

Grupo de Biomarcadores Moleculares. Universidad de Vigo

Francisco Javier Rodríguez Berrocal

Dpto. de Bioquímica, Genética e Inmunología. Facultad de Biología. Universidad de Vigo

Componentes del grupo

Francisco Javier Rodríguez Berrocal, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular; María Páez de la Cadena Tortosa, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular; Vicenta Soledad Martínez Zorzano, Profesora Titular de Bioquímica y Biología Molecular; Ana María Rodríguez Piñeiro; Paula Álvarez Chaver, becaria; Mónica Martínez Fernández, becaria; Andrés García Lorenzo, estudiante de Tercer Ciclo; Sabela Búa Aguín, estudiante de Tercer Ciclo; Sonia Blanco Prieto, estudiante de Tercer Ciclo.

Historia del grupo

Los miembros del equipo de investigación en Proteómica de la Universidad de Vigo trabajan en los laboratorios del Área de Bioquímica y Biología Molecular ubicados en la Facultad de Biología de dicha Universidad. Están integrados en un grupo más amplio que investiga desde el año 1994 en temas relacionados con Biomarcadores Moleculares, y cuyo principal objetivo es la obtención de nuevas pruebas de diagnóstico, de pronóstico y de seguimiento para distintos tipos de cáncer. Nuestros primeros estudios seguían un enfoque clásico evaluando el valor como marcadores de moléculas de las que ya se conocía o sospechaba su relación con los procesos tumorales. De este modo hemos investigado tanto glicoproteínas como monosacáridos mediante valoraciones enzimáticas, métodos electroforéticos e inmunológicos. Con este tipo de estudios comprobamos, por ejemplo, que algunas moléculas, como el CD26, tienen utilidad para el diagnóstico y el pronóstico en el cáncer colorrectal mientras que otras, como la alfa-L-fucosidasa, podrían ser utilizadas tanto en el pronóstico como durante el seguimiento postoperatorio de pacientes de cáncer de cabeza y cuello, permitiendo la detección de recidivas.

Sin embargo, es cada vez más evidente que la detección y el seguimiento de los procesos tumorales requieren no un único marcador, sino una combinación de varios. Ésta se considera la opción ideal en la actualidad, ya que la valoración de un conjunto de moléculas posibilita una mejora tanto de la sensibilidad como de la especificidad de una prueba. Las técnicas proteómicas, que incluyen varias tecnologías de separación de proteínas a gran escala, son adecuadas para este tipo de estudios, no sólo porque permiten la observación y comparación de miles de proteínas a la vez, sino porque permiten realizar los análisis sin un conocimiento *a priori* de las proteínas que finalmente van a presentar un potencial valor clínico. Esto incrementa las probabilidades de hallar nuevas moléculas, cuya relación con el cáncer no se hubiera demostrado previamente.

En la búsqueda de marcadores tumorales por comparación de mapas proteicos obtenidos mediante electroforesis bidimensional, nuestro grupo ha seguido distintas aproximaciones. Una de ellas consiste en la detección de proteínas que presenten diferencias en sus niveles de expresión (mayor o menor cantidad de proteína) entre individuos sanos y enfermos. Este tipo de estudios lo hemos llevado a cabo en pacientes de cáncer colorrectal, analizando tanto proteínas presentes en el suero como proteínas de membrana de los tumores de pacientes. En ambos casos hemos identificado numerosas proteínas cuya expresión se altera en relación con la patología, siendo la mayoría de ellas proteínas relacionadas con la proliferación celular, la apoptosis y la señalización celular, por lo que en principio todas ellas son candidatas a marcadores tumorales.

En relación a esta aplicación clínica de la proteómica, es evidente que la detección de proteínas alteradas en pacientes no garantiza su utilidad como marcadores tumorales, por lo que es preciso llevar a cabo su validación. Esto supone en la actualidad un cuello de botella en este tipo de estudios. Aunque actualmente existen numerosos trabajos en los que se identifican proteínas alteradas en distintas enfermedades, son muy escasos, por no decir

