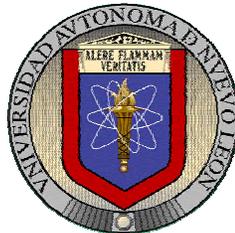


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
UN INMUNÓGENO ASOCIADO AL LINFOMA L5178Y

Por

DIANA ELIA CABALLERO HERNÁNDEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

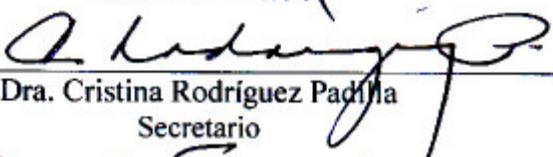
Diciembre, 2008

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE
UN INMUNÓGENO ASOCIADO AL LINFOMA L5178Y

Comité de Tesis



Dr. Ricardo Gómez Flores
Director de la tesis



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario



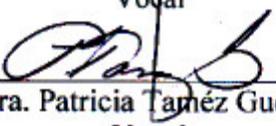
Dr. Reyes Taméz Guerra

Vocal



Dr. Juan Manuel Alcocer González

Vocal



Dra. Patricia Taméz Guerra

Vocal

4.5.3. Análisis de fluidos biológicos y medios condicionados celulares	33
4.6. El modelo murino L5178Y	37
5. MATERIAL Y MÉTODOS	41
5.1. Origen de los reactivos	41
5.2. Material Biológico	42
5.2.1. Animales de experimentación	42
5.2.2. Líneas celulares	42
5.3. Estrategia de trabajo	43
5.3.1. Subfraccionamiento celular de las líneas L5178Y-R y L5178Y-S	43
5.3.2. Obtención de proteínas del fluido ascítico LY-R y medios condicionados LY-R y LY-S	45
5.3.3. Inmunización de ratones con las líneas celulares L5178Y y L5178Y-S	46
5.3.4. Análisis SDS-PAGE y <i>Western blot</i> de proteínas de membrana LY-R y LY-S, de fluido ascítico y medios condicionados	47
5.3.5. Obtención de geles bidimensionales analíticos de las líneas celulares L5178Y-R, L5178Y-S y fluido ascítico LY-R	49
5.3.5.1. Preparación de las muestras para 2D SDS-PAGE	49
5.3.5.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoco	49
5.3.5.3. Segunda dimensión: Electroforesis SDS/PAGE	51
5.3.5.4. Tinción de los geles bidimensionales analíticos con nitrato de plata	52
5.3.6. Análisis de Imagen mediante el software PDQuest	53
5.3.6.1. Procesamiento de imagen	53
5.3.6.2. Determinación de punto isoelectrico y tamaño molecular de las manchas en los geles bidimensionales	53

5.3.7. Inmunodetección de proteínas antigénicas mediante 2D <i>Western Blot</i>	56
5.3.7.1. Electrotransferencia de geles bidimensionales a membranas PVDF	56
5.3.7.2. Inmunodetección de proteínas antigénicas en las líneas LY-R y LY-S y fluido ascítico LY-R	56
5.3.8. Identificación de las proteínas de interés por espectrometría de masas	57
5.3.9. Detección de fetuina en las fracciones LY-R, L-YS y fluido ascítico LY-R	58
5.3.10. Purificación de la proteína seleccionada	58
5.3.10.1. Obtención de fluido ascítico	58
5.3.10.2. Preparación de la muestra para cromatografía	59
5.3.10.3. Cromatografía de intercambio aniónico	59
5.3.10.4. Análisis SDS-PAGE y <i>Western blot</i> de las fracciones cromatográficas	60
6. RESULTADOS	61
7. DISCUSIÓN	80
8. CONCLUSIONES	84
9. LITERATURA CITADA	85
RESUMEN BIOGRÁFICO	98
APENDICE	

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Antígenos tumorales	6
II. Estrategias en la vacunación contra el cáncer	11
III. Comparación entre la Genómica y Proteómica	13
IV. Antígenos aislados a partir del linfoma L5178Y	40
V. Esquema de inmunización para la obtención de sueros policlonales	46
VI. Protocolo para tinción con azul de Coomassie	48
VII. Programa para isoelectroenfoque de muestras con un pH amplio (3-10) en la fuente de poder Thermo 400-V	50
VIII. Distribución de manchas proteicas específicas para cada línea celular, de acuerdo a su punto isoeléctrico y tamaño molecular	70
IX. Candidatos arrojados por el análisis MALDI-TOF	76

