

## ESTUDIO PROTEOMICO DIFERENCIAL ENTRE LIQUIDOS PLEURALES SECUNDARIOS A CÁNCER DE PULMÓN versus MESOTELIOMA

B. Romero Romero<sup>1</sup>, E. Arellano Orden<sup>2</sup>, V. Sánchez López<sup>2</sup>, M.D. Pastor<sup>2</sup>, C. Olmedo Rivas<sup>3</sup>, E. Márquez Martín<sup>3</sup>, J. Martín Juan<sup>3</sup>, R. Otero Candellera<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>UMQER Hospital Virgen del Rocío, Sevilla.

<sup>2</sup>Instituto de Investigación Biomédica Sevilla (IBIS).

<sup>3</sup>UMQER Hospital Virgen del Rocío, Sevilla.

<sup>4</sup>UMQER Hospital Virgen del Rocío, Instituto de Investigación Biomédica (IBIS). Sevilla.

Artículo elaborado gracias a la Beca Neumosur 7.2015

### RESUMEN

**Objetivo:** Encontrar perfiles proteicos en líquido pleural que diferencien derrames pleurales secundarios a cáncer de pulmón (CP) versus mesotelioma pleural maligno (MPM).

**Metodología:** Recogimos líquidos pleurales de 60 pacientes de tres grupos diferentes: MPM (N = 20), CP (N = 20) y derrames pleurales benignos (N = 20). Realizamos un análisis con proteómica diferencial con ITRAQ 4 plex (Applied Biosystem). Realizamos la identificación y cuantificación relativa de las proteínas con el programa Proteome Discoverer 1.4 (Termofisher Scientific). Construimos diagramas de Venn con las proteínas sobre/infra-expresadas en cada grupo. Realizamos una validación interna/externa mediante ELISA (Myobiosorce) añadiendo 25 muestras de CP y 14 de MPM.

**Resultados:** Encontramos sobreexpresión de Pi3K en los derrames pleurales neoplásicos (16,86 +/- 25,83 ng/ml en CP; 20,66 +/- 17,26 ng/ml en MPM vs 5,92 +/- 0,99 ng/ml en controles). Hubo sobreexpresión de SPRM en MPM (30.702 +/- 30.310,53 ng/ml en el grupo MPM vs 10.404 +/- 10.157,72 ng/ml en el grupo CP vs 8.498 +/- 3.437,18 ng/ml en controles). Existió sobreexpresión de RhoB en CP (4,46 +/- 1,65 mg/ml en CP vs 1,65 +/- 2,65 mg/ml en MPM vs 0,92 +/- 1,6 mg/ml en controles). También encontramos sobreexpresión de PDGFR-alfa en derrames pleurales benignos (74,12 +/- 22,57 ng/ml en controles vs 43,05 +/- 23,96 ng/ml en CP vs 36,12 +/- 21,51 ng/ml en MPM).

**Conclusión:** Existe un perfil diferencial proteico entre los derrames secundarios a CP (sobreexpresión de RhoB) y a MPM (sobreexpresión de SPRM). La sobreexpresión de Pi3K indica asociación a derrames pleurales malignos y la de PDGFR-alfa a derrames benignos.

**Palabras clave:** Proteómica, mesotelioma, Cáncer pulmón.

### DIFERENTIAL PROTEOMIC STUDY BETWEEN PLEURAL FLUID SECONDARY TO LUNG CANCER versus MESOTHELIOMA

#### ABSTRACT

**Objetivo:** Find protein profiles in pleural fluid that differentiate pleural effusions secondary to lung cancer (LC) versus malignant pleural mesothelioma (MPM).

**Metodología:** We collected pleural fluids from 60 patients from three different groups: MPM (N = 20), CP (N = 20), and benign pleural effusions (N = 20). We performed differential proteomics analysis with ITRAQ 4 plex (Applied Biosystem). We performed the identification and relative quantification of the proteins with the Proteome Discoverer 1.4 program (Termofisher Scientific). We built Venn diagrams with the over/under-expressed proteins in each group. We performed an internal/external validation using ELISA (Myobiosorce) adding 25 CP and 14 MPM samples.

**Resultados:** We found Pi3K overexpression in neoplastic pleural effusions (16.86 +/- 25.83 ng/ml in PC; 20.66 +/- 17.26 ng/ml in MPM vs 5.92 +/- 0.99 ng/ml in controls). There was overexpression of SPRM in MPM (30,702 +/- 30,310.53 ng/ml in the MPM group vs 10,404 +/- 10,157.72 ng/ml in the CP group vs 8,498 +/- 3,437.18 ng/ml in controls). There was overexpression of RhoB in CP (4.46 +/- 1.65 mg/ml in CP vs 1.65 +/- 2.65 mg/ml in MPM vs 0.92 +/- 1.6 mg/ml in controls). We also found overexpression of PDGFR-alpha in benign pleural effusions (74.12 +/- 22.57 ng/ml in controls vs 43.05 +/- 23.96 ng/ml in PC vs 36.12 +/- 21.51 ng/ml in MPM).

