

COLABORACIONES EN QUÍMICA

GLICOPROTEÍNAS COMO BIOMARCADORES DE CÁNCER

El cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades del aparato circulatorio [1], con aproximadamente 14 millones de casos nuevos en el mundo en el año 2012 [2]. Las estimaciones poblacionales indican que el número de casos nuevos aumentarán en las dos próximas décadas a 22 millones de casos nuevos al año [2]. En el caso de España, de acuerdo con los datos ofrecidos por REDECAN [3], el número total de nuevos casos de cáncer en 2015 fue de 247.771 (148.827 en varones y 98.944 en mujeres). Los tipos de cáncer más frecuentemente diagnosticados en dicho año fueron colorrectal (41.441 casos), próstata (33.370 casos), pulmón (28.347 casos), mama (27.747 casos) y vejiga (21.093 casos). Si los separamos por sexo, los cinco tumores más frecuentemente diagnosticados en varones en España fueron próstata (33.370 casos), colorrectal (24.764 casos), pulmón (22.430), vejiga (17.439) y estómago (5.150 casos) (ver figura 1). En mujeres, los cinco tumores más frecuentemente diagnosticados fueron el cáncer de mama (27.747), colorrectal (16.677), cuerpo uterino (6.160), pulmón (5.917) y vejiga (3.654) (ver figura 2).

En los últimos 20 años, el número de tumores diagnosticados ha experimentado un crecimiento constante en España y Europa debido no sólo al aumento poblacional, sino también a las técnicas de detección precoz y

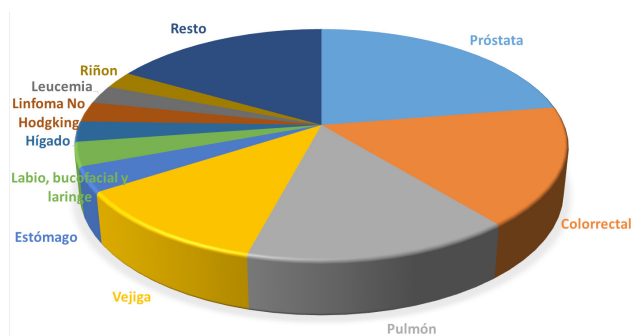


Figura 1. Incidencia estimada de los diez tumores más frecuentes en España en varones en el año 2015. Fuente: Galceran J, et al., REDECAN Working Group (2017). Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical and Translational Oncology*.

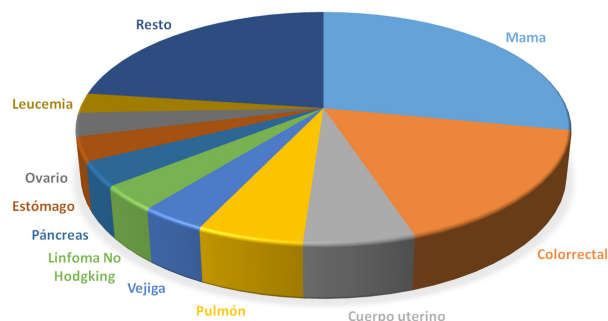


Figura 2. Incidencia estimada de los diez tumores más frecuentes en España en mujeres en el año 2015. Fuente: Galceran J, et al., REDECAN Working Group (2017). Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical and Translational Oncology*.

al aumento de la esperanza de vida (ya que el riesgo de desarrollar tumores aumenta con la edad) [2]. La tasa de supervivencia depende enormemente del estadio al cual la enfermedad es diagnosticada. La detección precoz de la enfermedad y el desarrollo de métodos de *screening* mínimamente invasivos, que tienen una amplia aceptación de los pacientes, es la estrategia más prometedora para mejorar la supervivencia de los pacientes de cáncer. Además, la glicosilación aberrante de proteínas es el sello distintivo bien conocido del cáncer y representa una fuente valiosa de información [4].

La mayoría de las proteínas plasmáticas son modificadas mediante la adición de cadenas de oligosacáridos (glicanos) en su superficie. El proceso, llamado glicosilación, es el responsable de introducir una enorme variedad de estructuras y, además, es importante en la definición de las propiedades funcionales expresadas por las glicoproteínas. La adición de estos glicanos ocurre a través del aminoácido asparagina (denominada N-glicosilación) o a través de los aminoácidos hidroxilisina, hidroxiprolina, serina o treonina (denominada O-glicosilación). En la figura 3 podemos ver un ejemplo de glicoproteína, el antígeno específico de próstata (PSA), la cual solamente tiene una cadena de glicanos (de color gris en la imagen).

