

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Inducción de una molécula de ~ 25 kDa por efecto del líquido ascítico en líneas celulares de cáncer de ovario”

Tesis que presenta

Q.B.P. Alfredo Toledo Leyva

**para obtener el Grado de
Maestro en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular**

Directora de la tesis: Dra. Patricia Talamás Rohana

México, Distrito Federal

Agosto del 2013

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Patricia Talamás Rohana** por permitirme trabajar y aprender bajo su tutoría y sobre todo por sus valiosos consejos que me han ayudado a ver y comprender el mundo de la investigación de una manera extraordinaria durante mi formación.

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por su apoyo y observaciones que fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo.

A la **Dra. Dolores Gallardo Rincón**, porque gracias a su apoyo y colaboración hemos podido realizar este trabajo conjuntando la ciencia básica con la ciencia aplicada.

A la **Q.B.P. Elizabeth Hernandez Nava** por todo el apoyo, los consejos y las discusiones acerca de los acontecimientos biológicos que me han permitido crecer y avanzar.

Al **CONACyT** por favorecerme con el apoyo económico (número de beca: 324255) para la realización de mis estudios de Maestría en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Al grupo de trabajo de la **Dra. Patricia Talamás**: **M. en C. Olga Lilia Garibay Cerdenares**, **M. en C. Carlos Osorio Trujillo**, **Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez**, **M. en C. Julio César Villegas Pineda**, **M. en C. Mayra Herrera Martínez**, **M. en C. Luilli López Contreras**, **M. en C. Luis Alberto Estrada Figueroa**, **Dr. José Alfredo Díaz Gandarilla** y **Tec. en Investigación Belem de Luna Vergara**.

A **María Elena Cisneros Albavera** e **Irma Edith Miranda Orea** por el apoyo secretarial brindado.

DEDICATORIAS

A **Dios**, por darme la oportunidad de vivir esta maravillosa experiencia de aprendizaje y permitir que las investigaciones científicas dejen conocer la grandeza y majestuosidad de este mundo.

A mi madre **Clemencia Leyva Jiménez**, la persona más increíble que he podido conocer y lograr inspirarme día con día, llenándome de amor, cariño, fortaleza y bondad para seguir adelante. Por ser padre y madre a la vez enseñándome las mejores cosas de la vida.

A mis hermanos: **Manue, Ángel, Nico, Clemen, Jesús y Vix**, porque cada uno de ustedes representa un mundo diferente permitiéndome aprender de sus experiencias y brindándome una familia maravillosa y única.

A mis sobrinas: **Ximena, Nicole, Camila, Ileana, Elvira y Alisson**, mis princesas, que me han mostrado la bondad e inocencia del ser humano.

A mis abuelitos **Manuela y Nicolás** y a mis tíos **Sigifredo y Magdalena**, por todo el cariño y la confianza depositada en mi y por su apoyo incondicional.

A **Elizabeth**, por ser la persona que hace que con su cariño y amor me sienta renovado y con ganas de seguir adelante y afrontar nuevos retos. Por ser parte de mi vida y dejarme formar parte de la tuya.

ABREVIATURAS

b-FGF	Factor Básico de Crecimiento de Fibroblastos
CaOv	Cáncer de ovario
Dil	Dilución
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetra-acético
F.I.G.O.	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
kDa	kilodaltones
LA	Líquido Ascítico o Ascitis
mg	Miligramos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio
NaF	Fluoruro de Sodio

PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SKOV-3	Línea celular de carcinoma ovárico (ATCC- HTB-77)
TBS-T	Amortiguador Tris-Salino- con Tween 20
TGF α , β	Factor de Crecimiento Transformante alfa y beta
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
vol	Volumen
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros

I. RESUMEN

El cáncer de ovario es una enfermedad con un alto índice de mortalidad en mujeres mayores de 40 años. Una consecuencia secundaria, en etapas avanzadas de esta enfermedad, es la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal originando el líquido ascítico o ascitis. El líquido ascítico que se genera en diversos procesos patológicos es altamente heterogéneo en su composición. En el cáncer de ovario, el líquido ascítico está constituido por una gran cantidad de factores, entre los cuales, algunos serán capaces de inducir diversos procesos oncológicos como sobre-proliferación, invasión y metástasis. El líquido ascítico funciona como un microambiente que favorece la supervivencia de las células transformadas en la mayoría de los casos. La agresividad de las células cancerosas depende en gran medida del microambiente en el que residen. Con el fin de avanzar en el conocimiento del cáncer de ovario y las funciones del líquido ascítico generado en esta patología, es imprescindible conocer los componentes que residen en la ascitis y que permiten mantener la viabilidad celular y además de que propician la inducción de un fenotipo celular más agresivo. La identificación de los componentes del líquido ascítico permitirá proponer moléculas que puedan ser utilizadas como herramientas diagnósticas y/o como blancos terapéuticos. Utilizando la línea celular de cáncer de ovario INCan017 recuperada en nuestro laboratorio, y el fraccionamiento por precipitación con sulfato de amonio saturado, se analiza la inducción de la expresión de una molécula de ~ 25 kDa por efecto del líquido ascítico. Esta molécula se localiza en la región perinuclear y citoplasmática en estructuras de tipo vesicular en las células mantenidas en cultivo y su expresión es inducida por diversos líquidos ascíticos; además la detección de esta molécula en tumores primarios de cáncer de ovario cobra mayor relevancia y sugiere su posible participación en algún proceso oncológico durante la fisiopatología de esta enfermedad.

II. ABSTRACT

Ovarian cancer is a disease with a high mortality rate in women over 40 years old. A secondary consequence, in advanced stages of the disease, is the accumulation of fluid in the peritoneal cavity causing ascites or ascitic fluid. Ascitic fluid generated in various pathological processes is highly heterogeneous in composition. In ovarian cancer ascites is constituted by a number of factors, among them, some will be capable of inducing various cancer processes as over-proliferation, invasion and metastasis. Ascites serves as a microenvironment that favors the survival of transformed cells in most cases. The aggressiveness of cancer cells depends heavily on the microenvironment in which they reside. In order to understand ovarian cancer and ascites functions and development ascites it is essential to identify ascites components that help to maintain cell viability and favor the induction of a more aggressive cell phenotype. Identifying ascites components as biomarkers that can be used as diagnostic tools and / or therapeutic targets are some of our short term goals. By using the ovarian cancer cell line INCan017 recovered in our laboratory and fractionation by precipitation with saturated ammonium sulfate, we detected the induction of expression of a ~ 25 kDa protein of as a result of ascites exposure. This protein is localized in the perinuclear region and in cytoplasmic vesicular structures in cultured cells and its expression is induced by various ascitic fluids. The detection of this molecule in ovarian cancer primary tumors is relevant and suggests a possible participation in the oncogenic process through the pathophysiology of this disease.

INDICE DE CONTENIDO

I. RESUMEN.....	1
II. ABSTRACT.....	2
III. INTRODUCCIÓN.....	5
1. Generalidades.....	5
1.1 Líquido ascítico	
1.1.1 Formación y función	
1.1.2 Relación ascitis-estados patológicos	
1.2 Cáncer Epitelial de ovario	
1.2.1 Generalidades	
1.2.2 Fisiopatología y patogénesis	
1.3 Microambiente del cáncer de ovario	
1.3.1 Microambiente del tumor	
1.3.2 Microambiente de las células presentes en la ascitis	
1.4 Generalidades sobre la regulación de la expresión de moléculas implicadas en cáncer de ovario	
1.5 Líneas celulares de cáncer de ovario	
2. Antecedentes.....	20
2.1 Efecto del líquido ascítico y/o sus componentes sobre líneas celulares de cáncer de ovario	
2.2 Generación de líneas celulares en el laboratorio	
2.3 Anticuerpo Monoclonal 3C10	
IV. JUSTIFICACIÓN.....	24
V. HIPÓTESIS.....	25
VI. OBJETIVOS.....	26
VII. ESTRATEGIA METODOLÓGICA.....	27
VIII. METODOLOGÍA.....	30
IX. RESULTADOS.....	35
X. DISCUSIÓN.....	84
XI. CONCLUSIÓN.....	88
XII. PERSPECTIVAS.....	89
XIII. REFERENCIAS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Representación esquemática del intersticio peritoneal.....	6
Figura 2: Principales tipos histológicos de carcinoma de ovario.....	9
Figura 3: Células epiteliales de la superficie de ovario humano.....	14
Figura 4: Western blots de la reactividad del anticuerpo monoclonal 3C10.....	22
Figura 5: Tratamiento de INCan017 con líquido ascítico de cáncer de ovario.....	36
Figura 6: Perfil proteico del LA y sus fracciones.....	39
Figura 7: Tratamiento de INCan017 con LA y fracciones.....	42
Figura 8: Perfil proteico de extractos de INCan017 y detección de la inducción de la proteína de ~ 25kDa por efecto del LA y las fracciones.....	45
Figura 9: Tratamiento de células INCan017 con el lote No. 1 de líquidos ascíticos.....	50-51
Figura 10: Tratamiento de células INCan017 con el lote No. 2 de líquidos ascíticos.....	54
Figura 11: Tratamiento de INCan017 con el lote No. 3 de líquidos ascíticos.....	57
Figura 12: Tratamiento de células INCan017 con el lote No. 4 de líquidos ascíticos.....	60
Figura 13: Cinética de inducción de la proteína de ~ 25kDa.....	63
Figura 14: SDS-PAGE y Western blot de extractos de células INCan017 tratadas con el lote No. 2 de líquidos ascíticos de CaOv	66
Figura 15: SDS-PAGE y western blot de extractos de células INCan017 tratadas con el lote No. 3.....	69
Figura 16: SDS-PAGE y Western blot de INCan017 tratadas con el lote No. 4.....	71
Figura 17: Inmunolocalización de la proteína de ~ 25 kDa en células INCan017 expuestas a medio o LA33.....	75
Figura 18: Inmunolocalización de la proteína de ~ 25 kDa en células INCan017 tratadas con LA y medio de cultivo.....	77-78
Figura 19: Inmunohistofluorescencia de ~ 25 kDa en cortes histológicos de ovario normal de humano y de tumor de cáncer de ovario.....	81
Figura 20: Acercamiento de una zona positiva para la proteína de ~ 25 kDa en biopsias de cáncer de ovario	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Resumen de resultados de la inducción de la proteína de ~ 25 kDa por efecto de líquidos ascíticos de CaOv.....	73
--	----

I. INTRODUCCIÓN

1. Generalidades

1.1 Líquido ascítico

1.1.1 *Formación y función*

El líquido ascítico (LA) o ascitis se define como la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal. El mecanismo que guía a este proceso de acumulación ha sido estudiado ampliamente durante décadas y la mayoría de los grupos de investigación implicados apoya a la teoría de que el bloqueo de los vasos linfáticos subdiafragmáticos es la principal causa de dicha acumulación. El efecto del bloqueo del drenado del líquido intraperitoneal, que funciona como lubricante en un estado fisiológico, resulta en el desequilibrio del proceso dinámico de la circulación del líquido, favoreciendo así la acumulación de la ascitis. Otro efecto muy notorio es el cambio de la permeabilidad vascular de los vasos que circundan el peritoneo, provocando así una mayor concentración de proteínas en la ascitis, lo cual también dependerá de la patología primaria que originó la acumulación del líquido ascítico (Neal *et al.*, 1987).

La ascitis se clasifica comúnmente en benigna y maligna, según se genere o no secundaria a una carcinomatosis (propagación de un tumor canceroso a diferentes órganos). La ascitis benigna, no asociada a carcinomatosis, presenta características ecográficas como la presencia de anecoica (ecos internos), flujo libre, peritoneo liso y regular, patrón de “la anemona de mar” (asas del intestino delgado con movimiento libre), pared intestinal móvil y delgada. La ascitis maligna, asociada a carcinomatosis posee características ecográficas como anecoica, encapsulado o loculado, peritoneo irregular, asas del intestino delgado apiladas, pared intestinal rígida y engrosada, metástasis ganglionares, peritoneales y hepáticas (Schmidt, 2007). Una excepción a esta clasificación es el síndrome de Meigs, generado por la

tríada de padecimientos como la ascitis, el derrame pleural y un tumor de ovario benigno. Este estado patológico por lo general es tratado con la resección del tumor benigno y la ooforectomía profiláctica (extirpación de uno o ambos ovarios) (Santangelo *et al.*, 2000). En el contexto del cáncer de ovario, se ha generado interés por realizar un estudio exhaustivo de la composición y función de la ascitis maligna, ya que parece poseer factores importantes para el desarrollo de complicaciones severas, como el favorecimiento de metástasis hacia diversos órganos.

En el estado fisiológico, la impermeabilidad capilar a las proteínas provoca la generación de diferencias en la presión oncótica. Aunque los líquidos puedan atravesar relativamente fácil las membranas, la diferencia en presión oncótica generada en la red capilar limita la cantidad de líquido filtrado y evita la formación de edema por reabsorción del fluido desde el espacio intersticial. Se pueden distinguir tres barreras que protegen de un proceso de formación de ascitis: las células endoteliales, el espacio intersticial y las células mesoteliales (Figura 1). Las células endoteliales se encuentran fuertemente unidas a través de uniones estrechas y poseen una gran cantidad de glicocálix extraperitoneal con una fuerte carga aniónica, lo cual provoca la repulsión de la albúmina al ser también aniónica y representar un porcentaje superior al 50% de las proteínas del plasma (Stanojeviæ *et al.*, 2004).

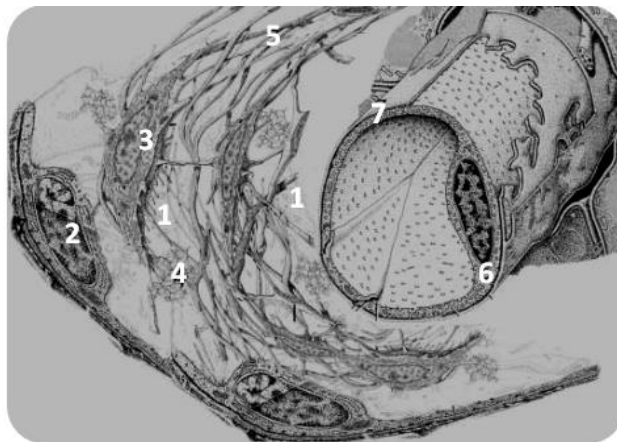


Figura1: Representación esquemática de intersticio peritoneal. 1. Espacio intersticial, 2. Células mesoteliales, 3. Fibrocitos, 4. Proteoglicanos, 5. Fibras de colágeno, 6. Células endoteliales, 7. Lámina basal (Stanojeviæ *et al.*, 2004).

Entre los vasos linfáticos y sanguíneos y el peritoneo se encuentra el espacio intersticial, el cual, está compuesto de fibroblastos, colágeno, ácido hialurónico y de macromoléculas cargadas negativamente. El mesotelio es un tejido de recubrimiento de varias cavidades y está formado por una monocapa de células mesoteliales. El mesotelio del peritoneo mide alrededor de dos metros cuadrados. Las células mesoteliales poseen abundantes proteoglicanos cargados negativamente que funcionan igualmente como barrera contra moléculas y macromoléculas cargadas negativamente (Nagy *et al.*, 1993; Stanojeviæ *et al.*, 2004).

Los capilares linfáticos de la cavidad peritoneal se ordenan a manera de un plexo y son los más importantes en el drenado de esta cavidad hacia los vasos linfáticos. Esta red de capilares y vasos son los que comúnmente se observan implicados en la génesis de la ascitis. La obstrucción severa de los vasos linfáticos y el incremento de la permeabilidad vascular y por lo tanto el desequilibrio de la presión oncótica, provocan la generación de la ascitis.

La albúmina se encuentra en proporciones mayoritarias en la ascitis y se han descrito también una importante gama de factores celulares como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor básico de crecimiento de fibroblastos (b-FGF), factor de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α , β), proteínas del complemento, lípidos bio-activos como el ácido lisofosfatídico, entre muchos otros. La presencia de estas moléculas en concentraciones diferentes, posiciona al líquido ascítico como un microambiente altamente heterogéneo según el estado patológico al que esté asociado (Marie *et al.*, 2007).

1.1.2 Relación ascitis-estados patológicos

La ascitis representa, en todos los casos, una respuesta secundaria a un proceso patológico y se relaciona con diversas enfermedades según sea su

generación: la ascitis benigna puede ser causada como un exudado secundario a una pancreatitis y peritonitis o puede ser un trasudado secundario a insuficiencia cardiaca congestiva, cirrosis hepática e hipoproteinemia. Por el contrario, la ascitis maligna se genera por un trasudado excesivo secundario a una carcinomatosis con presencia de células transformadas suspendidas en este fluido. Conforme avanza el estado patológico también se continúa con un exudado prolongado debido al cambio de la permeabilidad vascular por efecto de diversos factores presentes en el fluido acumulado. La ascitis maligna se genera principalmente en cánceres como el de ovario, pancreático, el gástrico y el de colon.

1.2 Cáncer Epitelial de Ovario

1.2.1 Generalidades

El cáncer de ovario (CaOv) representa del 3 al 5% de los cánceres que afectan a la mujer, sin embargo es la quinta causa más frecuente o común de muerte por cáncer, después del cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer colorectal y cáncer pancreático. La incidencia y la mortalidad del cáncer de ovario se incrementan con la edad. Mujeres mayores de 75 años o más presentan una incidencia de 55.6 % y una mortalidad del 55.2% (Roett *et al.*, 2009).

Entre los diferentes factores de riesgo para padecer cáncer de ovario, se encuentran la nuliparidad, la menarca temprana, la terapia con estrógenos, una historia familiar genética de cáncer de ovario y mutaciones puntuales en los genes BRCA-1 y BRCA-2 que también se encuentran ampliamente implicados en el desarrollo del cáncer de mama (Roett *et al.*, 2009).

El CaOv comprende las diferentes patologías originadas por la transformación de las células que conforman el tejido de recubrimiento del ovario, el mesotelio. Los tipos y características del CaOv, en una clasificación

muy utilizada, depende de las diferentes categorías morfológicas basadas en la apariencia y ultraestructura del epitelio y se clasifican como seroso, mucinoso, endometriode, de células claras, transicional, escamosas, mezcladas e indiferenciadas (Bell, 2005; Kathleen, 2009).

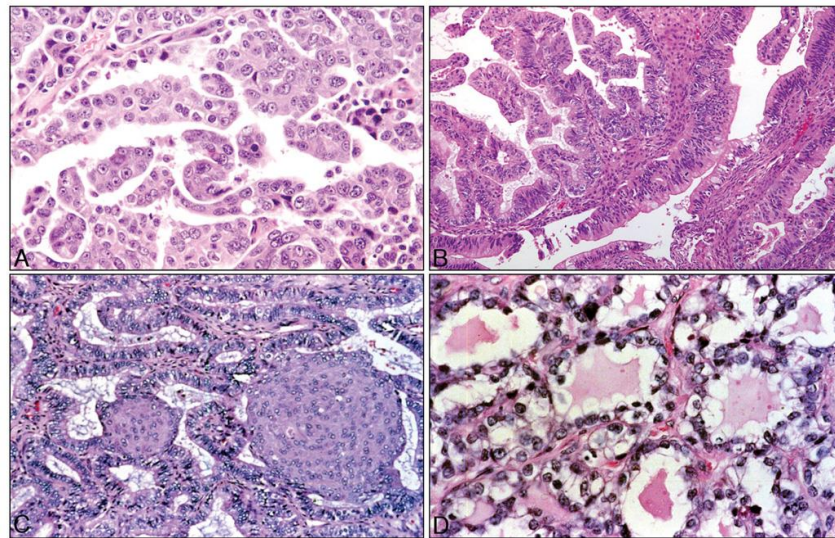


Figura 2: Principales tipos histológicos de carcinoma de ovario. A) Carcinomas serosos) comprenden aproximadamente el 70% de los carcinomas de ovario y frecuentemente albergan mutaciones de TP53. B) Carcinomas mucinosos son raros (aproximadamente 3%) y a menudo albergan mutaciones del gen KRAS. C) Carcinomas endometrioides (\approx 10-15%) tienen mutaciones relativamente frecuentes de CTNNB1, PIK3CA, KRAS y TP53. D) Carcinomas de células claras (\approx 10%) tienen la más alta frecuencia de mutaciones en PIK3CA. Todas las secciones se tiñeron con hematoxilina y eosina; X200 aumento original (Kathleen, 2009).

Actualmente, en la clasificación de los carcinomas se utiliza un sistema de estadios que fueron diseñados e implementados por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (F.I.G.O.). Los estadios son cuatro y se designan con base en los siguientes criterios:

Estadio I. El tumor está limitado a uno o ambos ovarios.

Estadio II. El tumor se encuentra en uno o ambos ovarios y además se ha extendido a la pelvis.

Estadio III. El tumor puede afectar a uno o ambos ovarios, existen implantes peritoneales fuera de la pelvis y/o ganglios linfáticos positivos, es decir, hay presencia de células tumorales en los ganglios y existe acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal.

Estadio IV. Además de haber afectación de uno o ambos ovarios, implantes peritoneales y en ganglios linfáticos y acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal, en esta etapa existe metástasis hacia órganos distantes.

Hay que tener en consideración que en cada estadio existen sub-estadios que especifican y/o particularizan aún más el estado patológico.

1.2.2 Fisiopatología y Patogénesis

En el cáncer de ovario, se han detectado mutaciones genéticas que favorecen el desarrollo de esta patología; esto lo hace aún más complejo que aquellos cánceres que están vinculados con la mutación en un solo gen. Los genes BRCA-1 y 2 presentan mutaciones en la mayoría de los casos de cáncer de mama y también muestran una correlación importante con el cáncer de ovario (Cvetkovic, 2003). Estas y otras mutaciones como las encontradas en los genes CRBP-1, DOC2-Dab2, K-ras, HGF-Met, p53, β -catenina, Src y Ras, predisponen a sufrir el cáncer de ovario que inicia con elementos inherentes a mutaciones en la línea germinal de cada padre. Mientras que el CaOv sólo puede ocurrir en las mujeres, los genes que predisponen a su desarrollo son autosómicos en la naturaleza y por lo tanto puede ser heredado de ambos padres.

Este concepto es fundamental con respecto a la información de la historia familiar ya que ambos padres pueden transmitir las mutaciones genéticas y el conocer estos datos permite realizar la evaluación del riesgo y permitir a su vez un tratamiento e intervención temprana, lo cual, en la mayoría de los casos es muy poco frecuente. Un cambio epigenético característico es la hipermetilación del promotor del gen BRCA-1, hallándose principalmente en

los tumores borderline, lo que sugiere que son eventos tempranos durante la transformación celular (Cvetkovic, 2003; Meunier *et al.*, 2010; Livingston *et al.*, 2010).