**Conclusión:** There is a differential protein profile between effusions secondary to CP (RhoB overexpression) and MPM (SPRM overexpression). Pi3K overexpression indicates association with malignant pleural effusions and PDGFR-alpha overexpression with benign effusions.

**Palabras clave:** Proteomics, mesothelioma, lung cancer.

### INTRODUCCION

El análisis de proteínas en diferentes fluidos biológicos constituye una de las aproximaciones diagnósticas más importantes llevadas a cabo en los laboratorios clínicos. La proteómica supone un paso adelante ya que su objetivo principal consiste en el análisis global cualitativo y cuantitativo de todas las proteínas que componen un sistema biológico definido en un momento determinado.

Tradicionalmente se emplea el suero o plasma en la determinación de estas proteínas como marcadores para el estudio de neoplasias. El líquido pleural secundario a las mismas presenta un alto contenido en proteínas procedentes de la sangre y también liberadas por el propio tumor<sup>1</sup>. Este hecho, unido a la relativa facilidad de su obtención, hace de este líquido una muestra biológica idónea para buscar nuevos marcadores tumorales para el cáncer de pulmón (CP) y el Mesotelioma Pleural Maligno (MPM)

Recibido: 09.03.2022 Aceptado: 02.05.2022

Dra. Beatriz Romero Romero.  
bearomeroromero3@gmail.com

En estudios previos, se ha demostrado que los pacientes con MPM tienen niveles elevados de ácido hialurónico<sup>2</sup>, mesotelina<sup>3</sup>, fibulina-3<sup>4,5</sup> y galectina-1<sup>6</sup> en líquido pleural, todos estos biomarcadores tienen alta especificidad, pero sólo moderada sensibilidad; por tanto, ninguno tiene suficiente poder diagnóstico como biomarcador para el MPM para su uso en la clínica de rutina<sup>7-9</sup>. Además también existen varios estudios publicados sobre el proteoma del líquido pleural en el MPM que pueden ayudar a entender la fisiopatología de esta enfermedad<sup>10-12</sup>.

El proteoma del líquido pleural en el CP no es todavía suficientemente entendido ni tampoco permite con seguridad diferenciar derrames malignos de benignos. En el líquido pleural de los pacientes con CP se han encontrado proteínas no aisladas en otros líquidos pleurales, estas proteínas aisladas están implicadas en procesos de adhesión, proteólisis y migración celular<sup>13-17</sup>.

En la práctica diaria habitual el diagnóstico diferencial entre MPM y derrame pleural secundario a CP (fundamentalmente adenocarcinoma) es muy difícil utilizando muestras de líquido pleural, siendo necesario en la mayoría de las ocasiones la utilización de técnicas más invasivas, que a veces por el performance estatus del paciente no se pueden realizar. El objetivo principal de este estudio es encontrar perfiles proteicos en líquido pleural que permitan diferenciar derrames pleurales secundarios a CP (fundamentalmente adenocarcinoma) versus MPM.

## MATERIALES Y METODO

### 1. Población a estudio:

El estudio proteómico se realizó en líquidos pleurales obtenidos de la colección de muestras criopreservadas en el biobanco del Hospital Virgen del Rocío de Sevilla con diagnóstico confirmado de MPM y cáncer de pulmón (CP). Además, se estableció un grupo control de líquidos pleurales de naturaleza no neoplásica obtenidos en la Unidad de Patología Pleural de nuestro Hospital.

Se incluyeron 3 grupos de pacientes: 20 pacientes con diagnóstico establecido de MPM, 20 pacientes con diagnóstico establecido de CP y un grupo control de 20 pacientes con derrame pleural de naturaleza no neoplásica confirmada en base al seguimiento y las pruebas complementarias realizadas y sin exposición a amianto reconocida (pacientes con insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal, hepatopatía, derrames paraneumónicos no complicados).

La validación de las proteínas seleccionadas se hizo en la cohorte empleada en el análisis de proteómica y en una cohorte externa en el que se incluyeron 39 pacientes más (14 con diagnóstico de MPM y 25 de CP).

El consentimiento informado fue firmado por todos los participantes antes de obtener las muestras.

### 2. Determinación de biomarcadores:

Para el análisis se utilizó proteómica de expresión diferencial, con el objetivo de estudiar los cambios de expresión del perfil proteico, entre un estado celular normal y patológico. Se empleó un marcaje peptídico basado en 8 etiquetas isobáricas, a nivel del extremo N-terminal del péptido, concretamente se utilizó iTRAQ de 4 plex. Este ensayo presenta las ventajas de analizar de forma simultánea hasta 4 muestras distintas en un único experimento de LC-MS/MS. También marca múltiples péptidos por proteína, mejorando la fiabilidad de la identificación y aumentando la precisión para la cuantificación y reproducibilidad. Además, admite el empleo de pools, permitiendo analizar una gran cantidad de pacientes en un único experimento. En concreto se utilizó un total de 60 muestras de líquidos pleurales procedentes de los individuos participantes en el estudio.

