

029272

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

MAXI HOSPITAL DE ESPECIALIDADES

DIRECCION DE EDUCACION E INVESTIGACION EN SALUD



IDENTIFICACION DE PEPTIDOS OBTENIDOS DE LIQUIDO DE ASCITOS  
DE PACIENTES CON NEOPLASIAS MALIGNAS, CON ACTIVIDAD  
INHIBITORIA DE LA PRODUCCION DE OXIDO NITRICO  
EN FAGOCITOS HUMANOS, POSIBLES CANDIDATOS PARA LA  
ELABORACION DE UN BIOMARCADOR TUMORAL

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE  
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA

DR. JAVIER TRISTAN GALVAN

DIRECTORES DE TESIS:

DR. GERARDO DEL CARMEN PALACIOS SAUCEDO  
DR. CARLOS ALBERTO VAZQUEZ MARTINEZ  
DRA. REBECA PALACIOS CORONA

MONTERREY, NUEVO LEON

2007

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SAN LUIS POTOSÍ**  
**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**U.M.A.E. HOSPITAL DE ESPECIALIDADES No. 25**  
**DIRECCIÓN DE EDUCACION E INVESTIGACIÓN EN SALUD**



IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDOS OBTENIDOS DE LÍQUIDO DE ASCITIS DE  
PACIENTES CON NEOPLASIAS MALIGNAS, CON ACTIVIDAD INHIBITORIA  
DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO EN FAGOCITOS HUMANOS,  
POSIBLES CANDIDATOS PARA LA ELABORACIÓN DE UN BIOMARCADOR  
TUMORAL.

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN  
MEDICINA INTERNA

PRESENTA:  
DR. JAVIER TRISTÁN GALVÁN

DIRECTORES DE TESIS:

DR. GERARDO DEL CARMEN PALACIOS SAUCEDO  
DR. CARLOS ALBERTO VÁZQUEZ MARTÍNEZ  
DRA. REBECA PALACIOS CORONA

MONTERREY, N.L.

DICIEMBRE 2008



Ganador del Premio IMSS  
De Calidad  
2005

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DIRECCION DE PRESTACIONES MEDICAS  
UNIDAD DE ATENCION MEDICA  
COORDINACION DE UMAES  
UMAE HOSPITAL DE ESPECIALIDADES No. 25, CMN Noreste  
DIRECCION EDUCACION E INVESTIGACION EN SALUD

Monterrey, Nuevo León, a 14 de Julio de 2008.

**Dr. Gerardo del Carmen Palacios Saucedo.**  
**Investigador responsable**  
**Presente**

En mi carácter de Director General de la UMAE Hospital de Especialidades No. 25 doy mi autorización para que el estudio: **“Caracterización parcial y purificación de la actividad inmunosupresora del líquido de ascitis y pleural de pacientes con neoplasias primarias mediante la inhibición de la producción de Óxido Nítrico en Células Mononucleares de sangre periférica”**, protocolo ya autorizado por el CLIS 1908 del Centro de Investigación Biomédica del Noreste (CIBIN) con el No. R-2008-1908-2, y que se propone como protocolo de tesis de un residente de Medicina Interna, sea realizado en colaboración con el CIBIN bajo su conducción como investigador local principal, siendo responsable de conducir dicho estudio de acuerdo a los lineamientos éticos internos, así como aquellos de las Buenas Prácticas Clínicas Internacionales y la Legislación Sanitaria vigente en México. Se le entregan los documentos que presentó a este comité, en la inteligencia de que quedan bajo su resguardo y que deberán estar disponibles en cualquier momento que el CLIS o la División de Investigación en Salud se lo requieran durante al menos cinco años.

Quisiera hacer mención de que esta institución cuenta con la infraestructura necesaria, así como con recursos humanos capacitados para la realización del estudio.

Atentamente  
“Seguridad y Solidaridad Social”

**Dr. Virgilio J. Lozano Leal**  
**Director General**

DR'CAVM/mltd



**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS  
Unidad de Educación, Investigación y Políticas de Salud  
Coordinación de Investigación en Salud

**Dictamen de Autorizado**

COMITÉ LOCAL DE INVESTIGACIÓN EN SALUD 1908

FECHA 18/01/2008

**Estimado Dr. (a).**

Rebeca Palacios Corona

**PRESENTE**

Tengo el agrado de notificarle que, el protocolo de investigación en salud presentado por usted, cuyo título es:

**Caracterización parcial y purificación de la actividad inmunosupresora del líquido de ascitis y pleural de pacientes con neoplasias primarias mediante la inhibición de la producción de Óxido Nítrico en Células Mononucleares de Sangre Periférica.**

fue sometido a consideración del Comité Local de Investigación en Salud, quien de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores consideraron que cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética médica y de investigación vigentes, por lo que el dictamen emitido fue de: **A U T O R I Z A D O**.

Habiéndose asignado el siguiente número de registro institucional:

<b>No. de Registro</b>
<b>R-2008-1908-2</b>

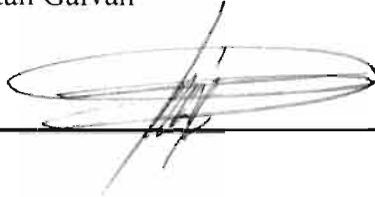
En consecuencia, solicito a usted que una vez recibido el dictamen de autorización de los CLIS antes señalados, notifique a este Comité, el número de registro asignado.

Atentamente

*Dr(a). Salvador Luis Sant Ferrnandez*  
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud Núm 1908

# APROBACIÓN DE TESIS

Tesista: Dr. Javier Tristán Galván



---

Director Interno: Dr. Gerardo del Carmen Palacios Saucedo, Jefe de División de Investigación.



---

Dra. Rosa María Elizondo Zapién, Jefe de División de Educación en Salud.



---

Director Interno: Dr. Carlos Alberto Vázquez Martínez, Director de Educación e Investigación en Salud.



---

Director Externo: Dra. Rebeca Palacios Corona, Investigador Asociado B.



---

## INDICE

- RESUMEN página 7
- ANTECEDENTES página 9
- JUSTIFICACION página 28
- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA página 29
- PREGUNTA DE INVESTIGACION página 30
- OBJETIVOS página 31
- MATERIAL Y METODOS página 32
- DESCRIPCION GENERAL DEL ESTUDIO página 33
- RESULTADOS página 44
- DISCUSION Y CONCLUSIONES página 48
- ANEXOS
  - APENDICE A página 53
  - TABLAS Y GRAFICAS página 56
- BIBLIOGRAFIA página 63

## RESUMEN

**TITULO DEL PROYECTO:** Identificación de péptidos obtenidos de líquido de ascitis de pacientes con neoplasias malignas, con actividad inhibitoria de la producción de Óxido Nítrico en Fagocitos Humanos, posibles candidatos para la elaboración de un biomarcador tumoral.

**ANTECEDENTES:** Las células tumorales producen factores que abaten la respuesta inmune; un mecanismo antineoplásico es la producción de óxido nítrico por los fagocitos humanos. La Espectrometría de Masas es una técnica utilizada para caracterizar los cambios en el proteoma; esta herramienta ha llevado al descubrimiento de nuevos biomarcadores.

**OBJETIVO GENERAL:** Identificar por Espectrometría de Masas el o los péptidos responsables de la inmunosupresión en el líquido de ascitis de pacientes con neoplasias malignas.

**MATERIAL Y MÉTODOS:** En 18 muestras de líquido de ascitis de pacientes con cáncer y con actividad inmunosupresora demostrada, se realizó la purificación parcial de las muestras y se obtuvieron las secuencias utilizando la técnica de HPLC acoplada a Espectrometría de Masas (LC-ESI-MS/MS). Se realizó el análisis con las bases de datos Swissprot-MASCOT y Protein-BLAST del NCBI.

**RESULTADOS:** Identificamos 656 péptidos, catalogando como péptidos confiables sólo 341. Se encontraron 22 péptidos altamente confiables, repetidos en diferentes tipos de neoplasias. Se obtuvieron alineaciones con proteínas relacionadas con los mecanismos de progresión tumoral y metástasis.

**CONCLUSIÓN:** Se identificaron péptidos con similitudes estructurales entre los diferentes tipos de neoplasias con actividad inhibitoria de la producción de Óxido Nítrico mediante Espectrometría de Masas. Con estos resultados se pretende analizar posteriormente la relevancia de los péptidos obtenidos para la elaboración de un biomarcador tumoral.

**PALABRAS CLAVE:** Fagocitos Humanos, Óxido Nítrico, Neoplasias, Actividad Inmunosupresora, Biomarcador tumoral.

## ANTECEDENTES

### *Identificación y Caracterización de los factores inmunosupresores de origen tumoral*

Varios grupos de investigadores han identificado diversos factores con actividad inmunosupresora. Actualmente con ayuda del análisis proteómico, por medio de nuevas tecnologías entre ellas, la Identificación y caracterización por Espectrometría de Masas, que pueden ser aplicadas a tejidos y líquidos corporales a fin de extraer importante información biológica, que ayuda a médicos y científicos para el entendimiento de la dinámica biológica y de sus sistemas de interés, tal y como lo es en el paciente con cáncer (Verma M, 2001). La aplicación de las tecnologías proteómicas beneficia a la comunidad oncológica en diversas áreas relacionadas al descubrimiento de biomarcadores y en tratamiento: Tamizaje serológico y análisis de tejidos para la detección temprana de malignidad, así como mapeo de las vías de señalización molecular para implementar intervenciones terapéuticas fármaco-proteómicas (Posadas E, Kohn E, et al 2005).

Uno de los primeros en identificar factores con actividad inmunosupresora fue Horikawa quien en 1969 aisló y purificó una glicoproteína (glicoproteína ácida alfa-1) a partir del fluido ascítico de pacientes con cáncer de estómago; dicha glicoproteína fue caracterizada en el año de 1970 la cual tiene un peso molecular de 44 kDa (Horikawa M et al, 1969; Hotta K, 1970; Lee SY, et al, 2001.). Posteriormente en el año 2003, Bruno R y col, se propusieron identificar marcadores de sobrevivencia en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas, los cuales estaban bajo tratamiento con Docetaxel, en base

a los resultados de este estudio es posible considerar a la glicoproteína ácida alfa-1 como un marcador independiente de la respuesta al tratamiento con Docetaxel y aun más importante, como un factor de sobrevivencia en pacientes con cáncer de pulmón de células no pequeñas (Bruno R et al, 2003.).

En 1975, Bole y col, realizaron el aislamiento y caracterización de una glicoproteína con un peso de 48.5 kDa y un pl de 5.3, proveniente de granulomas la cual inhibía la fagocitosis *in vitro* de macrófagos peritoneales (Bole GG Jr et al, 1975.); en un estudio similar en 1981, una proteína ácida de 50 kDa de peso y un pl de 3.0 aislada a partir de fluidos ascíticos de pacientes con cáncer mostró tener un efecto inmunosupresor ya que se encontró en un ensayo *in vitro* que suprime la inducción de la formación de linfoblastos por la fitohemaglutinina (PHA, por sus siglas en inglés Phitohemaglutinine) (Tamura K. et al. 1981.).

Miyata H y su grupo identificaron un factor de origen tumoral, en ratones portadores de un fibrosarcoma informando que es liberado a la circulación, lo que hace al animal susceptible a ser infectado experimentalmente con *Listeria monocytogenes* (Miyata H et al, 1981.). También se ha informado que el sobrenadante de cultivos de células tumorales desactiva a los macrófagos inhibiendo la actividad antitoxoplasmal y antileishmanial así como el metabolismo oxidativo de macrófagos, en condiciones *in vitro* (Szuro-Sudol A et al, 1983.).

Fujii y su equipo purificaron y caracterizaron una glicoproteína de 52 kDa a partir de fluido ascítico de pacientes con cáncer gastrointestinal; a la cual llamaron IS (por sus siglas en inglés Immunosuppressive Substance) y que mostró tener una actividad inmunosupresora mayor a la registrada en ensayos *in vivo* e *in vitro* por la alfa 1-AG aislada en 1979 (por sus siglas en inglés alpha 1-acid glycoprotein) (Fujii M et al, 1987.).

Así mismo, la línea celular A 549 de cáncer de pulmón humano produce espontáneamente un factor inmunosupresor derivado de tumor (TDSF, por sus siglas en inglés Tumor-Derived Immunosuppressive Factor) de alto peso molecular (150 kDa), el cual inhibe la proliferación de linfocitos T estimulados con PHA, esto en un patrón dosis dependiente; se demostró que la síntesis de este factor se inhibe mediante la administración de mitomicina C, actinomicina D y cyclohexamida; indicando que el factor es un producto génico de las células A 549 (Wang RD et al, 1989a; Wang RD et al, 1989b.).

