

Proteómica en la investigación del Melanoma Uveal

María Pardo-Pérez

Laboratorio de Endocrinología Molecular y Celular, Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago, Hospital Clínico Universitario de Santiago (CHUS), Santiago de Compostela - Spain.

Resumen

El melanoma uveal (MU) es el tumor intraocular primario más frecuente en el adulto humano. A pesar de los avances relevantes realizados en el diagnóstico y tratamiento del MU durante las últimas décadas, el pronóstico de los pacientes con MU es todavía malo. La enfermedad metastásica en el hígado es la principal causa de muerte en el MU, lo que puede ocurrir después de un largo periodo libre de enfermedad, sugiriendo la presencia de micrometástasis ocultas. La proteómica ha abierto nuevas oportunidades para elucidar los mecanismos moleculares de enfermedades complejas como el cáncer. En este artículo se revisará la reciente aplicación de esta tecnología al estudio del MU y su utilidad en la identificación de biomarcadores.

Palabras clave:

Melanoma uveal, proteómica, secretoma, biomarcador

1. Antecedentes

El melanoma uveal maligno (MU) es el tumor primario intraocular más frecuente en la edad adulta, con una incidencia de aproximadamente 5 casos por millón de habitantes y año, y con una mortalidad del 30% a los cinco años del diagnóstico [1]. A pesar de los avances importantes que se han llevado a cabo en el diagnóstico y tratamiento del MU en las últimas décadas, su pronóstico es todavía pobre. Estudios epidemiológicos señalan que el MU es más frecuente en edades avanzadas y en caucásicos, especialmente aquellos con ojos azules-grisáceos, sin que haya una predominancia de género ni herencia genética [2]. Es más frecuente a nivel de la coroides (90% de los casos), aunque también puede producirse en el cuerpo ciliar (5-10%) y en el iris (3%). Los MU de mejor pronóstico son los situados en el iris y los de peor pronóstico los de cuerpo ciliar. La mayor parte de los melanomas de iris, cuerpo ciliar y coroides son asintomáticos inicialmente. Cuando el tumor crece, puede causar deformidad del iris en el caso de los melanomas de iris o disminución de la agudeza visual en los de cuerpo ciliar y coroides [3] (Figura 1).

Aunque el MU y el melanoma cutáneo se originan a partir de un precursor celular común, los melanocitos de la cresta neural, presentan diferencias

importantes en la biología tumoral y en su comportamiento, incluyendo las características moleculares [4]. A diferencia del melanoma cutáneo, el MU se disemina principalmente por la sangre y sus metástasis se sitúan preferentemente en el hígado. Las metástasis hepáticas son la primera causa de muerte en el MU, y puede aparecer después de un intervalo largo libre de enfermedad, lo cual sugiere la presencia de micrometástasis ocultas en el momento en que el tumor primario se diagnostica y trata [5]. Tradicionalmente, la enucleación ha sido el tratamiento estándar aceptado para el melanoma corioideo primario y sigue siendo el tratamiento de elección para los tumores de gran tamaño. Sin embargo, posteriormente han surgido tratamientos alternativos para evitar la enucleación. Estos incluyen: placa radiactiva, haz de protones o radioterapia estereotáxica, resección trans-escleral o trans-retiniana, y combinaciones de los anteriores con la termoterapia trans-pupilar. En relación con el tratamiento conservador, en 1986 se inició en EEUU un estudio prospectivo, multicéntrico y aleatorizado (COMS, *Collaborative Ocular Melanoma Study*) con el objetivo de evaluar la utilidad de los tratamientos utilizados en ese momento (enucleación y braquiterapia con I125), considerando la supervivencia y el pronóstico visual entre otros factores. Se incluyeron en el estudio 9000 pacientes que fueron diagnosticados

y tratados en 43 centros de EEUU y Canadá hasta el 31 de julio de 2008. A pesar del gran número de nuevos datos relevantes aportados - como por ejemplo la exactitud del diagnóstico, o el seguimiento de las lesiones de pequeño tamaño - el COMS reveló resultados decepcionantes ya que no encontró diferencias en cuanto a la supervivencia de los enfermos tratados con enucleación de aquellos tratados con I125 [5]. Actualmente, utilizando cualquiera de las opciones de tratamiento conservador o sus combinaciones, el control local del MU es mayor del 90% después de 5 años. Sin embargo, a pesar del éxito conseguido en el tratamiento del tumor primario en el ojo, las metástasis ocurren por vía hematogena en más del 50% de los pacientes después de 15 años [6]. Esta evidencia sugiere, de manera similar a otros cánceres, la presencia de micrometástasis en el momento del diagnóstico. El especial tropismo de las células de MU por el hígado sigue siendo hoy en día un enigma. Es importante señalar que la extensión del MU por el sistema linfático no ocurre en el globo ocular; este hecho diferencia el MU del melanoma cutáneo. En los casos en los que el hígado está afectado, se aplica quimioterapia sistémica con resultados decepcionantes [7]. El tratamiento sistémico adyuvante en el momento del diagnóstico y el tratamiento del tumor primario podrían ofrecer mejores expectativas hacia la supervivencia. Sin duda, el mejor tratamiento para MU sería aquel que pueda predecir la metástasis en fases iniciales; sin embargo esto no es posible hoy en día. Así, puede concluirse que la situación actual es pesimista en relación al MU; se sabe que el tratamiento es capaz de controlar el tumor localmente, pero esto no excluye la posibilidad de extensión a nivel sistémico y muerte.