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Diagrama de flujo de las estrategias proteómicas	15
2. Electroforesis bidimensional de proteínas	16
3. Estrategias proteómicas en la búsqueda de antígenos tumorales	21
4. Proteólisis de ectodominios en la membrana celular	34
5. Células LY-R y LY-S en cultivo observadas al microscopio óptico	37
6. Ultracentrifugación diferencial	44
7. Equipo para electroforesis bidimensional usado en este trabajo	52
8. Determinación de punto isoeléctrico y peso molecular en geles bidimensionales	55
9. SDS-PAGE de las proteínas de la fracción membrana de las células LY-R y LY-S	62
10. Análisis Western blot de proteínas de membrana de las células LY-R y LY-S	63
11. SDS-PAGE de fluido ascítico LY-R y medios condicionados de células LY-R y LY-S	64
12. <i>Western blot</i> de fluido ascítico LY-R y medios condicionados de células LY-R y LY-S	65
13. Geles bidimensionales representativos de las proteínas de membrana de las células LY-R y LY-S teñidos con nitrato de plata	67
14. Mapas proteómicos de membrana de las líneas LY-R y LY-S	68
15. Mapa proteómico de las proteínas de fluido ascítico LY-R	69
16. Análisis <i>Western blot</i> bidimensional de la expresión de antígenos de membrana en las células LY-R y LY-S	72
17. Análisis <i>Western blot</i> bidimensional de la expresión de antígenos	

de membrana en el fluido ascítico LY-R	73
18. Comparación de blots y geles bidimensionales	74
19. Espectro de masas original de la mezcla de péptidos trípticos determinados por el espectrómetro MALDI-TOF	76
20. Secuencia de la alfa-2-HS-glicoproteína [<i>Mus musculus</i>]	77
21. Detección de fetuina-A en la fracción membrana de células LY-R y LY-S, y fluido ascítico LY-R	78
22. Cromatografía de intercambio aniónico de las proteínas del fluido ascítico LY-R	79

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-E	Electroforesis en gel bidimensional
IEF	Isoelectroenfoque
ESI	Ionización por <i>electrospray</i>
MS/MS	Espectrometría de masas en <i>tándem</i>
MALDI-TOF	Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz
PVDF	Poli fluoruro de vinilideno
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS
Alfa 2-HS glicoproteína	Alfa 2-Heremans-Schmid glicoproteína/Fetuina-A
CHAPS	3-(cloroamido propil)-dimetilamonio-1-propanosulfato
DNA	Acido desoxirribonucleico
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	(ácido etilenglicol-bis(2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetracético)
IPG	Gradiente de pH inmovilizado
kDa	Kilodaltones
LDS	Dodecil sulfato de litio
LY-R	Células L5178Y radioresistentes y tumorigénicas
LY-S	Células L5178Y radiosensibles y no-tumorigénicas
MOPS	ácido 3-[N-Morfolino]Propanosulfónico
NaCl	Cloruro de sodio
NL	no lineal
PBS	amortiguador salino de fosfatos
Tris base	tris hidroximetil aminometano clorhidrato
UV	luz ultravioleta

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Ricardo Gómez Flores director de mi tesis, la Dra. Patricia Tamez Guerra y el resto del Comité de Tesis, Dra. Cristina Rodríguez Padilla, Dr. Reyes Tamez Guerra, Dr. Juan Manuel Alcocer y Dr. Pablo Zapata Benavides por sus valiosas sugerencias e interés en el desarrollo del presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios. A la Universidad Autónoma de Nuevo León por el apoyo otorgado a través del programa PAICYT con el proyecto clave CN1363-06.

Al Departamento de Inmunología de nuestra facultad y a la Subdirección de Postgrado por su respaldo. A la Dra. Marisela Luna del Instituto de Neurobiología en Juriquilla, Querétaro, por su generosidad y apoyo. Al Dr. Josiah Ochieng de Meharry Medical College por la oportunidad de aprender y trabajar junto a su grupo de investigación durante mi breve estancia. Así mismo al Dr. Cesar Ferreira Batista y su grupo de la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología en Cuernavaca, Morelos por los servicios prestados.

Finalmente, a mi familia por el apoyo que siempre me ha brindado y a todas las personas que contribuyeron de una forma u otra en la realización de este trabajo.