El origen preciso del cáncer de ovario aún se desconoce; sin embargo, se han planteado varias teorías al respecto con igual grado de credibilidad, si se quiere considerar de ese modo. Se debe tener en cuenta que en la mayoría de los tipos de cáncer, el origen de éstos es la consecuencia de una serie de eventos concertados que predisponen a sufrir esta enfermedad. Por ejemplo, la teoría de la ovulación incesante apoya el hecho de que una ruptura continua del epitelio de la superficie del ovario al momento de la liberación del óvulo y la generación de quistes de inclusión por las rupturas frecuentes, provoca con el paso de los años y el deterioro de los sistemas de control del ciclo celular, una o varias mutaciones en las células de la superficie del ovario. Otra teoría igualmente aceptada hace referencia a la producción excesiva de andrógenos por parte de las células de la superficie del ovario, siendo estos andrógenos un factor de riesgo para padecer el cáncer de ovario. En las células del borde del ovario y en células de tumores de carcinoma ovárico se ha detectado el receptor para andrógenos. Como en la mayoría de los cánceres, existe también la posibilidad de la generación de un cáncer de ovario *de novo*, por lo que es posible que una célula de la superficie del ovario puede iniciar una lesión completa (Okamura *et al.*, 2006; Fleming *et al.*, 2006).

Una vez que las células de la superficie del ovario, ya sea aquéllas residentes de los quistes de inclusión o por una carcinogénesis *de novo*, han perdido su estabilidad genómica, el siguiente proceso es la proliferación descontrolada que obedece a un proceso de progresión y crecimiento para dar lugar a masas celulares amorfas y con diferentes tipos de control y regulación de sus sistemas genéticos, bioquímicos y en general biológicos. Los tumores serosos que abarcan el mayor porcentaje de cánceres de ovario, pueden ser de alto o bajo grado, según una clasificación más reciente

propuesta por Kurman *et al* (2004), al igual que los mucinosos y endometrioides. Con respecto al tumor seroso de alto grado existe una activación de vías oncogénicas para desregular la expresión de proteínas como beta-catenina, Ras y Src, posteriormente también se observa la desregulación de p53 y BRCA. Los tumores serosos y mucinosos de bajo grado, poseen un bajo potencial maligno que se interpreta como un bajo potencial proliferativo y una división mitótica aparentemente normal. Por otra parte los tumores endometrioides y de células claras tienen frecuentemente como común denominador la endometriosis, proponiendo que las lesiones provocadas por esta patología originen un tumor ya sea del tipo endometriode o de células claras. (Shih, 2010).

Un elemento importante en la malignidad del tumor y en general de la enfermedad es la capacidad de producir metástasis. La metástasis se define como la capacidad que posee una célula para desprenderse de la masa tumoral que le dio origen y expresar un patrón diferente de proteínas que le permiten realizar funciones como quimiotaxis, invasión, proliferación y adhesión; ésta última le permite generar un tipo de especificidad de unión a un órgano o tejido blanco, lo que realiza gracias a la expresión de moléculas de adhesión como integrinas, lectinas y cadherinas, las cuales, dependiendo de su tipo, podrían tener una gran variedad de blancos, lo que también ayudaría a explicar algunos patrones de diseminación metastásica hacia diferentes órganos durante el desarrollo de la enfermedad (Marie *et al.*, 2007).

En el cáncer de ovario epitelial se ha observado un tipo de metástasis denominada transcelómica. En este tipo de metástasis, se sugiere inicialmente que las células hayan invadido vasos linfáticos (FIGO III) y por la obstrucción de estos vasos se genere la acumulación del líquido ascítico en la cavidad peritoneal. Posteriormente, pueden ocurrir varios eventos, entre ellos: las células que invadieron los ganglios linfáticos tienen la capacidad de adherirse al peritoneo e iniciar la formación de nuevos tumores. La cercanía

del tumor ovárico con el peritoneo puede ocasionar que las células invadan esta cavidad. Además, se ha reportado también la formación de estructuras complejas multicelulares denominadas esferoides. Estos esferoides son el resultado de la agregación celular semejando a una réplica diminuta del tumor que los originó, solo que sin vasos sanguíneos; se ha resaltado su alto poder invasivo-proliferativo como responsable de la generación de nuevos tumores en distintos órganos. En estas condiciones se vuelve muy difícil lograr una comprensión adecuada del desarrollo de la enfermedad, ya que en este punto se genera un microambiente complejo al combinar los diferentes elementos de esta enfermedad como son: la génesis del tumor a partir de células transformadas, el grado de malignidad de la enfermedad, el proceso de progresión, metástasis, desregulación de sistemas hidrodinámicos y por lo tanto acumulación de líquido ascítico, formación de nuevos tumores en la cavidad peritoneal por células invasoras y/o esferoides multicelulares y por último el cambio de expresión genética y síntesis de proteínas por efecto del líquido ascítico y sus diversos constituyentes, en las células de cáncer epitelial de ovario (Chien *et al.*, 2007).

1.3 Microambiente del cáncer de ovario

El microambiente, en biología celular, hace referencia al conjunto de elementos y factores que prevalecen en un espacio determinado del organismo, permitiendo que en él se desarrollen solo aquellas células que posean las características necesarias para obedecer a estos elementos y factores. El ovario es un órgano tipo glándula que está conformado por distintos tipos celulares como: células fusiformes, musculares, de la teca, ovocitos, foliculares y epiteliales las cuales deben su diferenciación y diversidad a factores que les indican el tipo de especialización que deben desarrollar. Las células de la superficie del ovario constituyen una monocapa única de células denominadas células epiteliales de la superficie del ovario y son descendientes directos del epitelio celómico de la cresta gonadal embrionaria. Estas células, según las distintas teorías, sufren la

transformación hacia células malignas, que a grandes rasgos, originan un tumor (Carlson, 2005).

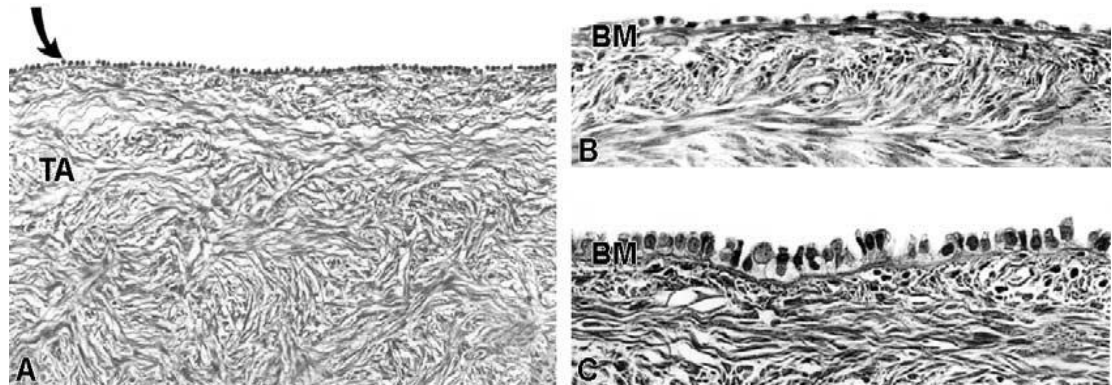


Figura3: Células epiteliales de superficie de ovario humano. (A) Las células epiteliales de la superficie del ovario (flecha) se alinean a lo largo de la túnica albugínea (TA) a través de una lámina basal. (B, C) monocapa plana (B) y cuboidal (C), o a veces pseudoestratificado columnar con citoplasma escaso. BM, membrana basal. Hematoxilina y eosina, magnificación original: 50 (A), 100 (B), 100 (C) (Katabuchi *et al.*, 2005).

1.3.1 Microambiente del tumor

La pérdida del control del crecimiento y de la proliferación celular se debe a la carencia de la actividad de las proteínas reguladoras, principalmente por mutaciones en los genes que las codifican. Sin embargo, además de las células transformadas, en el tumor también se presenta la producción de componentes de la matriz extracelular, células inflamatorias y células estromales. También existe la presencia de células endoteliales que están implicadas en la formación de nuevos vasos sanguíneos, en un proceso denominado angiogénesis. En el CaOv también pueden existir tumores mixtos o mezclados, según el tipo de células transformadas implicadas en su formación. Con respecto a las moléculas señalizadoras presentes en el microambiente del tumor, frecuentemente se encuentran el TGF-beta, VEGF, IL-8, integrina alfa-variable/beta3, EphA2 (receptor tirosina cinasa), enzimas como las metaloproteinasas (MMP-2 y 9) y FasL, que es utilizado para inducir la muerte a linfocitos y la presentación de HLA-G. Esta es una molécula importante que se utiliza para mediar la histocompatibilidad del tejido placentario principalmente y por lo tanto inhibe la actividad de las células dendríticas. Como ya se documentó anteriormente las células del

tumor, aumentan su poder de crecimiento y proliferación cuando los niveles de andrógenos son elevados. Esto esencialmente es respaldado por la teoría hormonal que trata de justificar el nivel tan elevado de andrógenos durante el desarrollo de esta enfermedad (Pourgholami *et al.*, 2012; Barbieri *et al.*, 2010).

1.3.2 *Microambiente de las células presentes en la ascitis*

El líquido ascítico es un fluido biológico que contiene una gran variedad de factores solubles, células y componentes de la matriz extracelular. Durante las etapas avanzadas del cáncer de ovario se presenta la formación y/o acumulación de este líquido en la cavidad peritoneal por obstrucción de vasos linfáticos que drenan esta zona. La obstrucción al ser provocada por células metastásicas nos hace entender que este tipo de ascitis, denominada maligna, posea también células transformadas. Además de estas células también se encuentra a los esferoides multicelulares y los exosomas (un tipo de micelas o porciones de membrana plasmática que son liberados del tumor primario o de los tumores que se implantan en el peritoneo). Por ello la ascitis representa un ambiente rico en moléculas de señalización que provocan un fenotipo específico en cada célula o tipo celular presente en él. Sin embargo es importante resaltar que el efecto completo del líquido ascítico sobre las células que en él residen ha sido poco estudiado.

En un intento por dilucidar estos efectos (Nagy *et al.*, 1993) han realizado diversas investigaciones para caracterizar y describir los eventos moleculares y celulares que desencadenan todo(s) o alguno (s) de los diferentes factores, en distintos patrones de concentración y tipo molecular, ya que al desconocer en su gran mayoría los constituyentes del líquido ascítico, particularmente para los distintos estadios y tipos de cáncer de ovario, existe una gran incertidumbre acerca de la función real que realice este fluido en la fisiopatología de la enfermedad. Los diferentes estudios que se han realizado como parte de la caracterización del líquido ascítico, comprenden ensayos

de crecimiento, proliferación, adhesión e invasión, principalmente; los cuales son aspectos relevantes en el estudio del cáncer.

Ahmed *et al.*, 2005, describió que la ascitis derivada de pacientes con CaOv es capaz de modular la expresión de la integrina $\alpha6\beta1$ y del receptor a urocinasa activadora de plasminógeno, demostrando que este fluido puede influenciar y/o inducir cambios en el fenotipo celular. Los tumores del carcinoma ovárico están constituidos por diferentes tipos celulares. Strauss *et al.*, (2011) demostraron que existen cambios fenotípicos en las células presentes en los tumores: las células epiteliales transformadas pueden transformarse en un fenotipo de células mesenquimales, dependiente del tipo de estímulo que se ejerza sobre ellas, ya sea estrés o el contacto con otro tipo celular. Lo cual se puede estudiar gracias a la presencia de marcadores celulares que permiten diferenciar a cada tipo celular.

Por su parte, Leroy *et al.*, (2008) describen un tipo de comunicación de las células del tumor de cáncer de ovario con su microambiente, en un término que denotan como microecología. Lo anterior pretende dilucidar la relación de las células transformadas con el funcionamiento fisiológico del organismo, que posteriormente se modifica por el efecto de las sustancias y factores que producen como respuesta estas células una vez que han desarrollado la inmortalidad, el crecimiento, la proliferación y la invasión, implicando por lo tanto el contacto con elementos de la matriz extracelular, como la colágena y los fibroblastos. Todo esto ocasiona una comunicación recíproca de las células con el medio, provocando la síntesis de metaloproteinasas de matriz como la 2 y la 9 y la expresión de moléculas de adhesión como la integrina $\alpha5/\beta1$ y αV (Leroy *et al.*, 2008).

1.4 Generalidades sobre la regulación de la expresión de moléculas implicadas en cáncer de ovario.

Las células epiteliales de la superficie del ovario se encuentran expuestas a diferentes señales que promueven el crecimiento, la migración y la proliferación principalmente. La mayoría de estos procesos poseen dos tipos principales de regulación: la regulación genómica y la regulación metabólica o citoplasmática. La regulación citoplasmática tiene la característica de ser muy rápida, ya que solo requiere de una modificación que puede ocurrir en milisegundos a segundos según sea el proceso a regular. Entre las principales modificaciones se encuentran la fosforilación, la metilación, la acetilación, la sumoilación y la ubiquitinación, entre otros. Asimismo, se debe agregar que la acción contraria, o sea el quitar cualquiera de estas modificaciones provoca también una importante modificación y un impacto en el desarrollo de diferentes eventos bioquímicos como la actividad enzimática o de transporte vesicular por ejemplo. La regulación genómica se enfoca principalmente a la síntesis *de novo* de proteínas a partir de sus genes codificantes. El evento inicial para una regulación genómica, es la interacción ligando-receptor, lo que produce un cambio conformacional del receptor en su porción citoplásmica y provoca una cascada de señalización en la que se realizan modificaciones semejantes a las metabólicas, con la diferencia de que su molécula blanco será un factor de transcripción o una molécula capaz de unirse a una región específica del DNA, al cual comúnmente se le denomina promotor; esto permitirá la formación de un complejo multi-proteico sobre esta región de DNA que estará encabezado por una polimerasa de RNA para dar lugar a un mRNA, que a su vez servirá de plantilla para realizar la síntesis de una nueva proteína. Todas las etapas de este proceso son sometidas a puntos de regulación. Para fines prácticos esta regulación se puede dividir en tres etapas principales: la interacción ligando-receptor, las modificaciones de moléculas citoplasmáticas y los eventos nucleares.

Por lo tanto, el líquido ascítico derivado de pacientes con cáncer de ovario o ascitis maligna, como se le denomina comúnmente a la ascitis generada por un proceso oncológico, forma parte de la enfermedad como un escenario complejo y rico en factores que pueden generar un cambio fenotípico sobre las células que se encuentran inmersas o en contacto con él. Por lo tanto, debemos recordar que las principales células presentes en el líquido ascítico son las células epiteliales transformadas del cáncer de ovario, las cuales *per se* cuentan ya con una regulación muy compleja pero que todavía persigue los principios antes mencionados. En el entorno de la interacción ligando-receptor en una célula epitelial de cáncer de ovario y el líquido ascítico como una fuente de diversos ligandos y por lo tanto, capaz de generar una configuración genética y metabólica distinta a la que encontramos en un epitelio normal, se abre la posibilidad de que este tipo de eventos celulares inducidos por el líquido ascítico generen un fenotipo más agresivo de estas células como: la invasividad, la metástasis y la proliferación, lo cual de hecho, respalda que el líquido ascítico acompañe a uno de los estados más graves de esta enfermedad (Kuk *et al.*, 2009).

1.5 Líneas celulares de cáncer de ovario.

Las líneas celulares son células inmortales que, en la mayoría de los casos, han sido caracterizadas considerando desde aspectos morfológicos hasta genéticos. Pueden ser generadas por deleciones, inserciones, mutaciones puntuales, entre otros, en aquellos genes importantes en procesos característicos del cáncer, por ejemplo, los principales oncogenes como p53, BRCA-1 y 2 y KRAS para cáncer de ovario. Las líneas celulares permiten desarrollar ensayos *in vitro* e *in vivo*, para poder entender mejor diversos aspectos de las enfermedades oncológicas como la comprensión de su biología, ayudar en el diseño de métodos de diagnóstico, y en la identificación de blancos terapéuticos. Entre las líneas celulares más utilizadas para cáncer de ovario se encuentran SKOV-3, OVCAR-5, CAOV-3, HEY y OVCA249 (Provencher *et al.*, 2000).

La línea celular SKOV3 se obtuvo en 1973, a partir de líquido ascítico de una mujer caucásica de 64 años con un tumor de ovario de subtipo histológico seroso papilar. Las células SKOV3 son resistentes al factor de necrosis tumoral y a varios fármacos citotóxicos, incluyendo la toxina diftérica, cisplatino y adriamicina. Tienen una morfología parecida a la epitelial y también poseen una abundante actividad de quimiotaxis en la cámara de Boyden y en los ensayos de invasión. Esta línea celular tiene la capacidad de crecer en agar blando, un indicador de la transformación y la tumorigenicidad, su colonia se observa relativamente alta, con una alta eficiencia de formación. *In vivo*, esta línea celular puede formar moderadamente adenocarcinoma bien diferenciado consistente con los tumores primarios de ovario. La línea celular disponible comercialmente puede poseer el gen de la luciferasa y el gen de resistencia a neomicina con la finalidad de investigación, (SKOV-3/Luc Cell Line, número de catálogo: AKR-232 Cell Biolabs Inc.).

La línea celular OVCAR-5 es una línea celular humana de carcinoma de ovario epitelial, fue recuperada de líquido ascítico de una paciente con adenocarcinoma de ovario progresivo sin tratamiento citotóxico previo. Con una morfología parecida a la epitelial y una elevada capacidad de quimiotaxis, la línea celular OVCAR-5 también resulta muy útil en la determinación del efecto de diversos fármacos contra el cáncer. *In vivo*, las células OVCAR-5 pueden formar un adenocarcinoma bien diferenciado consistente con las células ováricas primarias (OVCAR-5/RFP Cell Line, número de catálogo: AKR-254 Cell Biolabs Inc.).

Las células HEY pertenecen a otra línea celular de cáncer de ovario humano y se derivó de un xenoinjerto de cáncer de ovario humano (HX-62). Originalmente estas células crecieron en un depósito peritoneal de una paciente con cistadenoma papilar de ovario moderadamente diferenciado. Esta línea celular ha mostrado la capacidad diferencial para crecer en cultivo semisólido y como un xenoinjerto en ratones CBA/CJ comprometidos

inmunológicamente. Las células HEY muestran cierto grado de resistencia al agente alquilante cis-diaminodicloroplatino (Número de catálogo: CLU302, Cellutions Biosystems Inc.).

OV-90 es una línea celular recuperada en agosto de 1992 de una paciente franco-canadiense sin historia familiar de cáncer de ovario, se ha comentado su gran parentesco con la línea celular TOV-21G en cuanto a su descendencia pero a diferencia de ésta no presenta la delección a nivel cromosomal 3p24 (Número de catálogo: CRL-11732, Biocompare (ATCC)).

2. Antecedentes

2.1 Efecto del líquido ascítico y/o sus componentes sobre líneas celulares.

El líquido ascítico secundario a un cáncer de ovario epitelial ha sido estudiado para comprender la relación de este fluido con la gravedad de la enfermedad. Sengupta *et al.*, (2003), utilizando varias formas del ácido lisofosfatídico, demostraron que este ácido graso es capaz de inducir la proliferación de células HEY aunque a niveles inferiores de lo que induce el líquido ascítico completo. Marie *et al.*, (2007), utilizando la línea celular de cáncer de ovario OV-90, la cual fue descrita morfológica, inmunohistoquímica, citogenética y molecularmente, así como sus perfiles de expresión, demostraron un efecto en la regulación de diversos genes en estas células mediante ensayos de microarreglos de DNA como resultado de la exposición de estos cultivos a líquido ascítico. También demostraron el efecto positivo para inducir invasión y proliferación celular y evaluaron la capacidad de estas células para formar esferoides. Por otra parte, determinaron igualmente el efecto de la ascitis en la migración celular y en la expresión de genes *in vitro* realizando ensayos de herida y cierre (“wound-healing”), sustituyendo el 5% de suero por 5% de ascitis, observando un efecto pro-migratorio en estas células expuestas a este fluido. Este mismo grupo analizó el perfil de expresión de estas células expuestas a líquido

ascítico, observando la capacidad para regular a la baja o a la alta una gran variedad de genes (Marie *et al.*, 2007; Sengupta *et al.*, 2003).

2.2 Generación de líneas celulares en el laboratorio.

En nuestro laboratorio se logró la recuperación de dos líneas celulares denominadas INCan017 e INCan019, a partir del líquido ascítico de dos pacientes mexicanas diagnosticadas con carcinoma ovárico de tipo histológico endometriode y seroso papilar, respectivamente. Ensayos moleculares y ultraestructurales revelaron el origen epitelial de estas células, además se caracterizaron como adherentes, formadoras de multicapas, proliferantes y altamente metastásicas, en el modelo murino (Garibay-Cerdenares, 2013; Patente No. MX/a/2013/002883 en trámite).

Datos preliminares del trabajo realizado con las líneas celulares INCan017 e INCan019 indican la presencia de moléculas presumiblemente implicadas en eventos como adhesión y migración celular. Tal es el caso de moléculas de tipo integrina (Villegas-Pineda, 2012) y de haptoglobina (Garibay-Cerdenares, 2012). Se sabe que las integrinas pueden funcionar como receptores para las proteínas de matriz extracelular facilitando el proceso de adhesión. En muestras de biopsias de pacientes con CaOv, la presencia de estos receptores se detectó en zonas específicas del tejido, pero también en estructuras multicelulares de tipo esferoides, lo cual correlaciona con la capacidad que tienen estas estructuras para adherirse al peritoneo y formar nuevos tumores durante un proceso de metástasis transcelómica (Villegas-Pineda, 2012). La haptoglobina, es una proteína producida en el hígado y ha sido reportada como un factor quimiotáctico para macrófagos, siendo capaz de unirse a un receptor tipo serpiente, con siete dominios transmembranales, denominado CXCR2. En ensayos de herida y cierre (“wound-healing”) con las células INCan017 se demostró que la unión de haptoglobina a este receptor, estimula procesos migratorios. (Garibay-Cerdenares, 2012)

2.3 Anticuerpo Monoclonal 3C10

En cáncer, la presencia de moléculas de adhesión, como ya se mencionó, resulta muy importante para el desarrollo y la progresión de la enfermedad. En nuestro laboratorio se ha estudiado una molécula de 140 kDa presente en *Entamoeba histolytica*, cuyas funciones de adhesión y características antigénicas permiten clasificarla como una molécula tipo integrina (Sengupta *et al.*, 2001, 2011). Esta molécula de 140 kDa se describió como el receptor amibiano a fibronectina, un componente de la matriz extracelular, y ha demostrado tener un papel importante durante el proceso de invasión tisular en el desarrollo de la enfermedad amibiana. En el laboratorio se generó un anticuerpo monoclonal, denominado 3C10, el cual es capaz de reconocer a la molécula de 140 kDa no sólo en trofozoítos de *E. histolytica*, sino también en células eucarióticas como fibroblastos y macrófagos (Fig. 4a). Así mismo, este anticuerpo es capaz de inhibir la interacción de los trofozoítos amibianos

con fibronectina y con colágena (Talamás-Rohana *et al.*, 1998; Sengupta *et al.*, 2001).