inexistentes, aquellos en los que se comprueba la utilidad de esas proteínas como marcadores de la enfermedad. Además, estas pruebas de validación se realizan en suero o plasma y muchas veces no confirman los resultados obtenidos en los estudios proteómicos. Pensamos que, en parte, esto se debe a la existencia de isoformas que corresponden a una misma proteína con diferentes modificaciones post-traduccionales. En nuestro laboratorio, de los potenciales marcadores tumorales identificados en los estudios anteriores, elegimos para su validación la proteína clusterina. Esta proteína presenta formas tisulares citoplasmáticas y nucleares, siendo también secretada a fluidos biológicos como el suero. El interés de esta proteína radica en su implicación en diversos procesos neoplásicos, ejerciendo funciones tanto pro- como antiapoptóticas. Por ello, y aprovechando las técnicas proteómicas disponibles, hemos estudiado las diversas isoformas séricas de la clusterina (Rodríguez-Piñeiro *et al.*, 2006), observando un complejísimo patrón en individuos sanos que difiere del que existe en suero de pacientes con cáncer colorrectal. Así, detectamos una expresión alterada de, al menos, 16 N-glicofomas y el aumento, exclusivamente en pacientes, de una forma de clusterina, constituida por al menos 5 isoformas, y probablemente con una glicosilación aberrante. Actualmente tratamos de identificar, separar y purificar las isoformas que estén alteradas por la enfermedad con el objetivo aún lejano de generar anticuerpos específicos para su detección.

Una segunda aproximación proteómica para la búsqueda de marcadores tumorales consiste en utilizar los propios mapas bidimensionales como herramienta diagnóstica. En este sentido hemos empleado, por un lado, pruebas estadísticas multivariantes aplicadas a los niveles de expresión proteica y, por otro, un método morfométrico-geométrico denominado análisis de deformaciones relativas, que permite la detección de cambios casi inapreciables en la posición de algunas proteínas en los mapas bidimensionales. Estos cambios son el reflejo de pequeñas variaciones en el punto isoelectrico y la masa molecular, que pueden ser debidas a modificaciones post-traduccionales aberrantes producto del proceso tumoral. Hemos comprobado que todas estas técnicas, aplicadas a los mapas bidimensionales, pueden servir como herramienta diagnóstica, puesto que permiten la discriminación entre individuos sanos y enfermos. Además, en el último caso, el método permite detectar la contribución de cada proteína a la distinción de los grupos, por lo que *a posteriori* pueden seleccionarse las proteínas

con mayor importancia y llevar a cabo su validación como marcador tumoral.

Finalmente, comentar que nuestro grupo colabora también con un grupo de Genética de la Universidad de Vigo aplicando técnicas proteómicas para realizar estudios de especiación en moluscos. En estos trabajos la mayor dificultad estriba en la práctica inexistencia de secuencias de estas especies en las bases de datos, lo que complica la identificación de proteínas, obligando en muchos casos a su secuenciación. Acostumbrados a trabajar con proteínas humanas, todavía sorprende el poco avance alcanzado en proteómica en relación con estos organismos marinos.

Publicaciones y patentes

- Álvarez-Chaver, P., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Rodríguez-Berrocal, F.J., Martínez-Zorzano, V.S., Páez de la Cadena, M. (2007). Identification of hydrophobic proteins as biomarker candidates for colorectal cancer. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39 (3): 529-540.
- Martínez-Fernández, M., Rodríguez-Piñeiro, A.M., Oliveira, E., Páez de la Cadena, M., Rolán-Alvarez, E. The proteomic comparison between two marine snail ecotypes reveals details about the biochemistry of adaptation (enviada).
- Páez de la Cadena Tortosa, M., Rodríguez Piñeiro, A.M., Carvajal Rodríguez, A., Rolán Alvarez, E., Rodríguez Berrocal, F.J., Martínez Fernández, M. (2005). "Procedimiento para la detección de estados patológicos en humanos mediante la realización de un análisis morfométrico-geométrico de deformaciones relativas en mapas proteicos." Código de la patente: ES200502984.
- Rodríguez-Piñeiro, A.M., Ayude, D., Rodríguez-Berrocal, F.J., Páez de la Cadena, M. (2004). Concanavalin A chromatography coupled to two-dimensional gel electrophoresis improves protein expression studies of the serum proteome. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 803 (2): 337-343

- Rodríguez-Piñeiro, A.M., Carvajal-Rodríguez, A., Rolán-Álvarez, E., Rodríguez-Berrocal, F.J., Martínez-Fernández, M., Páez de la Cadena, M. (2005). Application of relative warp analysis to the evaluation of two-dimensional gels in proteomics: studying isoelectric point and relative molecular mass variation. *Journal of Proteome Research*, 4 (4): 1318-1323
- Rodríguez-Piñeiro, A.M., Páez de la Cadena, M., López-Saco, A., Rodríguez-Berrocal, F.J. (2006). Differential expression of serum clusterin isoforms in colorectal cancer. *Molecular and Cellular Proteomics*, 5 (9): 1647-1657.
- Rodríguez-Piñeiro, A.M., Rodríguez-Berrocal, F.J., Páez de la Cadena, M. (2007). Improvements in the search for potential biomarkers by proteomics: application of principal component and discriminant analyses for two-dimensional maps evaluation. *Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 849 (1-2): 251-260.