Los factores pronóstico más importantes en el MU son clínicos e incluyen: localización en cuerpo ciliar, tamaño y tipo celular, actividad mitótica, infiltración linfocítica, extensión extraocular y características de la matriz extracelular y microvascular [8]. La extensión extraocular, la recidiva y las metástasis están asociadas con un pronóstico extremadamente malo. Además, otros factores pronóstico basados en las características moleculares de las células de MU, tales como los cambios citogenéticos (pérdida de cromosoma 3), desregulación de proteínas del ciclo celular, pérdida de proteínas de adhesión celular o sobre-expresión de inhibidores de apoptosis, están actualmente comenzando a ser útiles en el manejo clínico del MU [9-13]. Por tanto, existe un gran interés en caracterizar mejor los MU en fases iniciales de acuerdo con su potencial metastásico para mejorar el

pronóstico y aumentar la supervivencia. Como ya se ha demostrado en otros cánceres, un mejor entendimiento de los eventos moleculares responsables del desarrollo tumoral puede mejorar la supervivencia.

Últimamente, los avances tecnológicos han aportado nuevas metodologías para monitorizar la expresión génica (transcriptómica) y los niveles de proteínas (proteómica) en el desarrollo de la enfermedad. Estas aproximaciones globales proveen una cantidad de información sin precedentes sobre la patofisiología molecular de las enfermedades humanas. Además estas tecnologías ofrecen una plataforma para el diagnóstico y clasificación de las dolencias como el cáncer, permitiendo un pronóstico más preciso ya que integra mucha más información que la obtenida mediante técnicas más convencionales como la inmunohistoquímica, la citometría de flujo, o la hibridación fluorescente in vitro (FISH) [14].

Recientemente, Harbour y cols. han realizado un esfuerzo importante en la caracterización genética de los MU por expresión génica. Los perfiles citogenéticos permitieron distinguir MU de bajo riesgo (clase 1) de los de alto riesgo de metástasis (clase 2) que además presentaban monosomía del cromosoma 3 [15]. Un trabajo más reciente permitió a este grupo subdividir estas clases moleculares en cuatro subclases de valor pronóstico (1A, 1B, 2A y 2B) basadas en la expresión génica [16].

Los datos anteriores han sugerido la necesidad de obtener muestras de todos los MU para clasificarlos en clase 1 y clase 2 y predecir su potencial metastásico en el momento del diagnóstico. Sin embargo, deben considerarse varios aspectos tales como la dificultad técnica y el teórico riesgo de diseminación celular al torrente sanguíneo, lo cual puede suponer un conflicto ético. Por otro lado, debe ser tenida en cuenta la heterogeneidad en la aneuploidía de las células recogidas, las cuales pueden no representar el total de la masa tumoral [17]. Bajo este contexto, sería muy importante el poder identificar biomarcadores específicos en el torrente sanguíneo para identificar tumores y clasificarlos según su potencial metastásico. El descubrimiento de biomarcadores ha sido un desafío para los investigadores en cáncer durante décadas. Desafortunadamente, actualmente hay muy pocos biomarcadores encontrados que tengan utilidad en la práctica clínica, lo cual hace que sea más importante la investigación en este campo. En relación con el MU, se han sugerido varios biomarcadores, sin potencial diagnóstico probado, tales como el antígeno carcino-embriionario y la gamma

glutamyltranspeptidasa, la actividad inhibitoria de melanoma (MIA), S-100 y la osteopontina [18].

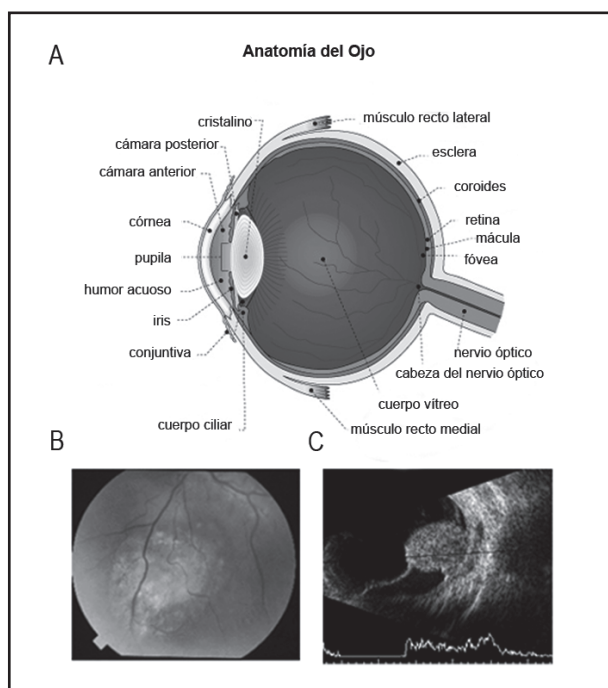


Figura 1: El ojo humano. Esquema representativo de la anatomía del ojo (A), imagen de fondo de ojo mostrando un tumor coroideo (B) y ecografía en modo B de un MU (C).