#### 2.1. Obtención de las muestras biológicas

Las muestras de líquido pleural extraídas de los pacientes se centrifugaron a 3.000 rpm, a 4 °C, durante 15 minutos; fueron alícuotadas y guardadas a -80 °C hasta su determinación.

#### 2.2. Depleción de proteínas

A partir de las muestras de plasma, tuvo lugar la depleción de albúmina e IgG, las cuales constituyen el 95% de todas las proteínas del plasma, mediante el kit comercial "ProteoPrep® Immunoaffinity Albumin and IgG Depletion Kit" (Sigma-Aldrich, EE. UU.) siguiendo el protocolo del fabricante. Continuando con los pasos establecidos en el kit anteriormente mencionado, se consiguió la separación de las proteínas minoritarias, que son de especial interés para nuestro estudio. Estos experimentos se realizaron para los 3 pools. Posteriormente, se midieron las concentraciones de proteínas totales de las muestras. Las determinaciones se realizaron por medio del método Bradford y la absorbancia se midió a 595 nm en espectrofotómetro (Tecan).

#### 2.3. Preparación de muestras previo al marcaje isobárico

Por medio de este procedimiento, se pudieron obtener péptidos de entre siete y veintiún aminoácidos.

Los lisados de proteínas se procesaron mediante el protocolo FASP DIGESTION, usando filtros Millipore Microcon 30K (Merck, Darmstadt, Alemania). Se pusieron alícuotas que contenían un máximo de 110 µg de lisado de proteína en cada filtro. A continuación, las proteínas se redujeron mediante la adición de solución TCEP a una concentración final de 15 mM, permitiendo la ruptura de los puentes disulfuro. Este procedimiento se complementó con la alquilación de proteínas en yodoacetamida (IAA) preparado en Urea a una concentración final de 30 mM.

Las muestras fueron incubadas en oscuridad, en Thermomixer a 300 rpm, a 25 °C durante una hora. Finalmente fueron almacenadas a -20 °C, hasta la continuación del procedimiento.

Se acondicionaron filtros Millipore Microcon 30K por medio de tres lavados con 50 µL de Urea 8M en Tris/HCl 100 mM, pH 8,0; alternados con centrifugaciones a 15 °C, a 11.000 x g durante 3 minutos, para seguidamente añadir la muestra con 200 µL de Urea 8M en Tris/HCl 100 mM, pH 8,0; en la unidad de ultrafiltración y centrifugar nuevamente a 25 °C, a 12.000 x g durante 10 minutos. Este procedimiento, donde los eluidos fueron descartados, se repitió dos veces. En cada filtro, se pipeteó 50 µL de la endoproteinasa LysC disuelta en Urea 2M en Tris/HCl 100 mM, pH 8,0; a una relación de enzima a proteína de 1:50. Tras una incubación a temperatura ambiente durante la noche, se procedió a una nueva centrifugación a 20 °C, a 11.000 x g, durante 10 minutos.

Posteriormente, se lleva a cabo la segunda digestión a partir de 150 µL de la endoproteinasa Tripsina porcina (Promega, Fitchburg, WI, EE. UU.) disuelta en Tris/HCl 0,05M; a una relación de enzima a proteína 1:100. A continuación, los filtros fueron incubados a 37 °C, durante 5 horas en Thermomixer a 300 rpm. Los péptidos liberados se recogieron por centrifugación a 12.000 x g durante 15 minutos, finalmente se almacenaron a -80 °C para una posterior medida de péptidos en NanoDrop. Una vez igualada la concentración, se volvieron a medir los péptidos en NanoDrop.

#### 2.4. Marcaje con reactivos de iTRAQ

Los péptidos fueron resuspendidos en 15 µL de H<sub>2</sub>O y 15 µL de TEAB 1 M hasta su total disolución. Los viales de reactivos con los marcadores isobáricos procedentes del kit iTRAQ® Reagent - 4PLEX Multiplex, se dejaron a temperatura ambiente. Se agregaron 50 µL de isopropanol a cada uno de los reactivos del kit y se agitó mediante spin.

Se agregó un marcador isobárico diferente a cada pool del estudio. Las muestras y los reactivos se mezclaron e incubaron durante 2 horas a 25 °C en Thermomixer a 450 rpm. La reacción fue parada mediante secado en Speed-Vac y cada muestra fue resuspendida en 200 µL de TFA al 1%. A continuación, se recogieron 2 µL de cada muestra y se mezclaron en un mismo Eppendorf para chequear el marcaje. El mismo procedimiento fue repetido para los dos pools restantes.