En 1990, se detectó una sustancia producida por las células HT29 de cáncer de colon (factor HT29), el cual suprimía la proliferación mitogénica de células T así como la producción de IL-2. En dicho estudio se evaluó un rango de funciones de las células T las cuales son susceptibles a los efectos inhibitorios del factor HT29; así mismo este factor abolió el desarrollo de células asesinas activadas por linfocinas cuando era presentado durante la activación de linfocitos de sangre periférica por Interleucina 2 (IL-2), pero cuando era agregado solo en la etapa de lisis no afectaba la lisis de células blanco por efectores normales. El factor HT29 no afecta la generación de concavalina A inducida por linfocitos supresores, sin embargo inhibe la síntesis de DNA (por sus siglas en inglés,

Ácido Desoxirribonucleico), RNA (por sus siglas en inglés, Ácido Ribonucleico) así como la expresión del antígeno CD25 durante la activación mitogénica de células T. Este factor por si mismo no induce a las células supresoras, indicando que dicho factor es selectivo (Ebert EC et al, 1990.).

Durante ese mismo año, otro estudio describió los efectos de un factor inmunosupresor derivado de tumor (TDSF por sus siglas en inglés) con un peso molecular de 150 kDa sobre la producción de Interleucina 2 (IL-2), su respuesta y la expresión de sus receptores. El TDSF es capaz de inhibir marcadamente la producción de IL-2 en linfocitos estimulados por fitohemaglutinina (PHA por sus siglas en inglés) así como la proliferación IL-2-dependiente de linfocitos. El hecho de que el TDSF exhiba una potente acción inhibitoria sobre la respuesta a la IL-2 es de gran importancia si se esta considerando a la IL-2 como un agente terapéutico, lo cual puede ser una importante razón por la que el tratamiento de tumores con IL-2 no proporciona resultados satisfactorios a largo plazo (Wang RD, 1990.).

Somers SS y cols, notaron que el sobrenadante de la línea celular de melanoma G361 contenía un factor que suprime la generación de células LAK (por sus siglas en inglés lymphokine-activated killer cells); para caracterizar dicho factor se realizaron comparaciones fisicoquímicas y funcionales con el TGF-  $\beta$  (por sus siglas en inglés Transforming Growth Factor- $\beta$ ), algunas de las diferencias más importantes encontradas en este estudio fueron que el TDSF perdía su actividad a un pH menor a 4, mientras que el TGF- $\beta$  no mostró pérdida de la misma; este TDSF posee en promedio un pI (por sus siglas

punto Isoeléctrico) de 4.3 y una masa molecular de 68-87 kDa, mientras que el TGF- $\beta$  cuenta con valores de pI 9.5 y un peso molecular de 25 kDa, todo esto indicaba que el TDSF era una sustancia diferente al TGF- $\beta$ , esto se confirmó cuando los efectos del TGF- $\beta$  sobre las células LAK fue revertido mediante la adición de un anticuerpo anti-TGF- $\beta$ , por el contrario el efecto sobre las células LAK inducido por el TDSF no fue afectado por la adición de dichos anticuerpos (Somers SS et al, 1991.).

Posteriormente, Yoshino y col, caracterizaron un factor inmunosupresor derivado de células escamosas de carcinoma de pulmón (LSCF, por sus siglas en inglés Lung Squamous cell Carcinoma Factor) se descubrió que el LSCF inhibe la proliferación, citotoxicidad y expresión de mRNA de citosinas en células T en un patrón dosis-dependiente, tiene un peso de 22 kDa y propiedades similares a las del TGF- $\beta$ , sin embargo su actividad no es inhibida por suero anti-TGF- $\beta$ . (Yoshino et al, 1993.).

Krishnan y su grupo investigaron las capacidades inmunosupresoras de sobrenadantes de líneas celulares derivadas de coriocarcinoma humano (HCS por sus siglas en inglés) empezando por la proliferación de linfocitos T *in vivo* e *in vitro* (Krishnan L et al, 1991, Krishnan L et al, 1993.), posteriormente se mostró que los HCS también inhiben la proliferación de células T de origen murino inducida por lipopolisacárido (LPS, por sus siglas en inglés), sin embargo no se inhibe la proliferación de líneas celulares de linfoma o de células B de hibridoma, indicando que este sobrenadante no tiene efectos inhibidores en células totalmente diferenciadas o transformadas. Así mismo en 1995 se aisló y caracterizo

parcialmente un factor supresor derivado del HCS de la línea celular JEG-3 (HCSf por sus siglas en inglés), el cual tiene un peso aproximado de 5-6 kDa (Krishnan L et al, 1995.).

En 1997, se investigaron los efectos de factores secretados por 3 líneas celulares de carcinoma colorrectal, mostrando que el sobrenadante de estas 3 líneas inhibe la proliferación de células T de manera dosis dependiente, esto debido a la secreción de factores inmunosupresores (ISF, por sus siglas en inglés); además los sobrenadantes de 2 de las líneas celulares son capaces de inhibir la generación de células LAK así como de disminuir la liberación de IL-2 en células T activadas con PHA. Sin embargo los efectos inducidos por los sobrenadantes no fueron idénticos, mientras los factores de la línea w25 de CRC influyen eventos tempranos y tardíos de la activación y división de las células T, los sobrenadantes de las otras 2 (w19 y te6) influyen solo en la inhibición de factores tempranos. Dichos resultados sugieren que los factores secretados por las células CRC pueden ser causa de la inmunosupresión observada *in vivo* en pacientes con estos tumores (Luo JS, et al, 1997.).

Así mismo, en 1997, se investigó la función inmunosupresora de una fracción aislada de sobrenadantes de líneas celulares de coriocarcinoma trofoblástico humano (HCS por sus siglas en inglés), *in vitro* mediante la respuesta inmune de los fagocitos humanos e *in vivo* evaluando su efecto en una reacción local murina implante-versus-portador (GVH, por sus siglas en inglés) mediante un ensayo de Nudo linfático poplíteo (PLN por sus siglas en inglés). La fracción presentó actividad inmunosupresora tanto *in vivo* como *in vitro*, lo

cual sugiere la importancia de esta y de otros factores similares tanto en el ámbito inmunológico como en el de sistemas de trasplante (Markert UR et al, 1997.).

En un trabajo realizado por Palacios Corona R y col, en 1999 se caracterizó parcialmente un factor inhibidor de la activación de macrófagos (FIAML) producido por el linfoma murino L5178Y, que fue aislado del líquido de ascitis libre de células. Este factor inhibe a los macrófagos sanos o de ratones portadores del tumor para producir Óxido Nítrico (NO, por sus siglas en inglés) cuando están estimulados con LPS, pero no con Interferón gamma (INF- $\gamma$ ). Este efecto inhibidor fue observado solamente cuando los cultivos de macrófagos eran expuestos al FIAML antes, pero no después de su incubación el LPS; esto indica que dicho factor inhibe la activación de los macrófagos, pero no desactiva las células, como ocurre en el caso de citosinas como las Interleucinas 4 y 10, (IL-4, IL-10) y TGF- $\beta$  (Palacios Corona R et al, 1999.).

El papel biológico del FIAML aparenta ser muy diferente al de los desactivadores de macrófagos; mientras que la función de los primeros consiste en prevenir un posible daño en el tejido producido por los macrófagos activados, el papel del FIAML puede ser el deshabilitar la respuesta protectora de los macrófagos contra microorganismos patógenos y células tumorales (Palacios Corona R et al, 1999.). Recientemente, se comprobó el efecto inhibitorio *in vivo* del FIAML sobre la activación de los macrófagos. Mediante la administración del FIAML se logró que *E. histolytica* y *L. monocytogenes* produjeran abscesos hepáticos en ratones Balb/c, los cuales son normalmente inmunes a estos patógenos; esto debido a la inhibición de la activación de macrófagos por parte del

FIAML, provocando que los ratones se vuelvan susceptibles y sean capaces de producir un Absceso Hepático Experimental (AHE) (González-Garza MT et al, 2000 y Palacios-Corona et al, En prensa.).

Zou JP y cols, observaron mediante un estudio con linfocitos T *in vitro*, que el sobrenadante de cultivo de células de glioblastoma humano (GCS, por sus siglas en inglés) disminuye la producción de IL-2, INF- $\gamma$ , factor necrótico tumoral-alpha (TNF- $\alpha$ , por sus siglas en inglés) y causa un aumento en la producción de IL-6 e IL-10; se demostró que los cambios inducidos por el GCS sobre la producción de IL-2 e IL-10 ocurren en monocitos, y que estos cambios son debidos a alteraciones en la expresión del gen p40 en la producción de IL-2 y en la expresión de mRNA de la IL-10. Así mismo el GCS causa una reducción en la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHCII por sus siglas en inglés) y en la expresión de moléculas co estimuladoras CD80/86. Estos resultados mostraron que el GCS está envuelto en la alteración de los perfiles de citosinas producidas por monocitos que actúan como células presentadores de antígeno (APC por sus siglas en inglés) y que dicha alteración inhibe las funciones de las células T (Zou JP et al, 1999.).

Posteriormente en el año 2000, Luo JS y cols, evaluaron el efecto de factores inmunosupresores (ISFs por sus siglas en inglés) producidos por 9 líneas celulares de CRC sobre la proliferación de linfocitos inducida por PHA y la secreción de citosinas. Se encontró que la mayoría de las líneas celulares de CRC (8/9) propusieron ISFs, los cuales inhiben la proliferación de células T, con un patrón dosis dependiente; esto fue estudiado

tanto en presencia como en ausencia de monocitos, mostrando que los monocitos pueden modular los efectos sobre los linfocitos derivados de los ISFs. Además, la exposición de PBMC a estos ISFs produce una reducción de la producción de INF- $\gamma$ , mientras que la secreción de IL-1  $\beta$ , IL-2 y TNF-  $\alpha$  fue ligeramente afectada, sugiriendo así que la secreción de ISFs es una propiedad común de los CRCs los cuales pueden ser muy importantes en el mecanismo de escape de los carcinomas de colon *in vivo* (Luo JS, et al, 2000.).

En el 2004, Muminova Z, Strong T y Shaw D, publicaron la caracterización de la mesotelina, un nuevo y atractivo blanco para la inmunoterapia debido a su expresión restringida en tejidos normales y su alta expresión en varios tipos de tumores, incluyendo adenocarcinomas pancreático y ovárico, a pesar del limitado entendimiento de su función biológica. También la variable soluble de la mesotelina se ha identificado como un posible marcador tumoral en los mesoteliomas malignos, además de que se ha desarrollado la ss1(dsFv)PE38 que es una inmunotoxina recombinante anti-mesotelina, que se encuentra bajo evaluación clínica en pacientes con tumores que expresan la mesotelina (Hassan, R 2004). Recientemente se describe la participación de la mesotelina en los adenocarcinomas de pulmón hasta en un 40%, así como en menor porcentaje en otras estirpes histológicas de cáncer pulmonar (Hassan, 2008).

Estos hechos refuerzan la hipótesis que señala que la liberación de sustancias inmunosupresoras por células tumorales es uno de los principales mecanismos involucrados en la evasión de la respuesta inmune; implicando con ello la necesidad de conocer los mecanismos mediante los cuales dichos factores afectan la respuesta inmune.

***El papel de los Fagocitos Humanos y el Oxido Nítrico (NO, por sus siglas en inglés) en el proceso tumoral.***

Además de la función importante de los macrófagos como células presentadoras de antígenos, se ha demostrado que los macrófagos juegan un papel muy importante en el reconocimiento y destrucción de las células neoplásicas y microorganismos patógenos (Roitt et al, 2001b.).

Sin embargo, el crecimiento tumoral induce a su vez innumerables cambios en los macrófagos, como son: a) inhibición de la síntesis de citosinas (Walker MT et al, 1994.) alteración de las funciones accesorias de los macrófagos durante la proliferación de células T, (Yurochko AD et al, 1990a, Yurochko AD et al, 1990b, Walker TM et al, 1994.), y c) inhibición de la síntesis y función del Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos y Granulocitos (GM-CSF) (Walker MT et al, 1994.).

A pesar de la importancia médica y fisiológica que implica la activación de los macrófagos, se sabe relativamente poco acerca de los mecanismos de los macrófagos a nivel bioquímico (Hibbs JB et al, 1988.). Actualmente se tiene conocimiento de los siguientes mecanismos: 1) la importancia de Intermediarios de Oxígeno Reactivos (ROI, por sus siglas en inglés) involucrados en los mecanismos antimicrobianos y antitumorales. (Segal AW, 1989); 2) la acidificación intravacuolar como defensa del huésped hacia los agentes patógenos (Sibley L et al, 1985.); 3) la importancia de Intermediarios de Nitrógeno

Reactivos (NRI, por sus siglas en inglés Reactive Nitric Intermediates) (Roitt et al, 2001c.); 4) la producción de lisozimas, las cuales actúan directamente sobre la pared celular de patógenos (bacterias Gram-positivo) (Roitt et al, 2001c.); y 5) la acción de las defensinas (proteínas cationicas y polipéptidos) (Roitt et al, 2001c.). En 1989 se informó de la producción de Intermediarios de Nitrógeno Reactivos como un mecanismo antimicrobiano de macrófagos murinos activados (Nathan CF y Hibbs JB, 1991). Este último mecanismo juega un papel antimicrobiano importante, y se dilucido de la convergencia de dos líneas de investigación independientes: del análisis del metabolismo de la nitrosamina en la carcinogénesis y del estudio de la actividad antitumoral de los macrófagos (Nathan CF y Hibbs JB, 1991, Stuehr DJ y Marleta MA, 1985, Stuehr DJ Y Marleta MA, 1987, Hibbs JB et al, 1987a, Hibbs JB et al, 1987b, Iyengar RD et al, 1987.).