2. Proteómica del melanoma uveal

Los estudios de expresión global de proteínas mediante proteómica en tumores humanos han aportado mucha información acerca de la heterogeneidad tumoral y han llevado a la identificación de polipéptidos con potencial pronóstico [19]. Muchos cambios de expresión génica que distinguen tumores benignos de sus formas malignas se deben a modificaciones post-traduccionales (PTMs) que no pueden ser detectadas mediante el análisis del ARN o ADN. Los pacientes con MU pueden tener evoluciones clínicas y respuestas al tratamiento muy variadas posiblemente debido a la heterogeneidad molecular de estos tumores. Por esta razón la clasificación molecular del MU es muy informativa y clínicamente muy útil. Se ha propuesto que, para ser efectiva, la terapia en cáncer debe ser individualizada, lo cual requiere un conocimiento detallado de las propiedades de cada tumor en relación a su sensibilidad a fármacos y su propensión a metastatizar [20].

Desafortunadamente los avances en el tratamiento del MU no han evolucionado paralelamente a otros cánceres, y la tasa de supervivencia de esta enfermedad ha cambiado muy poco en los últimos años [1,

21]. Teniendo en cuenta la baja incidencia del MU, y el hecho que sólo un bajo porcentaje de los pacientes con la enfermedad recién diagnosticada se somete a enucleación, la adquisición de un número significativo de muestras de tejido fresco para el análisis genómico o proteómico, o para el establecimiento de nuevos cultivos primarios, ha sido tradicionalmente problemático en el estudio de este cáncer. Quizás por este motivo la proteómica no ha sido tan aplicada al estudio del MU como a otros tipos de cáncer; sin embargo, en los últimos años se ha hecho un gran esfuerzo por cambiar esta situación. La reciente aplicación de esta tecnología en el MU está permitiendo mejorar nuestro conocimiento sobre la biología molecular y la patofisiología de estos tumores abriendo nuevas puertas a la identificación de biomarcadores [22].

2.1 Proteómica del humor acuoso

La proteómica fue aplicada por primera vez al estudio del MU para comparar el proteoma del humor acuoso de pacientes con el de individuos sanos usando SELDI-TOF [23]. Los autores compararon los espectros de masas de humores acuosos procedentes de 24 pacientes versus 24 controles usando un *bio-chip array* de intercambio iónico. Como resultado, Missotten y colaboradores pudieron distinguir el humor acuoso de enfermos del de individuos sanos en un 89% de los casos basándose en dos proteínas (con pesos moleculares de 4543,43 y 6853,30 kDa) todavía no identificadas. Aunque los autores muestran un alto número de casos en los cuales el espectro proteico no pudo ser medido por falta de muestra, sugieren la utilidad de la combinación de herramientas bioinformáticas junto con el perfil proteómico para la identificación de marcadores tumorales potenciales en el humor acuoso del MU.

2.2 Proteoma del melanoma uveal

El primer análisis proteómico de células tumorales de MU fue publicado por nuestro grupo desde el Oxford *Glycobiology Institute* (University of Oxford, Reino Unido) [24]. En este trabajo estudiamos el proteoma de un cultivo primario de MU (UM-A) establecido previamente por nosotros en la Universidad de Santiago de Compostela. Estas células tenían la característica de presentar una forma no funcional hipofosforilada de la proteína antitumoral restinoblastoma (Rb) incapaz de inhibir el factor de transcripción E2F-1 y por lo tanto incapaz de parar la división celular [12]. Este trabajo caracterizó por primera vez el

proteoma de un cultivo primario de MU estableciendo las bases para el uso de la tecnología proteómica al estudio de dichos tumores. Las proteínas procedentes de las células UM-A fueron separadas mediante electroforesis bidimensional (2-DE) usando un gradiente de *pI* 3-10NL. De los geles resultantes, teñidos con la tinción fluorescente OGT MP17, se cortaron 270 manchas al azar con distintas intensidades para ser analizadas mediante LC-MS/MS, lo que permitió identificar 683 proteínas codificadas por 393 genes diferentes (Figura 2). De las proteínas identificadas el 18% se relacionaron con procesos cancerosos incluyendo la división celular y la proliferación (ej. CENP-F, Op18 y p80), invasión (ej. α -actinina 4, ezrina, protomiosina y vimentina), metástasis (ej. MUC18), oncogénesis (ej. DJ-1, EMS1 y oncogen FUS), resistencia a fármacos (ej. P-glycoprotein, gp94, proteína major vault, y MGr1-Ag) y otras. El 96% de todas las proteínas identificadas incluyendo 16 proteínas hipotéticas, no habían sido descritas en el MU previamente (Figura 2). Las identificaciones y su anotación en los geles bidimensionales se pueden consultar la siguiente base de datos: www.bioch.ox.ac.uk/glycob/index.html.