La composición de glicanos y su estructura puede variar ampliamente y, potencialmente, mostrar especificidad hacia una determinada enfermedad, al contrario que la secuencia polipeptídica de la glicoproteína que se mantiene estable. Por tanto, el análisis de su estructura

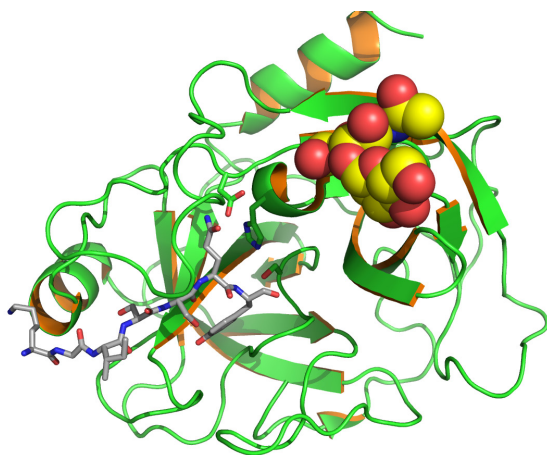


Figura 3. Imagen 3D de la glicoproteína PSA. La única cadena de glicanos que tiene está representada de color gris. Fuente: BCSB protein data bank, protein ID: 2ZCH.

podría ofrecer biomarcadores más precisos y específicos lo cual es crítico para el tratamiento temprano de enfermedades y su monitorización [5-7].

En contraposición a la estructura de la cadena polipeptídica, la glicosilación no se codifica directamente por unos determinados genes, sino que depende de la acción concertada de una serie de enzimas altamente específicas (glicosiltransferasas y glicosidasas), las cuales están presentes en el retículo endoplasmático y aparato de Golgi de las células, para iniciar y sintetizar la cadena precursora de glicanos (modificación postraduccional) [8]. La expresión de glicanos es específica para cada tejido y célula y depende también de la presencia de estados fisiopatológicos [9]. Una expresión anormal de una sola enzima participante en dicho proceso puede alterar los pasos siguientes y causar estructuras aberrantes de oligosacáridos. Los tipos de células que contienen estas biomoléculas determinan las enzimas expresadas y, por tanto, la variación de glicanos refleja tanto el origen celular o tisular como las condiciones bioquímicas y fisiológicas en dicho momento [8, 9]. Por ejemplo, una inusual o anormal mezcla de glicanos es a menudo detectada en la superficie de células tumorales y, también, entre las glicoproteínas excretadas fuera de la célula. Muchos de los bien conocidos antígenos asociados a tumores son glicoproteínas y glicolípidos que contienen estructuras de glicanos aberrantes [10].

Actualmente, existen alrededor de una docena de glicoproteínas que están aprobadas por la FDA como biomarcadores para el diagnóstico y/o pronóstico de cáncer (ver tabla I) pero, además, existen una multitud de glicoproteínas bajo estudio [4]. En algunos casos, se determina la concentración total de dichas glicoproteínas en

fluidos biológicos (PSA, CEA...) y, en otros casos, se determina la presencia de una determinada glicofoma perteneciente a la glicoproteína (MUC1, AFP-L3...).

TÉCNICAS ANALÍTICAS EMPLEADAS EN LA BÚSQUEDA DE BIOMARCADORES DE CÁNCER

La búsqueda de nuevos biomarcadores de cáncer basados en glicoproteínas presentes en fluidos biológicos (técnicas no invasivas) se ha centrado principalmente en dos estrategias. La primera se basa en la determinación de un epítipo presente en los glicanos de la glicoproteína y estudiar como influye el cáncer en la concentración de dicha glicoproteína, es decir, se trabaja con glicoproteína intacta. Dentro de esta estrategia estarían todos los métodos basados en lectinas y anticuerpos monoclonales, los cuales reconocen de manera específica dicho epítipo. Estos métodos ofrecen una enorme selectividad y sensibilidad pero se limitan al estudio de un único receptor o parámetro previamente definido. La segunda estrategia se basa en la separación de oligosacáridos que, previamente, han sido liberados de las glicoproteínas (N-PNGasa, tripsina...) y comparar perfiles de muestras de sanos y enfermos [4, 11, 12]. En esta estrategia no hay un compuesto objetivo predefinido por lo que permite descubrir nuevos glicanos asociados al cáncer. Dentro de esta estrategia, las técnicas instrumentales más empleadas son la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC), la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), la electroforesis capilar (CE) y la espectrometría de masas (MS) [4, 13, 14].