#### 2.5. Preparación de muestras previo al análisis por LC MS/MS

Una vez comprobado el marcaje, se combinaron las ocho muestras resuspendidas en 200 µL de TFA al 1%, y se secaron en Speed-Vac. A continuación, para desalar las muestras, la fracción seca de los péptidos marcados fue resuspendida en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%, y se cargó en cartuchos Oasis HLB C18 (Waters, 30 µm, 1cc, 10mg). La muestra se eluyó en 600 µL de 50% ACN/TFA 0,5% y en 600 µL de 100% ACN/TFA 0,5%. Finalmente se liofilizó utilizando Speed-Vac.

Posteriormente, la mezcla secada, con el contenido peptídico de interés para el estudio, se prefractionó por cromatografía de intercambio catiónico fuerte (SCX) usando columnas MCX Oasis (Waters, 30 µm, 1cc, 30mg). La muestra fue disuelta en 1 ml de Formiato amónico 5 mM en 0,025% TFA y se cargó. Los péptidos se eluyeron con un gradiente lineal de 50mM-2M en Formiato de Amonio/50% ACN/0,025% TFA, con fracciones recogidas tras centrifugaciones consecutivas a 400 rpm, a temperatura ambiente, en intervalos de 1 minuto. Seguidamente, las fracciones fueron secadas en Speed-Vac.

Por último, para la eliminación del exceso de residuos, las diferentes fracciones obtenidas fueron lavadas con ácido trifluoroacético (TFA) al 0,5% en cartuchos Oasis HLB C18 (Waters), siguiendo el mismo procedimiento de cromatografía reversa anteriormente descrito.

#### 2.6. Análisis por LC-MSMS

Los péptidos de cada una de las fracciones fueron separados utilizando nanocromatografía líquida y analizados por Electrospray (nano LC-MS/MS). El experimento se llevó a cabo en un sistema nano HPLC de Thermo (nano LC 1000) acoplado on-line a un espectrómetro de masas Q Exactive Plus Orbitrap (Thermo Electron, Germany) equipado con una fuente de ionización nanospray (Proxeon Biosystems, Odense, Denmark). Se cargaron 13 µL de cada fracción y los péptidos fueron pre-concentrados y lavados en una pre-columna C 75 µm x 2 cm, nanoViper, C18, 3 µm, 100 Å (Acclaim PepMap 100).

Posteriormente separados en una columna analítica (50  $\mu\text{m}$  x 15 cm, nanoViper, C18, 2  $\mu\text{m}$ , 100 Å (Acclaim PepMap RSLC)) (Thermo Fisher Scientific), durante 15 minutos a una velocidad de flujo de 200 nl/min.

Se utilizaron, como buffer A, 0,1% de ácido fórmico 100% de H<sub>2</sub>O y como buffer B, 0,1% de fórmico en ACN 100%, ambos calidad LC/MS. El gradiente utilizado fue el siguiente: 0 - 220 min 0 - 35% de Buffer B, 220 - 230 min 35 - 45% de Buffer B y 230 - 240 min 45 - 95% de Buffer B. El Q Exactive Plus Orbitrap operó en modo de ionización positivo y "data-dependent". Se realizó el barrido MS en el Orbitrap entre 200 y 1800m/z con una resolución de 70.000 FWHM para un m/z igual a 100. Se seleccionaron hasta 15 precursores de los más intensos, con carga mayor o igual a 2, y se incorporaron en una lista de exclusión durante 60 segundos. La identificación y cuantificación de péptidos se realiza teniendo en cuenta los espectros HCD. La fragmentación HCD se llevó a cabo con Energía de colisión del 32% para maximizar la abundancia de los iones "reporter" o etiquetados de iTRAQ.

### 2.7. Análisis de expresión diferencial:

Todos los datos obtenidos (raw data files), fueron procesados utilizando el programa proteome discovered 1.4 (Thermo), donde se utilizan bases de datos de Uniprot y MASCOT como motor de búsqueda. Las proteínas identificadas se seleccionaron en base a que presentaran una probabilidad > 95%, y un FDR > 0,05. Los datos obtenidos fueron normalizados utilizando el valor absoluto de log<sub>2</sub> entre casos y controles.

El primer análisis consistió en obtener un clúster jerárquico no supervisado con el fin de observar como se agregan las diferentes muestras analizadas atendiendo a su patrón de expresión proteómica, para ello se utilizó el software Babelomics 4.1. Paralelamente se hizo un análisis de componentes principales (PCA), para ver por un lado la variabilidad en el conjunto de datos, y por otra ordenar los componentes por su importancia. Conjuntamente se hizo un diagrama de Venn para ver que proteínas eran comunes entre los grupos y cuales diferentes. Con el segundo análisis, se identificaron eventos asociados a los diferentes tipos de cáncer, así como las rutas metabólicas implicadas en este proceso (para ello se utilizaron los softwares *Ingenuity Pathways analysis*, *DAVID Functional Annotation Bioinformatics*).

### 3. Validación de biomarcadores

La validación se hizo en la cohorte empleada en el análisis de proteómica y en una cohorte externa tal como hemos indicado previamente.