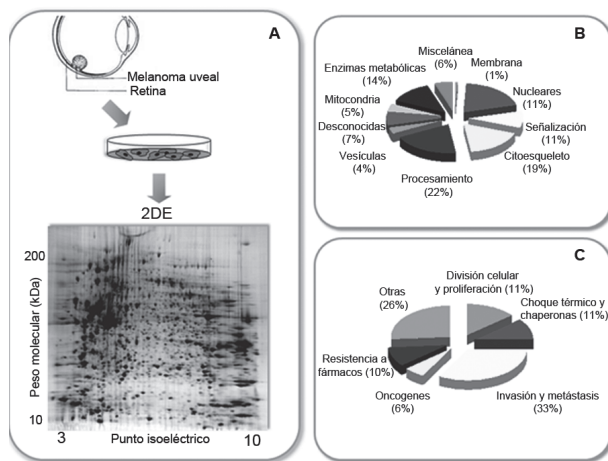


Figura 2: Proteoma del melanoma uveal humano. Esquema mostrando una imagen de 2-DE representativa del proteoma de un cultivo primario establecido a partir de un fragmento tumoral de melanoma de ívea (A); diagramas mostrando la clasificación funcional (B) y la implicación con procesos tumorales de las 683 proteínas identificadas (C). “Adapted from Expert Review of Proteomics 4(2), 273-286 (2007) with permission of Expert Reviews Ltd”

2.3 Proteómica en la progresión tumoral del melanoma uveal

Teóricamente, la comparación de la expresión proteica de tumores primarios de MU localizados en el ojo con las células metastásicas, debiera aportar

luz sobre el papel biológico de proteínas implicadas en el desarrollo de metástasis y en la identificación de biomarcadores que podrían ser de gran utilidad para rastrear pacientes con riesgo de desarrollar dichas metástasis. Con ese objetivo, Zuidervaart y colaboradores estudiaron la expresión diferencial del MU primario y metastásico [25]. Analizaron líneas celulares procedentes de tumores primarios de MU (Mel-270) y dos metástasis del mismo paciente (OMM-1.3 y 1.5) mediante 2-DE y MS (MALDI-TOF/TOF). El análisis diferencial mostró 29 diferencias de un total aproximado de 1100 manchas. De estas, se identificaron 24 proteínas que diferenciaban las células procedentes de tumores primarios de las procedentes de metástasis. Estas proteínas fueron asociadas con pasos distintivos y característicos de la metástasis tumoral como la motilidad, adhesión, dispersión, regulación de la apoptosis, y defensa celular. Además, en las líneas celulares metastásicas se detectó un aumento en la fosforilación de la proteína chaperona Hsp27 (implicada en la defensa celular), así como niveles altos de galectina-1 y β -hexosaminidasa (implicadas en la migración), y niveles más altos de la forma fosforilada inactiva de cofilina, proteína relacionada con la migración. Los mismos autores describen en las líneas metastásicas una disminución de la proteína relacionada con la defensa celular, glutathione-S-transferase (GST), y de proteínas del metabolismo como la piruvato 3 quinasa y la enolasa. Es necesaria la validación de estas proteínas para establecer su papel y especificidad en los tumores de MU.

De manera independiente, nuestro laboratorio hizo un análisis similar aplicando la proteómica a la caracterización del fenotipo invasivo del MU [26]. En este trabajo se continuó el estudio de las células UM-A descritas anteriormente comparando el proteoma del cultivo primario con la línea celular resultante después de siete pases *in vitro* [12]. El cultivo primario UM-A después de estos pases presentaba la inactivación de Rb por fosforilación y además presentaba una mayor tasa de proliferación y un aumento considerable en su potencial metastásico ensayado en sistemas de invasión *in vitro* en Matrigel. De manera similar a lo descrito por Zuidervaart, detectamos unas 1100 manchas en un rango de *pI* 3-10, pero en este caso, el número de diferencias detectadas fue mucho mayor. En concreto encontramos 290 diferencias entre los cultivos con baja y alta capacidad invasiva; de estas identificamos un 90% por LC-MS/MS. La identificación de proteínas reguladas diferencialmente reveló un aumento en el metabolismo celular de la línea celular UM-A y,

así mismo, la alteración de proteínas previamente relacionadas con el cáncer al compararlas con el cultivo primario. En concreto identificamos proteínas relacionadas con la adhesión y migración celular, proliferación, varios oncogenes y otras proteínas, muchas de ellas descritas por primera vez en el MU. Una selección de estas proteínas fue validada por Western blot en UM-A y en otras líneas celulares de MU con diferente potencial metastásico (UW-1, OCM-1, SP6.5 y 92.1) establecidas por otros grupos. De esta manera encontramos una relación entre la expresión de MUC18 y HMG-1 (*high mobility group protein*) y el poder invasivo del MU.