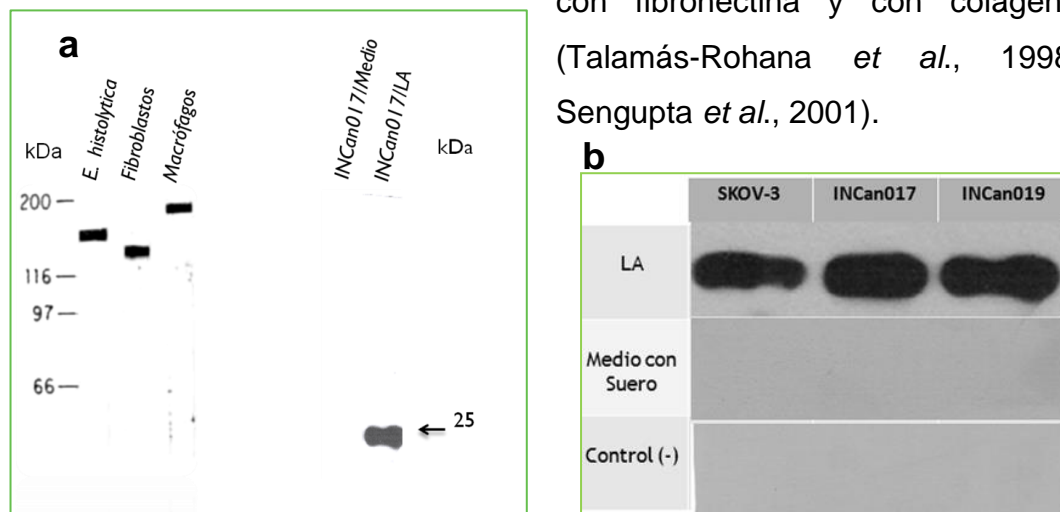


Figura 4: Western blots de la reactividad del mAb 3C10. **a.** Detección de proteínas de alto peso molecular en *E. histolytica*, fibroblastos y macrófagos por medio del anticuerpo monoclonal 3C10 y detección de una proteína de bajo peso molecular (~25 kDa) en la línea celular de CaOv INCan017 sólo cuando es tratada con líquido ascítico (INCan017/LA) de CaOv. **b.** Detección de la molécula de ~ 25 kDa en las líneas celulares de CaOv tratadas con LA: SKOV-3, INCan017 e INCan019.

Con base en dichos antecedentes, se realizaron ensayos para determinar si este anticuerpo monoclonal era capaz de detectar la presencia de moléculas integrina en la línea celular INCan017. Los resultados preliminares mostraron que las células INCan017 cultivadas en medio McCoy's suplementado con suero fetal bovino al 10% y en condiciones estándares de cultivo, no expresan ninguna molécula que presente reacción cruzada con el anticuerpo 3C10; sin embargo, cuando estas células son expuestas a líquido ascítico (sin medio y sin suero), el anticuerpo es capaz de reconocer una molécula ~ 25 kDa de manera específica en los extractos totales de las líneas celulares INCan017, INCan019 y SKOV-3. Estos resultados permiten sugerir que en el líquido ascítico, generado durante el desarrollo del cáncer de ovario, existe(n) uno o varios componentes que induce(n) la expresión de una molécula de bajo peso molecular, la cual podría estar participando en el desarrollo de la enfermedad.

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de ovario es una enfermedad oncológica que afecta principalmente a mujeres mayores de 40 años; una consecuencia secundaria de esta enfermedad es la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal originando la ascitis maligna. Este líquido está constituido por una gran cantidad de factores proteicos y lipídicos que son capaces de inducir diversos procesos oncológicos como proliferación, invasión y metástasis, además de funcionar como un medio que permite la viabilidad de las células transformadas de origen epitelial. La agresividad del cáncer está influenciada por el microambiente en el que reside o se encuentre presente. Por lo tanto, es imprescindible caracterizar el líquido ascítico para conocer los componentes cruciales que permiten mantener la viabilidad celular y que repercuten en la inducción de un fenotipo celular más agresivo de las células transformadas.

La caracterización detallada de los componentes del líquido ascítico permitirá identificar factores que puedan ser utilizados como herramientas para un diagnóstico temprano y/o como blancos para el diseño de esquemas terapéuticos.

V. HIPÓTESIS

El líquido ascítico de pacientes con CaOv posee uno ó varios factores que inducen la expresión de una proteína ~ 25 kDa en la línea celular de CaOv INCan017.

VI. OBJETIVOS

Objetivo General

Analizar la inducción una proteína de ~ 25 kDa en la línea celular INCan017 por efecto del tratamiento con líquido ascítico derivado de pacientes con cáncer de ovario.

Objetivos específicos

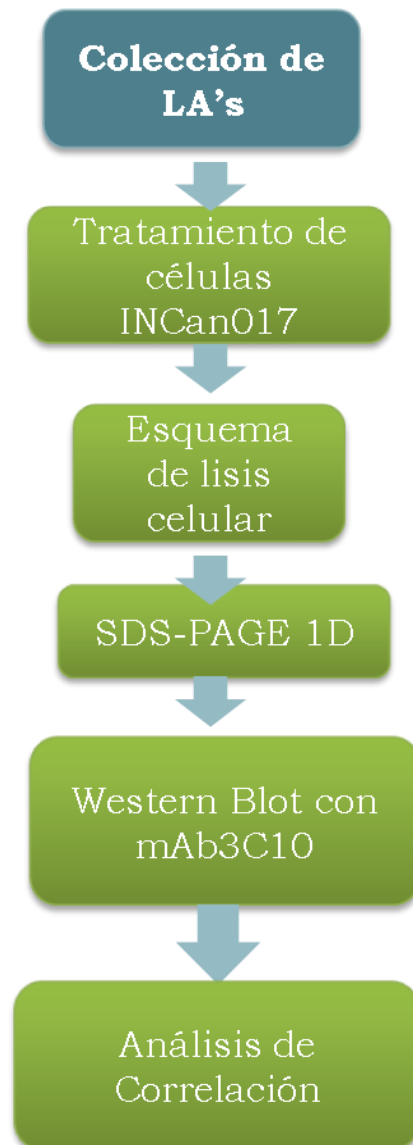
1. Obtener una fracción de líquido ascítico de CaOv inductora de la proteína de ~ 25 kDa en células INCan017.
2. Analizar la capacidad inductora de diferentes líquidos ascíticos de CaOv con respecto a la expresión de la molécula de ~ 25 kDa en células INCan017.
3. Determinar la asociación de la inducción de esta proteína de bajo peso molecular con el subtipo histológico o etapa clínica.
4. Determinar la localización celular de la proteína de ~ 25 kDa.

VII. ESTRATEGIA METODOLOGICA

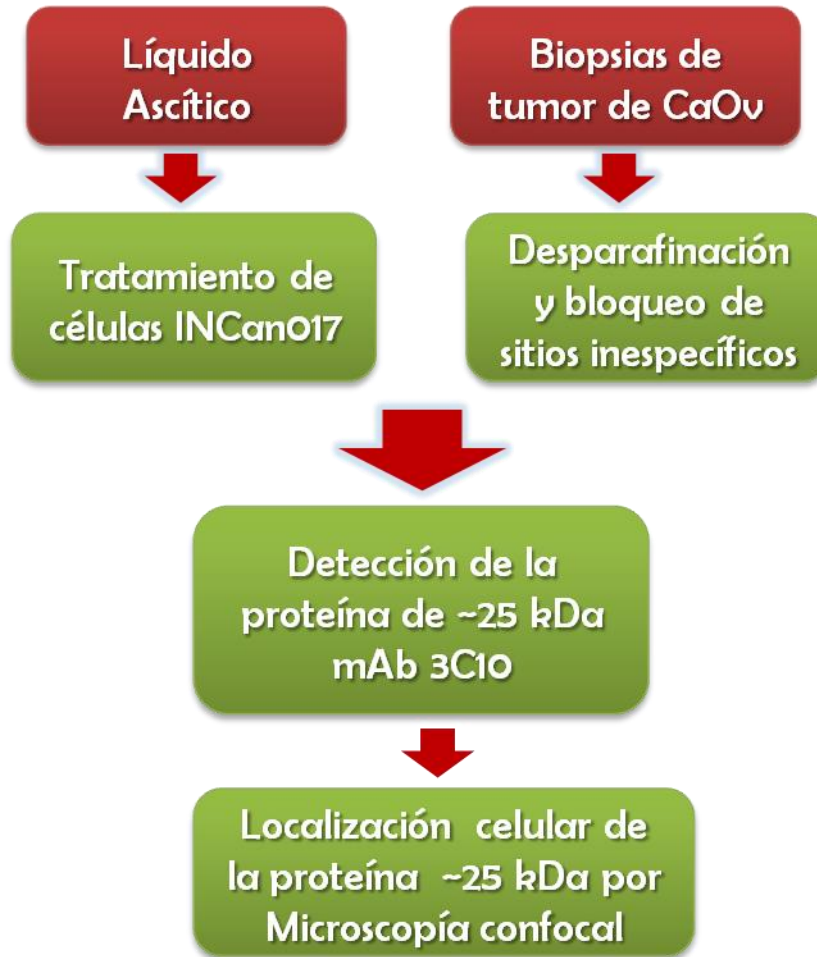
- Obtener una fracción de líquido ascítico de CaOv inductora de la proteína de ~ 25 kDa en células INCan017.



- Analizar la capacidad inductora de diferentes líquidos ascíticos de CaOv con respecto a la expresión de la proteína de ~25 kDa en células INCan017.
- Determinar la asociación de la inducción de esta proteína de bajo peso molecular con el subtipo histológico o etapa clínica.



- Determinar la localización celular de la proteína de ~ 25 kDa.



VIII. METODOLOGIA

- *Fraccionamiento del líquido ascítico (LA) con sulfato de amonio saturado (SAS)* (Lovrien *et al.*, 2001).

Se realiza la saturación con esta sal para lograr precipitar las diferentes proteínas y generar las diferentes fracciones para su análisis. Se adicionó el volumen necesario de solución saturada de sulfato de amonio (No. cat. A4418-1KG) para llevar a un 30% de saturación. Se dejó interaccionar la sal con el líquido ascítico por un lapso de 1 a 1:30 h, en agitación y a 4 °C. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min a 4 °C. El precipitado es resuspendió en la mitad del volumen inicial en PBS 1x. El sobrenadante se llevó al 50% de saturación adicionando el volumen necesario de SAS. Se realizaron nuevamente los pasos 3 al 5 y se siguió el mismo procedimiento para generar la fracción 90%.

- *Diálisis*

Las diferentes fracciones se someten a un protocolo de diálisis utilizando membranas de 8-12 MWCO (No.cat. 3787-F15) y como solución el PBS 1x. Se colocan las fracciones en tubos eppendorf para microcentrífuga horadando la tapa la cual se sella con la membrana de diálisis. Se sumergen los tubos en un vaso de precipitados de 1000 ml lleno con PBS 1x y se mantiene en agitación en agitación a 4 °C. Se somete a este proceso por 48 h con tres o cuatro cambios del PBS 1x.

- *Tratamiento de líneas celulares con LA y/o sus fracciones*

Aproximadamente 120,000 células INCan017 se sometieron a un tratamiento con LA o sus fracciones generadas por precipitación con sulfato de amonio. El LA utilizado para estos ensayos fue el LA33, al cual nos referiremos como LA de referencia ya que con este LA se realizaron la mayoría de los ensayos. Las células en medio McCoy (No. cat. 16600-082) se crecieron por 48 h en placas de cultivo de 24 pozos o cajas T-25

para trabajar con ellas en su fase de crecimiento. El día del ensayo se lavaron dos veces con PBS 1x atemperado y se les colocó medio nuevo sin suero fetal bovino (No. cat. A15-701) (solo al control negativo se le adiciona SFB). Para cada condición se calculó la adición de 10 mg de proteína de la fracción correspondiente o se adicionó 2 (pozo) -5 (caja T-25) ml de LA como control positivo. Se incubaron las células durante 72 h a 37 °C y 5% de CO₂, con monitoreos constantes para descartar contaminación (al medio se le adicionan antibióticos y antimicóticos, No. cat P11-002). Se recuperaron las células retirando el medio de cultivo y lavando 2 veces con PBS 1x, se adicionó brevemente 500 µl (pozo) o 1 ml (caja T-25) de tripsina-EDTA (T4674), se retiró y se adicionó nuevamente 1 ml de tripsina-EDTA y se incubó por 5 min a 37 °C. Se detuvo la reacción adicionando 1 ml de medio con SFB.

Los tratamientos de células INCan017 con los diferentes lotes de LAs fueron realizados de la misma manera en que se trataron con el LA de referencia y fue realizado en cajas T-25. Además el mismo LA de referencia se utilizó como control positivo de inducción y el medio McCoy + SFB como control negativo del mismo evento.

➤ *Esquema de lisis celular*

Se centrifugaron las células a 1,000 rpm durante 10 min a 4 °C para empastillarlas. Se lavaron agregando 1 ml de PBS 1x estéril y se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 min a 4 °C; se lavaron 3 veces del mismo modo. Se retiró el PBS y se agregaron 200 µl de amortiguador de lisis (Tris-HCl 5 mM, EDTA 2 mM y Nonidet P-40 al 1%) con inhibidores (1 µg/ml de Aprotinina y Leupeptina, 1 mM de PMSF, Na₃VO₄ y NaF). Se sometieron a 3 ciclos de vórtex/ hielo (1 min/3 min respectivamente). Se dejaron reposar por 30 min en hielo para propiciar la interacción con el amortiguador de lisis. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante y se guardó el precipitado.

➤ *Ensayos de Proliferación (Wlodkowic et al., 2009)*

El principio del método para determinar proliferación utilizando Sytox green stain (No. cat. S7020) se basa en la cantidad de ácidos nucleicos totales. Sytox es una molécula que se une específicamente al DNA, dicha unión da como resultado la emisión de luz a 538 nm. La condición control para los ensayos consiste en las células incubadas en medio de cultivo y las condiciones problema consisten en las células tratadas con el LA o sus fracciones. Se utilizaron 10 µl (20 µl para una réplica) del lisado total de células INCan017 (sujetas previamente a distintas condiciones). Se llevó a 100 µl con amortiguador de lisis. Se adicionaron 20 µl de una dilución de Sytox (dil. 1:5000). Se incubó 10' a temperatura ambiente. Se realizó la lectura a 538 nm.

➤ *Electroforesis en 1D*

Los extractos de las células INCan017 expuestas a las diferentes condiciones se corrieron en geles de poliacrilamida al 12.5% para conocer su perfil proteico. Además con la misma finalidad se realizó el perfil proteico de las distintas fracciones de LA obtenidas por saturación con sulfato de amonio en geles de poliacrilamida al 10%. Las muestras se prepararon en condiciones desnaturizantes con el amortiguador de muestra (Laemmli, 1970). Se prepararon minigeles en los que se montaron las muestras preparadas previamente y se corrieron inicialmente a 120 volts por 15 min y posteriormente se elevó el voltaje hasta 180 volts por 45 min. Como marcador de peso molecular se utilizó Precision Plus Protein® Dual Color, Bio Rad (Cat. No. 161-0374). Un gel se utilizó para realizar la tinción con plata y analizar el perfil proteico. Una réplica de dicho gel se electrotransfirió a una membrana de nitrocelulosa para su análisis por western blot.

➤ *Western Blot*

Previamente se realizó una electrotransferencia a partir de un gel SDS-PAGE al 10%. La electrotransferencia se realizó en presencia de amortiguador de transferencia frío y se dejó transfiriendo toda la noche a 30 V y 4 °C. Se recuperó la membrana de nitrocelulosa con las proteínas transferidas y se tiñó con el colorante Rojo de Ponceau por 30 min en agitación constante a temperatura ambiente. Se lavó la membrana con TBS-Tween 20 al 0.05% hasta lograr quitar la mayor cantidad de colorante. Se bloqueó la membrana con leche al 5% en TBS-Tween por 1 h. Se lavó la membrana con TBS-Tween (4-5 lavados 20 min c/u). Se adicionó el anticuerpo primario 3C10 (Dil 1:1000) en TBS-Tween leche al 5%, se dejó incubando toda la noche. Se lavó exhaustivamente con TBS-Tween 0.05% (5-7 lavados de 15 min c/u). Se incubó con el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa de rábano (HRP) (Dil. 1:1000 en TBS-Tween leche al 5% por 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Se lavó 3 a 5 veces con TBS-Tween 15 min c/lavado. Se reveló por quimioluminiscencia (SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, #34095)

➤ *Inmunofluorescencia*

Células INCan017 sometidas a diferentes condiciones (LA o medio de cultivo) se fijaron con p-formaldehído al 4% por 1 h a 37 °C. Se lavaron 3 veces con PBS 1x filtrado y se permeabilizaron con una solución de 0.2% de Tritón X-100 en PBS 1x por 15 min a temperatura ambiente y en agitación. Se lavaron tres veces con PBS 1x filtrado y se bloquearon con SFB ó SBA al 5% por 1 hora a 37 °C. Se adicionó el mAb 3C10 en una dilución 1:100 en PBS 1x, se incubó toda la noche a 4 °C en agitación constante. Al siguiente día se lavaron tres veces con PBS 1x. Se colocó el Ab secundario α -ratón-FITC (Thermo Scientific, 31569) y se incubó durante 1 h a 37 °C bajo protección de la luz. Se agregó el Vectashield

que contiene DAPI (No. cat. H-1200) y se montó en un portaobjeto. Se guardó a -20°C con protección de luz, hasta su observación.

➤ *Inmunohistoquímica de biopsias de CaOv*

Se colocaron cortes histológicos de tumor de CaOv del tipo seroso papilar (previamente desparafinados) en xilol durante 5 min y el procedimiento se repitió 3 veces. Posteriormente se colocaron en soluciones de etanol seriados descendientes (95%, 90%, 80%, 70%) durante 5 min en cada uno. Se incubaron los cortes en tripsina al 0.1% en CaCl₂ 0.1%, pH 7.8 en agua miliQ o destilada durante 20 min a T° ambiente en cámara húmeda. Se adicionó el anticuerpo primario, que en este caso fue el anticuerpo monoclonal 3C10 Dil 1:50 en Tris-HCl 0.05 M pH 7.4 con PBS al 1%, Tween 20 al 0.1% y se adicionaron 100 µl por corte. Se incubaron los cortes cubiertos con el anticuerpo monoclonal 3C10 en cámara húmeda a 4 °C toda la noche. Se retiró el anticuerpo primario y se lavó 3 veces con TBS-T 5 min c/lavado. Posteriormente se adicionó el anticuerpo secundario, un α-ratón-FITC Dil 1:100 en Tris-HCl 0.05 M pH 7.4. Se incubó en cámara húmeda a T° ambiente durante 1 h. Se lavó 3 veces con TBS-T 5 min c/lavado. Se montó en un portaobjetos con 15 µl de Vectashield conteniendo DAPI. Se guardó a -20°C hasta su observación y con protección de la luz.

IX. RESULTADOS

Tratamiento de células INCan017 con líquido ascítico de CaOv.

Los tratamientos de células INCan017 con LA de CaOv para la inducción de la proteína de ~25 kDa, se realizaron inicialmente con el LA de referencia (LA33) con el fin de determinar la inducción positiva de esta proteína y mediante estos ensayos se logró documentar también la inducción de cambios morfológicos mediante fotomicrografías utilizando microscopía de luz. Las células crecidas en medio de cultivo convencional presentaron dos tipos morfológicos principalmente: el primero consiste en células de gran tamaño, con un citoplasma muy extendido, estructuras filamentosas abundantes y la presencia de uno o varios núcleos de gran tamaño. Dentro de ellos, fue posible apreciar un número considerable de nucléolos. El segundo tipo morfológico es de células pequeñas, circundantes a las células de gran tamaño descritas previamente. En la mayoría de los casos solo se pudo apreciar uno o dos núcleos compactos en comparación con las células de mayor tamaño (Figura 5a). Las células en LA poseen una morfología de células fusiformes pequeñas, formando estructuras trabeculares con grandes prolongaciones de membrana (Figura 5b). Estas estructuras pueden llegar a ser muy largas y en su parte más distal pueden alcanzar a otra célula con la misma característica morfológica. El contacto célula-célula de este tipo parece ser importante cuando se les expone a LA, debido a que un gran número de células parece tener contacto celular mediante estas largas prolongaciones. El LA de referencia presenta una coloración verde olivo, sin embargo, el color de este fluido en CaOv puede ir desde un color chocolate hasta un amarillo pajizo.