Los biomarcadores diferenciales entre los distintos grupos se validaron mediante ELISA (Myobiosource) en cada una de las muestras de la población.

### 4. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa IBM SPSS Statistics (IBM Corporation, Armonk, NY), versión 26.0. En primer lugar, se realizó una estadística bivalente descriptiva de los rasgos basales de los pacientes para ver si había diferencias entre ambos grupos. Las variables cualitativas se muestran con las frecuencias absolutas y relativas observadas de las categorías. Las variables continuas se describen con la media y la desviación estándar. La comparación entre ambos grupos se realizó empleando la prueba de la Chi-cuadrado (o test exacto de Fisher) para las variables categóricas y con la prueba de la t de Student para datos independientes previa verificación de la homogeneidad de las varianzas con el test de Levene (en caso de requerir pruebas no paramétricas usamos el test de Mann-Whitney). Los datos cuantitativos se evaluaron mediante la técnica de Kolmogorov - Smirnov para determinar si seguían una distribución normal (si  $p > 0,05$ ). Para estudiar las diferencias entre los tres grupos realizamos el análisis de la varianza de una vía (ANOVA), previa verificación de la normalidad de los grupos y la homocedasticidad (prueba de Levene).

## RESULTADOS

Para el análisis proteómico, analizamos líquidos pleurales de 60 pacientes con derrame pleural diferenciados en tres grupos: 1) Derrames pleurales secundarios a MPM (N = 20); 2) Derrames pleurales secundarios a CP (N = 20); 3) Derrames pleurales benignos (N = 20) de los cuales 10 fueron insuficiencias cardíacas, 5 hepatopatías y 5 derrames pleurales paraneumónicos no complicados. Posteriormente, la validación de las proteínas seleccionadas se hizo en la cohorte empleada en el análisis de proteómica y en una cohorte externa en el que se incluyeron 39 pacientes más (14 con diagnóstico de MPM y 25 de CP).

Los pacientes de los tres grupos estudiados no presentaban diferencias en cuanto a edad y sexo. La edad en el grupo con diagnóstico de MPM fue de 66 +/- 9,8 años vs 64,5 +/- 9,8 en el grupo con diagnóstico de CP vs 71,6 +/- 9,6 en el grupo control, siendo las diferencias no significativas entre los 3 grupos ( $p > 0,05$ ). Los resultados están expresados en media +/- SD. En el grupo con diagnóstico de MPM había 7 mujeres y 13 hombres, en el grupo con diagnóstico de CP había 8 mujeres y 12 hombres, en el grupo control había 9 mujeres y 11 hombres; siendo las diferencias no significativas entre los 3 grupos ( $p > 0,05$ ).

En los líquidos pleurales, obtuvimos 1.450 proteínas que se encontraban sobre o infra-expresadas en el líquido pleural de pacientes con CP y/o MPM, comparados con el grupo control. Tal como indicamos en la metodología mediante un diagrama de Venn determinamos las proteínas infra o sobre-expresadas exclusivas para cada grupo (figura 1). Con los genes sobre-expresados o infra-expresados en cada uno de los grupos hicimos un análisis para explorar las redes de interacción proteica y su conexión con los hallmarks del cáncer, y de esta forma seleccionamos las proteínas que creíamos implicadas en las principales rutas metabólicas.

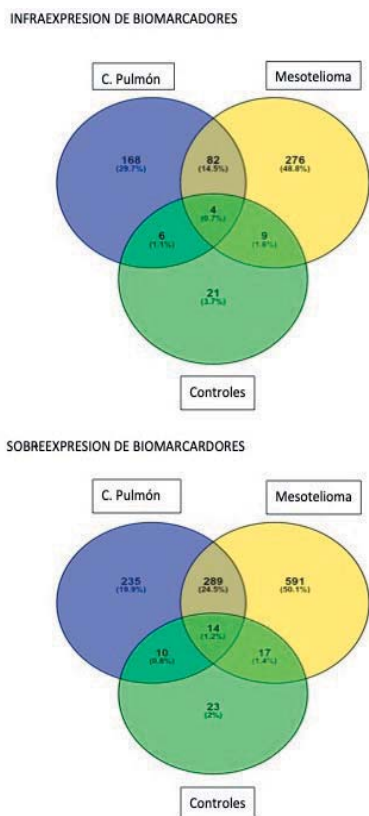


Figura 1: Diagramas de Venn con las proteína infra o sobre-expresadas exclusivas para cada grupo.

Posteriormente realizamos una validación tanto interna como externa de estos resultados mediante ELISA, obteniendo los siguientes resultados:

Existe sobreexpresión de Pi3K en los derrames pleurales neoplásicos respecto a los controles (16,86 +/- 25,83 ng/ml en CP; 20,66 +/- 17,26 ng/ml en MPM vs 5,92 +/- 0,99 ng/ml en controles) siendo la diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo con MPM con  $p < 0,001$ . Al comparar el grupo de CP y el de MPM la diferencia también es significativa con  $p = 0,01$ , sin embargo, no encontramos diferencia significativa al comparar el grupo control con el grupo CP con  $p > 0,05$ .