MUC18 (MelCAM/CD146) es una molécula de adhesión celular que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas y que está constitutivamente expresada en el endotelio humano [27]. Se sabe que MUC18 está sobre-expresada durante el desarrollo del cáncer de piel de manera progresiva permitiendo distinguir entre las células de nevus y los melanocitos tumorales [28]. Además de en el cáncer de piel, se ha encontrado una relación entre la expresión de MUC18 y el aumento del potencial metastásico en otras neoplasias como el cáncer de próstata y de vejiga [29]. En este trabajo nuestro grupo demostró por primera vez la relación entre MUC18 y la capacidad invasiva del MU *in vitro*.

La proteína HMG-1, es un componente no histónico de la cromatina implicado en la regulación transcripcional de un número de genes que juegan un papel en diferentes procesos biológicos de la progresión tumoral y metástasis [30]. La mayoría de las células normales y diferenciadas expresan niveles muy bajos de HMG-1, y sólo células transformadas experimentalmente y muchos neoplasmas se caracterizan por niveles altos de esta proteína [31]. Nuestro estudio de proteómica y la validación mediante Western blot mostró que el HMG-1 está presente en los cultivos de MU sugiriendo su participación en el proceso de metástasis. Para completar nuestro trabajo, necesitaríamos llevar a cabo una mayor validación de MUC18 y HMG-1 mediante inmunohistoquímica en secciones tumorales con invasión celular y metástasis.

Nuestro estudio diferencial también mostró la sobre-expresión de la oncoproteína DJ-1 en células de MU. Lo sorprendente fue encontrar que estas células liberaban esta proteína al medio de cultivo *in vitro*, y es interesante destacar que pudimos identificar su presencia en el suero de ciertos pacientes de MU, indicando su potencial como biomarcador. DJ-1 fue origi-

nalmente clonado como un oncogén putativo capaz de transformar células NIH-3T3 en cooperación con H-ras [32]. Hay muchas evidencias que demuestran que DJ-1 juega un papel relevante en la génesis de tumores humanos, incluyendo el cáncer de mama, de pulmón de células no pequeñas y el cáncer de próstata [33-35]. Además DJ-1 se ha descrito como un antígeno tumoral circulante en el suero del 37 % de pacientes con cáncer de mama recién diagnosticados [35].

Nuestro estudio proteómico fue la primera publicación manifestando la participación de MUC-18 y HMG-1 como marcadores de metástasis y la implicación de la oncoproteína DJ-1 en el MU, demostrando a su vez la capacidad de la proteómica para estudiar esta neoplasia [26].

2.4 Identificación de biomarcadores de MU en suero y análisis del secretoma

Las células cancerígenas liberan proteínas a la matriz extracelular secretando péptidos intactos o fragmentos. Además, los marcadores cancerígenos circulantes pueden ser liberados al micro-ambiente tumoral por células vecinas hospedadoras del tumor como fibroblastos y macrófagos. Estos productos secretados pueden acabar en el torrente sanguíneo y servir como potenciales marcadores en el suero y/o plasma. Así, el secretoma de las células y tejidos representa una fuente de biomarcadores importante. La identificación de proteínas secretadas, normalmente a partir de fluidos biológicos, es bastante inaccesible porque estas proteínas están frecuentemente ocultas entre otras de mayor abundancia que no se secretan por las células a estudio. Para solventar este problema se recurre a la eliminación de las proteínas más abundantes; sin embargo, con este proceso puede haber problemas como la falta de especificidad y la eliminación de proteínas de interés [36].

En este momento no hay marcadores con la adecuada especificidad y sensibilidad para el diagnóstico precoz del MU. La proteómica del suero parece ser un área prometedora para la identificación de biomarcadores, pero no se han descrito estudios de suero por proteómica en el MU hasta la fecha. En nuestro laboratorio hemos realizado un análisis diferencial comparando el suero de pacientes de MU con individuos sanos tras la inmunoeeliminación de las 12 proteínas más abundantes (aproximadamente el 96% de proteínas totales) y hemos encontrado muy pocas diferencias y aparentemente poco relevantes [37] (Figura 3). Igual que ha ocurrido en otros cánceres, a pesar de las esperanzas iniciales,

la caracterización proteómica del suero o plasma como herramienta diagnóstica conlleva problemas técnicos que necesitan ser mejorados debido al amplio rango dinámico de la concentración de las proteínas que componen estas muestras. Además, los potenciales biomarcadores se ven enmascarados por la gran abundancia de relativamente pocas proteínas. La eliminación de dichas proteínas no es una solución del todo satisfactoria debido a que su eliminación puede arrastrar otras proteínas poco abundantes de interés.