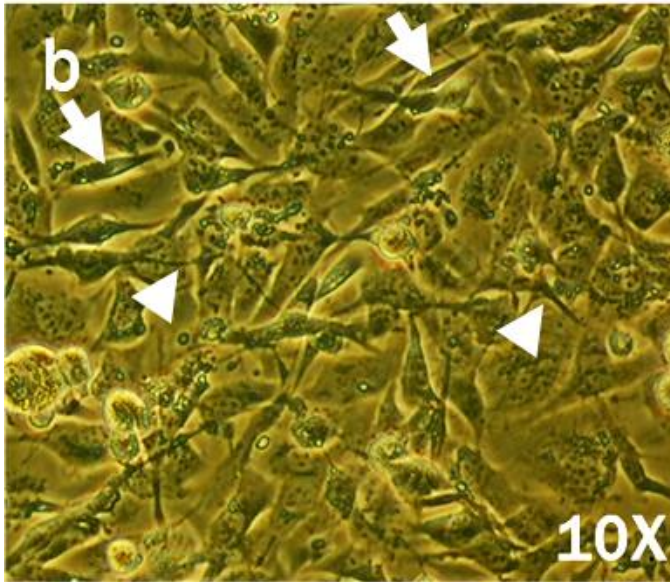
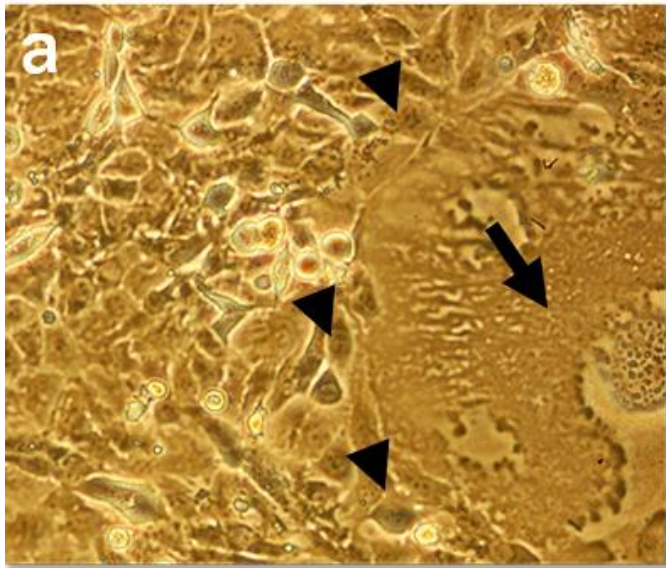


Figura 5: Tratamiento de INCan017 con LA de CaOv. Fotomicrografías por microscopía óptica por contraste de fases que muestran a. La morfología característica de las células con citoplasmas grandes (flecha negra) rodeadas por células pequeñas (cabeza de flecha negra) formando multicapas en medio McCoy suplementado con SFB. b. Morfología diferencial de las células INCan017 en presencia de LA de CaOv tomando una forma fusiforme (flecha blanca) y presentando prolongaciones de membrana puntiagudas y una organización tipo trabecular (cabeza de flecha blanca) además de predominar células relativamente pequeñas.

Fracciones del líquido ascítico de CaOv obtenidas por saturación con sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Con el fin de obtener un grupo de proteínas que mantuvieran el efecto inductor de la proteína de bajo peso molecular en células INCan017 se sometió al LA de referencia a un fraccionamiento con una solución de sulfato de amonio saturado, lo que permitió precipitar las diversas proteínas de este fluido de acuerdo a su solubilidad y peso molecular principalmente. Las proteínas precipitadas con los distintos porcentajes de sulfato de amonio fueron sometidas a un protocolo de diálisis descrito en la metodología y se resolvieron en un gel SDS-PAGE al 10% adicionando 40 μg de proteína por condición, tanto el LA como sus fracciones y posteriormente se le aplicó al gel tinción con plata. De este modo se observó un perfil diferencial de proteínas para cada fracción cuando se compara con el perfil de un líquido ascítico completo (Figura 6 carril 2), la nomenclatura fue asignada de acuerdo al porcentaje de saturación con solución saturada de sulfato de amonio. La presencia de la albúmina se mantuvo en las tres fracciones y pudo ser visualizada a la altura de los 66 kDa. La fracción F30 (Figura 6, carril 3 de izquierda a derecha) mostró un mayor parentesco con el LA completo, en esta misma fracción (y en el LA) se logró observar la presencia de una banda correspondiente a la cadena pesada de las inmunoglobulinas (55 kDa) y de la albúmina. Con respecto a la fracción F60 (Figura 6, carril 4) además de mantener la presencia de albúmina se logró distinguir proteínas de ~ 80 kDa y un enriquecimiento a la altura de los 50 kDa y la escases de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas. En la fracción F90 (carril 5, de izquierda a derecha), se observó un grupo reducido de proteínas, entre las que destaca nuevamente la albúmina y otro grupo de proteínas cerca de los 73 kDa además de otro grupo de proteínas de bajo peso molecular cerca de los 25 kDa que se mantuvo en todas las fracciones.

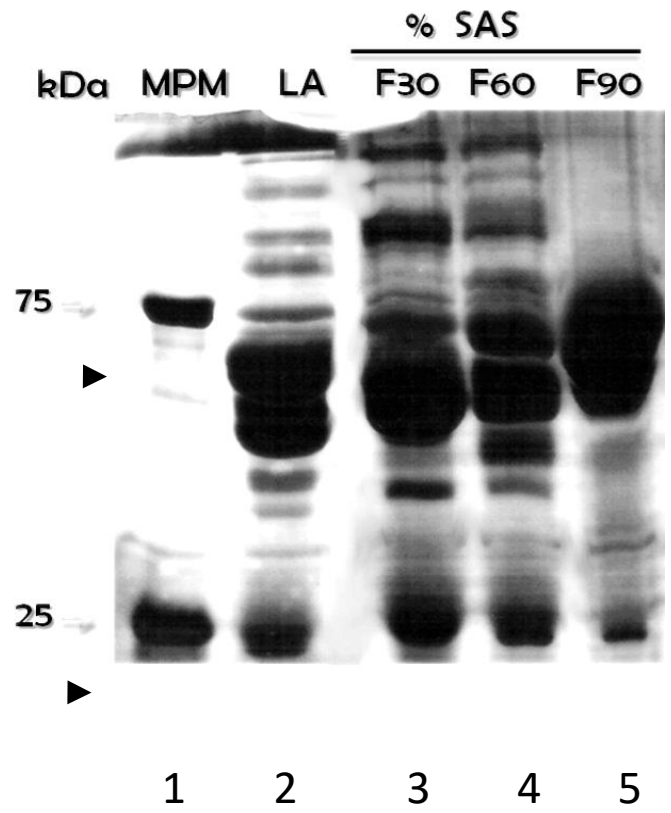


Figura 6: Perfil proteico del líquido ascítico y sus fracciones. A partir de LA completo se generaron tres fracciones mediante saturación con sulfato de amonio ((NH₄)₂SO₄). De izquierda a derecha carril 2: LA completo, carril 3: fracción F30, carril 4: fracción F60 y carril 5: fracción F90. En el carril de la extrema izquierda se muestran los marcadores de peso molecular. SDS-PAGE al 10%, teñido con plata, representativo de 3 experimentos realizados en forma independiente.

Tratamiento de células INCan017 con líquido ascítico y las fracciones obtenidas por saturación con sulfato de amonio.

Una vez obtenidas las fracciones de líquido ascítico con sulfato de amonio y conociendo el perfil proteico de cada fracción, se realizó el tratamiento de células INCan017 utilizando 10 mg de proteína por fracción, disuelta en medio de cultivo McCoy en ausencia de SFB e incubada por 72 h a 37 °C y 5% de CO₂. Se logró apreciar que cada fracción mantenía el cultivo en buenas condiciones y en ninguno de los casos se presentaron los cambios morfológicos observados en el caso del tratamiento de estas células con el LA completo. Las células tratadas con las fracciones conservaron en la mayoría de los casos la morfología que presentan cuando se crecen en medio de cultivo (Figura 7b, c y d). En el experimento se utilizó como control positivo al LA de referencia (Figura 7a) y el medio de cultivo McCoy + SFB como control negativo de inducción (imagen no mostrada).

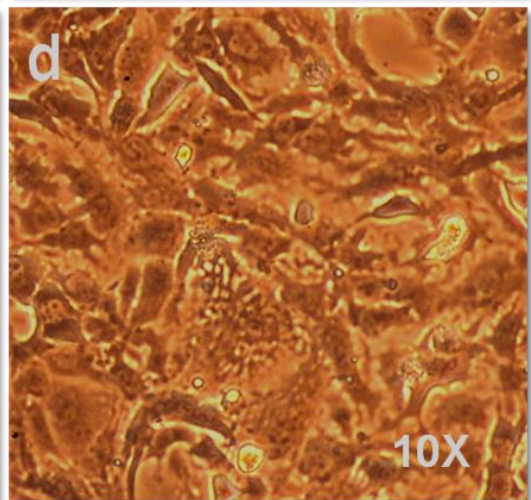
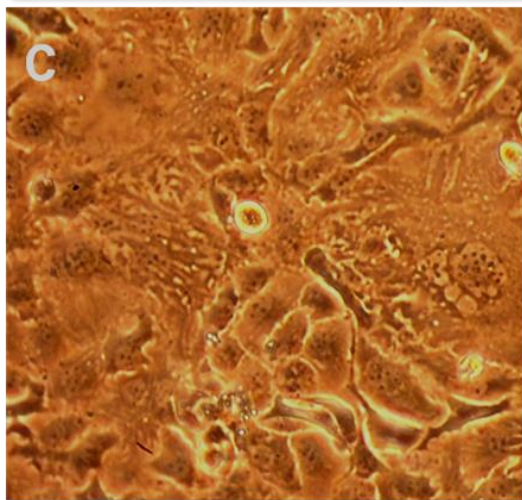
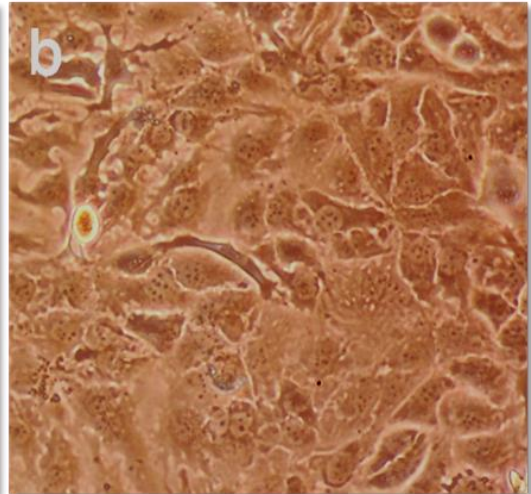
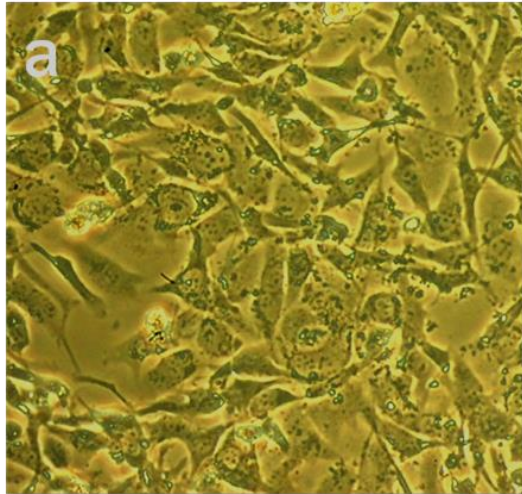


Figura 7: Tratamiento de INCan017 con LA y fracciones. a), Fotomicrografías por microscopía óptica por la técnica de contraste de fases (Objetivo 10X) de las células INCan017 en exposición directa a LA. b, c y d), células INCan017 tratadas con 10 mg de las fracciones F30, F60 y F90, respectivamente. Todas las condiciones, incluyendo células en medio, fueron incubadas por 72 h, a 37 °C y 5% de CO₂. Imágenes representativas de 10 campos observados. Resultados representativos de 3 experimentos independientes.

La proteína de ~ 25 kDa es inducida en células INCan017 por efecto del LA completo y la fracción F90.

Con el fin de evaluar la capacidad inductora de cada una de las fracciones del LA referente a la proteína de ~ 25 kDa se utilizaron los extractos celulares de INCan017 previamente tratadas con cada una de las fracciones y sus controles antes mencionados para su análisis mediante electroforesis unidimensional y western blot. Utilizando el anticuerpo monoclonal 3C10 se determinó la inducción de la proteína de ~ 25 kDa por parte del líquido ascítico (control positivo de inducción) y de alguna de las fracciones. El perfil proteico fue analizado mediante la tinción con plata de las proteínas. No se observaron diferencias importantes entre los perfiles (Figura 8a). El ensayo de western blot reveló la inducción de la molécula de ~ 25 kDa por parte del LA completo y de la fracción F90 (Figura 8b carriles 3 y 6). La presencia de la proteína a ~ 25 kDa se observó en mayor cantidad en las células tratadas con LA completo y en menor proporción en la fracción F90 y totalmente ausente en las fracciones F30 y F60 (Figura 8b carriles 4 y 5). Lo anterior indicó que se logró separar diferencialmente el o los componentes del LA que son capaces de lograr la inducción de esta proteína de bajo peso molecular.

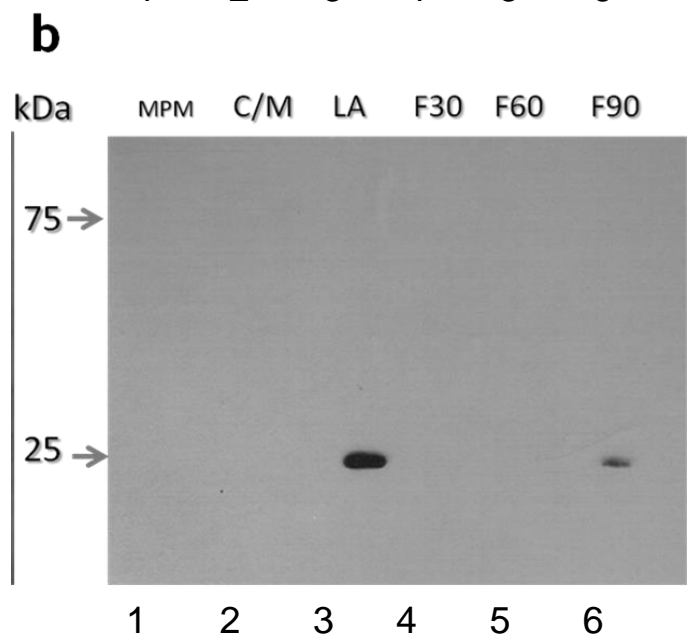
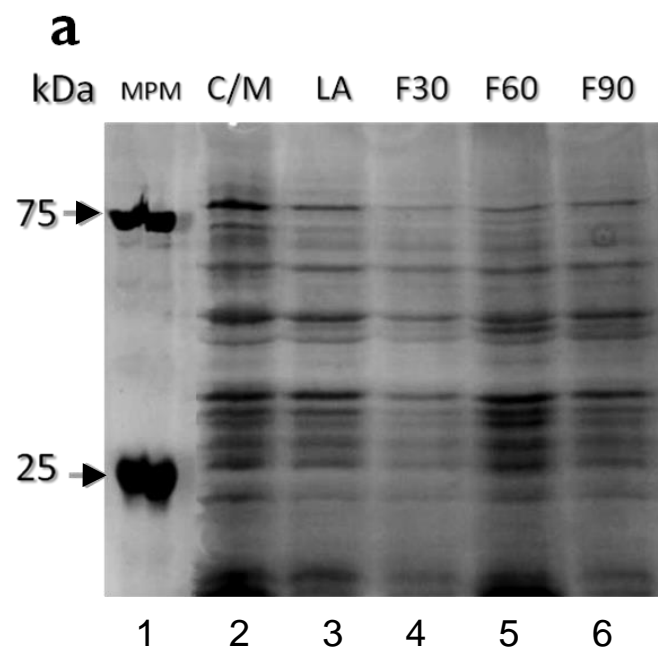


Figura 8: Perfil proteico de extractos de INCan017 y detección de la inducción de la molécula de ~ 25 kDa por efecto del LA y las fracciones.

a). Perfil proteico de las células INCan017 en medio de cultivo (C/M, carril 2), líquido ascítico (LA, carril 3) y las fracciones F30 (carril 4), F60 (carril 5) y F90 (carril 6). b). Reacción positiva a la inducción por parte del LA completo (LA33, carril 3) y la fracción F90 (carril 6). MPM, marcador de peso molecular, kDa, kilodaltones. (SDS-PAGE 12,5%). Imágenes representativas de 2

Tratamiento de células INCan017 con el lote No.1 de líquidos ascíticos.

Para determinar si el efecto de inducción de la proteína de ~25 kDa también podía ser conferido por otros líquidos ascíticos derivados de pacientes con CaOv, se trataron células INCan017 con líquidos ascíticos de la colección que posee el laboratorio, específicamente el lote No. 1 y que provienen de pacientes mexicanas con CaOv recién diagnosticado y sin tratamiento con quimioterapia. El tratamiento con los LAs se realizó del mismo modo que en el caso del LA de referencia (LA33), el cual fue designado como control positivo de la inducción y las células en medio de cultivo como control negativo (Figura 9A). Al realizar el tratamiento de los cultivos se observó un efecto dañino por parte de 5 LAs a 12 h de iniciado el tratamiento. Estos corresponden a las muestras: LA10, LA11, LA14, LA18 y LA23. Esta numeración fue asignada de manera arbitraria (Figura 9B).

Las células expuestas al grupo de LAs que ocasionaron un efecto nocivo mostraron distintas morfologías; para el caso del LA10 las células toman una forma redondeada y a 72 h el cultivo se encuentra sumamente dañado, un evento similar se observó para los LA11 y LA23 (Figura 9B LA10, LA11 y LA23). El LA14 destacó por un efecto letal desde el inicio de la incubación (Figura 9B LA14). El LA18 indujo agregación celular formando estructuras engrosadas (Figura 9B LA18, flecha). Al tiempo de 72 h todos estos cultivos se encontraron muy dañados o murieron. Por el contrario los líquidos ascíticos restantes del lote No.1 favorecieron el crecimiento de la línea celular. Estos LAs corresponden a LA17, LA20, LA21 y LA22 (Figura 9C).

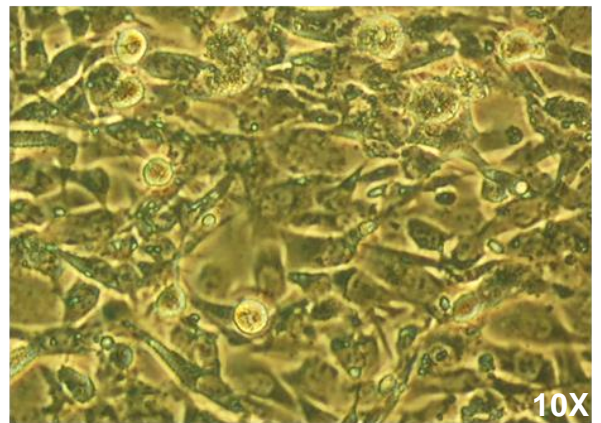
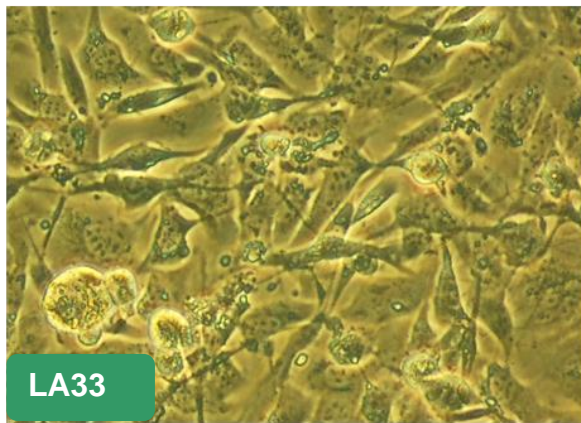
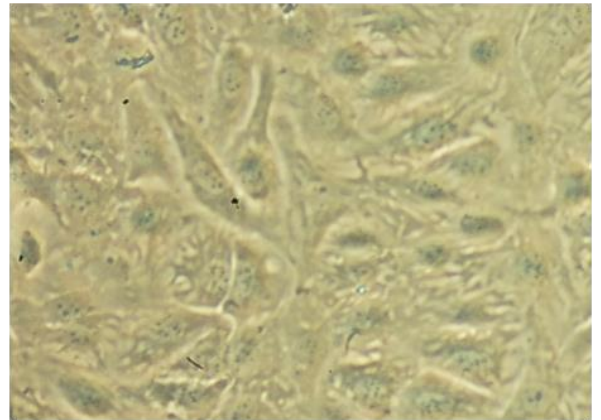
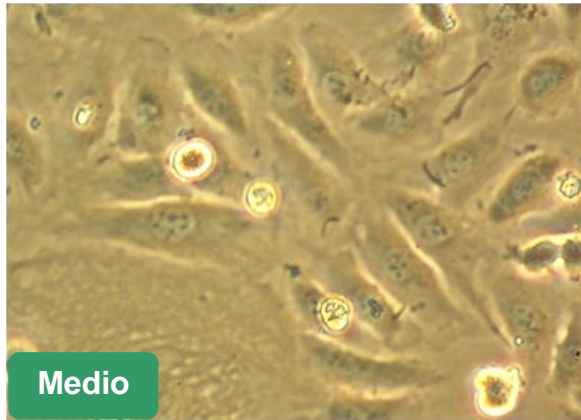
También se observó que estos LAs que mantuvieron los cultivos indujeron un cambio morfológico similar al observado con el control positivo (LA33, referencia). Con este primer experimento se logró establecer que cada líquido ascítico presenta un comportamiento específico. En varias micrografías puede observarse la presencia de moco, gotas aparentemente oleosas y la gama de colores que pueden adquirir los diferentes LAs. En general los líquidos ascíticos que dañaron los cultivos iniciaron redondeando

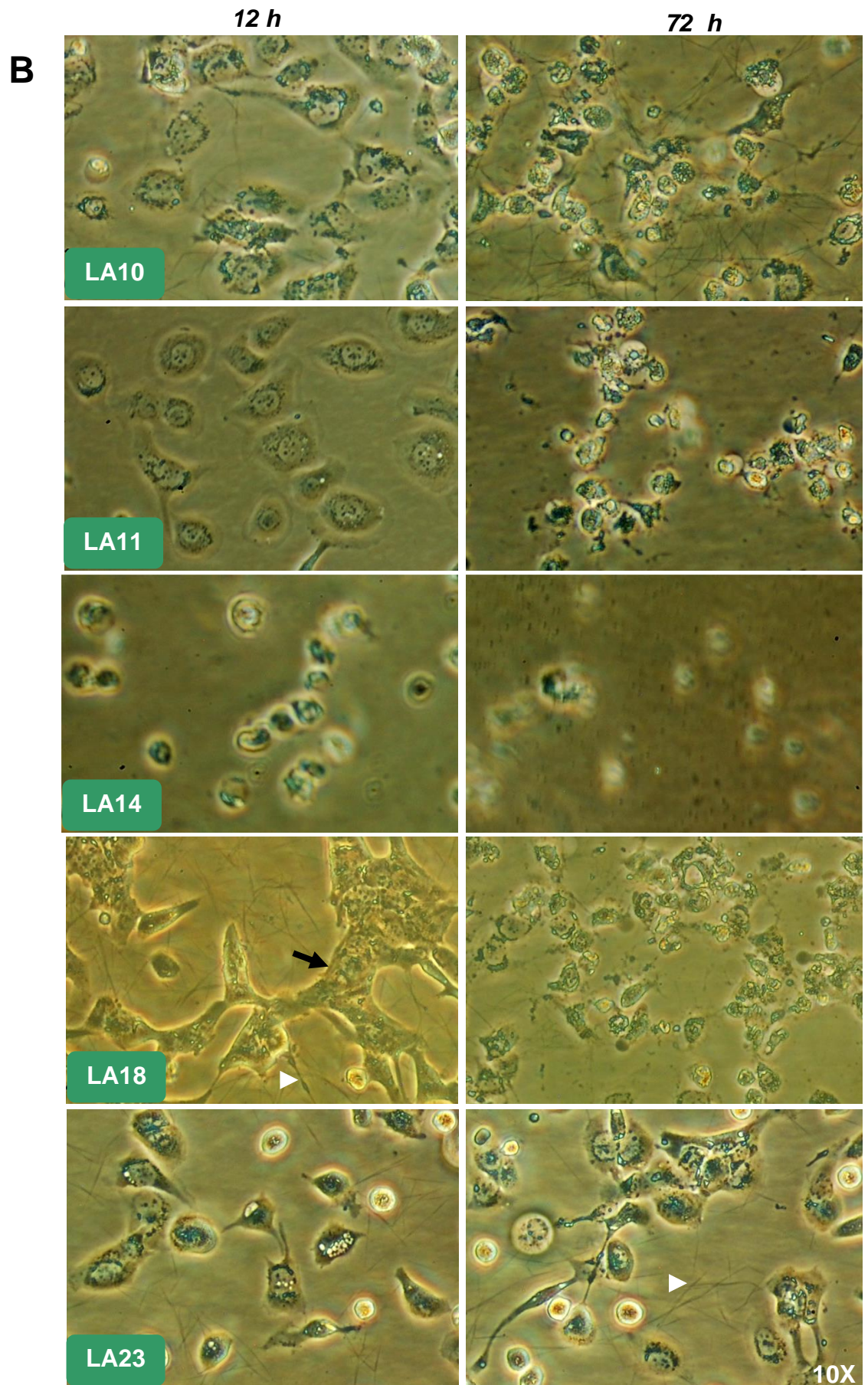
las células hasta prácticamente lissarlas, a diferencia de los que propiciaron la supervivencia del cultivo que indujeron la formación de prolongaciones largas y muy delgadas terminadas en punta.