Los resultados están expresados en mediana +/- SD (figura 2).

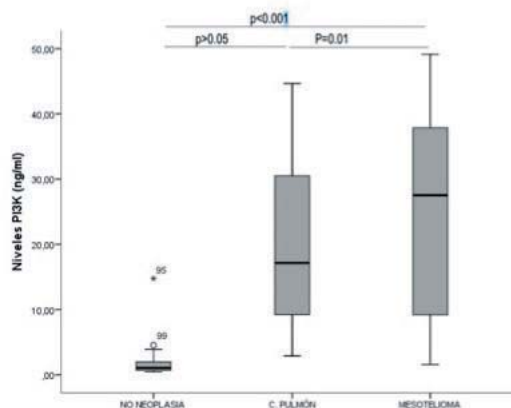


Figura 2: Diferencias de los niveles de Pi3k (ng/ml) líquido pleural entre los diferentes grupos.

Existe sobreexpresión de SPRM en los derrames pleurales secundarios MPM (30.702 +/- 30.310,53 ng/ml en el grupo MPM vs 10.404 +/- 10.157,72 ng/ml en el grupo CP vs 8.498 +/- 3.437,18 ng/ml en el grupo control) siendo la diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo MPM con  $p < 0,001$ , y también entre el grupo CP y el grupo MPM con  $p = 0,011$ , no encontrando diferencias significativas entre el grupo control y el grupo CP con  $p > 0,05$ . Los resultados están expresados en mediana +/- SD. (figura 3).

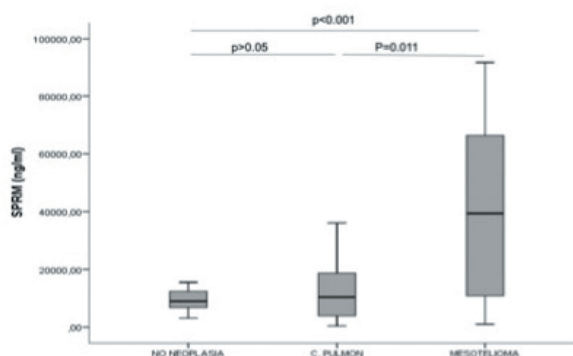
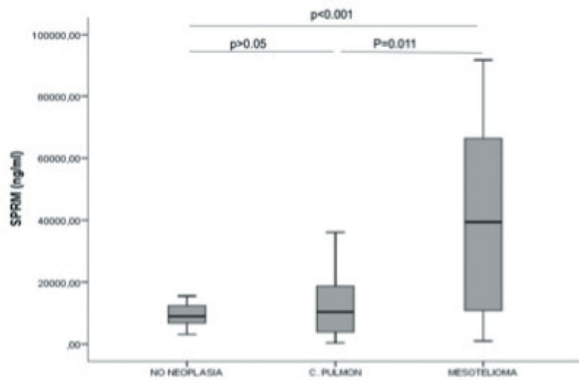


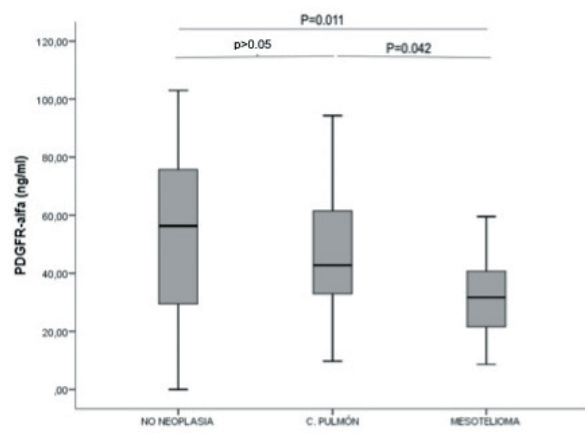
Figura 3: Diferencias en los niveles de SPRM (ng/ml) en líquido pleural entre los diferentes grupos.

Existe sobreexpresión de RhoB en los derrames pleurales secundarios a CP (4,46 +/- 1,65 mg/ml en CP vs 1,65 +/- 2,65 mg/ml en MPM vs 0,92 +/- 1,6 mg/ml en controles) siendo la diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo CP con una  $p < 0,001$ , no encontrando diferencias significativas entre el grupo control y el grupo MPM con  $p > 0,05$ , y entre el grupo MPM y el grupo CP con  $p = 0,07$ . Los resultados están expresados en mediana +/- SD (figura 4).



**Figura 4:** Diferencias en los niveles de RHOB (ng/ml) en líquido pleural entre los diferentes grupos.

Existe sobreexpresión de PDGFR-alfa en los derrames pleurales benignos fundamentalmente respecto a los derrames pleurales secundarios a MPM (74,12 +/- 22,57 ng/ml en controles vs 43,05 +/- 23,96 ng/ml en CP vs 36,12 +/- 21,51 ng/ml en MPM) siendo la diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo con MPM con  $p = 0,001$ , entre el grupo con MPM y el grupo control con  $p = 0,042$ , siendo la diferencia no significativa entre el grupo control y el grupo con CP ( $p > 0,05$ ). Los resultados están expresados en mediana +/- SD (figura 5).