Una alternativa al proteoma del suero y el plasma es el estudio de los secretomas de MU como una fuente rica de biomarcadores. Es bien conocido que las células tumorales alteran e interactúan con su micro-ambiente secretando proteínas, entre las cuales hay factores de crecimiento, proteinasas que degradan la matriz extracelular y factores de motilidad, que fomentan migración y metástasis. Otros factores son citoquinas inmunoregulatoras, moléculas de interacción célula-sustrato y célula-célula, relacionadas con el no reconocimiento inmune, invasión y angiogénesis [38]. De esta forma, los secretomas de células y tejidos pueden reflejar una gran variedad de condiciones patológicas. Recientemente, en nuestro grupo nos hemos centrado en el estudio de proteínas específicas de MU liberadas en la cercanía del tumor incluyendo aquellas liberadas en el suero de los pacientes. Primero caracterizamos el secretoma de un línea celular establecida por nosotros (UM-A) y de otras líneas establecidas por otros grupos (SP6.5, UW-1, 92.1, OCM-1) [37]. Esta investigación nos llevó a la identificación de 133 proteínas secretadas por células de MU, algunas de ellas relacionadas con la angiogénesis (ej. semaphorin 5A), la adhesión celular (ej. N-CAM-L1), invasión (ej. MIF), migración, etc. Más de la mitad de las proteínas identificadas no habían sido detectadas anteriormente en el estudio del proteoma global. Este hecho se debe a la diferente naturaleza de la muestra y del abordaje experimental; la simplicidad de los secretomas comparado con los extractos celulares, y las conocidas limitaciones de la 2-DE para resolver proteínas hidrofóbicas poco solubles y proteínas ácidas [39]. Sin embargo, las proteínas MUC-18 y DJ-1 fueron encontradas de nuevo. Además se pudieron detectar proteínas de membrana como el receptor del factor de crecimiento del hígado (HGFR/c-met protooncogen) y el receptor para el factor de crecimiento de la insulina 2 (IGF-2R).

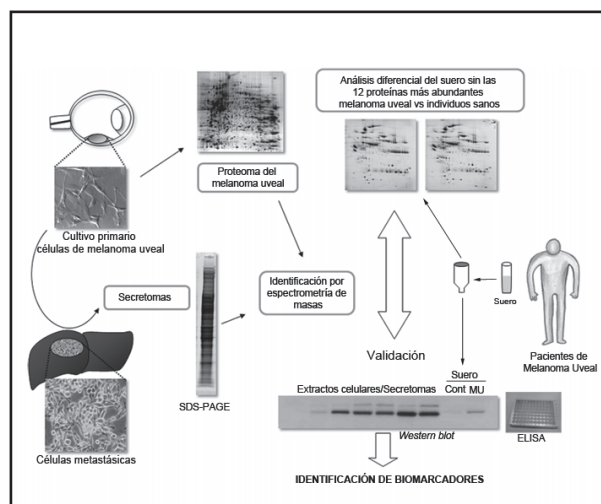


Figure 3: Estrategias para la identificación de biomarcadores de melanoma uveal humano. Se representan las diferentes estrategias aplicadas por nuestro grupo para el estudio e identificación de nuevos biomarcadores específicos del MU. El primer paso fue el estudio del proteoma del MU a partir de cultivos primarios del mismo. Posteriormente se realizaron análisis diferenciales comparando los proteomas de células con menor o mayor capacidad invasiva, y los proteomas del suero (sin las 12 proteínas más abundantes) de individuos sanos vs. pacientes con MU. Estos trabajos, junto con el estudio de la secreción *in vitro* o secretoma de células de MU permitió identificar proteínas de MU ya conocidas y también numerosas proteínas no relacionadas con este tumor hasta la fecha. Algunas de estas proteínas se han validado por otras técnicas (Western blot) en el tumor, en su secretoma y en el vítreo. Es relevante destacar que hemos podido detectar estos potenciales biomarcadores en el suero de pacientes con MU. En la actualidad se está trabajando sobre la detección de estos biomarcadores candidatos a gran escala correlacionando su presencia en el suero con el estadio clínico y su capacidad para predecir el potencial metastásico de estos tumores precozmente. “Adapted from Expert Review of Proteomics 4(2), 273-286 (2007) with permission of Expert Reviews Ltd”

De las proteínas mencionadas, basándose en la bibliografía, se seleccionaron tres proteínas relacionadas con el cáncer para su validación: la sintenina, la catepsina D y la gp100, las cuales están implicadas en la progresión tumoral [40, 41]. Mediante *Western blot* con anticuerpos específicos se pudieron identificar las tres proteínas en los extractos celulares y secretomas de las células de MU y su ausencia en los melanocitos normales. Además, se pudieron identificar la catepsina D y gp100 en el suero de algunos pacientes con MU [37]. Así, podemos decir que ya hemos identificado varios biomarcadores potenciales secretados por las células MU *in vitro* que también pudieron ser identificados en el suero de los pacientes (Figura 3). En la actualidad, se están determinando estos biomarcadores en el suero y el

vítreo de una muestra estadísticamente significativa de pacientes con MU, que además están siendo correlacionados con los hallazgos en los estadios clínicos del tumor. Tenemos la esperanza de que en un futuro próximo una combinación de un grupo de biomarcadores con suficiente especificidad permitirá al oftalmólogo predecir tan sólo con una muestra de sangre qué pacientes son de alto riesgo y por lo tanto desarrollarán metástasis; de esta forma, se podrían ajustar mejor los rastreos y tratamientos con el fin de aumentar la supervivencia.