Estudios posteriores corroboraron la evidencia, de que los RNI contribuyen a la habilidad de los macrófagos murinos activados de inhibir a una amplia variedad de patógenos intracelulares como lo son *Mycobacterium tuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Entamoeba histolytica*, entre otros (Gregory SH et al, 1993; Chan J et al, 1992, Boockvar KS et al 1994; Beckerman KP et al, 1993; Chan J et al, 1995; Denis et al, 1992.).

Doi K y cols, realizaron un estudio en el cual investigaron el papel del NO en la patología de tumores sólidos, esto por medio del monitoreo del NO por Resonancia paramagnética electrónica (EPR por sus siglas en inglés) así como mediante la examinación de isoformas de la iNOS (por sus siglas en ingles inducible Nitric Oxide Syntase) a través de una reacción en cadena de la polimerasa- transcriptasa reversa (RT-

PCR por sus siglas en inglés), los resultados de este trabajo identificaron inequívocamente la excesiva producción de NO por la iNOS en tumores sólidos. El NO producido por el tumor sólido puede estar envuelto en el aumento de la permeabilidad vascular y del flujo sanguíneo, y por consecuencia en el mantenimiento y crecimiento del tumor (Doi K et al, 1996.).

En 1996 Di Napoli y col, mostraron que los macrófagos peritoneales (PEM, por sus siglas en inglés) de ratones Balb/c portadores de tumor mamario (T-PEM, por sus siglas en inglés) disminuyeron su capacidad para lisar células después de la estimulación con LPS, un fenómeno asociado con la baja producción de NO, esto era revertido con una estimulación con INF- $\gamma$  (Di Napoli MR et al, 1996.). Posteriormente este mismo grupo investigó la posible participación de moléculas y factores de transcripción, encontrando alteraciones en la actividad enlazante de los factores de transcripción Necrotic Factor-kappaB y C/EBP (por sus siglas en inglés CCAAT Enhancer Binding Protein) parecen estar involucrados en la reducción de la transcripción de iNOS; estos resultados proveen evidencia de que la reducción en la transcripción de iNOS seguida de alteraciones en la señalización de la célula, pueden ser responsables de la disminución de la capacidad de los macrófagos activados por LPS provenientes de portadores de tumor para producir NO y lisar células tumorales (Di Napoli MR et al, 2005.).

El hecho de considerar por una parte el gran potencial de los macrófagos en contra de los microorganismos patógenos, y por otra el efecto inhibitorio de la célula cancerosa sobre la actividad de los macrófagos, sugiere fuertemente que la incidencia de infecciones

oportunistas observada en pacientes con cáncer, probablemente se deba al efecto deletéreo de estas células sobre la actividad de los macrófagos (Ortiz N, 2000.).

***Estudios de macrófagos aislados de líquido de ascitis de pacientes con alguna neoplasia.***

Actualmente no se conocen estudios referentes a la caracterización de la actividad estimuladora de la producción de NO de fracciones obtenidas de líquidos ascíticos de pacientes con alguna neoplasia sobre fagocitos humanos de sujetos sanos. Sin embargo, Baskic D. y cols. utilizaron fagocitos humanos y macrófagos asociados a tumor (TAM, por sus siglas en inglés) de pacientes con carcinomatosis peritoneal, que no habían recibido quimioterapia o terapia endocrinológica durante al menos tres meses, utilizando como grupos control, sujetos en diálisis peritoneal continua ambulatoria (DPCA) y sujetos sanos. Ellos determinaron la cantidad de nitritos como indicador de la producción de óxido nítrico y encontraron elevaciones sustanciales en los fagocitos humanos de pacientes con cáncer y no así en los fagocitos humanos de los sujetos controles sanos. Así mismo, observaron una disminuida capacidad para producir óxido nítrico de los TAM (Baskic D. et al. 2000.) (Baskic D. et al. 2001).

Mantovani G. y cols. emplearon linfomonocitos asociados a tumor (TALM, por sus siglas en inglés), obtenidos de líquidos neoplásicos y los compararon con los fagocitos humanos de pacientes con cáncer y sujetos sanos. Ellos encontraron que las TALM fueron funcionalmente defectuosas, mostrando altos niveles de ligando Fas, el cual puede ser una vía de escape del control inmune. (Mantovani G. et al 1999.) Ellos mismos demostraron,

que los linfocitos asociados a tumor (TAL, por sus siglas en inglés) producían mayores cantidades de citosinas en los líquidos de ascitis o pleural, que aquellos encontrados en el suero y por los fagocitos humanos. (Mantovani G et al. 1995.)

Otra proteína encontrada en pacientes con ascitis secundaria a cáncer gástrico es la lipocortin-1 (LC1) descrita por Koseki H y cols., quienes la probaron en fagocitos humanos propios de los pacientes, mostrando inmunosupresión, indicando que esta proteína puede estar relacionada en mecanismos inmunosupresores del tumor (Koseki H et al. 1997.)

Existen teorías acerca del desarrollo tumoral, a pesar de una vigilancia inmune funcionante. Y se ha agregado un nuevo concepto, denominado immunoediting (corrección inmune), que es una explicación más compleja del papel del sistema inmune en el desarrollo tumoral. (Swann J.B. and Smith M.J 2007.) (Crocì D.O. et al 2007 )

El concepto “immunoediting” ha sido dividido en tres fases: eliminación, equilibrio y escape. La primera engloba la vigilancia inmune, donde las células tumorales son detectadas y eliminadas por el sistema, pero si existe una falla del sistema y/o las células tumorales, ellas crean sustancias para alterar el buen funcionamiento del sistema inmune, entonces el tumor se desarrolla. La fase de equilibrio, es cuando no fue posible eliminar el tumor, pero aún el sistema inmune actúa como contención para su desarrollo, mediante mecanismos específicos. En la fase de escape, el tumor evade todas las rutas de contención del sistema inmune y existe progresión tumoral. (Swann J.B. and Smith M.J 2007.)

Las principales células involucradas en la vigilancia inmune contra las neoplasias son los linfocitos T, células NK (del inglés, Natural Killers), células polimorfonucleares (PMNC) y los monocitos/macrófagos. (Rabinovich G.A. et al. 2007.) (Wang X. et al. 2006.) (Melichar B. et al. 2000.) (McIntosh L.C. et al. 1986.) (Zembala M et al 1973.) (Baskic D. et al. 2003.) Estas evitan o retrasan el escape tumoral del sistema inmune a través de varios mecanismos como son la falta o exceso de producción de ciertas citosinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , IL-2, TGF- $\beta$ , IL-10, PGE-2) (Wojtowicz-Praga S. 1997.) (Botti C. et al. 1998.) (Zhou J.W. et al. 2004.) (Lagadec P. et al. 1999.); así como recientemente se ha descubierto, la presencia de factores inmunosupresores de tipo proteico, (Swann J.B. and Smith M.J. 2007.) (Eisenthal A. et al. 2006.) (Oh S.K. and Moolten F L. 1981.) (Elg S.A. et al. 1997.) (Morvillo V. et al. 1996.) (Aso H. et al. 1999.) y que han mostrado utilidad en el análisis (Yan Xu. and Anne E. Goodbody 1994.) y pronóstico de los pacientes (Takeuchi H. et al. 2003.) Aquí es donde, nuestro estudio será de ayuda, al tratar de encontrar la proteína asociada a la actividad inmunosupresora de las células cancerosas y en un futuro crear un anticuerpo monoclonal que inhiba a dicha proteína, con el fin de poder contribuir al control del crecimiento y progresión tumoral, podríamos decir, algo llamado immunoediting farmacológico.

### ***Líquido de ascitis***

Las células del recubrimiento mesotelial del peritoneo secretan líquido seroso que circula dentro de la cavidad peritoneal. En condiciones normales esta última contiene de 50 a 100 ml de líquido con una concentración de solutos casi idéntica a la del plasma, con una cantidad de proteínas de alrededor de 3 g/dl. El flujo sanguíneo y los factores que alteran la

permeabilidad de la membrana peritoneal afectan la eficiencia del intercambio de líquido. La inflamación intraperitoneal aumenta en forma notable la permeabilidad peritoneal (Schwartz, 1999).

Un principio básico hemodinámico de los fluidos en los capilares es la relativa impermeabilidad a las proteínas, mientras los líquidos y solutos son capaces de atravesar las membranas de manera fácil. Y como consecuencia, las diferencias en las concentraciones de proteínas a través de la membrana capilar están presentes y esto crea las diferencias en la presión oncótica necesaria para la reabsorción de fluido del espacio intersticial. Las propiedades anatómicas de la pared del capilar reúnen estos requerimientos fisiológicos. La anatomía microscópica de las membranas peritoneales muestran, aparte de del endotelio capilar y la membrana basal, tres distintas barreras para prevenir la pérdida de proteínas dentro de la cavidad peritoneal: el estroma intersticial, la membrana basal mesotelial y las células mesoteliales de revestimiento del peritoneo (Gotloib L, 1990).

La ascitis maligna está caracterizada por presentar células malignas; comparada con ascitis causada por otras entidades de carácter benigno tales como la cirrosis, desnutrición e insuficiencia cardíaca; la ascitis maligna contiene altos niveles de deshidrogenasa láctica y mayor número de glóbulos blancos. (Salerno F, 1990) Así como se ha observado que son mayores los niveles de proteínas en los líquidos de ascitis de los pacientes con carcinomatosis peritoneal (Jungst D, 1992).

Los factores identificados en la formación de la ascitis maligna son la disminución de la absorción linfática y el incremento de la producción de fluido. El incremento neto de la producción de líquido por los capilares se debe a un incremento de la totalidad de la superficie de membrana capilar, incremento de la permeabilidad capilar y subsecuentemente un incremento de la concentración de proteínas intraperitoneales, lo que lleva a un incremento de la presión oncótica intraperitoneal. Esta secuencia puede ser el resultado de péptidos biológicamente activos, producidos por células tumorales como el factor de crecimiento vascular endotelial y el factor de crecimiento básico de fibroblastos, entre otros. La interferencia contra estos mediadores puede servir de estrategias terapéuticas en un futuro (Tamsma JT, 2001).

Virtualmente todos los tumores que se encuentran en el peritoneo son malignos y pueden ser divididos en formas primarias y secundarias. (Robbins, 1999) Los tumores primarios se originan del mesotelio del peritoneo y son extraordinariamente raros y son llamados mesoteliomas; están asociados a la exposición de asbesto en más del 80 por ciento de los casos. Y los tumores secundarios que en contraste, son los más frecuentes. En cualquier forma de cáncer avanzado, la penetración a la membrana serosa o implantes metastásicos pueden ocurrir. La ascitis maligna ocurre comúnmente en pacientes con cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer pancreático, cáncer de hígado y cáncer de colon, entre otros menos frecuentes (Olopade OI, 1991).

## *Metástasis*

Las células cancerosas tienen la habilidad de no solo crecer en el tejido de origen, sino también propagarse y colonizar sitios distantes. Los procesos de invasión y metástasis han sido comparados con los procesos fisiológicos normales de la migración celular embrionaria y la reparación tisular. Muchas moléculas responsables de dichos procesos fisiológicos normales se encuentran desreguladas en la invasión tumoral. La migración de la célula maligna es regulada por integrinas, enzimas de degradación de la matriz celular y de la adhesión célula-célula (Pedraza-Fariña L, 2006).

La metástasis es el resultado de múltiples eventos que proveen a la célula tumoral la capacidad de migrar, acceder al sistema circulatorio y linfático, para propagarse a sitios distantes. Actualmente está claro que estos procesos son altamente dependientes de componentes del sistema de coagulación, angiogénesis y más aún se ha demostrado que existen factores tisulares que mantienen el proceso de metástasis (Bluff J, Staton C, 2008).

Hay entidades clínicas como el síndrome carcinoide que es la situación clínica resultante de la acción de diversas sustancias elaboradas en exceso por un tumor neuroendocrino, y cuando este aparece frecuentemente existen metástasis hepáticas. Existen marcadores para el diagnóstico de los tumores neuroendocrinos. Las cromograninas, son los marcadores más utilizados, en estos casos, especialmente la secretogranina V. Dentro de esta familia de proteínas se encuentran las cromograninas A y

B, secretogranina II o cromogranina C y la secretogranina III, IV, V y VI, NCAM (Öberg K, 2005 y Cebollero-Presmanes M, 2004).

Algunos estudios han encontrado aumento de la expresión de ciertas proteínas en tejidos tumorales respecto a tejidos normales; otras investigaciones han sugerido que, al inhibir la actividad de estas proteínas, entre estas se encuentran implicadas la familia de las metaloproteinasas, se podría prevenir la diseminación celular del tumor. El análisis de la expresión de metaloproteinasas, así como el papel de sus inhibidores, sugiere una nueva era en el horizonte, del diagnóstico, la prevención y el tratamiento (Stetler-Stevenson WG, 1993).