RESUMEN

Los antígenos tumorales representan el punto partida en el desarrollo de estrategias para la prevención, diagnóstico, monitoreo y tratamiento del cáncer y por ello, es de gran interés biomédico su aislamiento, así como las metodologías que para ello se emplean. En este trabajo usamos herramientas propias de la proteómica como la electroforesis bidimensional, análisis de imagen asistido por computadora, *Western blotting* y espectrometría de masas para la definición de los antígenos asociados al linfoma murino L5178Y. Se llevó a cabo el análisis comparativo de los patrones bidimensionales de expresión de proteínas de membrana de las células tumorigénicas L5178Y-R y su contraparte no tumorigénica L5178Y-S; establecimos los mapas de referencia para ambas líneas y encontramos diferencias en el patrón de expresión de proteínas, que hacen distintivo el perfil de membrana de cada una de estas líneas. Adicionalmente, aprovechamos la respuesta inmune humoral contra tumores de animales inmunizados con ambas líneas para detectar antígenos potenciales en ensayos de inmunodetección. De esta forma identificamos una forma inmunogénica de la proteína sérica alfa-2-HS-glicoproteína asociada a la línea celular L5178Y-R, pero no a la sub-línea no tumorigénica L5178Y-S. Se requieren estudios adicionales para establecer el papel que juega esta forma inmunogénica de fetuina en la tumorigénesis del linfoma L5178Y-R y si esta fetuina inmunogénica se encuentra en otras formas de cáncer.

ABSTRACT

Tumor antigens hold great promise to develop strategies in cancer prevention, diagnosis, monitoring and treatment. In the present thesis work we applied proteomic tools such as two-dimensional electrophoresis, computer assisted image analysis, Western blotting, and mass spectrometry, to define the antigens associated to the murine lymphoma L5178Y. In was performed comparative analysis of two-dimensional patterns of membrane proteins for the tumorigenic cells L5178Y-R (LY-R) and the non tumorigenic L5178Y-S (LY-S). The reference proteomic maps for both cell lines showed differences in protein expression patterns that make distinctive the membrane profile for each cell line. Auto-antibodies raised against LY-R and LY-S cells were employed to detect potential antigens in the surface of these cells in immunodetection assays. Through this approach it was detected an immunogenic form of alpha-2-HS-glycoprotein, also known as fetuin-A, on LY-R lymphoma cells. Fetuin-A was recognized by antibodies present in the serum of LY-R tumor-bearing and immunized mice, but not by sera of mice immunized with the non-tumorigenic variant LY-S or by healthy mouse serum. Further analysis is needed in order to establish the role that immunogenic fetuin-A plays in tumorigenesis of this lymphoma and if this immunogenic form is relevant to others types of cancer.

1. INTRODUCCIÓN

En el área de inmunología, el concepto de antígeno tumoral tiene gran relevancia; un antígeno tumoral es una molécula biológica cuya expresión está asociada o es específica de ciertos tumores y por lo tanto representan un blanco para la acción del sistema inmune contra el tumor: esta idea constituye el fundamento de la inmunología anti-tumoral. Los antígenos tumorales aislados e identificados no sólo permiten una mejor comprensión de diversos aspectos de la biología tumoral, sino que constituyen el punto de partida para el estudio y desarrollo de nuevas estrategias de terapia antitumoral, como vacunas y métodos de diagnóstico y monitoreo de cáncer.

Por esto, es evidente la importancia de aislar e identificar antígenos asociados a tumor, y uno de los aspectos fundamentales en dicha tarea es la estrategia seleccionada para lograr tal objetivo. Hoy en día, la proteómica, que es la disciplina que se encarga del estudio de los productos de expresión genética a nivel traduccional (proteínas), y la espectrometría de masas orientada a la identificación de proteínas, son herramientas que han permitido logros significativos en el área de los antígenos tumorales. En este trabajo se propuso el uso de herramientas propias de proteómica, principalmente electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, para el aislamiento e identificación de los antígenos asociados al linfoma L5178Y, un linfoma murino que constituye un modelo con utilidad e interés para el estudio y establecimiento de estrategias para el aislamiento de antígenos tumorales.

2. HIPÓTESIS

1. Los tumores presentan un número ilimitado de antígenos potenciales que pueden ser el objeto de una respuesta inmune antitumoral. Este potencial inmunogénico los hace candidatos para el desarrollo de métodos de diagnóstico y de inmunoterapia antitumoral.
2. Las herramientas proteómicas son una alternativa útil para el aislamiento e identificación de antígenos tumorales, ya que permiten eludir la dificultad de generar líneas específicas de linfocitos citotóxicos que reconozcan antígenos de tumor.
3. El linfoma murino L5178Y es un modelo de interés para el estudio y establecimiento de estrategias proteómicas orientadas al aislamiento e identificación de antígenos tumorales.
 - a. La sublínea tumorigénica L5178Y-R expresa diversos antígenos, entre ellos proteínas presentes en las fracciones de membrana plasmática y microsomas.
 - b. La sub-línea no tumorigénica, L5178Y-S puede emplearse como un control comparativo en la búsqueda de antígenos tumorales en las células L5178Y-R.