Nota de la autora:

Partes de este artículo han sido adaptadas a partir de la revisión publicada en *Expert Review of Proteomics* 4(2), 273-286 (2007) con permiso de *Expert Reviews Ltd*. "Parts of this text have been adapted from *Expert Review of Proteomics* 4(2), 273-286 (2007) with permission of *Expert Reviews Ltd*"

Agradecimientos:

A la autora le gustaría agradecer todo el apoyo aportado por la Prof. Capeans y el Servicio de Oftalmología del Complejo Hospitalario de Santiago de Compostela, y especialmente a los Dres. Piñeiro y Blanco. Mi agradecimiento al Prof. Dwek y a la Dra. Zitzmann por subvencionar y apoyar el desarrollo de este trabajo en el *Oxford Glycobiology Institute, University of Oxford*. María Pardo es Investigadora del Sistema Nacional de Salud "Miguel Servet" (Instituto de Salud Carlos III/SERGAS).

Bibliografía

- [1] Singh AD, Topham A. Survival rates with uveal melanoma in the United States: 1973-1997. *Ophthalmology* 2003;110:962-5.
- [2] Damato B. Developments in the management of uveal melanoma. *Clin Experiment Ophthalmol* 2004;32: 639-47.
- [3] Shields CL, Shields JA. Ocular melanoma: relatively rare but requiring respect. *Clin Dermatol* 2009;27:122-33.
- [4] Iwamoto S, Burrows RC, Kalina RE, George D, Boehm M, Bothwell MA, Schmidt R. Immunophenotypic differences between uveal and cutaneous melanomas. *Arch Ophthalmol* 2002;120:466-70.
- [5] Eskelin S, Pyrhonen S, Summanen P, Hahka-Kemppinen M, Kivela T. Tumor doubling times in metastatic malignant melanoma of the uvea: tumor progression before and after treatment. *Ophthalmology* 2000;107:1443-49.
- [6] Lorigan JG, Wallace S, Mavligit GM. The prevalence and location of metastases from ocular melanoma: imaging study in 110 patients. *AJR Am J Roentgenol* 1991;157:1279-81.
- [7] Mooy CM, De Jong PT. Prognostic parameters in uveal melanoma: a review. *Surv Ophthalmol* 1996;41:215-28.
- [8] McLean IW, Foster WD, Zimmerman LE. Uveal melanoma: location, size, cell type, and enucleation as risk factors in metastasis. *Hum Pathol* 1982;13:123-132.
- [9] Horsthemke B, Prescher G, Bornfeld N, Becher R. Loss of chromosome 3 alleles and multiplication of chromosome 8 alleles in uveal melanoma. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;4:217-21.
- [10] Mouriaux F, Maurage CA, Labalette P, Sablonniere B, Malecaze F, Darbon JM. Cyclin-dependent kinase inhibitory protein expression in human choroidal melanoma tumors. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2837-43.
- [11] Coupland SE, Anastassiou G, Stang A et al. The prognostic value of cyclin D1, p53, and MDM2 protein expression in uveal melanoma. *J Pathol* 2000;191:120-26.
- [12] Pardo M, Pineiro A, de la Fuente M et al. Abnormal cell cycle regulation in primary human uveal melanoma cultures. *J Cell Biochem* 2004;93:708-20.
- [13] Anastassiou G, Schilling H, Stang A, Djakovic S, Heiligenhaus A, Bornfeld N. Expression of the cell adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and NCAM in uveal melanoma: a clinicopathological study. *Oncology* 2000;58:83-88.
- [14] Madi A, Pusztahelyi T, Punyiczki M, Fesus L. The biology of the post-genomic era: the proteomics. *Acta Biol Hung*. 2003;54:1-14.
- [15] Onken MD, Worley LA, Ehlers JP, Harbour JW. Gene expression profiling in uveal melanoma reveals two molecular classes and predicts metastatic death. *Cancer Res* 2004;64:7205-9.
- [16] Landreville S, Agapova OA, Harbour JW. Emerging insights into the molecular pathogenesis of uveal melanoma. *Future Oncol* 2008;4:629-36.
- [17] Damato B, Coupland SE. Translating uveal