A

12 h

72 h





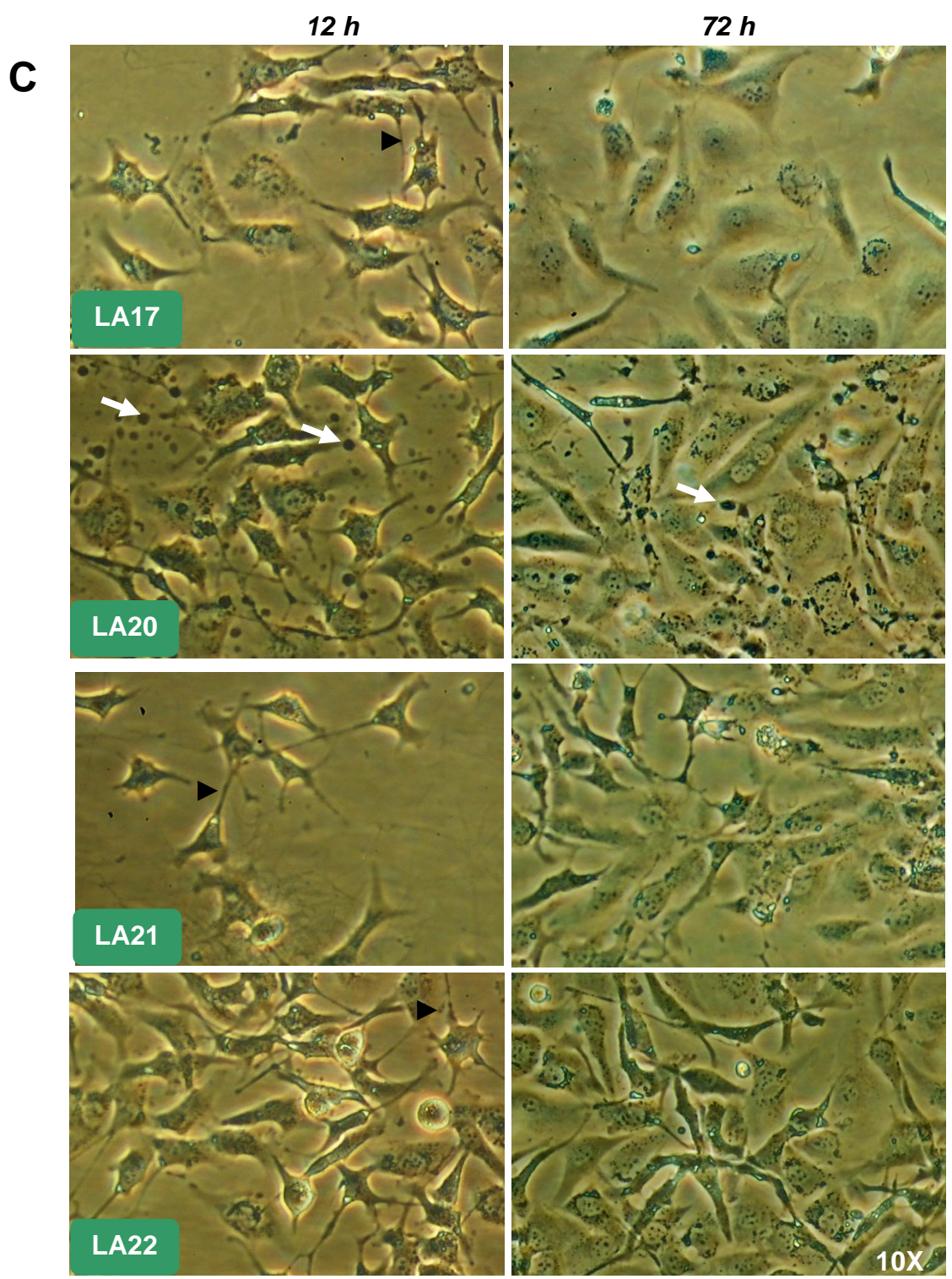


Figura 9: Tratamiento de INCan017 con líquidos ascíticos del lote No. 1. Fotomicrografías por microscopía óptica por la técnica de contraste de fases (Objetivo 10X). Cultivos de 25×10^4 células de INCan017 por condición, fueron sometidos al tratamiento con el primer lote de líquidos ascíticos. A. Como control positivo de inducción se utilizó el LA33 y como control negativo medio de cultivo McCoy + SFB. De acuerdo al efecto que mostraron los LAs sobre las células éstos se dividieron en: dañinos y no dañinos. B. Los LAs que mostraron tener un efecto contraproducente para el cultivo fueron el LA10, LA11, LA14, LA18 y LA23. C. Por el contrario las ascitis que permitieron la supervivencia del cultivo de manera favorable fueron: LA17, LA20, LA21 y LA22. (Prolongaciones puntiagudas, cabeza de flecha negra; agregado celular, flecha negra; gotas tipo oleosas, flecha blanca; moco, cabeza de flecha blanca).

Tratamiento de cultivos de INCan017 con líquidos ascíticos del lote No.2

Una vez determinado el efecto de los distintos líquidos ascíticos se procedió a realizar el procesamiento el tratamiento con el segundo lote de líquidos ascíticos para lo cual 25×10^4 células fueron sembradas en cajas T-25 y se trataron con las siguientes ascitis: LA24, LA25, LA28, LA29, LA31, LA32, LA34, utilizando como controles del experimento células incubadas con medio McCoy suplementado con 10% de SFB como control negativo de inducción y células incubadas con el LA33 como control positivo de la inducción. Se incubaron por 72 h a 37 °C y 5% de CO₂.

En este caso los cultivos se mantuvieron viables a excepción del cultivo tratado con el LA24, el cual tuvo que ser procesado casi 48 h después de haber iniciado el tratamiento debido a que desarrolló la formación de agregados celulares presentando un cambio morfológico no típico de crecimiento en ascitis. Esto sucedió de acuerdo a lo observado en el experimento de análisis previo del efecto de los líquidos ascíticos. La morfología celular en la mayoría de los casos fue claramente similar a la antes observada con el líquido ascítico de referencia y en algunos casos (Figura 10).

72 h

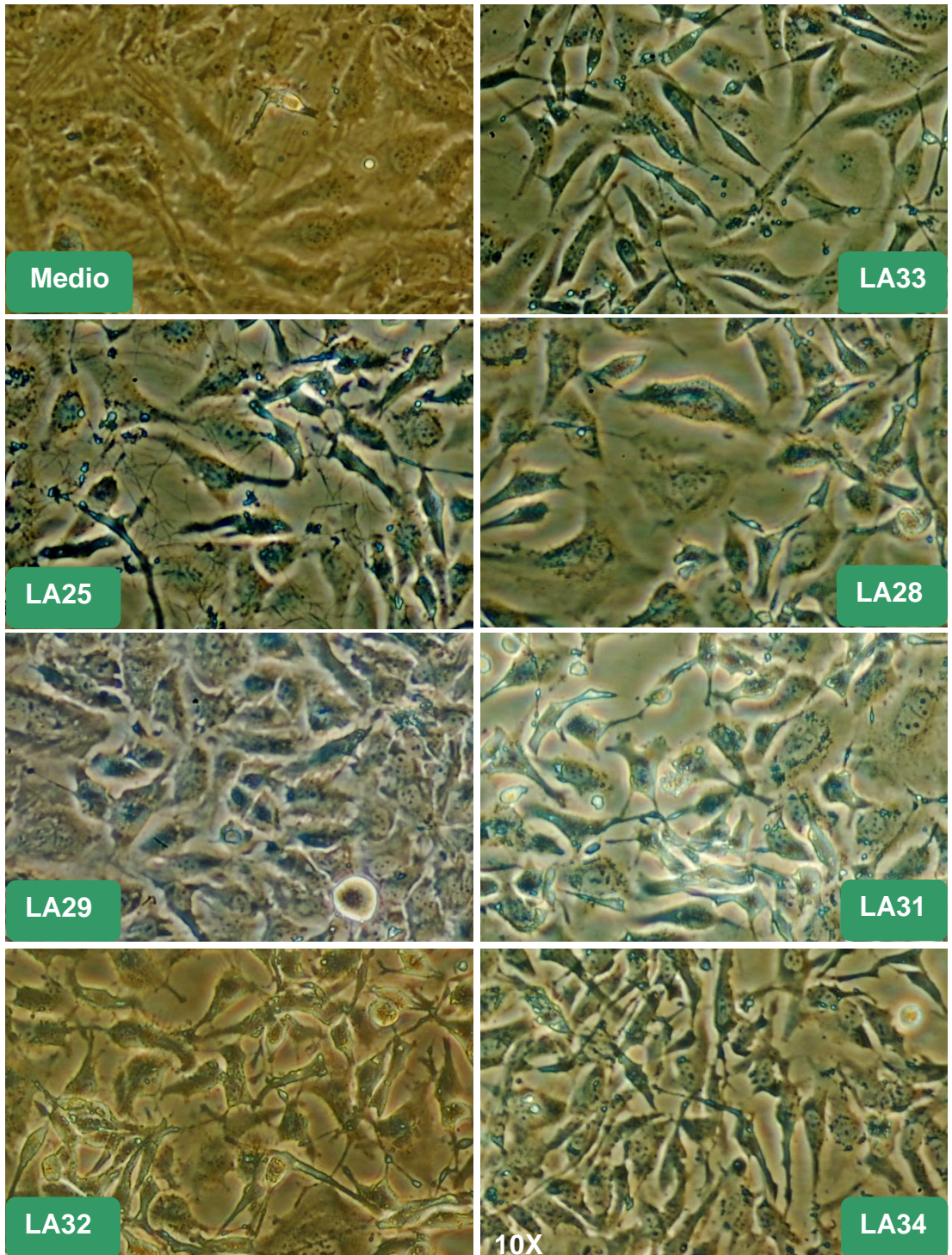


Figura 10: Tratamiento de cultivos de INCan017 con el lote No. 2 de líquidos ascíticos. Fotomicrografías por microscopía óptica por la técnica de contraste de fases (Objetivo 10X). Cultivos de 25×10^4 células de la línea celular INCan017 fueron tratados según el protocolo de exposición de cultivos con líquidos ascíticos, con el segundo lote de líquidos ascíticos el cual está comprendido por: LA24, LA25, LA28, LA29, LA31, LA32, LA34 y los controles de inducción de ~25 kDa, medio y LA33 (negativo y positivo, respectivamente). Los cultivos fueron incubados por 72 h a 37 °C, 5%CO₂ (las micrografías corresponden a las 72 h de tratamiento).

Tratamiento de células INCan017 con del lote No. 3 de líquidos ascíticos.

Para continuar con la determinación del efecto inductor de la proteína de 25 kDa por parte de diversos líquidos ascíticos se realizó el tratamiento con el tercer lote de líquidos ascíticos el cual está comprendido por: LA30, LA35, LA36, LA37, LA39, LA41 y LA43. De igual manera los cultivos utilizados fueron a partir de 25×10^4 células de la línea celular INCan017 y se incubaron por 72 h a 37 °C con una atmosfera de 5% de CO₂. Los cultivos se mostraron estables durante el primer día de tratamiento y aquéllos que mostraron algún grado de afectación fueron procesados después de transcurrir las 13 h de incubación. Las células no mostraron una morfología típica de células en LA muy acentuada, sin embargo, los cambios morfológicos observados parecieron no afectar al cultivo celular al poder visualizar muy pocas células despegadas del sustrato (Figura 11). El no encontrar la morfología típica de células en LA (de referencia) nuevamente indicó que la constitución de los distintos LAs influye en el comportamiento celular.

72 h

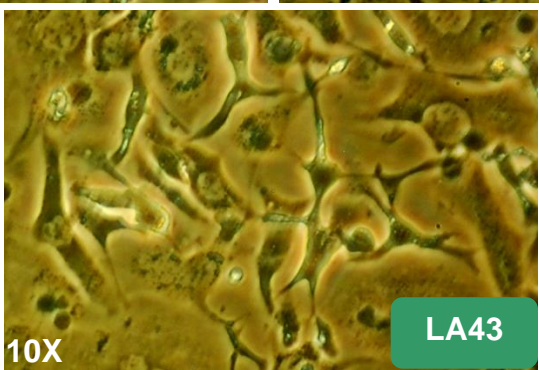
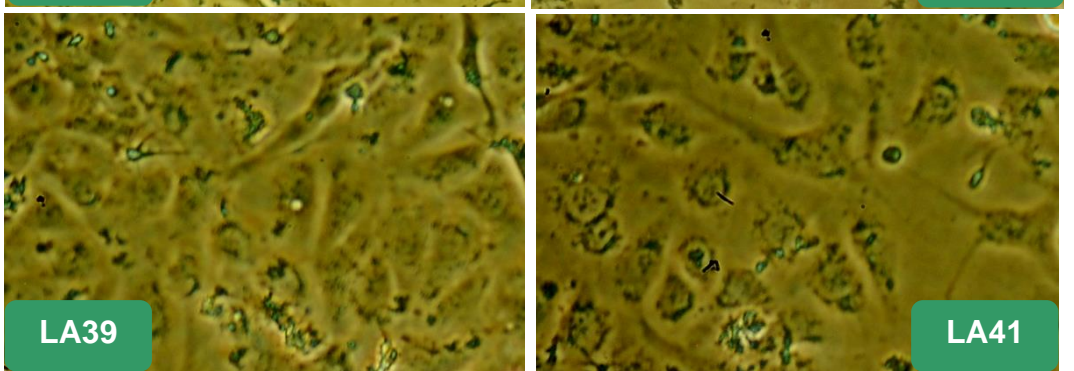
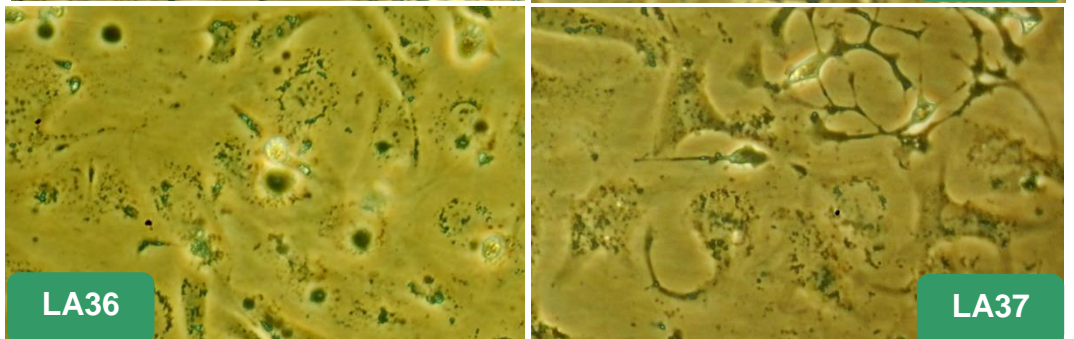
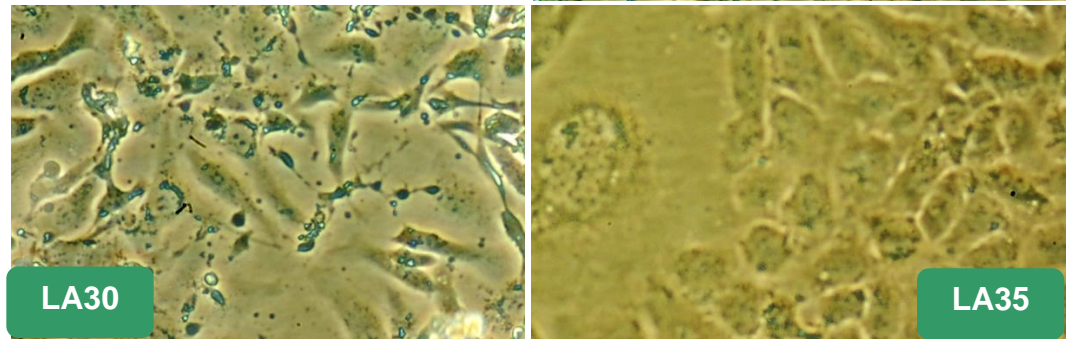
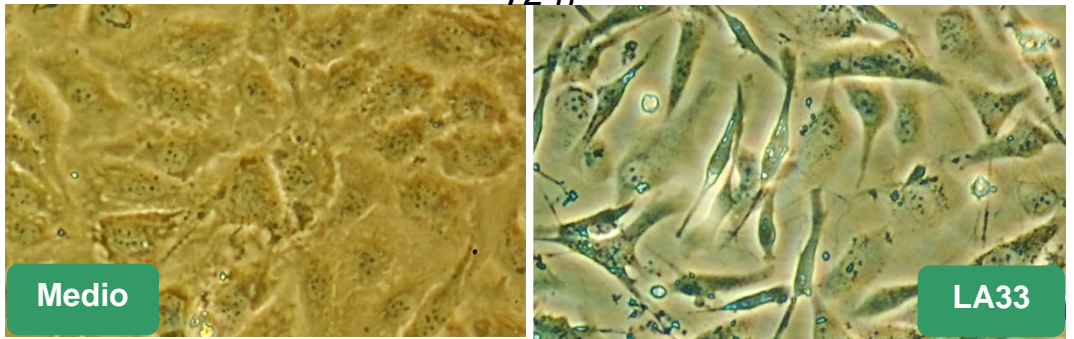


Figura 11: Tratamiento de cultivos de INCan017 con el lote No.3 de líquidos ascíticos. Fotomicrografías por microscopía óptica por la técnica de contraste de fases (Objetivo 10X). Cultivos de 25×10^4 células INCan017 fueron tratadas con el lote No. 3 de líquidos ascíticos (LA30, LA35, LA36, LA37, LA39, LA41 y LA43). Se incluyeron medio + SFB y LA33 como controles de inducción negativo y positivo, respectivamente.

Tratamiento de células INCan017 con líquidos ascíticos del lote No. 4

Se continuó evaluando el efecto inductor de los líquidos ascíticos con respecto a la inducción de la molécula de ~ 25kDa en células INCan017. En este experimento las células fueron tratadas con los líquidos ascíticos que conformaron al lote No.4 los cuales son LA 49, LA 50, LA51, LA52, LA53, LA55 y LA56. Los cultivos fueron procesados siguiendo el mismo protocolo acerca del daño celular que el líquido ascítico pueda causarles y procesando a más tardar transcurridas 13 h de tratamiento con el líquido ascítico. Se utilizaron como controles de inducción: medio McCoy + SFB y LA33 como control negativo y positivo, respectivamente. En el caso de LA49, LA53 y LA52 se logró observar la morfología celular antes documentada con el líquido ascítico de referencia. Además el LA56 presentaba abundantes cristales, los cuales parecieron no afectar el cultivo (Figura 12).