La transformación de una célula y la adquisición del fenotipo invasor y metastásico resulta de la activación de un grupo de procesos celulares complejos, más que del efecto de un solo gen; se ha implicado a los genes homeobox como candidatos potenciales del control transcripcional de la transformación y del fenotipo invasor (Castronovo V, 1994)

## JUSTIFICACION

El presente proyecto de investigación responde a un problema de salud para el IMSS, ya que corresponde directamente al segundo tema en la lista de Temas Prioritarios de Salud: Tumores Malignos.

Uno de los campos principales de investigación en el área de la Inmunología, es dilucidar los mecanismos por los cuales las células tumorales evaden la respuesta inmune para su proliferación incontrolable; una de las teorías más importantes sostiene que la evasión de las células tumorales puede ser mediante la liberación de sustancias inmunosupresoras las cuales tienen como blanco principal a los Fagocitos Humanos. Aunque se han estudiado pocos factores solubles de inmunosupresión en fluidos corporales en pacientes con cáncer, definitivamente con el desarrollo de este proyecto logramos caracterizar diferentes factores con propiedades diferentes a los ya descritos en el campo del arte con impacto científico y terapéutico. Por lo que la originalidad de este proyecto radica en llevar a cabo la purificación y caracterización parcial de los factores obtenidos de las muestras de líquidos ascíticos de pacientes con neoplasias malignas, determinando su similitud en secuencia entre sí y determinar su mecanismo de acción en base a su caracterización. Esta información puede ser utilizada para el desarrollo de biomarcadores tumorales importantes.

## PLANTEAMIENTO

Se ha sugerido que la inmunodeficiencia en pacientes con cáncer se debe a la presencia de factores producidos por la célula tumoral que inducen el abatimiento de la respuesta inmune. Los Fagocitos Humanos juegan un papel importante en el mecanismo antineoplásico produciendo sustancias citotóxicas como el NO y es posible que éste mecanismo sea inhibido en los pacientes con cáncer. Se considera que es posible identificar y caracterizar las secuencias responsables de la actividad inhibitoria del Óxido Nítrico producido por los fagocitos humanos de los pacientes con ascitis secundaria a una neoplasia maligna, que posteriormente pueda conducir a la elaboración de un biomarcador tumoral.



## **OBJETIVO GENERAL**

- Identificar y Caracterizar por Espectrometría de masas (MS) el o los factores responsables de la inmunosupresión en el líquido de ascitis de pacientes con neoplasias malignas.

## **OBJETIVO ESPECÍFICO**

- Determinar la relación en término de secuencia de aminoácidos entre los líquidos ascíticos de los pacientes con neoplasias malignas.

## MATERIAL Y METODOS

**Tipo de estudio:** Se trata de un estudio experimental *in vitro* a partir de líquido de ascitis obtenido de pacientes.

**Lugar del estudio:** Unidad Médica de Alta Especialidad 25, CMNN, Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS, Monterrey, N.L., México.

**Criterios de inclusión:**

Se incluyeron las muestras de líquido de ascitis de pacientes pertenecientes a la población del departamento de hemato-oncología médica de la UMAE 25 con diagnóstico de cáncer, en los cuales se demostró la actividad inmunosupresora medida mediante la inhibición de la producción de Óxido Nítrico por Fagocitos Humanos.

**Criterios de exclusión:**

Se excluyeron las muestras de líquido de ascitis de pacientes con neoplasias malignas en las que no se demostró la actividad inmunosupresora medida mediante la inhibición de la producción de Óxido Nítrico por Fagocitos Humanos.

## DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

Se utilizaron muestras de líquido de ascitis con actividad inmunosupresora demostrada en un estudio previamente realizado en la Unidad Médica de Alta Especialidad 25, CMNN y en el Centro de Investigación Biomédica del Noroeste, IMSS, Monterrey, N.L., México

### *1. OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS EN MUESTRAS DE LÍQUIDO DE ASCITIS DE PACIENTES CON NEOPLASIAS MALIGNAS.*

- a. Se trabajó con 18 muestras de líquido de ascitis de pacientes con neoplasias malignas, (Gráfica 1), las cuales se colocaron en tubos con microfiltros para ser centrifugadas a 14 000 revoluciones por minuto durante 20 minutos, para obtener fracciones de proteínas de bajo peso molecular y separando el sobrenadante en donde se deben de encontrar proteínas y restos celulares de mayor peso molecular; se trabajó con las fracciones obtenidas de 1 ml por cada muestra.
- b. Se separan las proteínas de bajo peso molecular, obteniendo muestras de diferente volumen en microlitros (de acuerdo a cada muestra) y se colocan en tubos previamente rotulados haciendo referencia a cada muestra por paciente.

## 2. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE LAS MUESTRAS DE LÍQUIDO DE ASCITIS.

- a. Para poder determinar la cantidad de proteínas de cada muestra se utilizó el método de Lowry (Lowry et al, 1951)
- b. El primer paso consistió en realizar la curva de seroalbúmina bovina fracción V, la cual se realiza agregando 0, 5, 10, 20, 40, 60, 80 ml de seroalbúmina, por duplicado, en tubos de ensayo de 13 x 100 mm. Se aforó con agua a 200 microlitros ( $\mu\text{L}$ ). Se añadió a cada muestra 1 mL de la solución C y se mezcló. Se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregó entonces la solución E, se agitó y se reposó a temperatura ambiente durante 30 min.
- c. Se realizó la lectura de la absorbancia a 750nm. utilizando un espectrofotómetro (Biotek, Synergy HT).

Solución A: Se disolvieron 2 g de carbonato de sodio en 100 mL de NaOH 0.1 N

Solución B1: Se disolvieron 2 g de tartrato de sodio y potasio en 100 mL de agua.

Solución B2. Se disolvió 1 g de sulfato de cobre en 100 mL de agua desionizada.

Solución E: Se diluyeron 3 mL del reactivo de Folin-Ciocalteu con 3 mL de HCl 1 N. (Inmediatamente antes de usarse)

Solución C: Se mezclaron 49 mL de solución A, 0.5 mL de solución B1 y 0.5 mL de solución B2. (Inmediatamente antes de usarse)

En tubos de ensayo se colocaron 100  $\mu$ l (30  $\mu$ g) de la fracción de bajo peso molecular de las muestras de los pacientes con líquidos de ascitis.

Se agregó 1 mL de la solución C, se agitaron las mezclas y se dejaron 10 min a temperatura ambiente. Posteriormente se agregó a cada tubo 0.1 mL de la solución E, agitando inmediatamente, se reposaron las muestras por 30 min a temperatura ambiente y posteriormente se midió la absorbancia a 750 nm en un espectrofotómetro (Biotek, Synergy HT).

Para calcular la masa de proteínas se realizó la ecuación obtenida de la curva preparada con seroalbúmina bovina fracción V. (programa Excell). (Tabla 1)

- d. Se capturaron los datos de la cantidad de proteína obtenida de cada muestra, en Excel para graficar los resultados y obtener el resultado de Regresión lineal ( $R^2$ ) del cual se obtiene  $R^2 = 0.9998$  y la fórmula del valor de "y", donde  $y = 0.005x + 0.1711$  donde el valor de "y" es igual al resultado de la lectura de cada muestra de la medición por espectrofotometría.
- e. Se despeja el valor de "x" de la fórmula quedando de la siguiente manera para obtener el resultado de "x" con la siguiente fórmula.  $x = (y - 0.1711) / 0.005$
- f. Se aplica la fórmula de "x" sacando el valor de "x" de cada muestra, en donde "x" es igual a concentración en  $\mu$ g en 100  $\mu$ L de muestra.

- g. Se convierte a unidades de  $\mu\text{g/ml}$  de cada resultado.

### ***3. CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS MEDIANTE EVAPORACIÓN***

- a. Se añade acetonitrilo en una proporción de 3:1 con las muestras líquido de ascitis ya procesadas con su determinación de proteínas correspondiente.
  
- b. Se colocan las muestras en el Centrivap console (Labconco) y posteriormente se procede a prender el aparato verificando previamente que tenga etanol. Se continúan los pasos de encendido:
  - i. Encender (COLD TRAP)
  - ii. Dejar enfriar por 30 minutos
  - iii. Encender bomba de vacío (VACUUM PUMP)
  - iv. Girar perilla de concentrador de vacío
  - v. Encender rotor (ROTOR)
  - vi. Girar perilla de auxiliar de vacío
  
- c. Se retiran las muestras al presentar evaporación del volumen contenido
  
- d. Se siguen los pasos de apagado del equipo:

- i. Liberar el vacío al regresar la perilla de auxiliar de vacío a su posición de apagado
- ii. Se apaga rotor
- iii. Apagar la bomba de vacío
- iv. Cerrar la perilla de concentrador de vacío

#### ***4. PROCESO DE DIGESTIÓN DE LAS MUESTRAS DE PROTEÍNAS PARA SU POSTERIOR SECUENCIACIÓN.***

##### **a. Reactivos a utilizar y modo de preparación:**

###### **i. Bicarbonato de amonio 100 mM**

Se pesaron 79.10 mg de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  y se disolvieron en 10 mL de agua MILLI-Q.

###### **ii. Bicarbonato de amonio 50 mM**

Se realizó una dilución de 1:2 a partir de la solución de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM utilizando agua MILLI-Q.

###### **iii. Ditiotreitól (DTT) 200 mM**

Se pesaron 30.84 mg de DTT y se disolvieron en 1 mL de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM.

**iv. Iodoacetamida 1 M**

Se pesaron 37 mg de Iodoacetamida y se disolvieron en 200  $\mu$ L de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM.

**v. Tripsina**

50  $\mu$ g de Tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin, PROMEGA) en una solución de ácido acético 50 mM a 1  $\mu$ g/  $\mu$ L almacenada a -70°C.

**b. Preparación de la muestra.**

**i.** Las muestras de proteínas de 100  $\mu$ g se llevaron a 100  $\mu$ L con  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM. y se expusieron 30 minutos a ultrasonido para la solubilización de las muestras. Se agitaron en Vortex.

**c. Reacción disulfuro.**

**i.** Se añadieron 5  $\mu$ L de DTT a los 100  $\mu$ L de muestra. La muestra se calentó a ebullición por 10 minutos. Se agitó en Vortex y se dio un Spin. Se incubó a temperatura ambiente 1 hora.

d. Alquilación.

- i. La muestra se alquiló añadiendo 4  $\mu\text{L}$  de la solución de Iodoacetamida. Se agitó en Vortex y se dió un Spin. Se incubó a temperatura ambiente 1 hora.

e. Neutralización.

- i. Se neutralizó la Iodoacetamida remanente añadiendo 20  $\mu\text{L}$  de DTT. Se agitó en Vortex y se dió un Spin. Se incubó a temperatura ambiente 1 hora.

f. Digestión.

- i. La muestra se digirió utilizando una solución de tripsina manteniendo una relación 1:50 (w/w). Se agitó en Vortex y se dió un Spin. Se incubó 18 horas a 37 C. Se precipitó para terminar la actividad de proteasa al adicionar ácido tricloro acético para alcanzar una concentración final del 10%.

**5. *CONCENTRACIÓN DE LAS MUESTRAS POSTERIOR A LA DIGESTIÓN MEDIANTE EVAPORACIÓN.***

- a. Se colocan las muestras de proteínas posterior al proceso de digestión al Centrivap console (Labconco) y se utiliza el mismo protocolo de uso ya descrito anteriormente, por alrededor de una hora verificando la evaporación del volumen contenido.

**6. *RESUSPENSIÓN DE LAS MUESTRAS CON 100  $\mu$ L DE ÁCIDO FÓRMICO AL 0.5%.***

- a. Se añadieron 100  $\mu$ L de ácido fórmico al 0.5% a cada muestra. Se agitó en Vortex y se guardaron bajo congelación hasta su utilización.

**7. *SECUENCIACIÓN DE LOS PÉPTIDOS DE INTERÉS MEDIANTE ESPECTROMETRÍA DE MASAS.***

- a. Las muestras se introdujeron al espectrómetro de masas para su lectura utilizando la interfase ESI en modo positivo, el equipo híbrido cuadrupolar-tiempo de vuelo (modelo QTOF-micro, Waters) acoplado al sistema HPLC (Waters Alliance 2695), ambos controlados por el software MassLynx (v4.0). La información fue procesada

con el software ProteinLynx Global Server, versión 2.2 utilizando la base de datos de MASCOT.

- b. El método cromatográfico y de detección fueron optimizados utilizando albúmina sérica bovina como control para verificar la sensibilidad del método. (Jonscher K, 2005)
- c. Se analizaron los resultados de los cromatogramas de las muestras de líquido de ascitis ya procesadas, con las bases de datos y se analizaron manualmente los espectros según el grado de confiabilidad.
- d. Descripción del método cromatográfico

Fase móvil acuosa (A2). Se preparó acetonitrilo al 1% en agua Mili-Q con 0.1% de ácido fórmico. Se colocó en el reservorio A.

Fase móvil orgánica (B2). Se preparó acetonitrilo al 80% en agua Mili-Q con 0.1% de ácido fórmico. Se colocó en el reservorio B.

La columna se mantuvo a una temperatura de 50 °C y la muestra a 4 °C. Como fase móvil se utilizó un gradiente de concentración preparado a partir de acetonitrilo, grado HPLC (apéndice, tabla V). El flujo se mantuvo constante a 0.2 mL/min y se utilizó un volumen de inyección de 15 µL.