Actualmente, hay cierto consenso que la técnica más prometedora en la búsqueda de nuevos biomarcadores

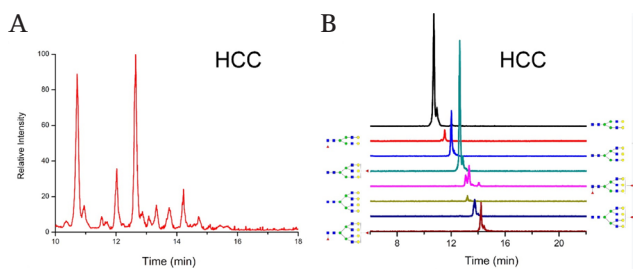


Figura 4. Cromatogramas obtenidos por HPLC/MS correspondientes a N-glicanos de haptoglobina procedentes de muestras de suero de pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC). (A) Cromatograma con todos los picos obtenidos por HPLC/MS. (B) Cromatogramas extraídos de cada ion identificado por MS, correspondientes a un único glicano. Acompañando a cada cromatograma se muestra la representación simbólica del glicano identificado. Adaptada de: Zhang Y, Zhu J, Yin H, Marrero J, Zhang XX, Lubman DM (2015). *Journal of Proteome Research* 14, 5388-5395.

Tabla I. Biomarcadores de cáncer aprobados por la FDA. Fuente: Kirwan A, Utratna M, O'Dwyer ME, Joshi L, Kilcoyne M (2015). Glycosylation-Based Serum Biomarkers for Cancer Diagnostics and Prognostics. BioMed Research International 2015, Article ID 490531.

Marcador	Nombre completo	Tipo de cáncer	Tipo de detección	Aplicación clínica	Año de aprobación por la FDA
AFP	α -Fetoproteína	Hígado	Concentración de proteína y fucosilación core	Diagnosis, estadio, detección de recurrencia y monitorización de la terapia	1992/2008
PSA	Antígeno específico de próstata	Próstata	Concentración de proteína	Screening, discriminación entre cáncer y enfermedad benigna	1986/1994/2012
CA125 (MUC16)	Antígeno de cáncer 125	Ovario	Concentración de proteína	Monitorización de la terapia y detección de recurrencia	1997/2011
HE4 (WFDC2)	Proteína 4 del epidídimo humano	Ovario	Concentración de proteína	Monitorización de la terapia y detección de recurrencia	2008
OVA1 test (múltiples proteínas)	β -2-microglobulina, CA 125 II, apolipoproteína A1, prealbúmina, transferrina	Ovario	Concentración de proteína	Predicción	2009
ROMA test	HE4 + CA125	Ovario	Concentración de proteína	Predicción	2011
CA15-3 (MUC1)	Antígeno de cáncer 15-3	Mama	Sialización de los O-oligosacáridos de la MUC1	Monitorización de la terapia	1997
CA27-29	Antígeno de cáncer 27-29	Mama	Nivel de proteína MUC1	Monitorización de la terapia	2002
CA19-9	Antígeno de carbohidrato 19-9	Páncreas y ovario	Sialización de Lewis a en mucinas, glicoproteínas y gangliosidos	Monitorización de la terapia	2002
CEA	Antígeno carcinoembrionario	Colon, estómago, páncreas, pulmón y mama	Concentración de proteína	Monitorización de la terapia y detección de recurrencia	1985
HER2 / neu	Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano	Mama	Concentración de proteína	Elección de terapia	1998
Tg	Tiroglobulina	tiroides	Concentración de proteína	Monitorización de la terapia	1997
hCG	Gonadotropina coriónica humana	Testículo, ovario	Concentración de proteína	Diagnosis, estadio, detección de recurrencia y monitorización de la terapia	No aprobada

de cáncer es la combinación HPLC/MS [12-14]. El HPLC permite separar un gran número de picos y la MS permite identificar dichos picos y elucidar la estructura del mismo. En la figura 4, se muestra un cromatograma obtenido por esta técnica donde consiguen separar e identificar los N-glicanos procedentes de haptoglobina en muestras de suero de pacientes con carcinoma hepatocelular. Esta técnica junto con el desarrollo de nuevas herramientas bioinformáticas facilitará la adquisición de nuevos datos de manera más rápida y exacta lo que,

previsiblemente, aumentará las posibilidades de descubrir alteraciones de glicanos asociados al cáncer. Todo ello con el objetivo final de descubrir nuevos biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico del cáncer.