3. OBJETIVO GENERAL

Aislamiento y caracterización de un inmunógeno asociado al linfoma murino L5178Y-R, empleando una estrategia proteómica.

3.1. Objetivos específicos

- 3.1.1. Obtener geles bidimensionales de las proteínas de membrana de las líneas celulares L5178Y-R y LY-S.
- 3.1.2. Procesar y analizar cualitativamente con el programa PDQuest, los patrones de expresión de proteínas de membrana de las líneas celulares LY-R y LY-S obtenidos mediante electroforesis bidimensional.
- 3.1.3. Detectar mediante análisis *Western blot*, proteínas presentes en la fracción membranal de las células tumorales L5178Y-R que reaccionen en forma específica contra suero policlonal anti-LYR.
- 3.1.4. Identificación del antígeno candidato asociado al linfoma L5178Y mediante espectrometría de masas.

4. ANTECEDENTES

4.1. Cáncer y antígenos tumorales.

El cáncer es una enfermedad de proliferación, causa acumulación de células, de diferenciación causa pérdida de estructura y función, y de organización tisular, lo que lleva a su invasión y sobrevivencia en un medio ectópico. El cáncer perturba las actividades celulares que son cruciales para el desarrollo y el mantenimiento de los organismos multicelulares, como el crecimiento, la diferenciación, la muerte celular programada y la integridad tisular. Clínicamente, el cáncer se manifiesta en la forma de un tumor debido al crecimiento excesivo, a través del dolor y sangrado debido a la invasión de nervios y venas, y a través de perturbaciones funcionales debido a la presión y reemplazo de tejidos normales (Mareel y LeRoy, 2003).

La investigación del cáncer de los últimos 50 años ha generado una amplia variedad de terapias. La radio y quimioterapia son los tratamientos más comunes contra el cáncer; aprovechan la proliferación diferencial entre tejidos sanos y malignos y su blanco son las células que se dividen rápidamente. Estos tratamientos han tenido un efecto significativo en la sobrevivencia al cáncer, pero también son responsables de toxicidad, ya que algunos tejidos sanos también se dividen rápidamente. A pesar de los avances en la terapia del cáncer, este sigue siendo una de las principales causas de muerte y minusvalía (Skinner, 2005).

El cáncer es una enfermedad multifactorial y altamente compleja. Aunque se origina a consecuencia de cambios genéticos irreversibles, a nivel funcional es una enfermedad de alteraciones en las proteínas. Estas proteínas son, de hecho, los componentes o efectores finales de vías de señalización alteradas, que dirigen la sobrevivencia, crecimiento, invasión y metástasis (Fontana *et al*, 2006).

Es aquí donde es importante introducir el concepto de antígeno tumoral. Este se refiere a una molécula cuya expresión está asociada o es producto de la transformación de células normales en células cancerosas, y que como tal puede representar un blanco potencial para la respuesta inmune contra tumores, en la forma de vacunas. De acuerdo con esta descripción, se infiere que los antígenos tumorales tienen también potencial como biomarcadores, herramientas importantes para el diagnóstico y monitoreo del cáncer. Los biomarcadores sirven como señales del estado fisiológico de una célula en un momento dado, y de los cambios que suceden durante la enfermedad (Wulfkühle *et al*, 2003). Debido a esto, en la actualidad el aislamiento de antígenos tumorales es una de las áreas de investigación que genera mayores expectativas, por su potencial en el diagnóstico e inmunoterapia del cáncer (Kawakami *et al*, 2004; Yang y Yang, 2005).

Los antígenos tumorales pueden clasificarse en cuatro grupos:

- a) antígenos únicos a un tumor de paciente;
- b) antígenos comunes a un grupo de tumores histológicamente similares,
- c) antígenos de diferenciación de tejido y
- d) antígenos ubicuos expresados por células normales y malignas (Tabla I).

Para atacar un tumor en forma específica, los antígenos deben ser expresados únicamente en células tumorales. Los antígenos únicos incluyen proteínas mutantes, como la oncoproteína ras y proteínas supresoras de tumor mutantes p53 y von Hippel Lindau. Otro tipo de antígenos de tumor únicos son los antígenos con modificaciones post-traduccionales específicas de tumor, por ejemplo MUC1, que muestran glicosilación alterada en células cancerosas, creando sitios neo-antigénicos al exponer secuencias proteicas normalmente enmascaradas por glicosilación (Berzofsky *et al*, 2004).