## Método de espectrometría de masas

### Leucina encefalina.

Solución Stock. Para obtener una solución de 250 ng/ $\mu$ L, se disolvieron 25 mg en 100 mL 50/50 MeOH/Agua con 1% de ácido fórmico.

Solución Spec. Para obtener una solución de 2ng/ $\mu$ L se tomaron 800  $\mu$ L del stock y se añadieron a 40 mL de MeOH/Agua con 1% de ácido fórmico.

### Glucofibrino-péptido (GFP)(C<sub>66</sub>H<sub>95</sub>N<sub>19</sub>O<sub>26</sub> 15569 Da).

Solución stock. Para obtener una solución de 32 pmol/ $\mu$ L, se añadieron 2000  $\mu$ L al vial conteniendo originalmente 64 nmol. Se almacenó a -20°C

Solución intermedia. Para obtener una solución de 1 pmol/ $\mu$ L, se tomaron 100  $\mu$ L de la solución stock y se añadieron 300  $\mu$ L de una mezcla de 50/50 MeOH/Agua con 1% de ácido acético. La solución se almacenó a -20°C

Solución spec. Para obtener una solución de 100 fmol/ $\mu$ L, se tomaron 220  $\mu$ L de la solución intermedia y se añadieron 2000  $\mu$ L de una mezcla de 50/50 MeOH/Agua con 1% de ácido acético.

### Condiciones de calibración

El espectrómetro de masas se calibró con la solución spec de leucina encefalina, con la cual se llevó a cabo el cálculo de los parámetros de resolución y el ajuste del valor del punto de calibración inicial ( $L_{ref}$ ).

Para la calibración de un solo punto, se utilizó la solución spec del GFP. El ion doblemente cargado  $[(M+2H)^{2+}]$  con valor de masa exacta de 785 Da se liberó a través del sprayer de referencia de la fuente NanoLockSpray.

Voltaje del capilar: 3500 V

Voltaje del cono de extracción: 2 V

Voltaje de extracción de la muestra: 35 V

Temperatura de desolvatación: 350 °C

Análisis de resultados.

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando el blastp (protein-protein BLAST) del Protein BLAST del NCBI

## RESULTADOS

Se ha propuesto que la producción de líquido de ascitis de pacientes con cáncer, es indicativo del crecimiento y desarrollo tumoral, el estudio de este líquido de ascitis es esencial para discernir los compuestos que por ende pueden estar involucrados en el proceso de la inhibición de la respuesta inmune. Es por eso que en un estudio previo se demostró la inhibición de la producción de NO por los fagocitos humanos en líquido de ascitis de pacientes con neoplasias malignas (Urzúa-González AR, 2007), y que ya había sido previamente observado en un modelo murino (Palacios-Corona R, 1999, y 2006).

Se cuantificaron las concentraciones de proteínas en 18 muestras de líquido de ascitis, secundaria a una neoplasia maligna, por el método tradicional de Lowry y cols. utilizando en todos los experimentos 30 µg/mL de cada una de las fracciones proteicas de bajo peso molecular correspondiente a cada paciente (Tabla 1).

Se obtuvo la secuencia de los péptidos contenidos en las fracciones purificadas y la identificación de las proteínas a las que estos pertenecen, con mayor confiabilidad. Sin embargo no es posible dar a conocer las secuencias aminoacídicas de los péptidos obtenidos en este trabajo por estar en trámite la solicitud de la patente ante la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS.

Con las fracciones purificadas de líquido de ascitis se logró la lectura e interpretación de los espectros obtenidos en secuencias de aminoácidos usando la base de datos MASCOT con el software ProteinLynx Global Server versión 2.2.

Se identificaron 656 péptidos, de los cuales se catalogaron como péptidos con alto valor de confiabilidad (mayor a 30 %) por el Espectrómetro de masas. Tras un escrutinio minucioso realizado por el software mencionado se determinaron sólo 314 péptidos a analizar subsecuentemente (Tabla 2).

En la Tabla 2 se muestra, la cantidad de péptidos confiables que proporciono el análisis de las fracciones por medio de EM de cada una de las muestras de líquido de ascitis de pacientes con cáncer. Los péptidos importantes tuvieron un rango de probabilidad dado por el software del EM, el cual fue de 45 a 96%, y dicho dato se tomó en cuenta para seleccionar los péptidos a analizar. En la Tabla 3 se clasifican, las secuencias con confiabilidad de identificación mayor al 70%, teniendo en cuenta que por el método utilizado se generan identificaciones correctas a partir de una confiabilidad mayor al 40% (Jonscher KR, 2005).

De los 314 péptidos, se repitieron 22 secuencias, con un rango de 5 a 11 aminoácidos en su estructura, entre los diferentes tipos de neoplasias. De las 22 secuencias hubo similitudes en las secuencias entre los diferentes tipos de neoplasias, incluso en las mismas variedades de cáncer (Tabla 5).

Cabe destacar que hubo cuatro muestras de líquido de ascitis que no proporcionaron péptidos confiables (Tabla 2), que fueron las muestras 1,7,14 y 15 las cuales corresponden a líquidos de ascitis de pacientes con carcinoma primario desconocido en la muestra 1 y a cáncer de ovario las otras 3. Y por el contrario hubo muestras en las que se identificaron varias secuencias, como en el caso de la muestra 13 con 9 secuencias identificadas.

Las secuencias de aminoácidos que componen los péptidos identificados por EM de los líquidos de ascitis de pacientes con las diferentes neoplasias malignas se identificaron con la abreviación SEQ seguida del número de péptido del 1 al 22 asignados aleatoriamente, ya que por el momento se omitieron las secuencias específicas. (Tabla 5)

En las secuencias repetidas que fueron de la SEQ-1 a la SEQ-22 se les correlacionó con un alto valor de confiabilidad con respecto a las demás secuencias encontradas (Tabla 4), por lo que se determinó que dichas secuencias fueran sometidas a investigación para la búsqueda de un biomarcador tumoral.

Por otro lado, se obtuvieron alineaciones de las secuencias obtenidas, con proteínas ya descritas en las bases de datos de blastp (protein-protein BLAST) del Protein BLAST del NCBI. Como se observa en la Tabla 6, hubo 11 secuencias en las que no se identificó una alineación con alguna proteína en específico. Once secuencias alinearon de manera confiable con proteínas con funciones parcialmente conocidas, como son: aminopeptidase P-like metallopeptidase, disintegrin and metallopeptidase domain 18, secretogranin V, homeobox protein ceh-14, homeobox protein ceh-34, peroxisomal biogenesis factor 3, type



## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

El campo de la proteómica ha producido un equipo de tecnologías y técnicas analíticas que han servido de manera significativa para el diagnóstico de cáncer. Estas tecnologías permiten de manera eficiente la identificación de nuevos biomarcadores para la detección temprana del cáncer, y prometen nuevos métodos diagnósticos para seguimiento serológico en estos pacientes (Verma M, 2001).

Las limitaciones están aun presentes, por lo que se están mejorando de manera constante nuevas herramientas y técnicas. Los potenciales resultados de esta tecnología son múltiples. El análisis por espectrometría de masas puede ser adaptado a aplicaciones costo-efectivas y altamente dirigidas a múltiples modelos de discriminación de diferentes estados patológicos. El refinamiento de la proteómica utilizando líquidos corporales y tejidos permitirá en un futuro próximo mayor precisión en los métodos diagnósticos. La oncología podrá en un futuro individualizar las intervenciones terapéuticas específicamente en las vías de señalización involucradas en cada tipo de tumor (Posadas E, Kohn E, et al 2005).

En este estudio se utilizaron muestras de líquido de ascitis de pacientes con cáncer, con actividad inmunosupresora demostrada, con el propósito de obtener información acerca de las secuencias de los factores involucrados, para posteriormente continuar con la búsqueda de un biomarcador que permita evaluar la posibilidad de un diagnóstico más temprano en los pacientes con neoplasias malignas.

Como se mencionó anteriormente, hemos identificado péptidos por medio de la Espectrometría de masas (MS) y que se alinearon con distintas proteínas, las cuales ya han sido identificadas que participan en procesos patológicos relacionados a la diseminación metastásica, vías de señalización de la apoptosis, progresión tumoral, crecimiento, migración y angiogénesis, así como algunas que no se ha demostrado su actividad, y que participan con mecanismos aún no esclarecidos pero se encuentran presentes en pacientes con cáncer de comportamiento agresivo, como lo es el carcinoma pancreático (Li KX, 2008).

Como ejemplo están las SI:Q-2 y SEQ-17 que alinearon con proteínas de la familia de las metaloproteinasas, que están implicadas en varios acontecimientos biológicos tales como adherencia, fusión, migración celular, desplazamiento de la proteína de la membrana y proteólisis, dichos efectos favorecen la diseminación metastásica (Yoon SO, 2003), todavía no se cuenta con una herramienta efectiva que ayude a detener o identificar sus efectos de manera oportuna. Por otro lado hay estudios en cáncer gástrico que han evaluado la expresión de las metaloproteinasas en el tejido tumoral y el tejido sano, y se demostró que hay una mayor expresión de éstas en las células tumorales, comparándola con las células sanas, lo que sugiere que un aumento de la expresión de dichas proteínas juega un papel importante en la invasión tumoral en el carcinoma gástrico y puede ser usado como marcador de la agresividad biológica (Honda M, 1996). Se encontró que la SEQ-17 obtenida, pertenece a una muestra de líquido de ascitis de un paciente con cáncer gástrico, lo cual pudiera sugerir algún tipo de asociación que pueda permitir una línea de

investigación que permita la elaboración de un biomarcador partiendo de secuencias repetidas y con alto valor de confiabilidad identificadas.

Otro claro ejemplo es la implicación que se ha atribuido a las proteínas de la familia homeobox como reguladoras de metástasis en cáncer de pulmón, demostrándose también la amplificación del gen de esta clase de proteínas en el cáncer de mama (Cavalli LR, 2008). En el presente estudio se identificaron 2 secuencias que alinearon de manera altamente confiable con proteínas de la familia homeobox, las cuales son las SEQ-3, presente en Carcinoma primario desconocido y la SEQ-16, presente en Cáncer de ovario y recto.

Así mismo, otra proteína identificada, la secretogranina V, (SEQ-4), proveniente de Cáncer de ovario y Carcinoma primario desconocido, es un marcador no específico utilizado principalmente en el diagnóstico de los gastrinomas, aunque puede estar también presente en cualquier tipo de tumores neuroendócrinos (Öberg K, 2005 y Cebollero-Presmanes M, 2004).

Al alterarse la función normal del proceso de apoptosis, se incrementa la capacidad de que las células normales se conviertan en células cancerosas (Yang L, 2003). En este estudio encontramos que la SEQ-9, alinea con la proteína ribosomal protein S20, la cual se ha relacionado con la regulación negativa del inicio de la apoptosis en líneas celulares de leucemia humana (Goldstone SD, Lavin MF, 1993); y sólo se identificó en el líquido de

ascitis de un paciente portador de Leucemia linfocítica Crónica, que le da mayor peso a estos resultados.

La función de inmunosupresión observada en todas las muestras de líquido de ascitis en las diferentes modalidades de neoplasias malignas no ha sido reportada en las proteínas con las que se encontró alineación con alta confiabilidad, lo que pudiera sugerir una nueva acción de dichas proteínas.

Con respecto a las 4 muestras de líquido de ascitis que no proporcionaron péptidos confiables, que fueron las muestras 1,7, 14 y 15 las cuales corresponden a líquido de ascitis de pacientes con carcinoma primario desconocido en la muestra 1 y las otras 3 a cáncer de ovario, habría que analizar una nueva muestra de estos pacientes para poder obtener secuencias significativamente confiables como en el resto de las muestras analizadas.