**Figura 5:** Diferencias en los niveles de PDGFR- alfa (ng/ml) en los diferentes grupos.

## DISCUSION

Este trabajo fue diseñado para ver si existían biomarcadores en líquido pleural que permitieran en primer lugar el diagnóstico diferencial entre derrame maligno y benigno; y posteriormente, entre derrame pleural secundario a CP y MPM.

En nuestro estudio encontramos que los derrames pleurales malignos presentan niveles elevados de Pi3K respecto a los controles, siendo estos niveles más elevados de forma significativa en los derrames secundarios a mesotelioma. Existen trabajos que demuestran los niveles elevados de Pi3K en diferentes tipos de cáncer (incluido el cáncer de pulmón). Se ha demostrado que la vía Pi3K/AKT/mTOR está implicada en procesos como la oncogénesis, la proliferación, el crecimiento, la apoptosis, la invasión, la metástasis, la transición epitelio-mesénquima, regulación de la respuesta inmunitaria y también la resistencia de las células tumorales a los fármacos<sup>18, 19</sup>. El hallazgo de niveles elevados de Pi3K en los derrames pleurales malignos de nuestro estudio en comparación con los controles, se puede explicar por esa implicación en los procesos biológicos relacionados con el cáncer. El hecho de que estos niveles estén más elevados en los derrames pleurales secundarios a mesotelioma es algo que tenemos que investigar en estudios futuros; una explicación puede ser que en la patogenia de estos derrames el proceso de transición epitelio mesénquima juega un papel fundamental, estando la vía Pi3K/AKT/mTOR especialmente involucrada en este proceso<sup>20, 21</sup>.

Los niveles de RhoB están elevados en los derrames pleurales malignos secundarios a cáncer de pulmón de forma significativa respecto a los controles. Se ha demostrado que la proteína RhoB está involucrada en procesos de oncogénesis, invasión y metástasis<sup>22</sup>. Pensamos que ésta puede ser la explicación del hallazgo de niveles más elevados de esta proteína en el derrame pleural de pacientes con cáncer de pulmón en este estudio. Los derrames pleurales secundarios a mesotelioma también presentan niveles elevados de esta proteína, pero en menor medida que en el cáncer de pulmón, este hallazgo debe ser confirmado en estudios posteriores, pero podría explicarse por las diferentes rutas metabólicas implicadas en la génesis del cáncer de pulmón y el mesotelioma.

En estudios preliminares ya se habla del hallazgo de niveles elevados de SPRM en líquido pleural y sangre de pacientes con mesotelioma pleural maligno, presentando este hallazgo una alta especificidad con moderada sensibilidad<sup>3, 7, 8</sup>. El hallazgo de niveles elevados de SPRM en el líquido pleural de los pacientes con mesotelioma está en concordancia con lo publicado previamente.

Uno de nuestros hallazgos es que los derrames pleurales etiquetados como controles presentan niveles elevados de PDGFR-alfa respecto a los derrames malignos.

El PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas) juega un rol significativo fundamentalmente en la angiogénesis, que implica el crecimiento de vasos a partir de tejido vascular existente.

Se ha relacionado con algunas enfermedades como la arterioesclerosis, procesos de fibrosis, procesos inflamatorios y también con neoplasias. Los controles en este estudio eran pacientes con insuficiencia cardiaca, insuficiencia renal, hepatopatía y derrames paraneumónicos no complicados. Se han descrito niveles elevados de PDFGR en estas patologías, lo que puede justificar nuestro hallazgo. Son necesarios más estudios para determinar si existe una cifra determinada a partir de la cual pudiéramos diferenciar la sobreexpresión en procesos benignos y en neoplasias.

La principal limitación de este estudio a la hora de obtener conclusiones es que los resultados que presentamos son resultados preliminares que tienen que ser validados con una cohorte externa más amplia de pacientes que incluya líquido pleural de controles, además de los grupos con derrame pleural secundario a MPM y CP. Esta validación ya se está realizando en nuestro laboratorio. Otra potencial limitación es si estos líquidos pleurales obtenidos del biobanco de nuestro hospital son líquidos aptos para la determinación de estas proteínas: previamente a la determinación de éstas, se realizó un estudio de viabilidad de los líquidos en nuestro laboratorio y se demostró que las muestras empleadas eran todas viables.