Por otro lado, uno de los retos a los que se enfrentan los investigadores es la baja concentración a la que se encuentran algunas proteínas biomarcadoras lo que obliga muchas veces al empleo de técnicas de purificación/preconcentración antes del análisis [8, 15]. Además, la instrumentación utilizada es compleja, se necesitan

ordenadores potentes para interpretar los datos y los consumibles son extremadamente caros, por lo que son necesarios laboratorios muy especializados con personal técnico altamente cualificado. En este sentido, hay bastantes autores que destacan la necesidad de simplificar los métodos experimentales y de usar protocolos de detección más simples y baratos, indicando como una alternativa a explorar el empleo de tecnologías microfluidicas que ofrecen mayor automatización y mayor velocidad [13, 15].

ABREVIATURAS

- AFP: α -fetoproteína
- CEA: antígeno carcinoembrionario
- FDA: U.S. Food and Drug Administration
- HPLC: Cromatografía líquida de alta eficacia
- MS: Espectrometría de masas
- MUC1: Mucina codificada por el gen MUC1
- PSA: antígeno específico de próstata
- REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer

REFERENCIAS

- [1] Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa, Informe de la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN), Octubre 2014.
- [2] Las Cifras del Cáncer en España 2016, Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), Depósito Legal: M-2172-2017, 2017.
- [3] Galceran J, et al., REDECAN Working Group (2017). Cancer incidence in Spain, 2015. *Clinical and Translational Oncology*.
- [4] Kirwan A, Utratna M, O'Dwyer ME, Joshi L, Kilcoyne M (2015). Glycosylation-Based Serum Biomarkers for Cancer Diagnostics and Prognostics. *Bio-Med Research International* 2015, Article ID 490531.
- [5] Kolarich D, Lepenies B, Seeberger PH (2012). Glycomics, glycoproteomics and the immune system. *Current Opinion in Chemical Biology* 16, 214–220.
- [6] Hennet T (2012). Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 1306–1317.
- [7] Dall'Olio F, Malagolini N, Trinchera M, Chiricolo M (2012). Mechanisms of cancer associated glycosylation changes. *Frontiers in bioscience* 17, 670–699.
- [8] Smith KD, Behan J, Matthews-Smith G, Magliocco AM (2012). Alpha-1-Acid Glycoprotein (AGP) as a Potential Biomarker for Breast Cancer, capítulo 9, pgs. 201–222, in book: "Glycosylation", edited by S. Petrescu S, ISBN 978-953-51-0771 2, under CC BY 3.0 license.
- [9] van Dijk W, Turner GA, Mackiewicz A (1994). Changes in glycosylation of acute phase proteins in health and disease: occurrence, regulation and function. *Glycosylation and Disease* 1, 5–14.
- [10] Adamczyk B, Tharmalingam T, Rudd PM (2012). Glycans as cancer biomarkers. *Biochimica et Biophysica Acta* 1820, 1347–1353.
- [11] Narimatsu H, Sawaki H, Kuno A, Kaji H, Ito H, Ikehara Y (2010). A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. *FEBS journal* 277, 95–105.
- [12] Christiansen MN, Chik J, Lee L, Anugraham M, Abrahams JL, Packer NH (2014). Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics* 14, 525–546.
- [13] Brooks SA (2009). Strategies for analysis of the glycosylation of proteins: Current status and future perspectives. *Molecular biotechnology* 43, 76–88.
- [14] Tousi F, Hancock WS, Hincapie M (2011). Technologies and strategies for glycoproteomics and glycomics and their application to clinical biomarker research. *Analytical Methods* 3, 20–32.
- [15] Silva MLS (2015). Cancer serum biomarkers based on aberrant post-translational modifications of glycoproteins: Clinical value and discovery strategies. *Biochimica et Biophysica Acta* 1856, 165–177.

Agustín González Crevillén
Dpto. de Ciencias Analíticas