Encontramos 11 secuencias (cáncer de ovario en su mayoría, cáncer gástrico, cáncer rectal, Leucemia Linfocítica Crónica, carcinoma primario desconocido y sarcoma renal) en las que no se identificó alineación con alguna proteína en particular de las descritas en las bases de datos utilizadas, sin embargo se requiere de mas estudios para analizar si estas secuencias son de novo y pueda tratarse de una proteína aun no publicada en dichas bases de datos , ya que de ser así, sería una importante contribución el destacar una proteína de novo en este tipo de muestras. Tampoco se han encontrado reportes

referentes a los péptidos identificados en este trabajo con función de inhibición del NO en fagocitos humanos

Como estos hay vastos ejemplos del arsenal con el que contamos y con el que próximamente se tendrán resultados favorables en cuanto al diagnóstico temprano de enfermedades neoplásicas, así como el desarrollo de futuros fármacos con blancos específicos para el tratamiento del cáncer; motivo por el cual consideramos de gran importancia que se continúe con el estudio de estas técnicas a nivel clínico y también a nivel molecular para el entendimiento a fondo de esta devastadora enfermedad

# APÉNDICE A

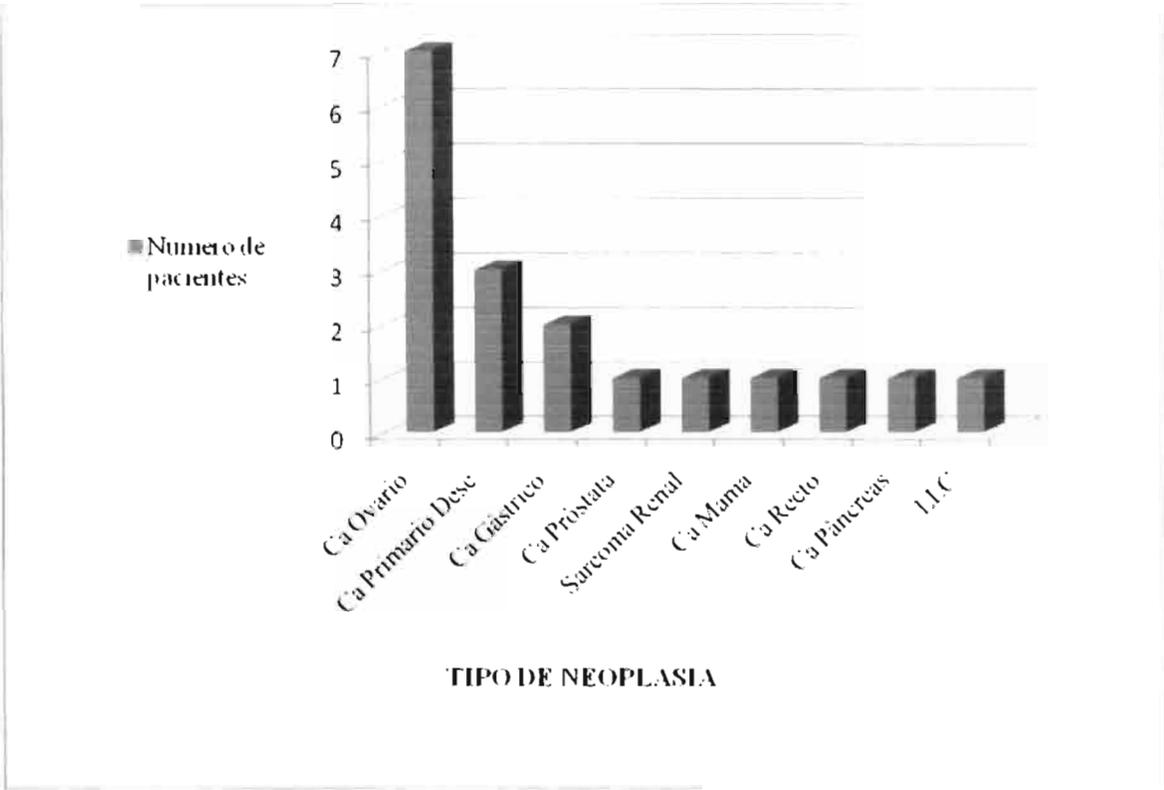
## ABREVIATURAS

▪ %	Por ciento
▪ µl	Microlitros
▪ APC	Células presentadoras del antígeno
▪ C/EBP	Proteínas de enlace aumentadoras a CCAAT
▪ Células LAK	Células Asesinas activadas por linfocinas
▪ CRC	Carcinoma colorrectal
▪ Ensayo GVII	Ensayo implante-contraportador
▪ EPR	Resonancia paramagnética electrónica
▪ FIAML	Factor inhibidor de la activación de macrófagos del linfoma
▪ GCS	Sobrenadante de cultivo de células de glioblastoma
▪ GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos/granulocitos
▪ h	hora/s
▪ HCS	Sobrenadante de células de Coriocarcinoma Humano
▪ HCSf	Factor derivado de sobrenadante de células de Coriocarcinoma Humano
▪ IL-10	Interleucina 10
▪ IL-2	Interleucina 2
▪ IL-4	Interleucina 4
▪ IL-6	Interleucina 6

▪ INF- $\gamma$ (gamma)	Interferón <b>gamma</b>
▪ iNOS	Sintetasa inducible del óxido nítrico
▪ IS	Substancia inmunosupresiva
▪ ISF	Factor <b>inmunosupresor</b>
▪ KDa	Kilo Daltons
▪ l	litro
▪ LLC	Leucemia Linfocítica Crónica
▪ LPS	Lipopolisacárido
▪ LSCF	Factor de células <b>escamosas de carcinoma</b> de pulmón
▪ mg	miligramos
▪ MHCII	Complejo mayor de histocompatibilidad II
▪ min	minutos
▪ mL	mililitros
▪ mM	Milimolar
▪ MS	Espectrometría de Masas
▪ N	Concentración normal
▪ nm	Nanómetros
▪ nM	Nanomoles
▪ NO	Óxido nítrico
▪ NRI	Intermediarios de nitrógeno reactivos
▪ °C	Grados Centígrados
▪ PEM	Macrófagos peritoneales
▪ pH	Potencial de hidrógeno

- PHA Fitohemaglutinina
- pI Punto Isoeléctrico
- ROI Intermediarios de oxígeno reactivos
- RT-PCR Reacción en cadena de polimerasa- transcriptasa reversa
- SEQ Secuencias
- TDSF Factor inmunosupresivo derivado de tumor
- TGF- $\beta$  (beta) Factor de crecimiento tumoral beta
- TNF- $\alpha$  (alpha) Factor de Necrosis tumoral alpha
- T-PEM Macrófagos peritoneales de ratones portadores de tumor mamario
- U Unidades
- Xg Centrifugación relativa
- $\mu$ g microgramos
- $\mu$ M Micromoles

**Gráfica 1. Tipos de Neoplasias malignas en los pacientes con líquido de ascitis.**



LLC=Leucemia Linfocítica Crónica

**TABLA 1. Cuantificación de proteínas de las muestras purificadas de líquido de ascitis de los pacientes con neoplasias malignas.**

No DE MUESTRA	Tipo de neoplasia maligna	Iniciales del Paciente	ABS (750 nm)	Concentración ( $\mu\text{g}$ ) (en 30 $\mu\text{L}$ de Muestra)
1	CPD	RNJ	0,2372	13,22
2	Ca Recto	RTCN	0,2149	8,76
3	Ca Mama	ABS	0,2374	13,26
4	Ca Próstata	VGO	0,2118	8,14
5	Ca Gástrico	CRA	0,2002	5,82
6	Ca Ovario	ASE	0,2349	12,76
7	Ca Ovario	CFA	0,2349	12,76
8	Ca Ovario	SZB	0,2419	14,16
9	SR	MOR	0,2588	17,54
10	LLC	RMF	0,2285	11,48
11	Ca Ovario	HAG	0,2071	7,2
12	Ca Gástrico	TBJ	0,2428	14,34
13	CPD	GLR	0,1891	3,6
14	Ca Ovario	MBA	0,2257	10,92
15	Ca Ovario	BOMA	0,1879	3,36
16	CPD	PGML	0,2237	10,52
17	Ca Ovario	MRV	0,2494	15,66
18	Ca Páncreas	GGJ	0,2108	7,94

CPD=Carcinoma primario desconocido. LLC=Leucemia Linfocítica Crónica. SR=Sarcoma Renal

**TABLA 2. Rangos de confiabilidad de las secuencias detectadas por Espectrometría de Masas en las muestras purificadas de líquido de ascitis de los pacientes con neoplasias malignas.**

<b>MUESTRA</b>	<b>Tipo de Neoplasia</b>	<b>No. de Péptidos con confiabilidad de 30-96%</b>	<b>Secuencias repetidas en diferentes muestras con alta confiabilidad (45% - 96%)</b>
1	CPD	3	0
2	Ca Recto	15	(SEQ-16, SEQ-18)
3	Ca Mama	18	(SEQ-15)
4	Ca Próstata	17	(SEQ-1, SEQ-2)
5	Ca Gástrico	16	(SEQ-19, SEQ-20)
6	Ca Ovario	31	(SEQ-11,SEQ-12,SEQ-13,SEQ-14 SEQ-16,SEQ-18)
7	Ca Ovario	18	0
8	Ca Ovario	13	(SEQ-15)
9	SR	19	(SEQ-22)
10	LLC	16	(SEQ-5,SEQ-6,SEQ-7,SEQ-8 SEQ-9,SEQ-10)
11	Ca Ovario	16	(SEQ-4, SEQ-11, SEQ-17)
12	Ca Gástrico	18	(SEQ-17,SEQ-19,SEQ-20 SEQ-21,SEQ-22)
13	CPD	35	(SEQ-2,SEQ-3,SEQ-4,SEQ-5 SEQ-6,SEQ-7,SEQ-8 SEQ-9,SEQ-10)
14	Ca Ovario	7	0
15	Ca Ovario	20	0
16	CPD	16	(SEQ-3, SEQ-4)
17	Ca Ovario	32	(SEQ-11, SEQ-12, SEQ-13, SEQ-14)
18	Ca Páncreas	4	(SEQ-1)

CPD=Carcinoma primario desconocido. LLC=Leucemia Linfocítica Crónica. SR=Sarcoma Renal

SEQ=Secuencia

**TABLA 3. Secuencias de las muestras purificadas de líquido de ascitis de los pacientes con neoplasias malignas con Confiabilidad de Identificación por Espectrometría de masas mayor al 70%.**

<b>MUESTRA</b>	<b>Tipo de Neoplasia</b>	<b>Secuencias obtenidas con confiabilidad &gt;70%</b>
1	CPD	-
2	Ca Recto	SEQ-18
3	Ca Mama	-
4	Ca Próstata	SEQ-1
5	Ca Gástrico	SEQ-19, SEQ-20
6	Ca Ovario	-
7	Ca Ovario	-
8	Ca Ovario	-
9	SR	-
10	LLC	SEQ-6, SEQ-8, SEQ-9
11	Ca Ovario	-
12	Ca Gástrico	-
13	CPD	-
14	Ca Ovario	-
15	Ca Ovario	-
16	CPD	SEQ-4
17	Ca Ovario	-
18	Ca Páncreas	-

CPD=Carcinoma primario desconocido. LLC=Leucemia Linfocítica Crónica. SR=Sarcoma Renal

SEQ=Secuencia

**TABLA 4. Confiabilidad de identificación máxima de las secuencias obtenidas por Espectrometría de Masas en las muestras purificadas de líquido de ascitis de los pacientes con neoplasias malignas.**

SECUENCIAS	No. de Aminoácidos	Confiabilidad de Identificación
SEQ-1	(7 aa)	95.90%
SEQ-2	(8 aa)	65.90%
SEQ-3	(8 aa)	65.80%
SEQ-4	(8 aa)	70.60%
SEQ-5	(9 aa)	68.10%
SEQ-6	(8 aa)	74.20%
SEQ-7	(8 aa)	66.50%
SEQ-8	(8 aa)	74.10%
SEQ-9	(8 aa)	73.30%
SEQ-10	(8 aa)	65.90%
SEQ-11	(5 aa)	61.20%
SEQ-12	(5 aa)	60.70%
SEQ-13	(5 aa)	61.20%
SEQ-14	(5 aa)	60.10%
SEQ-15	(6 aa)	69.50%
SEQ-16	(11 aa)	59.30%
SEQ-17	(10 aa)	58.50%
SEQ-18	(11 aa)	72.00%
SEQ-19	(6 aa)	80.20%
SEQ-20	(6 aa)	70.70%
SEQ-21	(10 aa)	63.60%
SEQ-22	(6 aa)	65.50%

SEQ=Secuencia. aa=Aminoácido

**TABLA 5. Identificación de las secuencias repetidas entre las neoplasias malignas.**

SECUENCIAS	Aminoácidos	REPETIDAS EN:		
SEQ-1	(7 aa)	MUESTRA 4 (Ca Próstata)	MUESTRA 18 (Ca Páncreas)	
SEQ-2	(8 aa)	MUESTRA 4 (Ca Próstata)	MUESTRA 13 (Prim Desc)	
SEQ-3	(8 aa)	MUESTRA 13 (Prim Desc)	MUESTRA 16 (Prim Desc)	
SEQ-4	(8 aa)	MUESTRA 13 (Prim Desc)	MUESTRA 16 (Prim Desc)	MUESTRA 11 (Ca Ovario)
SEQ-5	(9 aa)	MUESTRA 13 (Prim Desc)	MUESTRA 10 (LLC)	
SEQ-6	(8 aa)	MUESTRA 13 (Prim Desc)	MUESTRA 10 (LLC)	
SEQ-7	(8 aa)	MUESTRA 13 (Prim Desc)	MUESTRA 10 (LLC)	
SEQ-8	(8 aa)	MUESTRA 13 (Prim Desc)	MUESTRA 10 (LLC)	
SEQ-9	(8 aa)	MUESTRA 13 (Prim Desc)	MUESTRA 10 (LLC)	
SEQ-10	(8 aa)	MUESTRA 13 (Prim Desc)	MUESTRA 10 (LLC)	
SEQ-11	(5 aa)	MUESTRA 17 (Ca Ovario)	MUESTRA 6 (Ca Ovario)	
SEQ-12	(5 aa)	MUESTRA 17 (Ca Ovario)	MUESTRA 6 (Ca Ovario)	
SEQ-13	(5 aa)	MUESTRA 17 (Ca Ovario)	MUESTRA 6 (Ca Ovario)	
SEQ-14	(5 aa)	MUESTRA 17 (Ca Ovario)	MUESTRA 6 (Ca Ovario)	
SEQ-15	(6 aa)	MUESTRA 8 (Ca Ovario)	MUESTRA 3 (Ca Mama)	
SEQ-16	(11 aa)	MUESTRA 6 (Ca Ovario)	MUESTRA 2 (Ca Recto)	
SEQ-17	(10 aa)	MUESTRA 11 (Ca Ovario)	MUESTRA 12 (Ca Gástrico)	
SEQ-18	(11 aa)	MUESTRA 6 (Ca Ovario)	MUESTRA 2 (Ca Recto)	
SEQ-19	(6 aa)	MUESTRA 5 (Ca Gástrico)	MUESTRA 12 (Ca Gástrico)	
SEQ-20	(6 aa)	MUESTRA 5 (Ca Gástrico)	MUESTRA 12 (Ca Gástrico)	
SEQ-21	(10 aa)	MUESTRA 12 (Ca Gástrico)	MUESTRA 11 (Ca Ovario)	
SEQ-22	(6 aa)	MUESTRA 12 (Ca Gástrico)	MUESTRA 9 (Sarcoma Renal)	