72 h

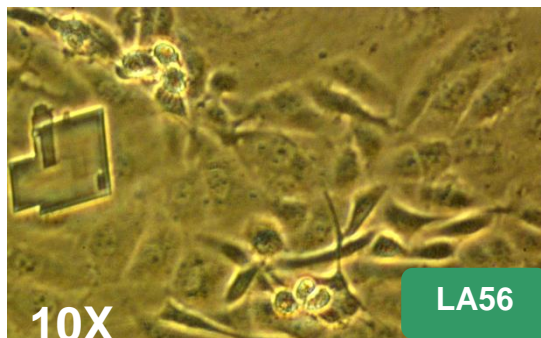
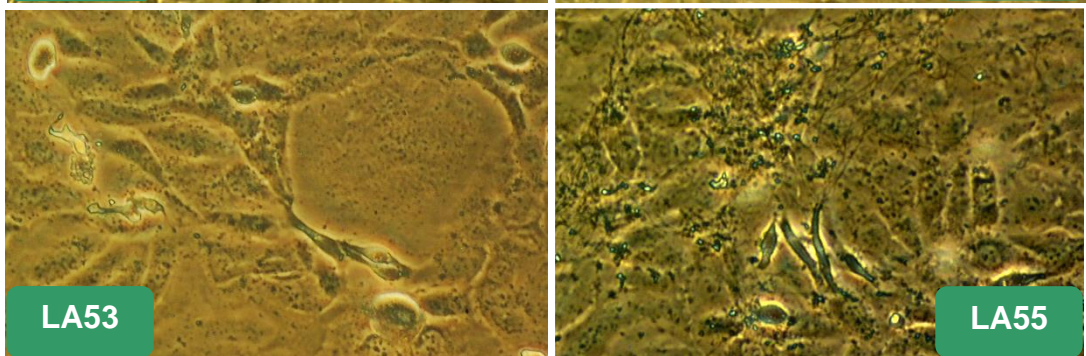
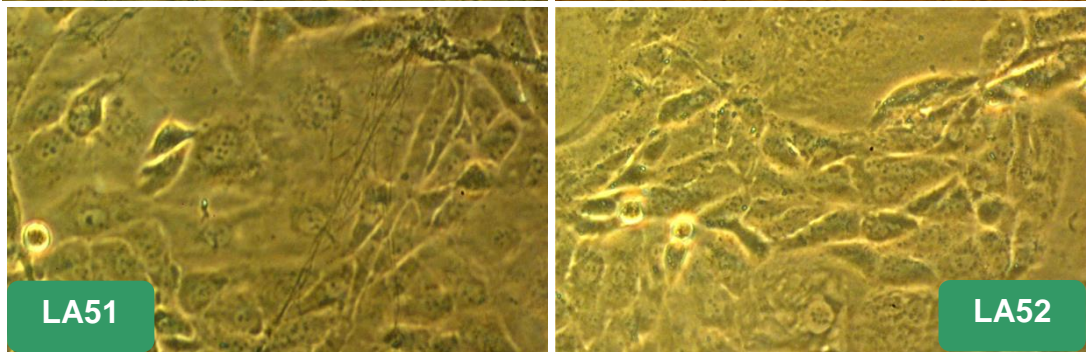
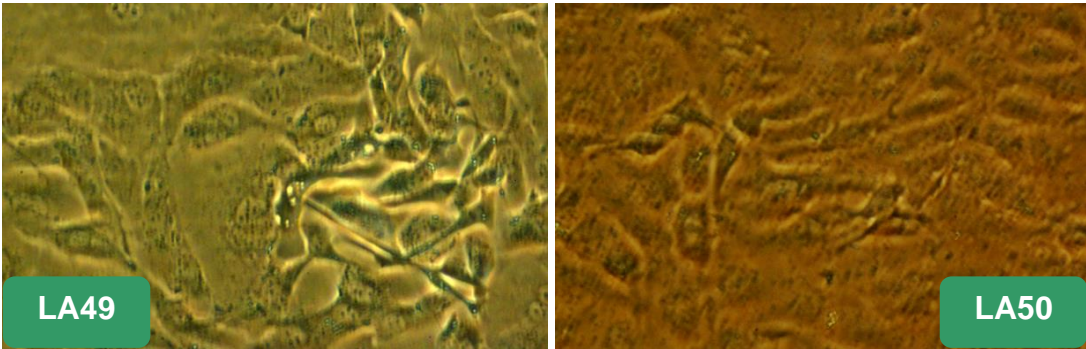
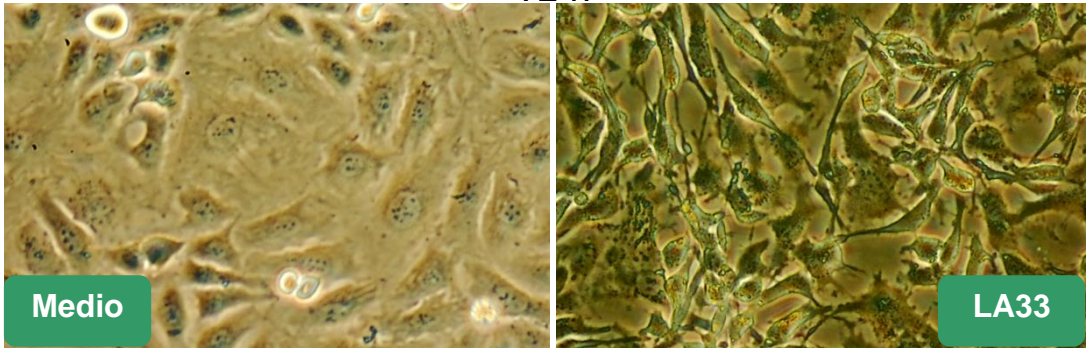
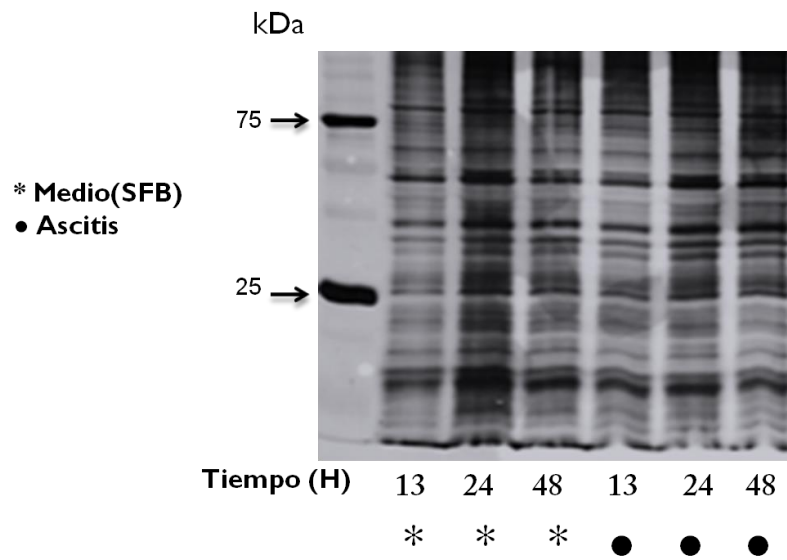


Figura 12: Tratamiento de células INCan017 con líquidos ascíticos del lote No.4. Fotomicrografías por microscopía óptica por la técnica de contraste de fases (Objetivo 10X). 25×10^4 células INCan017 fueron tratadas con el lote No. 4 de LA, los cuales corresponden a: LA49, LA50, LA51, LA52, LA53, LA55 y LA56. Todos los cultivos fueron llevados a un tiempo de incubación de 72 h a 37°C en una atmosfera al 5% de CO². El experimento tuvo como controles: medio + SFB y LA33 como control, negativos y positivo de inducción respectivamente.

La proteína de ~25 kDa es inducida a tiempos cortos (13 y 24 h) de tratamiento con el líquido ascítico de referencia, LA33.

Resultaba importante conocer si la proteína de ~ 25 kDa era inducida a tiempos tempranos de 13, 24 y 48 h, lo cual serviría para procesar aquellos cultivos que resultaban dañados por algunos Las, antes de perder a la mayoría de las células, lo que se traduciría en la pérdida de proteína total. Se realizó el experimento utilizando 25×10^4 células de INCan017 con los controles de inducción antes establecidos (medio de cultivo + SFB y LA33 a 48 h, controles negativo y positivo, respectivamente). El perfil proteico mostró que el procesamiento de las muestras se llevó a cabo correctamente, al no detectar degradación, visualizado por tinción con plata de las proteínas (Figura 13A). El resultado del Western blot indicó que la proteína de ~ 25 kDa se induce desde tiempos de 13 h de incubación en células INCan017 con el líquido ascítico de referencia (Figura 13B). Así mismo, este resultado evidenció que la proteína de ~ 25 kDa, se induce desde tiempos relativamente cortos de interacción con el LA. Será necesario realizar cinéticas a tiempos muy cortos (min) para determinar el tiempo mínimo requerido para lograr la detección de la proteína. Además con este ensayo se confirmó nuevamente que la proteína es inducida por efecto del LA de CaOv, al no ser detectada a tiempos tempranos de crecimiento de las células en medio de cultivo convencional.

A



B

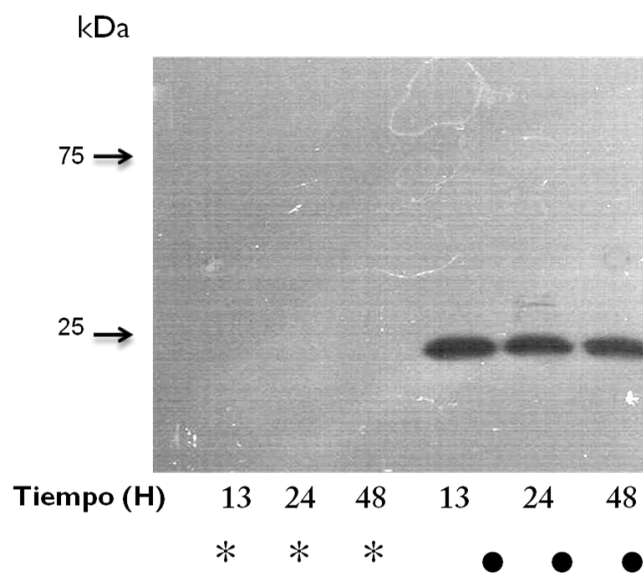


Figura 13: Cinética de Inducción de la proteína de ~25 kDa. Cultivos de INCan017 tratados con el LA de referencia para determinar la inducción de esta molécula a 13, 24 y 48 h de incubación. A. SDS-PAGE al 12.5% de extractos de INCan017 tratados con medio o con LA33 durante la cinética. B. Western blot con el mAb 3C10 (dil. 1:1000) de extractos de INCan017 tratadas con medio o LA33 durante la cinética de inducción, mostrando reacción positiva desde tiempos de 13 h de incubación con el líquido ascítico de referencia, LA33.

La proteína de ~25 kDa es inducida por efecto de distintos LA de CaOv pertenecientes al lote No. 2.

El tratamiento de la línea celular INCan017 con los líquidos ascíticos de CaOv mostró diferencias morfológicas y estructurales importantes. Una característica importante de las células tratadas con ascitis es que se vuelven más adherentes o resistentes al proceso de digestión brindado por la tripsina para separarlas o despegarlas de la superficie para su procesamiento posterior. El protocolo descrito en la metodología cubre bien los requerimientos para las células cultivadas solo en presencia de medio + SFB; en el caso de las células tratadas con ascitis el tiempo de despegado puede duplicarse o triplicarse en comparación con las células en medio. El perfil proteico obtenido por la separación de las proteínas en un SDS-PAGE al 12.5% permitió visualizar estas biomoléculas mediante una tinción con plata. Se pudo apreciar que las proteínas de las células tratadas con el LA24 se observaron en menor concentración, debido quizá a un proceso de degradación de la muestra (Figura 14A). El resultado del Western blot mostró que los líquidos ascíticos: LA25, LA28, LA29, LA31, LA32 y LA34 son capaces de inducir la expresión de la molécula de ~25 kDa en cultivos celulares de INCan017 (Figura 14B). Con respecto al LA24, la prueba debe ser repetida debido al estado de la muestra con la que se midió este evento.

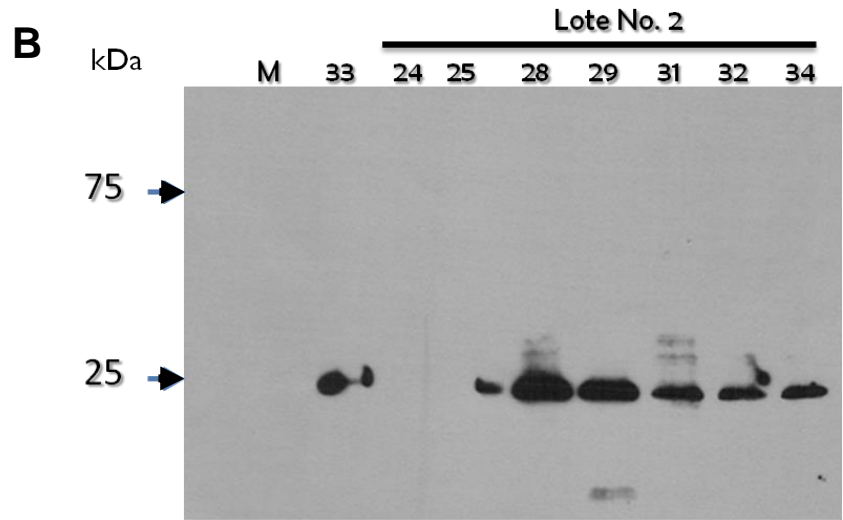
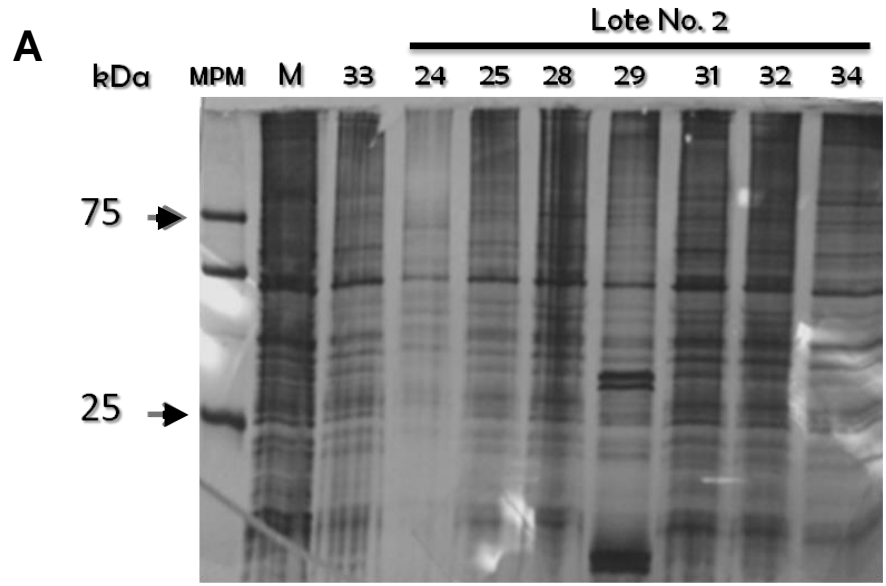
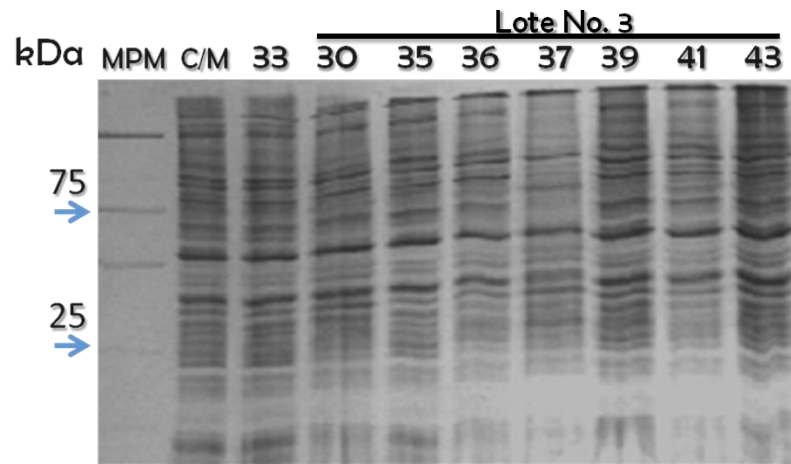


Figura 14: SDS-PAGE y Western blot de extractos de células INCan017 tratadas con el lote No. 2 de líquidos ascíticos de CaOv. A. Perfil proteico de células INCan017 tratada con líquidos ascíticos. B. Western blot con el anticuerpo monoclonal 3C10 Dil. 1:1000, detectando la molécula de ~25 kDa en extractos de INCan017 expuestos a los LAs: LA25, LA28, LA29, LA31, LA32 y LA34.

La proteína de ~ 25 kDa es inducida por efecto de LA de los lotes No. 3 y No. 4.

A partir de cultivos de INCan017 tratados con los lotes 3 y 4, se prepararon extractos proteicos para resolverlos en geles SDS-PAGE al 12.5%. Dos geles conteniendo extractos de células INCan017 tratadas con el lote No.3 o No.4 se destinaron a tinción con plata y mostraron que las proteínas se encontraban con un patrón similar entre cada una de las condiciones de tratamiento (Figura15A, Figura 16A). Los ensayos de Western blot mostraron un efecto inductor para el caso de los cultivos tratados con los LAs: LA30, LA35, LA36, LA37, LA39, LA41 y LA43 del lote No. 3. Esta señal se mostró positiva para todas las ascitis. Sin embargo la inducción fue diferente para LA37 y LA43 los cuales mostraron menos intensidad (Figura 15B). El resultado para el caso de los LAs del lote No. 4 fue de señal positiva para inducción de la proteína de ~25 kDa con: LA49, LA52, LA53, LA55 y LA56. Para los líquidos ascíticos LA50 parece haber muy pobre señal, lo cual todavía debe ser corroborado. En el caso de LA51 la señal parece ser francamente negativa (Figura 16B).

A



B

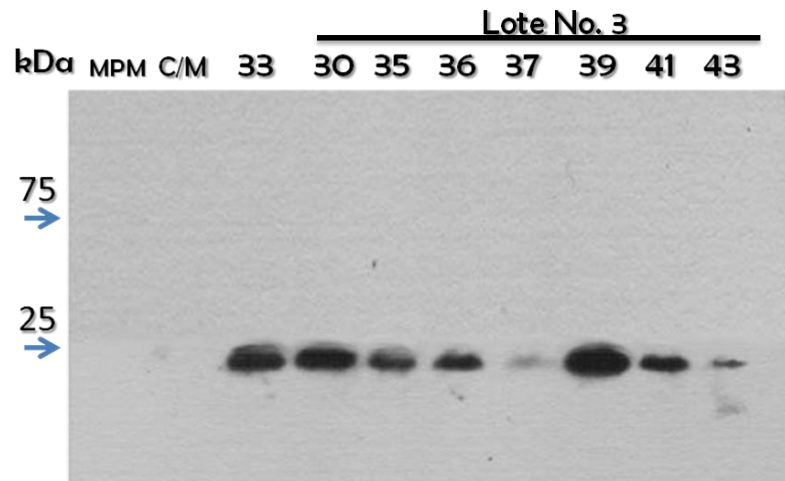
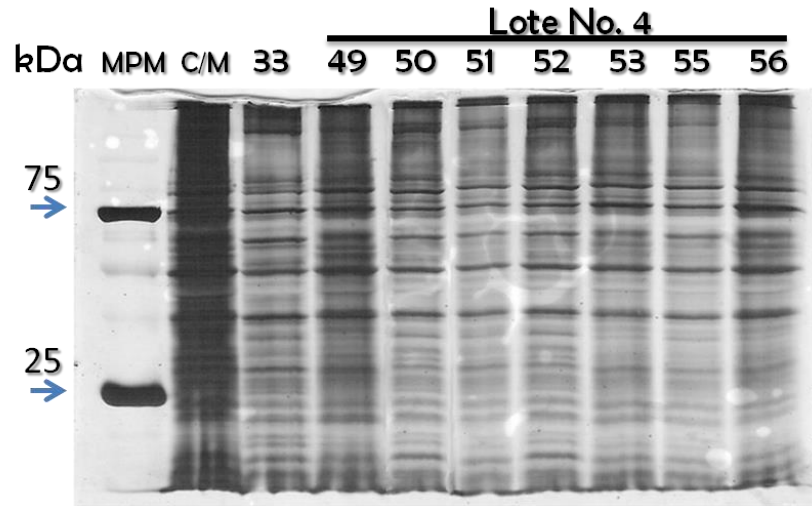


Figura 15: SDS-PAGE y Western blot de extractos de células INCan017 tratadas con el lote No.3. A. SDS-PAGE al 12.5% de extractos de INCan017 tratadas con los líquidos ascíticos del lote No.3. B. Western blot utilizando el anticuerpo monoclonal 3C10 (Dil. 1:1000) para detectar el efecto inductor del lote No.3 con respecto a la expresión de la proteína de ~ 25 kDa.

A



B

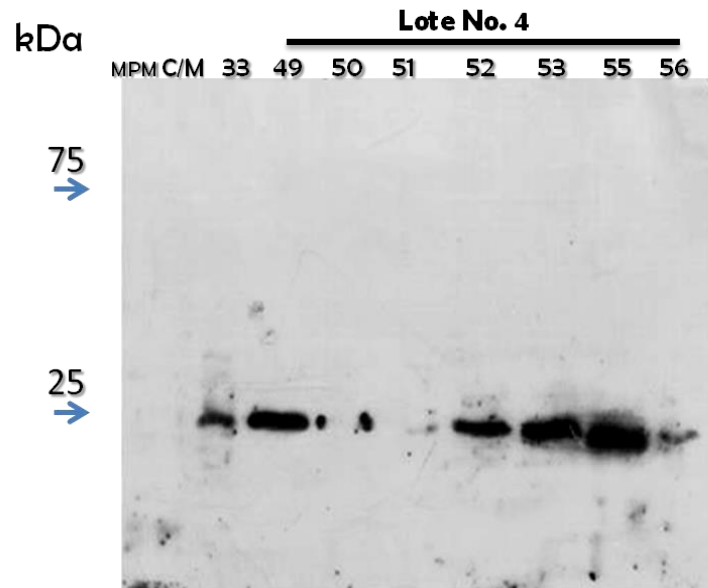


Figura 16: SDS-PAGE y Western blot de INCan017 tratadas con el lote no.4.

A. Perfil proteico de extractos de INCan017 tratadas con el lote no.4 de líquidos ascíticos. B. Western blot utilizando el mAb 3C10 (dil 1:1000) para detectar la inducción de ~ 25 kDa por efecto de los líquidos ascíticos del lote no. 4.

Tabla 1: Resumen de resultados de la inducción de ~25 kDa por efecto de líquidos ascíticos de CaOv.

	No. de LA	Subtipo histológico de CaOv	Etapas clínicas	Inducción de ~25 kDa
1.	LA24	Seroso papilar	IV	No
2.	LA25	Seroso papilar	IIIC	Si
3.	LA28	Mucinoso	IV	Si
4.	LA29	P. diferenciado	IIIC	Si
5.	LA30	Krukenberg	IV	Si
6.	LA31	Seroso papilar	IIB	Si
7.	LA32	Células claras	IV	Si
8.	LA34	Seroso papilar	IV	Si
9.	LA35	Seroso papilar	IV	Si
10.	LA36	Seroso papilar	IIIC	Si
11.	LA37	Seroso papilar	IIIC	Si
12.	LA39	Seroso papilar	IV	Si
13.	LA41	P. diferenciado	IIIC	Si
14.	LA43	Seroso papilar	IIIC	Si
15.	LA49	Mucinoso	IIIC	Si
16.	LA50	Seroso papilar	IIIC	No
17.	LA51	Seroso papilar	IIIC	No
18.	LA52	ND	ND	Si
19.	LA53	ND	ND	Si
20.	LA55	ND	ND	Si
21.	LA56	ND	ND	Si
22.	LA33	Endometrioides	IIIC	Si

ND: No Determinando

La proteína de ~ 25 kDa se localiza en estructuras de tipo vesicular en el citoplasma y en la periferia nuclear.