- melanoma cytogenetics into clinical care. *Arch Ophthalmol* 2009;127:423-9.
- [18] Haritoglou I, Wolf A, Maier T, Haritoglou C, Hein R, Schaller UC. Osteopontin and 'Melanoma Inhibitory Activity': Comparison of Two Serological Tumor Markers in Metastatic Uveal Melanoma Patients. *Ophthalmologica* 2009;223:239-43
- [19] Srinivas PR, Srivastava S, Hanash S, Wright GL Jr. Proteomics in early detection of cancer. *Clin Chem* 2001;47:1901-11.
- [20] Verrills NM. Clinical proteomics: present and future prospects. *Clin Biochem Rev* 2006;27:99-116.
- [21] Jemal A, Siegel R, Ward E et al. Cancer statistics, 2006. *CA Cancer J Clin* 2006;56:106-130.
- [22] Pardo M, Dwek RA, Zitzmann N. Proteomics in uveal melanoma research: opportunities and challenges in biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* 2007;4:273-86.
- [23] Missotten GS, Beijnen JH, Keunen JE, Bonfrer JM. Proteomics in uveal melanoma. *Melanoma Res* 2003;13:27-29.
- [24] Pardo M, Garcia A, Thomas B et al. Proteome analysis of a human uveal melanoma primary cell culture by 2-DE and MS. *Proteomics* 2005;5:4980-93.
- [25] Zuidervaart W, Hensbergen PJ, Wong MC et al. Proteomic analysis of uveal melanoma reveals novel potential markers involved in tumor progression. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47:786-93.
- [26] Pardo M, Garcia A, Thomas B et al. The characterization of the invasion phenotype of uveal melanoma tumour cells shows the presence of MUC18 and HMG-1 metastasis markers and leads to the identification of DJ-1 as a potential serum biomarker. *Int J Cancer* 2006;119:1014-22.
- [27] Shih IM. The role of CD146 (Mel-CAM) in biology and pathology. *J Pathol* 1999;189:4-11.
- [28] McGary EC, Lev DC, Bar-Eli M. Cellular adhesion pathways and metastatic potential of human melanoma. *Cancer Biol Ther* 2002;1:459-65.
- [29] Haritoglou I, Wolf A, Maier T, Haritoglou C, Hein R, Schaller UC. Isolation and characterization of the major form of human MUC18 cDNA gene and correlation of MUC18 over-expression in prostate cancer cell lines and tissues with malignant progression. *Gene* 2001;279:17-31.
- [30] Reeves R, Edberg DD, Li Y. Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Mol Cell Biol* 2001;21:575-94.
- [31] Evans A, Lennard TW, Davies BR. High-mobility group protein 1(Y): metastasis-associated or metastasis-inducing? *J Surg Oncol* 2004;88:86-99.
- [32] Nagakubo D, Taira T, Kitaura H et al. DJ-1, a novel oncogene which transforms mouse NIH3T3 cells in cooperation with ras. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;231:509-13.
- [33] MacKeigan JP, Clements CM, Lich JD, Pope RM, Hod Y, Ting JP. Proteomic profiling drug-induced apoptosis in non-small cell lung carcinoma: identification of RS/DJ-1 and RhoGDIalpha. *Cancer Res* 2003;63:6928-34.
- [34] Hod Y. Differential control of apoptosis by DJ-1 in prostate benign and cancer cells. *J Cell Biochem* 2004;92:1221-33.
- [35] Le Naour F, Misek DE, Krause MC, Deneux L, Giordano TJ, Scholl S, Hanash SM. Proteomics-based identification of RS/DJ-1 as a novel circulating tumor antigen in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2001;7:3328-35.
- [36] Govorukhina NI, Keizer-Gunnink A, van der Zee AG, de Jong S, de Bruijn HW, Bischoff R. Sample preparation of human serum for the analysis of tumor markers. Comparison of different approaches for albumin and gamma-globulin depletion. *J Chromatogr A*. 2003;1009:171-78.
- [37] Pardo M, García A, Antrobus R, Blanco MJ, Dwek RA, Zitzmann N. Biomarker discovery from uveal melanoma secretomes: identification of gp100 and cathepsin D in patient serum. *J Proteome Res* 2007;6:2802-11.
- [38] Knezevic V, Leethanakul C, Bichsel VE, Worth JM, Prabhu VV, Gutkind JS, Liotta LA, Munson PJ, Petricoin EF 3rd, Krizman DB. Proteomic profiling of the cancer microenvironment by antibody arrays. *Proteomics* 2001;1:1271-78.
- [39] Shaw MM, Riederer BM. Sample preparation for two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics* 2003;3:1408-17.
- [40] Koo TH, Lee JJ, Kim EM, Kim KW, Kim HD, Lee JH. Syntenin is overexpressed and promotes cell migration in metastatic human breast and gastric cancer cell lines. *Oncogene* 2002;21:4080-8.
- [41] Helmke BM, Polychronidis M, Benner A, Thome M, Arribas J, Deichmann M. Melanoma metastasis is associated with enhanced expression of the syntenin gene. *Oncol Rep* 2004;12:221-8.