SEQ=Secuencia. LLC=Leucemia Linfocítica Crónica. aa=Aminoácido

**TABLA 6. Proteínas alineadas con las secuencias repetidas obtenidas de las muestras purificadas de líquido de ascitis de los pacientes con neoplasias malignas.**

No. DE IDENTIFICACIÓN DE LA SECUENCIA	PROTEINAS ALINEADAS
SEQ-1	NI
SEQ-2	aminopeptidase P-like metallopeptidase
SEQ-3	homeobox protein ceh-14
SEQ-4	secretogranin V
SEQ-5	NI
SEQ-6	peroxisomal biogenesis factor 3
SEQ-7	type I restriction enzyme
SEQ-8	IS21 ATP-binding protein
SEQ-9	ribosomal protein S20
SEQ-10	ribosomal protein L29
SEQ-11	NI
SEQ-12	NI
SEQ-13	NI
SEQ-14	NI
SEQ-15	NI
SEQ-16	homeobox protein ceh-34
SEQ-17	disintegrin and metallopeptidase domain 18
SEQ-18	NI
SEQ-19	NI
SEQ-20	NI
SEQ-21	electron transfer flavoprotein
SEQ-22	NI

SEQ=Secuencia. NI= No Identificada

## BIBLIOGRAFÍA

- Ai KX, Lu LY, Huang XY, et al Prognostic significance of S100A4 and vascular endothelial growth factor expression in pancreatic cancer World J Gastroenterol. 2008 Mar 28;14(12):1931-1935
- Aso H, Tamura K, Rose MT, Tomioka Y, Mizugaki M, Ishida N. Effect of alpha 1-acidic glycoprotein in the ascitic fluid of cancer patients on human NK cells. selective suppression of interferon-induced NK activation. Inflammation. 1999 Apr;23(2):117-29.
- Baskic D, Acimovic L, Samardzic G, Djurdjevic P, Djukic A, Arsenijevic NN. The altered activation state of macrophages isolated from ascitic fluid of patients with peritoneal carcinomatosis. Archive of Oncology. 2000;8(3):99-103
- Baskic D, Acimovic L, Samardzic G, Vujanovic NL, Arsenijevic NN Blood monocytes and tumor-associated macrophages in human cancer differences in activation levels. Neoplasma. 2001;48(3):169-74.
- Baskic D, Acimovic L, Djukic A, Djurdjevic P, Popovic S, Milicic B, Labovic I, Arsenijevic NN. Phagocytic activity and nitric oxide production of circulating polymorphonuclear leukocytes from patients with peritoneal carcinomatosis. Acta Oncol. 2003;42(8):846-51
- Beckerman KP, Rogers HW, Corbett JA, Schreiber RD, McDaniel ML, Unanue ER. Release of nitric oxide during the T cell-dependent pathway of macrophage

activation. Its role in resistance to *Listeria monocytogenes*. *J Immunol* 1993; 150: 888.

- Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Berton S, Lovat F, Wolf K, Canzonieri V, D'Andrea S, Zucchetto A, Friedl P, Colombatti A, Baldassarre G. Stathmin activity influences sarcoma cell shape, motility, and metastatic potential. *En prensa*
- Bluff J, Brown N, Reed M and Staton C. Tissue factor, angiogenesis and tumour progression. *Breast Cancer Research*. 2008(10);204.1-10
- Bole GG Jr, Jourdian GW, Wright JE, 1975 Isolation and chemical characterization of a granuloma glycoprotein that inhibits macrophage phagocytosis. *J Lab Clin Med*. 1975 Dec;86(6):1018-31.
- Boockvar KS, Granger DL, Poston RM, Maybody M, Washington MK, Hibbs JB, Kurlander RL. Nitric oxide produced during murine listeriosis is protective. *Infect Immun*. 1994; 62: 1089.
- Botti C, Seregni E, Ferrari L, Martinetti A, Bombardieri E. Immunosuppressive factors. role in cancer development and progression. *Int J Biol Markers*. 1998 Apr-Jun;13(2):51-69.
- Bruno R, Olivares R, Berille J, Chaikin P, Vivier N, Hammershaimb L, Rhodes GR, Rigas JR, 2003 Alpha-1-acid glycoprotein as an independent predictor for treatment effects and a prognostic factor of survival in patients with non-small cell lung cancer treated with docetaxel. *Clin Cancer Res*. 2003 Mar;9(3):1077-82.
- Castronovo V, Kusaka M, Chariot A, et al. Homeobox genes. potential candidates for the transcriptional control of the transformed and invasive phenotype. *Biochem Pharmacol*. 1994 Jan 13;47(1):137-143

- Cavalli LR, Man YG, Schwartz AM, et al. Amplification of the BP1 homeobox gene in breast cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2008 Nov;187(1):19-24
- Cebollero-Presmanes M (2004). Estudio de la historia natural de los carcinomas pulmonares no microcíticos con diferenciación neuroendocrina oculta memoria. tesis de doctorado, departamento de Anatomía Patológica, Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Medicina. ISBN: 84-669-2807
- Chan J, Tanaka K, Carrol D, Flynn J, Bloom BR, 1995. Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Murine Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 1995; 63: 736.
- Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR, 1992. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J. Exp. Med.* 1992; 175. 1111.
- Croci DO, Zacarias Fluck MF, Rico MJ, Matar P, Rabinovich GA, Scharovsky OG. Dynamic cross-talk between tumor and immune cells in orchestrating the immunosuppressive network at the tumor microenvironment. *Cancer Immunol Immunother.* 2007 Nov;56(11):1687-700.
- Denis M and Ghadirian E, 1992. Activated mouse macrophages kill *Entamoeba histolytica* trophozoites by releasing reactive nitrogen intermediates. *Microb. Pathog.* 1992, 12:193-198.
- Di Napoli MR, Calderon CL, Lopez DM, 1993. The altered tumoricidal capacity of macrophages isolated from tumor-bearing mice is related to reduce expression of the inducible nitric oxide synthase gene. *J Exp Med.* 1996 Apr 1,183(4).1323-9.

- Di Napoli MR, Torroella-Kouri M, Perry G, Lopez DM, 2005. Diminished PKC activity and decreased binding of transcription factors are involved in the impaired production of nitric oxide by macrophages from tumor-bearing mice. *Int J Mol Med.* 2005 Mar;15(3):503-11.
- Doi K, Akaike T, Horie H, Noguchi Y, Fujii S, Beppu T, Ogawa M, Maeda H, 1996. Excessive production of nitric oxide in rat solid tumor and its implication in rapid tumor growth. *Cancer* 1996 Apr 15;77(8 Suppl):1598-604.
- Ebert EC, Roberts AI, Devereux D, Nagase H, 1990. Selective immunosuppressive action of a factor produced by colon cancer cells. *Cancer Res.* 1990 Oct 1;50(19):6158-61.
- Eisenthal A, Barbarsteyn E, Gitstein G, Lifschitz-Mercer B. Inhibition of lymphokine-activated killer cells generation in vitro by soluble factors released from mixed human tumor and peripheral blood mononuclear adherent cells culture. *Cancer Invest.* 2006 Feb;24(1):28-34
- Elg SA, Mayer AR, Carson LF, Twiggs LB, Hill RB, Ramakrishnan S. Alpha-1 acid glycoprotein is an immunosuppressive factor found in ascites from ovarian carcinoma. *Cancer* 1997 Oct 15;80(8):1448-56.
- Fujii M, Takahashi N, Hayashi H, Matsunaga K, Yoshikumi C, 1987 Purification and characterization of immunosuppressive (IS) substance obtained from ascitic fluids of patients with gastrointestinal cancer *Clin Biochem.* 1987 Jun;20(3):183-189.

- Goldstone SD, Lavin MF. Isolation of a cDNA clone, encoding the ribosomal protein S20, downregulated during the onset of apoptosis in a human leukaemic cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993 Oct 29;196(2):619-623
- González-Garza MT, Palacios-Corona R, Ortiz-Navarrete V, Castro-Garza J, Said-Fernández S, 2000. The macrophage-activation inhibitory factor (MAIF) from L5178Y murine lymphoma favors experimental amebic hepatic abscess development in Balb/c mice. *Arch Med Res.* 2000 Jul-Aug;31(4 Suppl):S104-5
- Gotloib L, Shostak A. The functional anatomy of the peritoneum as a dialyzing membrane. In Twardowski ZJ, Nolph KD, Khanna R (eds): *Contemporary Issues in Nephrology, Vol 22. Peritoneal Dialysis: New Concepts and Applications.* New York 1990; 1-29
- Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem.* 1982 Oct;126(1):131-8
- Gregory SH; Wing EJ, Hoffman RA, Simmons RL, 1993 Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to *Listeria*. *J Immunol.* 1993; 150:2901.
- Hageman T, Robinson SC, Thompson RG, et al. Ovarian cancer cell-derived migration inhibitory factor enhances tumor growth, progression and angiogenesis. *Mol Cancer Ther* 2007 Jul;6(7):1993-2002
- Hassan R, Bera T, Pastan I. Mesothelin. A new target for immunotherapy *Clin Can Res.* 2004 Jun 15;(10):3937-3942

- Hassan R, Ho M. Mesothelin targeted cancer immunotherapy. *Eur J Cancer* 2008 Jan; 44(1): 46-53
- Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM, 1988. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988 Nov 30;157(1):87-94.
- Hibbs JB, Taintor RR, Vavrin Z, 1987a. Macrophage Cytotoxicity Role for L-arginine Deiminase and Imino Nitrogen Oxidation to Nitrite. *Science* 1987; 235:473
- Hibbs JB, Vavrin Z, Taintor RR, 1987b. L-arginine is Required for Expression of the Activated Macrophage Effector Mechanism Causing Selective Metabolic Inhibition in Target Cells. *J. Immunol.* 1987; 138: 550.
- Honda M, et al. Matrix metalloproteinases-7 expression in gastric carcinoma. *Gut* 1996; 39: 444-8.
- Horikawa M, Kurokawa M, Hotta K, 1969. Alpha 1-acid glycoprotein. I. Isolation and purification of alpha 1-acid glycoprotein in the ascitic fluid of human stomach cancer. *Seikagaku.* 1969 Oct;41(10):717-21.
- Hotta K, Horikawa M, Kurokawa M, 1970. Purification and characterization of alpha 1-acid glycoprotein from ascitic fluid. *Anal Biochem.* 1970 Feb;33(2):463-8.
- Iyengar RD, Stuehr DJ, Marletta MA, 1987 Macrophage Synthesis of Nitrite, Nitrate and N-nitrosamines: Precursors and Role of the Respiratory Burst. *Proc. Natl. Academ. Sci. USA.* 1987; 84 6369

- Jonscher KR. Validating sequence assignments for peptide fragmentation patterns. A primer in MS/MS sequence identification. 2005 Jun. Proteome Software Inc pp. 1-28
- Jungst D, Xie Y, Gerbes AL. Pathophysiology of elevated ascites fluid cholesterol in malignant ascites. Increased ascites to serum relation of proteins and lipoproteins in patients with peritoneal carcinomatosis as compared to patients with cirrhosis of the liver. *J Hepatol* 1992, 14(2-3):244-248
- Koseki H, Shiiba K, Suzuki Y, Asanuma T, Matsuno S. Enhanced expression of lipocortin-1 as a new immunosuppressive protein in cancer patients and its influence on reduced in vitro peripheral blood lymphocyte response to mitogens. *Surg Today* 1997;27(1):30-9
- Krishnan L, Kinsky R, Chaouat G, Talwar GP, Raghupathy R, 1993 Suppression of local and systemic GVHR by supernatants from human choriocarcinoma cell lines. *Cell Immunol* 1993 Sep;150(2):376-81
- Krishnan L, Menu E, Chaouat G, Talwar GP, Raghupathy R, 1991a. In vitro and in vivo immunosuppressive effects of supernatants from human choriocarcinoma cell lines. *Cell Immunol*. 1991 Dec;138(2):313-25.
- Krishnan L, Sad S, Raghupathy R, 1995. Characterization of an immunosuppressive factor secreted by a human trophoblast-derived choriocarcinoma cell line. *Cell Immunol*. 1995 May;162(2):295-308.
- Lagadec P, Raynal S, Lieubeau B, Onier N, Arnould L, Saint-Giorgio V, Lawrence DA, Jeannin JF Evidence for control of nitric oxide synthesis by intracellular

transforming growth factor-beta1 in tumor cells. Implications for tumor development. *Am J Pathol.* 1999 Jun;154(6):1867-76.

