatocellular carcinoma. *Cancer Res.* 2000;60:1117-20.
- Lee IN, Chen CH, Sheu JC, Lee HS, Huang GT, Chen DS, et al. Identification of complement C3a as a candidate biomarker in human chronic hepatitis C and HCV-related hepatocellular carcinoma using a proteomics approach. *Proteomics.* 2006;6:2865-73.
- Hong WS, Hong SI. Clinical usefulness of alpha-1-antitrypsin in the diagnosis of hepatocellular carcinoma. *J Korean Med Sci.* 1991;6:206-13.

Bibliografía recomendada

Gstaiger M, Aebersold R.
Applying mass spectrometry-based proteomics to genetics, genomics and network biology. *Nat Rev Genet.* 2009;10:617-27.

Excelente revisión sobre los últimos avances técnicos en la proteómica basada en la espectrometría de masas. Además, esta revisión incluye un apartado dedicado a la integración de la información generada por la proteómica y la genómica para la construcción de modelos fenotípicos (fenómica).

Hung KE, Yu KH. Proteomic approaches to cancer biomarkers. *Gastroenterology.* 2010;138:46-51.

Este artículo es una revisión sencilla de las técnicas empleadas en la actualidad para la detección y validación de biomarcadores de interés en el cáncer gastrointestinal.

Hüttenhain R, Malmström J, Picotti P, Aebersold R. Perspectives of targeted mass spectrometry for protein biomarker verification. *Curr Opin Chem Biol.* 2009;13:518-25.

En este artículo se revisan las estrategias proteómicas actuales destinadas al análisis cuantitativo de los posibles biomarcadores presentes en el plasma sanguíneo.

Sun S, Lee NP, Poon RT, Fan ST, He QY, Lau GK, et al. Oncoproteomics of hepatocellular carcinoma: from cancer markers' discovery to functional pathways. *Liver Int.* 2007;27:1021-38.

Revisión dedicada al análisis de los biomarcadores del carcinoma hepatocelular. Revisa la información obtenida con diferentes técnicas proteómicas y agrupa los biomarcadores en relación a sus actividades funcionales.