Cultivos de INCan017 crecidos en cubreobjetos se incubaron con el anticuerpo monoclonal 3C10 de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Los cubreobjetos se montaron con Vectashield con DAPI (en rojo para la Figura 17 y azul para la Figura 18) para marcar los núcleos celulares y las laminillas se observaron con el microscopio confocal Carl Zeiss LMS 700, como se describe en la sección de metodología.

Como control negativo de fluorescencia una de las laminillas se incubó únicamente con el anticuerpo secundario (solo α -ratón-FITC) y no se observó señal alguna, descartando así que la señal observada en las muestras problema pudiera deberse a un pegado inespecífico del anticuerpo secundario. Las condiciones probadas fueron células INCan017 crecidas en medio de cultivo o en LA33. Ambas condiciones se incubaron con el mAb3C10 pero solo se observó señal positiva para la condición de INCan017 en LA33.

La presencia de la marca fluorescente debida al pegado del anticuerpo 3C10 se puede apreciar claramente a nivel citoplasmático, en estructuras de tipo vesicular, así como también se puede apreciar una localización perinuclear de esta molécula (Figura 17). Posteriormente este mismo ensayo se analizó utilizando la herramienta de campo claro lo que permitió conocer la distribución celular, observando la marca para la proteína de ~25 kDa en estructuras citoplasmáticas, así como en las típicas prolongaciones celulares que forman las células INCan017 cuando son tratadas con liquido ascítico. Resulta evidente la diferencia morfológica estructural y la forma del núcleo, así como también la talla celular, que suele ser mayor en las células que se encuentran con medio + 10% de SFB (Figura 18A). Una proyección máxima (3D) de las células en INCan017 en LA33 corrobora que la localización de la proteína de ~ 25 kDa es citoplasmática y perinuclear contenida en estructuras de tipo vesicular (Figura 18B).

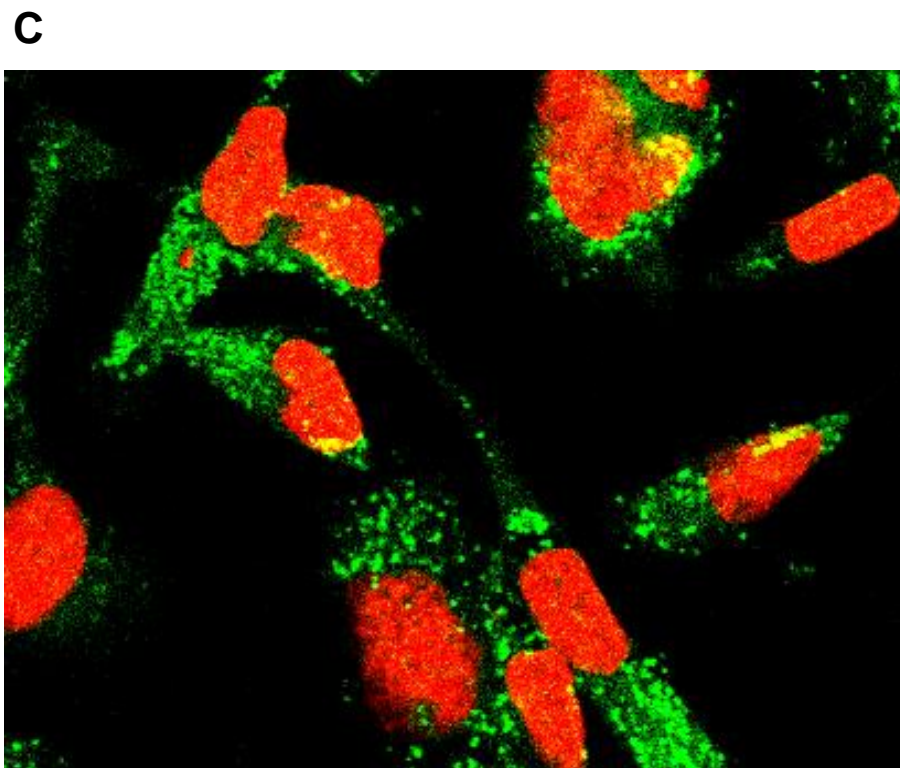
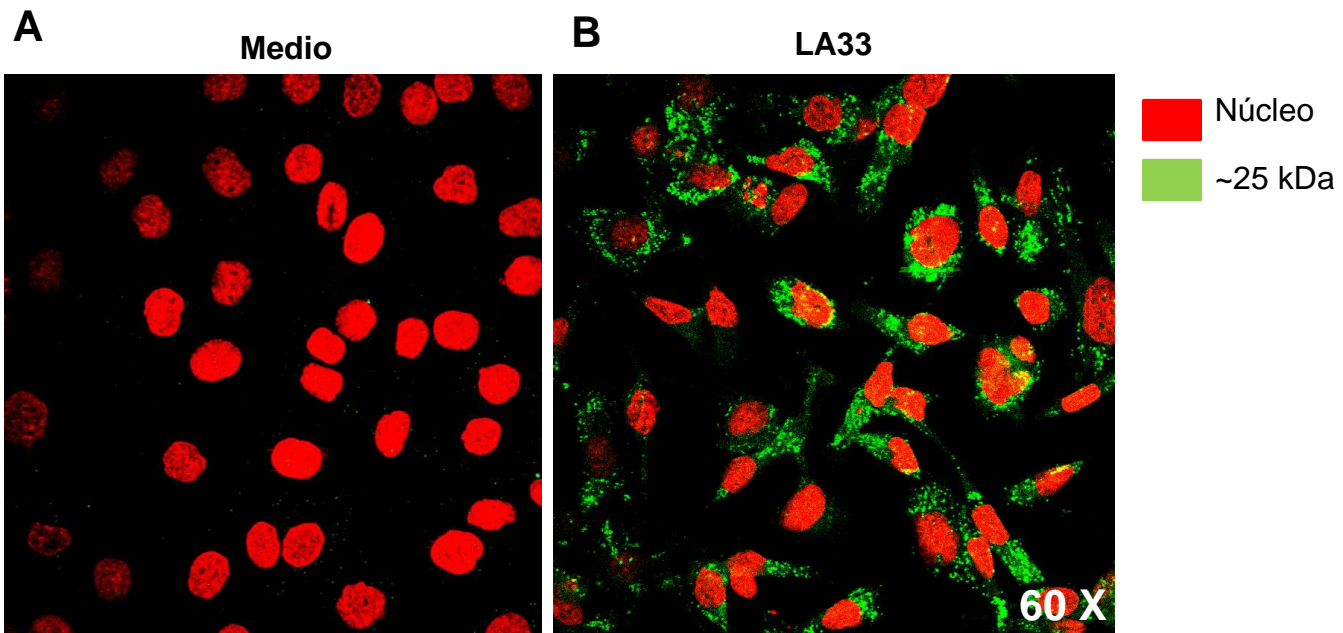
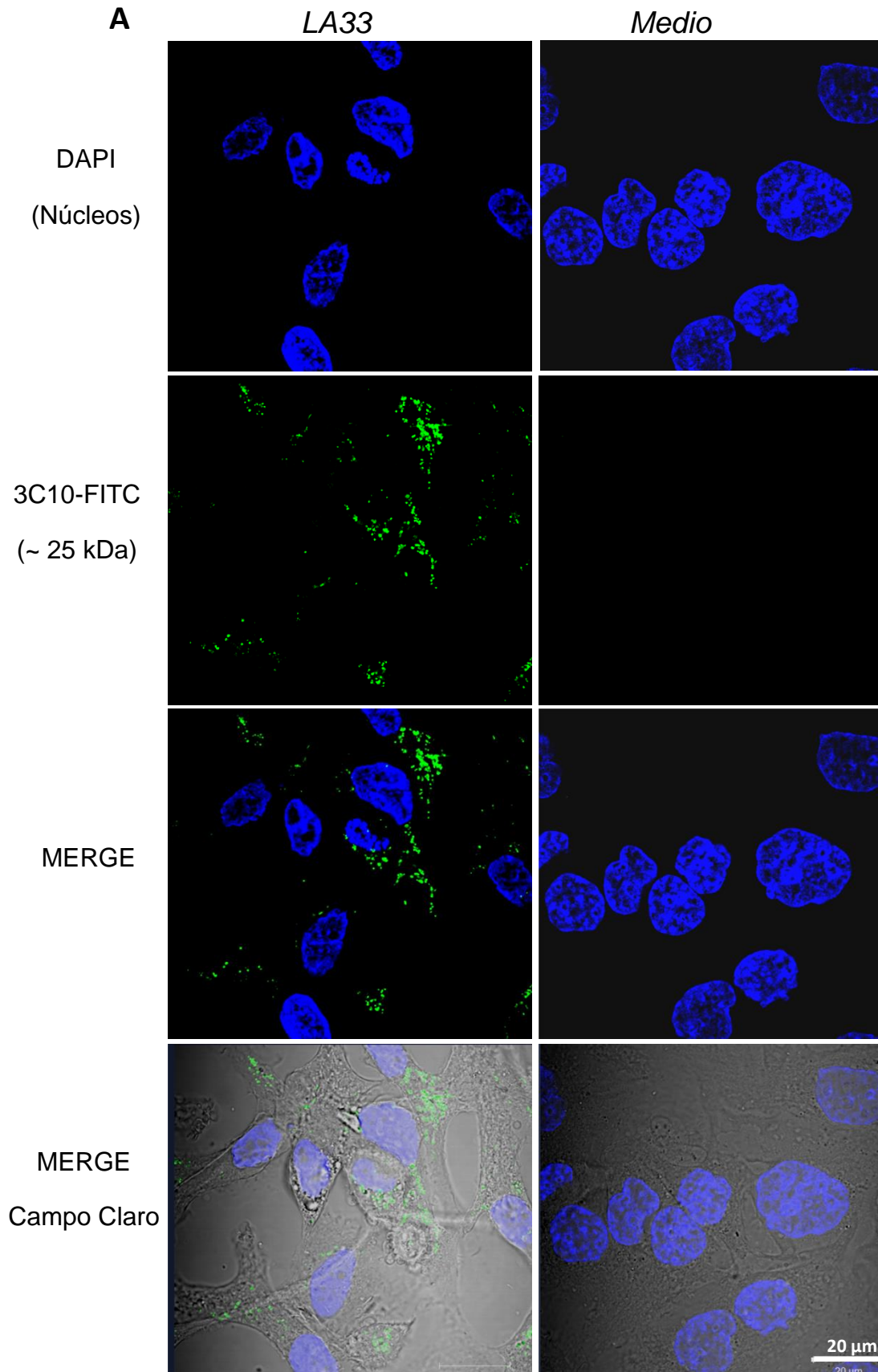


Figura 17: Inmunolocalización de ~25 kDa en células INCan017 expuestas a medio o LA33. A). Tinción con el anticuerpo monoclonal 3C10 (revelado con α -ratón-FITC), condición en medio suplementado con 10% de SFB. B). INCan017 tratada por 72 h con LA33. C). INCan017 tratadas con LA33 y teñidas con el mAb 3C10. Aumento 60X. Se muestra un corte representativo obtenido por microscopía confocal.



B

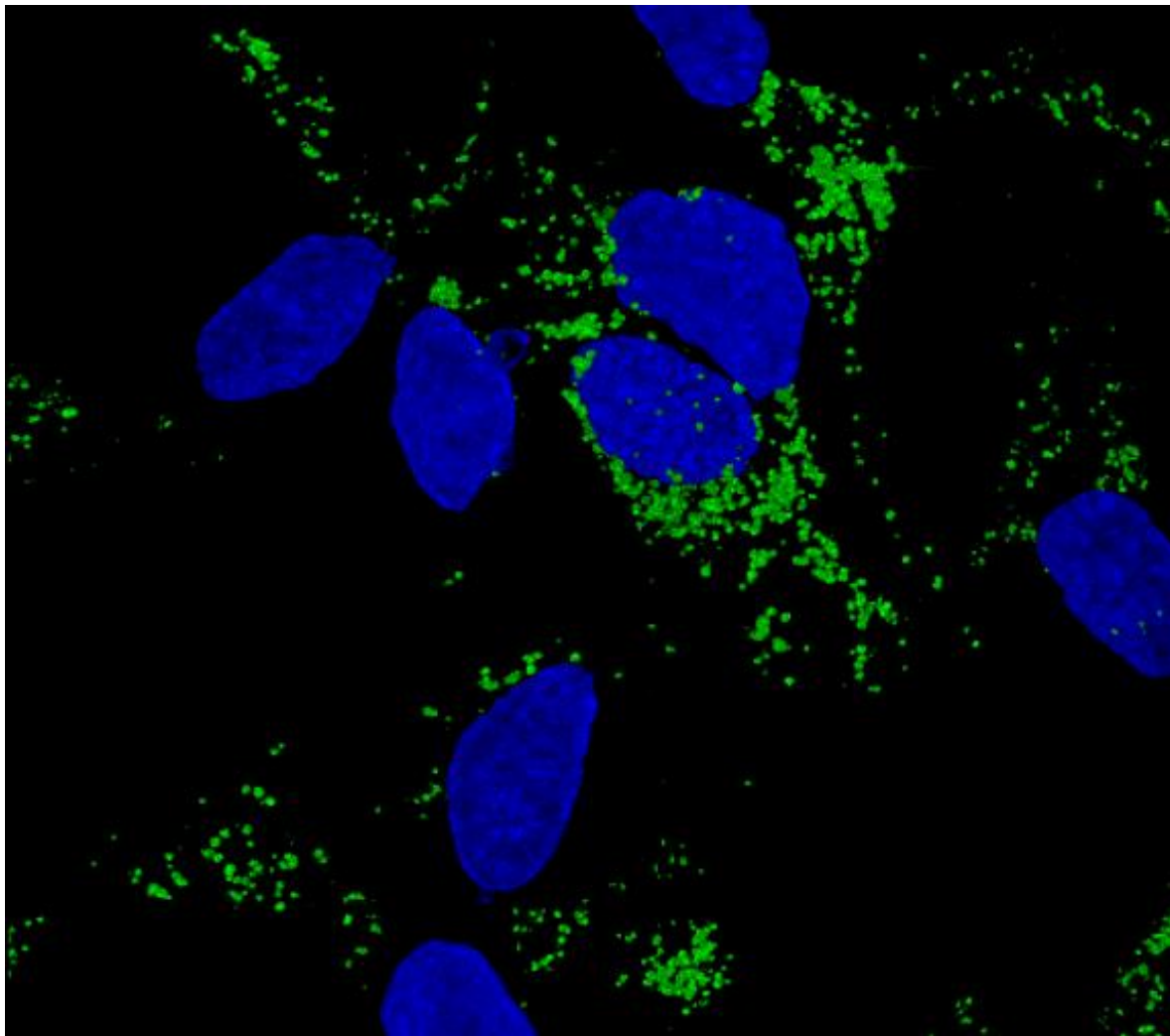


Figura 18: Inmunolocalización de la molécula de ~25 kDa en células INCan017 tratadas con LA y medio. Células INCan017 fueron tratadas con LA33 o con medio. Tinción con el mAb3C10 como anticuerpo primario (Dil. 1:100) y con un anticuerpo α -ratón-FITC (verde) como anticuerpo secundario (Dil. 1: 50); los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Se muestra un corte representativo obtenido por microscopía confocal en ambas condiciones (A) y un aumento en 3D de una sección de células en LA33 (B). Imágenes representativas de 2 experimentos independientes.

Inmunohistofluorescencia de ~ 25 kDa en cortes histológicos de ovario y de tumores de CaOv.

Para conocer si esta molécula también se expresa en el tejido tumoral, se utilizaron cortes histológicos de un tumor de CaOv de tipo seroso papilar. Utilizando el anticuerpo mAb 3C10 se procedió a realizar una inmunohistofluorescencia. al igual que en las muestras de células en cultivo procesadas para Inmunofluorescencia, se utilizó DAPI para marcar los núcleos y FITC para marcar a la molécula de ~ 25 kDa. En este experimento se tomó como condición control la tinción de un corte de ovario sano, el cual al analizarlo se consideró como negativo al no detectar la señal correspondiente a la tinción por el mAb 3C10; cabe mencionar que se realizó una exploración utilizando la herramienta denominada “tile scan” que posee el microscopio confocal, la cual, mostró un análisis de 5 x 5 campos para descartar la positividad del tejido sano (Figura 19A).

El resultado de la tinción del tumor primario de CaOv de tipo seroso papilar muestra una señal claramente positiva para esta molécula detectada por el anticuerpo monoclonal 3C10. Similarmente a lo observado en las IF de cultivos celulares de INCan017 pretratadas con Las, se observa la presencia de esta proteína en el citoplasma celular. En el epitelio del borde del tumor también se alcanza a detectar señal positiva tanto en el citoplasma como en la membrana celular (Figura 19B).

Se realizó un acercamiento de una zona positiva, en la cual se puede apreciar la monocapa de células epiteliales y el estroma del tumor. En el estroma del tumor, se puede apreciar la localización de tipo vesicular y perinuclear antes descrita para los cultivos de INCan017 (Figura 20). El acercamiento también permitió determinar que la señal positiva para la proteína de ~ 25 kDa en el epitelio se encuentra en menor proporción que la señal detectada en el estroma del tumor.

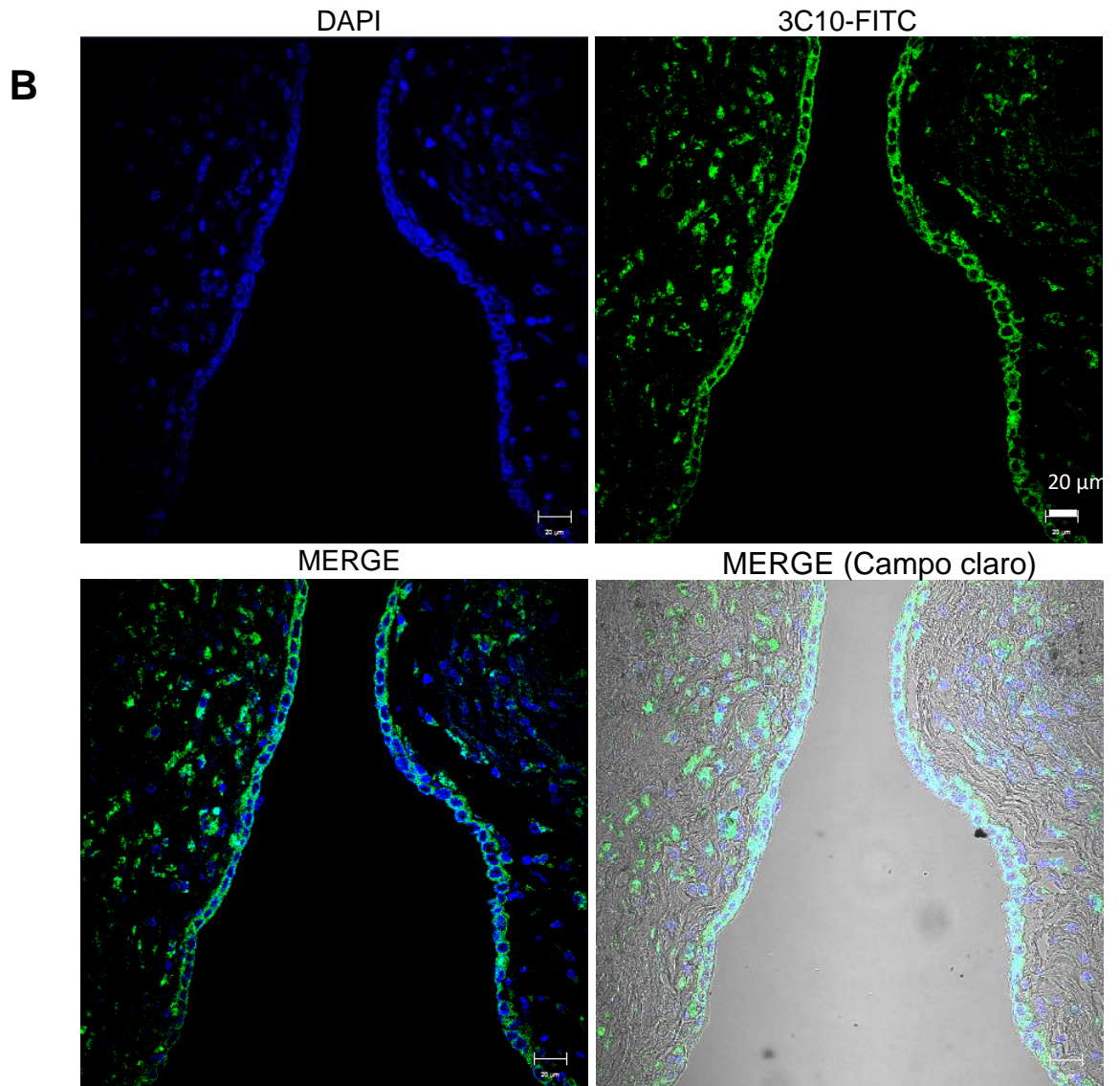
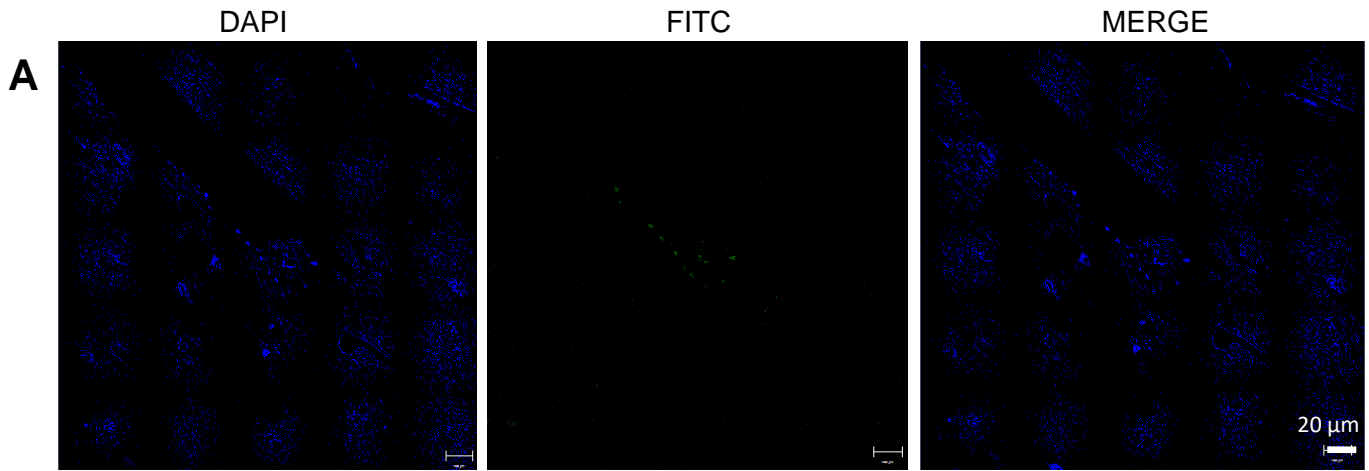


Figura 19: Inmunohistofluorescencia de la proteína de ~ 25 kDa en cortes histológicos de ovario y de tumor de CaOv. A. Corte histológico de ovario sano teñido con DAPI y mAb 3C10 (FITC). B. Corte histológico de CaOv seroso papilar teñido con DAPI y 3C10 (FITC).