Pensamos que la determinación aislada de alguno de estos biomarcadores en líquido pleural no va a aportar más a lo publicado previamente. La utilización de una combinación de diferentes biomarcadores en líquido pleural (Pi3K, SPRM, RHOB y PDGFRA según nuestros resultados preliminares) puede facilitar el diagnóstico diferencial de forma precoz en los pacientes con sospecha de derrame pleural neoplásico, orientando las pruebas complementarias a realizar posteriormente. Esta hipótesis tendremos que demostrarla en estudios futuros en pacientes con derrame pleural secundario a cáncer de pulmón y mesotelioma, estableciendo también un grupo control con patología benigna.

## BIBLIOGRAFÍA

- Jantz MA, Antony VB. Pathophysiology of the pleura. *Respiration; international review of thoracic diseases* 2008; 75 (2): 121 – 133.
- Creaney J, Dick IM, Segal A et al. Pleural effusion hyaluronic acid as a prognostic marker in pleural malignant mesothelioma. *Lung cancer*. Dec 2013; 82(3): 491-498.
- Creaney J, Segal A, Olsen N et al. Pleural fluid mesothelin as an adjunct to diagnosis of pleural malignant mesothelioma. *Disease markers*, 2014; 2014: 413946.
- Battolla E, Canessa PA, Ferro P et al. Comparison of the Diagnostic Performance of Fibulin-3 and Mesothelin in Patients with Pleural Effusions from Malignant Mesothelioma. *Anticancer research*. Mar 2017; 37(3): 1.387-91.
- Pass HI, Levin SM, Harbut MR et al. Fibulin-3 as a blood and effusion biomarker for pleural mesothelioma. *The New England Journal of Medicine*. Oct 11, 2012; 367(15): 1417 – 1427.
- Mundt F, Johansson HJ, Forshed J et al. Proteome screening of pleural effusions identifies galectin 1 as a diagnostic biomarker and highlights several prognostic biomarkers for malignant mesothelioma. *Mol Cell Proteomics*. 2014 Mar; 13 (3): 701 – 715.
- Gillezeau CN, Van Gerwen M, Ramos J et al. Biomarkers for malignant pleural mesothelioma: a meta-analysis. *Carcinogenesis*. Nov 25, 2019; 40(11): 1.320-31.
- Panou V, Vyberg M, Weinreich UM et al. The established and future biomarkers of malignant pleural mesothelioma. *Cancer Treatment reviews* Jun 2015; 41(6): 486 – 495.
- Paleari L, Rotolo N, Imperatori A et al. Osteopontin is not a specific marker in malignant pleural mesothelioma. *The International Journal of Biological Markers*. Apr-Jun 2009; 24(2): 112-117.
- Karunakaran KB, Yanamala N, Boyce G et al. Malignant Pleural Mesothelioma Interactome with 364 Novel Protein-Protein Interactions. *Cancers (Basel)* 2021 Apr; 13 (7); 1.660.
- Johnson BW, Takahashi K, Cheng YY. Preclinical Models and Resources to Facilitate Basic Science Research on Malignant Mesothelioma- A Review. *Front Oncol*. 2021; 11: 748444.
- Lacerena S, Ciregia F, Giusti L et al. Putative Biomarkers for Malignant Pleural Mesothelioma by Proteomic Analysis of Cell Secretome. *Cancer Genomics Proteomics*. 2020; 17(3): 225-236
- Li Y, Lian H, Jia Q et al. Proteome screening of pleural effusions identifies IL1A as a diagnostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Biochemical and biophysical research communications*. Feb 6 2015; 457(2): 177-182.
- Liu L, Teng J, Zhnag L, Peishan C et al. The Combination of the Tumor Markers Suggests the Histological Diagnosis of Lung Cancer. *BioMed research international*. 2017; 2017: 2013989.
- Okamura K, Takayama K, Izumi M et al. Diagnostic value of CEA and CYFRA 21 - 1 tumor markers in primary lung cancer. *Lung Cancer*. Apr 2013; 80(1): 45-49.
- Cheung CHY, Juan H-F. Quantitative proteomics in lung cancer. *J Biomed Sci* 2017; 24: 37.
- Marrugal A, Ojeda L, Paz-Ares L et al. Proteomic-Based Approaches for the Study of Cytokines in Lung Cancer. *Dis Markers* 2016; 2016: 2138627.
- Mishra R, Patel H, Alanazi S. Pi3K inhibitors in cancer: Clinical implications and adverse effects. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr; 22(8): 3.464.
- Jiang N, Dai Q, Su X et al. Role of Pi3K/AKT pathway in cancer: the framework of malignant behavior. *Mol Biol Rep*. 2020; 47(6): 4.587-4.629.
- Hiltbrunner S, Mannarino L, Kirschner MB et al. Tumor Immune Microenvironment and Genetic Alterations in Mesothelioma. *Front Oncol*. 2021; 11: 660039.
- Obacz J, Yung H, Shamseddin M et al. Biological basis for novel mesothelioma therapies. *Br J Cancer*. 2021 Oct 12; 125(8): 1.039 – 55.
- Ju JA, Gilkes DM. RhoB: Team Oncogene or Team Tumor Suppressor?. *Genes (Basel)* 2018 Feb; 9(2): 67.