- Lee SY, Lim JW, Kim YM, 2001. Effect of alpha1-acid glycoprotein expressed in cancer cells on malignant characteristics. *Mol Cells.* 2001 Jun 30;11(3):341-5
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951 Nov;193(1):265-75
- Luo JS, Kammerer R, Schultze H, von Kleist S, 1997. Modulations of the effector function and cytokine production of human lymphocytes by secreted factors derived from colorectal-carcinoma cells. *Int J Cancer.* 1997 Jul 3;72(1):142-8.
- Luo JS, Kammerer R, von Kleist S. 2000b. Comparison of the effects of immunosuppressive factors from newly established colon carcinoma cell cultures on human lymphocyte proliferation and cytokine secretion. *Tumour Biol.* 2000 Jan-Feb;21(1):11-20.
- Mantovani G, Maccio A, Versace R, Pisano M, Lai P, Esu S, Ghiani M, Dessi D, Turnu E, Santona MC, et al. Tumor-associated lymphocytes (TAL) are competent to produce higher levels of cytokines in neoplastic pleural and peritoneal effusions than those found in sera and are able to release into culture higher levels of IL-2 and IL-6 than those released by PBMC. *J Mol Med.* 1995 Aug;73(8):409-16
- Mantovani G, Maccio A, Massa E, Lai P, Manca G, Mudu C, Versace R, Pusceddu G. Relationships between Fas expression, activation molecule CD25, and functional activity of tumor-associated lymphomonocytes from neoplastic effusions. *Oncol Rep.* 1999 Jan-Feb;6(1):235-9.

- Markert UR, Chaouat G, 1997. Preliminary characterization of an immunosuppressive inducer factor secreted by the JEG-3 choriocarcinoma cell line: in vitro and in vivo studies. *Am J Reprod Immunol*. 1997 Nov;38(5):327-38.
- McIntosh LC, Morrice LM, Udagawa Y, Thomson AW. Influence of tumour carriage on the production of lymphokines affecting macrophage behaviour. *Immunology*. 1986 Mar;57(3):359-65.
- Melichar B, Nash MA, Lenzi R, Platsoucas CD, Freedman RS Expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 and their receptors CD28, CTLA-4 on malignant ascites CD3<sup>+</sup> tumour-infiltrating lymphocytes (TIL) from patients with ovarian and other types of peritoneal carcinomatosis. *Clin Exp Immunol*. 2000 Jan;119(1):19-27.
- Miyata H, Himeno K, Miake S, Nomoto K, 1981 Alterations of host resistance to *Listeria monocytogenes* in tumour-bearing mice and the effect of *Corynebacterium parvum*. *Immunology* 1981;44:305-10.
- Morvillo V, Bover L, Mordoh J. Identification and characterization of a 14 kDa immunosuppressive protein derived from IIB-MEL-J, a human melanoma cell line. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*. 1996 Jul;42(5):779-95.
- Muminova ZE, Strong TV, Shaw DR. Characterization of human mesothelin transcripts in ovarian and pancreatic cancer *BMC Cancer* 2004 May;4(19):1-10
- Nathan CF and Hibbs JB. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Current Opinion in Immunol*. 1991; 365-70.
- Öberg K, Eriksson B. Endocrine tumours of the pancreas. *Best Practice of Research Clinical Gastroenterology* 2005; 19( 5): 753- 81

- Oh SK, Moolten FL. Purification and characterization of an immunosuppressive factor from ovarian cancer ascites fluid. *Eur J Immunol.* 1981 Oct;11(10):780-8.
- Olopade OI and Ultmann JE. Malignant effusions. *Cancer J Clin.* 1991;41:166-179
- Ortiz N, 2000. Infectious and metabolic nervous system complications of systemic cancer. *Rev Neurol.* 2000 Dec 16-31;31(12):1252-6.
- Palacios-Corona Rebeca, Ortiz-Navarrete Vianney, Castro Garza Jorge, Said-Fernández Salvador, Moreno Cuevas Jorge, Guzmán-Delgado Nancy and González Garza MT. A macrophage- activation inhibitor factor produced by L5178Y murine lymphoma (MAIF) allows *Listeria monocytogenes* to form hepatic abscesses in Balb/c mice. En Prensa.
- Palacios-Corona R, Ortiz-Navarrete VF, Said-Fernández S, Rodríguez-Padilla C, González-Garza MT, 1999. Detection of a factor released by L5178Y lymphoblasts that inhibits mouse macrophage-activation induced by lipopolysaccharides. *Arch Med Res.* 1999 Jul-Aug;30(4):298-302.
- Palacios-Corona R, Ortiz-Navarrete V, Castro-Garza J, Said-Fernandez S, Moreno-Cuevas J, Guzmán-Delgado N, González-Garza MT Macrophage-activation inhibitor factor from 5178Y murine lymphoma and formation of hepatic abscesses in BALB/c mice. *Arch. Med. Res:* 37(4):474-8; 2006
- Pedraza-Fariña L. Mechanism of oncogenic cooperation in cancer initiation and metastasis. *Yale J Biol Med Dic* 2006 79(3-4):95-103
- Posadas EM, Simpkins F, Liotta LA, MacDonald C, Kohn EC. Proteomic analysis for the early detection and rational treatment of cancer – realistic hope? *Ann Onc.* 2005;16:16-22

- Rabinovich GA, Gabrilovich D, Sotomayor EM. Immunosuppressive strategies that are mediated by tumor cells. *Annu Rev Immunol* 2007;25:267-96.
- Robbins. *Pathologic basis of disease*. 6<sup>th</sup> Edition. W.B. Saunders Co. pp. 841-842
- Roitt, Brostoff, Male, 2001a. *Immunology*. 6<sup>th</sup> Edition. Harcourt Publisher Limited pp 300-301
- Roitt, Brostoff, Male, 2001b. *Immunology*. 6<sup>th</sup> edition. Harcourt Publisher Limited pp.147
- Roitt, Brostoff, Male, 2001c. *Immunology*. 6<sup>th</sup> Edition. Harcourt Publisher Limited pp157-160.
- Salerno F, Restelli B, Incerti P et al. Utility of ascitic fluid analysis in patients with malignancy-related ascites. *Scand J Gastroenterol* 1990;25(3):251-256
- Scherpereel A, Grigoriu B, Conti M, et al. Soluble Mesothelin-related peptides in the diagnosis of malignant pleural mesothelioma. *Am J Respir Crit Care Med*. 2006 Feb; 173(2):1155-1160
- Schwartz SI, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fischer JE, Galloway AC *Principles of surgery*. 1999. The McGraw-Hill Co, Inc.
- Segal AW, 1989. The Electron Transport Chain of the Microbiological Oxidase of Phagocytic Cells and its Involvement in the Molecular Pathology of Chronic Granulomatous Disease. *J Clin. Invest*. 1989; 83. 1785.
- Sibley L, Wedner E, Krahenbuhl J, 1985. Phagosome Acidification Blocked by Intracellular *Toxoplasma gondii*. 1985; 315. 416.

- Somers SS, Dye JF, Guillou PJ, 1990. Comparison of transforming growth factor beta and a human tumor-derived suppressor factor. *Cancer Immunol Immunother.* 1991;33(4):217-22.
- Stetler-Stevenson WG, et al. Tumor cell interactions with extracellular matrix during invasion and metastasis. *Ann Rev Cell Biol* 1993, 9: 541-73
- Stuehr DJ, Marleta MA, 1985. Mammalian Nitrate Biosynthesis: Mouse Macrophages Produce Nitrite and Nitrate in Response to Escherichia coli Lipopolysacchride. 1985;82. 7738
- Stuehr DJ, Marleta MA, 1987 Induction of Nitrite/ Nitrate Synthesis in Murine Macrophages by BCG Infection, Lymphokines, or Interferon-. *J. Immunol.* 1987, 139: 518.
- Swann JB, Smyth MJ Immune surveillance of tumors. *J Clin Invest.* 2007 May;117(5):1137-46.
- Szuro-Sudol A, Murray HW, Nathan CF 1983 Suppression of macrophage antimicrobial activity by a tumor cell product. *J Immunol.* 1983, 131.384-387
- Takeuchi H, Maehara Y, Tokunaga E, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K Prognostic value of preoperative immunosuppressive acidic protein levels in patients with gastric carcinoma. *Hepatogastroenterology* 2003 Jan-Feb;50(49):289-92.
- Tamsma JT, Keizer HJ and Meinders AE. Pathogenesis of malignant ascites: Starling's law of capillary hemodynamics revisited. *Ann Onco.* 2001,12:1353-1357
- Tamura K, Shibata Y, Matsuda Y, Ishida N, 1981. Isolation and characterization of an immunosuppressive acidic protein from ascitic fluids of cancer patients. *Cancer Res.* 1981 Aug;41(8):3244-52.

- Urzua-González AR. (2007). Identificación de la actividad inmunosupresora del líquido de ascitis de pacientes con neoplasias primarias mediante la inhibición de la producción de Óxido Nítrico por células mononucleares de sangre periférica. Tesis de Especialidad en Medicina Interna, Universidad de Monterrey e Instituto Mexicano del Seguro Social. Monterrey N. L., México.
- Verma M, Wright Jr, Hanash SM et al. Proteomic approaches within the NCI early detection research network for the discovery and identification of cancer biomarkers. *Ann N Y Acad Sci* 2001;945: 103-115.
- Walker MT, Burger JC, Elgert EK, 1994. Tumour Growth Alters T Cell and Macrophage Production of and Responsiveness to Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor: Partial Dysregulation through Interleukin-10. *Cell. Immunol.* 1994; 154:343
- Wang RD, Chen ZC, Luo Y, Feng ZH, 1989a. Biologic characteristics of an immunosuppressive factor derived from a human lung cancer cell line. *J Tongji Med Univ.* 1989;9(3):129-33
- Wang RD, Feng ZH, Luo Y, Chen ZC, 1989b. Investigation on the inhibitory effect of tumor-derived immunosuppressive factor(s) on T lymphocyte proliferation. *J Tongji Med Univ* 1989;9(3):139-42.
- Wang RD, Luo Y, Feng ZH, Chen ZC, 1990. Effect of tumor-derived immunosuppressive factor(s) on interleukin 2 and on expression of interleukin 2 receptor. *J Tongji Med Univ* 1990;10(1):43-7.
- Wang X, Deavers M, Patenia R, Bassett RL Jr, Mueller P, Ma Q, Wang E, Freedman RS. Monocyte/macrophage and T-cell infiltrates in peritoneum of

patients with ovarian cancer or benign pelvic disease. *J Transl Med.* 2006 Jul 6;4:30.

- Wojtowicz-Praga S. Reversal of tumor-induced immunosuppression by TGF-beta inhibitors. *Invest New Drugs.* 2003 Feb;21(1):21-32.
- Yang L, Mashima T, Sato S et al. Predominant suppression of apoptosome by inhibitor of apoptosis protein in non-small cell lung cancer H460 cells. therapeutic effect of a novel polyarginine-conjugated Smac peptide. *Cancer Res.* 2003 Feb 63(4):831-837
- Yoon SO, Park SJ, Yun CH, Chung AS. Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. *J Biochem Mol Biol.* 2003 Jan 31;36(1):128-137.
- Yoshino I, Yano T, Miyamoto M, Yamada K, Kajii Y, Onodera K, Ishida T, Sugimachi K, Kimura G, Nomoto K, 1993. Characterization of lung squamous cell carcinoma-derived T-cell suppressive factor. *Cancer* 1993 Oct 15;72(8):2347-57.
- Yurochko AD, Askew D, Burger CJ and Elgert KD, 1990a. Normal and tumour-bearing host splenic macrophage responses to lipopolysaccharide. *Immunol. Invest* 1990; 19: 41
- Yurochko AD, Burger CJ and Elgert KD, 1990b. Tumour modulation of autoreactivity: decreased macrophage and autoreactive T cell interactions. *Cell Immunol* 1990; 127: 105.
- Zembala M, Ptak W, Hanczakowska M The role of macrophages in the cytotoxic killing of tumor cells in vitro. I. Primary immunization of lymphocytes in vitro for

target cell killing and the mechanism of lymphocyte-macrophage cooperation. Immunology. 1973 Oct;25(4):631-44.

- Zhou JW, Cheng Q, Xie X, Chen HZ, Ye DF, Lu WG. [Relationship between interleukin-10 level in ascites of patients with primary ovarian epithelial carcinoma and immune defect in peritoneal cavity] Ai Zheng. 2004 May;23(5):573-6.
- Zou JP, Morford LA, Chougnet C, Dix AR, Brooks AG, Torres N, Shuman JD, Coligan JE, Brooks WH, Roszman TL, Shearer GM, 1999. Human glioma-induced immunosuppression involves soluble factor(s) that alters monocyte cytokine profile and surface markers. J Immunol. 1999 Apr 15;162(8):4882-92.