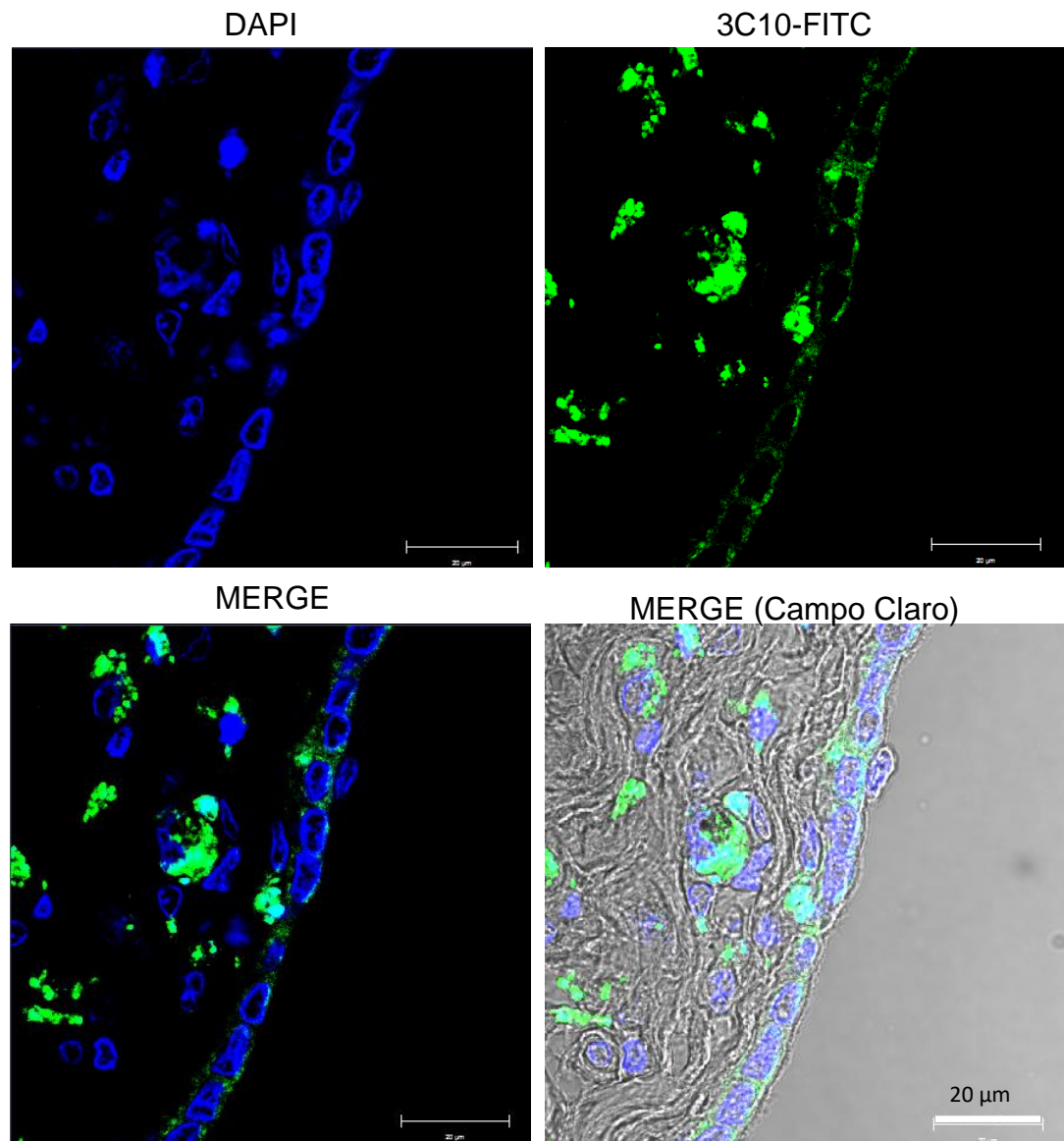


Figura 20: Acercamiento de una zona positiva para la tinción con el mAb 3C10. Tinción de núcleos con DAPI, detección de ~25 kDa con mAb 3C10 (FITC).

X. DISCUSIÓN

El líquido ascítico generado por la enfermedad metastásica es ahora conocido como un importante microambiente tumoral debido a las características tan particulares que posee. En el cáncer de ovario, la acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal es consecuencia de la diseminación de células transformadas desde el ovario hasta órganos distantes, afectando principalmente la cavidad abdominal y la peritoneal, esto debido al bloqueo de los vasos linfáticos que se encargan de drenar el fluido desde esta región del organismo (Neal *et al.*, 1987). Este bloqueo está protagonizado por células malignizadas que generan diversos factores que modulan o descontrolan la permeabilidad vascular (Pourgholami MH., *et al* 2012). En diversos intentos por conocer más sobre la biología de la ascitis o líquido ascítico durante la enfermedad metastásica, éste se ha estudiado determinando la presencia de las principales moléculas involucradas en procesos oncológicos: factores de crecimiento (Saltzman *et al.*; Zebrowski *et al.*, 1999.) y lípidos bioactivos (Mills *et al.*, 2002), entre algunas otras moléculas que vuelven muy complejo al líquido ascítico.

En nuestro laboratorio se logró la detección de una proteína de bajo peso molecular (~ 25 kDa) utilizando un anticuerpo monoclonal dirigido contra moléculas de tipo integrina. Interesantemente, esta proteína de bajo peso molecular se expresa diferencialmente en líneas celulares de cáncer de ovario como SKOV-3, INCAN017 e INCAN019, teniendo un reconocimiento sumamente limpio y específico solo cuando estas células se encuentran bajo el tratamiento con algunos líquidos ascíticos de cáncer de ovario. Este comportamiento demostró que el líquido ascítico funcionaba efectivamente como un microambiente diferente para las células transformadas (Leroy *et al.*, 2008). El enfoque inicial fue reproducir este evento de inducción de la proteína de bajo peso molecular, por lo que se realizaron ensayos de western blot con el mAb 3C10 en las condiciones de cultivos de INCAN017 en medio McCoy y en LA de CaOv de referencia (LA33), observando que

efectivamente la presencia de la proteína era inducida por efecto del LA. Para comprobar que la proteína era inducida en las células por efecto del líquido ascítico y no por haber sido captada del propio LA se realizaron ensayos de western blot sondeando directamente sobre el LA con el mAb3C10, los resultados fueron negativos (ensayo no mostrado). Se decidió entonces evaluar el grado de conservación de la inducción de esta molécula a nivel de la enfermedad en general; así como acercarnos a determinar que molécula o moléculas pudiesen estar induciendo la presencia de esta proteína de bajo peso molecular. Derivado de esto se decidió fraccionar el líquido ascítico de referencia LA33 mediante el uso de sulfato de amonio. Esto generaría la separación diferencial de moléculas presentes en el LA que pueden ser capaces de desencadenar diversos procesos celulares y de los cuales uno puede ser la inducción de la molécula de ~ 25 kDa. El fraccionamiento con sulfato de amonio permitió obtener tres fracciones (F30, F60 y F90) las cuales fueron probadas para determinar su efecto inductor y después de un prolongado proceso de estandarización se logró obtener la inducción de la molécula de ~ 25 kDa solo en la fracción F90, la cual es una fracción generada por saturación del LA con grandes concentraciones de sal. Esto nos sugirió que en la naturaleza del factor o factores podría(n) contener características hidrofílicas y por lo tanto ser altamente soluble(s).

Todas las fracciones del LA poseen grandes cantidades de albúmina, lo cual podría sugerir que el factor o factores pudiesen estar siendo transportados por esta abundante proteína, dificultando su identificación al ser minoritaria la concentración del factor respecto a la concentración de la albúmina. Para esto se ha planteado utilizar filtros que permitan fraccionar el líquido ascítico en una fracción enriquecida en albúmina y otra carente de esta proteína y posteriormente determinar en cuál de ellas permanece la actividad inductora, con el fin de lograr determinar, mediante análisis por interactomas, posibles inductores de esta proteína.

Por otra parte se decidió evaluar la inducción por parte de otros líquidos ascíticos de CaOv con relación a la proteína de bajo peso molecular. En nuestro grupo de investigación poseemos un banco de líquidos ascíticos de CaOv derivado de pacientes mexicanas diagnosticadas con CaOv, lo que permitió realizar esta evaluación mediante el análisis del efecto del tratamiento de cultivos de células INCan017 con estos líquidos ascíticos y la posterior detección de la proteína de ~ 25 kDa mediante western blot con el mAb 3C10. El resultado final del análisis mostró que al menos 17 líquidos ascíticos de un aproximado de 20 analizados poseen la capacidad de inducir esta molécula, lo cual sugiere que es un proceso relativamente generalizado y quizá importante. Posteriormente analizando los subtipos histológicos de los CaOv que generaron estos líquidos inductores se sugiere que esta capacidad inductora no está relacionada con el subtipo histológico del tumor ni con la etapa clínica de la enfermedad, por lo que la relación de los factores inductores y la molécula de ~ 25 kDa con la enfermedad se vuelve aún más compleja.

Durante los tratamientos de las células INCan017 con los diferente LAs se pudo observar que las ascitis de CaOv son altamente heterogéneas aún tratándose de la misma enfermedad como ya había sido reportado por Marie et al. (2007). Entre los efectos causados y más relevantes se encuentra la eliminación de cultivos de células INCan017 por efecto de algunos líquidos ascíticos, LA14 por ejemplo, el cual diezmó un cultivo en pocas horas, mismo que poseía las características de un cultivo en buen estado. Otros líquidos ascíticos al parecer provocan un alto dinamismo con respecto a la migración o motilidad celular y proliferación. Cada uno de estos eventos es debido a las características intrínsecas de la enfermedad de cada una de las pacientes con cáncer de ovario epitelial. La observación de estas claras diferencias en el comportamiento y las características de los líquidos ascíticos, provee apoyo a la idea de diseñar un tratamiento personalizado para esta enfermedad altamente compleja.

Con lo que respecta a la molécula inducida, se logró determinar que su principal localización es a nivel citoplasmático y se sugiere una ubicación en estructuras de tipo vesicular, esto gracias a las técnicas de inmunofluorescencia e inmunohistofluorescencia, las cuales corroboran dicho patrón de distribución. Para caracterizar mejor su localización se recomienda la utilización de marcadores específicos de vesículas. Debido a que se logró documentar la presencia de esta molécula en tumores primarios de pacientes con CaOv, se sugiere que esta proteína de bajo peso molecular pudiera tener alguna relevancia durante el proceso fisiopatológico de la enfermedad. Por lo tanto, será necesario diseñar estrategias experimentales que permitan estudiar su posible función, inicialmente a través de su identificación por proteómica y espectrometría de masas y posteriormente, una vez conociendo la identidad de la misma por ensayos de “knock-down” del gen correspondiente.

XI. CONCLUSIÓN

El líquido ascítico de CaOv posee factores que inducen la expresión de una molécula de ~25 kDa en la línea celular INCa017, la cual parece ser importante en la enfermedad debido a que un gran número de líquidos ascíticos de CaOv son capaces de inducir dicha expresión. Esta proteína se localiza en el citoplasma y la periferia nuclear en estructuras de tipo vesicular sólo en células tratadas con líquido ascítico y no en células incubadas en medio de cultivo tradicional. Se sugiere que esta proteína podría ser importante en etapas tempranas de la enfermedad, debido a que también se detectó en tumores primarios de CaOv.

XII. PERSPECTIVAS

- Identificar el o los factores presentes en el líquido ascítico de CaOv que inducen la expresión de la proteína de ~ 25 kDa en la línea celular INCan017.
- Identificar la proteína de ~ 25 kDa que es inducida por efecto de la ascitis.
- Someter la línea celular con el resto de líquidos ascíticos para determinar la capacidad inductora de éstos con respecto a la proteína de ~ 25 kDa.
- Caracterizar la función en la que se encuentra implicada la proteína de ~ 25 kDa.
- Determinar el mecanismo mediante el cual algunos de los líquidos ascíticos resultan citotóxicos hacia el cultivo de INCan017.

XIII. REFERENCIAS

- Abendstein B, Stadlmann S, Knabbe C, Buck M, Müller-Holzner E, Zeimet AG, Marth C, Obrist P, Krugmann J, Offner FA." Regulation of Transforming Growth Factor-Beta Secretion by Human Peritoneal Mesothelial and Ovarian Carcinoma Cells". Cytokine. (2000) 12(7):1115-1119.
- Ahmed N, Oliva K, Rice G and Quinn M. "Ascites Induces Modulation of $\alpha 6\beta 1$ Integrin and Urokinase Plasminogen Activator Receptor Expression and Associated Functions in Ovarian Carcinoma". British Journal of Cancer (2005) (92):1475 – 1485.
- Barbieri F, Bajetto A, Florio T. "Role of Chemokine Network in the Development and Progression of Ovarian Cancer: A Potential Novel Pharmacological Target". (2010). Journal of Oncology 2010;2010:426956. doi: 10.1155/2010/426956.
- Bell DA. "Origins and Molecular Pathology of Ovarian Cancer." Modern Pathology (2005) (18): 19-32.
- Carlson BM. Embriología Humana Y Biología Del Desarrollo. (2005). 2: 368-380, Ediciones Harcourt.
- Chien RJ, Bell DA, Gary LK, Viji S, and a. Hartmann LC. "Molecular Pathogenesis and Therapeutic Targets in Epithelial Ovarian Cancer". Journal of Cellular Biochemistry (2007)102: 1117–1129.
- Cvetkovic D. "Early Events in Ovarian Oncogenesis." Reproductive Biology and Endocrinology (2003)(1): 68. *Open access*.
- Fang X, Schummer M, Mao M, Yu S, Tabassam FH, Swaby R, Hasegawa Y, Tanyi JL, LaPushin R, Eder A, Jaffe R, Erickson J, Mills GB." Lysophosphatidic Acid is a Bioactive Mediator in Ovarian Cancer". Biochimica et Biophysica Acta. (2002) 23 (1-3):257-264.
- Fleming J, Haviv I, and Chenevix TG. "Incessant Ovulation, Inflammation and Epithelial Ovarian Carcinogenesis: Revisiting Old Hypotheses". Molecular and Cellular Endocrinology (2006) 247(1–2): 4–21.

- Garibay-Cerdenares O, Tesis de Doctorado. Solicitud de Patente No. MX/a/2013/002883 (en trámite).
- Garibay-Cerdenares O, Villegas-Pineda J, Osorio-Trujillo C, Hernández-Ramírez VI, Chávez-Munguía B, González-Robles A, Encarnación-Guervara S, Gallardo-Rincón D, Talamás-Rohana P. (2012). "Proteomic and Functional Analysis of Ascitic Fluid from Mexican Patients with Ovarian Adenocarcinoma: Role of Haptoglobin in Cancer Cell Migration". The EMBO Meeting 2012 - Advancing the life sciences. Niza, Francia.
- Katabuchi, HO. "Pathophysiological Dynamics of Human Ovarian Surface Epithelial Cells in Epithelial Ovarian Carcinogenesis". International Review of Cytology, (2005): 242.
- Kathleen RCh. "Ovarian Cancer Update: Lessons from Morphology, Molecules, and Mice". Archives of Pathology Laboratory Medicine. (2009)133(11): 1775-1781.
- Kuk C, Gunawardana CG, Smith CR, Batruch I, Diamandis EP. (2009). "Mining The Ovarian Cancer Ascites Proteome for Potential Ovarian Cancer Biomarkers". Molecular & Cellular Proteomics (2009) 8(4): 661-669.
- Laemmli, U. K. "Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4". Nature (1970) 227, 680-685.
- Leroy DJ, Gauduchon P. and Carreiras F, "Epithelial Ovarian Tumor Microecology". Bulletin Cancer. (2008) 95(9):829-39.
- Livingston D and O'Donovan P. "BRCA1 and BRCA2: Breast/Ovarian Cancer Susceptibility Gene Products and Participants in DNA Double-Strand Break Repair". Carcinogenesis (2010) 31(6): 961–967.
- Lovrien RE, Matulis D: Selective Precipitation of Proteins. (Library WO ed.: Current Protocols in Protein Science; University of Minnesota, St. Paul, Minnesota, USA (2001) Chapter 4: Unit 4.5.
- Marie LP , Filali MA, Zietarska M, Ouellet V and P N. Toniny, Chevrette M, M. Provencher D and Mes-Masson A. "Characterization of Ovarian

- Cancer Ascites on Cell Invasion, Proliferation, Spheroid Formation, and Gene Expression in an *In Vitro* Model of Epithelial Ovarian Cancer". Neoplasia **(2007)** 9(10): 820 – 829.
- Meunier L, Le Page C, Filali MA, Chevrette M, Tonin P., Provencher DM and Mes-Masson AM. "Effect of Ovarian Cancer Ascites on Cell Migration and Gene Expression in an Epithelial Ovarian Cancer *In Vitro* Model". Translational Oncology **(2010)** 3(4): 230–238.
- Mills GB, Eder A, Fang X, Hasegawa Y, Mao M, Lu Y, Tanyi J, Tabassam FH, Wiener J, Lapushin R, Yu S, Parrott JA, Compton T, Tribley W, Fishman D, Stack MS, Gaudette D, Jaffe R, Furui T, Aoki J, Erickson JR. "Critical Role of Lysophospholipids in the Pathophysiology, Diagnosis and Management of Ovarian Cancer" Cancer Treatment and Research. **(2002)** 107:259-283.
- Nagy J, Dvorak J, and Dvorak H, "Pathogenesis of Malignant Ascites Formation: Initiating Events That Lead to Fluid Accumulation". Cancer Research **(1993)** 53: 2631-2643.
- Neal GR, Galloway R, and Heuser L. "Mechanisms of Malignant Ascites Production". Journal of Surgical Research **(1987)** 42: 126- 132.
- Okamura H, Nitta M, and Ohtake H, "Structural Changes and Cell Properties of Human Ovarian Surface Epithelium in Ovarian Pathophysiology". Microscopy Research And Technique **(2006)** 69: 469–481.
- Pourgholami MH, Moghaddam MS, Amini A, Morris DL. "Significance of Vascular Endothelial Growth Factor in Growth and Peritoneal Dissemination of Ovarian Cancer". Cancer Metastasis Review **(2012)** 31: 143–162.
- Provencher DM, Lounis H, Champoux L, Tétrault M, Manderson EN, Wang JC, Eydoux P, Savoie R, Tonin PN, Mes-Masson AM. "Characterization of Four Novel Epithelial Ovarian Cancer Cell Lines". In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal **(2000)** 36(6): 357-361.

- Roett M. *et al.*, "Ovarian Cancer: An Overview". American Family Physician **80**(6).
- Santangelo M, Vescio G, Sammarco G, Gallelli G, Vetere A, Sommella L, Triggiani E. (2000). "Meigs' Syndrome: Its Clinical Picture and Treatment". Annals of Italian Chiropractic **(2009)** 71(1): 115-119.
- Schmidt, G. Ecografía, de la imagen al diagnóstico **(2007)**. Libro. Editorial Médica Panamericana. p-448.
- Sengupta K, Hernández RVI., Rios A, Mondragón R and Talamás RP. "*Entamoeba histolytica*: Monoclonal Antibody against the β 1 Integrin-like Molecule (140 kDa) Inhibits Cell Adhesion to Extracellular Matrix Components". Experimental Parasitology **(2001)** 98: 83–89.
- Sengupta S, and Xu Y. "A Novel Laminin-Induced Lysophosphatidic Acid Autocrine Loop in the Migration of Ovarian Cancer Cells". The FASEB Journal **(2003)**17(11): 1570-1572.
- Shih R. "The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer a Proposed Unifying Theory". American Journal of Surgical Pathology **(2010)** 34(3): 433-443.
- Stanojeviæ Z, Radiæ S, Potiæ ZN, and Ðorðeviæ B. "Pathogenesis of malignant ascites in ovarian cancer patients". Archives of Oncology **(2004)** 2(12): 115-118.
- Strauss R, Liu Y, Beyer I, Persson J, Sova P, Möllwe T, Hamerlik P, Drescher Ch, Urban N, Bartek J. "Analysis of Epithelial and Mesenchymal Markers in Ovarian Cancer Reveals Phenotypic Heterogeneity and Plasticity". PLoS ONE **(2011)** 6(1): e16186.
- Talamás-Rohana P, Hernández-Ramirez VI, Perez-García JN, Ventura-Juárez J. *Entamoeba histolytica* contains a beta 1 integrin-like molecule similar to fibronectin receptors from eukaryotic cells. Journal of Eukaryotic Microbiology. **(1998)**: 45(3):356-360.
- Villegas-Pineda J."Estudio Comparativo de la Expresión de Proteasas e Integrinas entre Líneas Celulares, Tumores Primarios de Pacientes y Ratones Xenotransplantados con Carcinoma Ovárico". Departamento

de Infectómica y Patogénesis Molecular. CINVESTAV. Maestría México, D.F., **(2012)**.

Wlodkowic D, McGuinness D, Faley S, Kolch W, Darzynkiewicz Z, Cooper JM: "Chip-Based Dynamic Real-Time Quantification of Drug-Induced Cytotoxicity in Human Tumor Cells". Analytical Chemistry. **(2009)**: 81:6952-6959.

Zebrowski BK, Liu W, Ramirez K, Akagi Y, Mills GB, Ellis LM. "Markedly Elevated Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Malignant Ascites". Annal Surgical of Oncology. **(1999)**: 6(4):373-378.