TABLA I
Antígenos tumorales¹

Tipo de antígeno	Antígeno	Neoplasia
Ag específico de tejido	Ag específico de próstata Ag de membrana específico de próstata Tirosinasa Gp100 α -fetoproteína	Cáncer de próstata Cáncer de próstata Melanoma Melanoma Cáncer de hígado
Ag específico de tumor	Idiotipo de inmunoglobulina TCR Producto de fusión Bcr-abl P53 mutante	NHL de células B, mieloma NHL de células T CML Cáncer de pulmón, colon, cabeza y cuello, etc.
Ags de cáncer de testículo	MAGE-1, MAGE-3, NY-ESO-1	Melanoma, cáncer de pulmón y colon Melanoma y cáncer de mama
Ags sobre-expresados	Her-2/ <i>Neu</i> Muc-1	Cáncer de mama, pulmón y ovario Cáncer de colon, mama, pulmón y páncreas.

Ag= antígeno, NHL= linfoma No Hodgkin, CML= Leucemia mieloide crónica

¹Adaptado de Espinoza-Delgado, 2002

4.2. Antígenos tumorales en la terapia antitumoral

La inmunoterapia del cáncer ha tenido notorios avances en las últimas décadas; sin embargo, durante la mayor parte del siglo XX se desarrolló en forma empírica. Las toxinas de Coley, una mezcla de extractos de *Streptococcus* y *Serratia*, fueron la primera forma de inmunoterapia para el cáncer, y su empleo estaba basado en la observación empírica, según la cual enfermos de cáncer que desarrollaban y sobrevivían la erisipela mostraban regresión de su tumor. Con un blanco a la vista no hay necesidad de disparar a ciegas, por ello el descubrimiento de antígenos tumorales humanos fue un momento definitorio en la historia de la inmunología tumoral. Fue el primer paso para el diseño racional de inmunoterapias contra el cáncer. Tener un blanco definido también permite la optimización de ensayos para la medición de parámetros inmunológicos (Davis *et al*, 2003).

En la actualidad, sabemos que la respuesta inmune relevante para la defensa contra el cáncer requiere de la activación antígeno-específica de las células T CD4⁺ y CD8⁺. Esta respuesta es iniciada por las células presentadoras de antígeno (APCs, por sus siglas en inglés). Teóricamente, cualquier proteína en una célula tumoral es potencialmente un antígeno tumoral. Estos antígenos pueden ser secretados, desprendidos o ser producto de la lisis de la célula tumoral, y entonces son capturados por las APCs. Los antígenos capturados son procesados y presentados por las moléculas del complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) clase I y clase II, para la sensibilización y activación de las células T-CD4⁺ y T-CD8⁺, respectivamente. Las

células T-CD4⁺ proporcionan co-estimulación mediante la secreción de citocinas, lo cual puede iniciar o amplificar la respuesta de las células T-CD8⁺. Además, las células T-CD4⁺ tienen un papel crucial en mantener la inmunidad protectora. Una vez activadas, las células T-CD8⁺ se vuelven citotóxicas y lisan a las células tumorales (Greten y Jaffe, 1999). Existe creciente evidencia de la inducción espontánea de T-CD8⁺ contra antígenos de tumor en varios tipos de cáncer, incluyendo melanoma, adenocarcinomas y leucemias.

Debido a lo expuesto anteriormente, el aislamiento de antígenos tumorales tiene gran impacto en el desarrollo de vacunas contra el cáncer (Bocchia et al, 2000; Yang y Yang, 2005). Las vacunas basadas en antígenos de tumor no son un concepto nuevo, y las propuestas más sencillas y directas consisten en la administración de células tumorales inactivas, las cuales portan todos los antígenos del tumor y por ende no es necesario conocer la identidad de los antígenos (Ferriols-Lisart *et al*, 1997; Schmidt *et al*, 1997; Greten y Jaffe, 1999; Rosenberg, 2001, 2004; Rosenberg *et al*, 2004; Yu y Restifo, 2002). Aunque en la práctica esto podría parecer suficiente, el descubrimiento y descripción de un antígeno asociado o específico de tumor permite proponer estrategias dirigidas a aumentar la inmunogenicidad del antígeno, anticipar los posibles efectos de su administración (por ejemplo la auto-inmunidad) y a la vez aumentan nuestro conocimiento sobre los procesos de transformación celular y mecanismos de tumorigenicidad (Lewis, 2004). El reciente desarrollo de vacunas contra el melanoma prueba que la definición de antígenos asociados a tumor posee potencial en el desarrollo de vacunas contra el cáncer (Bystryn, 2002).

Diversos grupos de investigación alrededor del mundo han emprendido la tarea de aislar e identificar antígenos asociados a tumor, empleando para ello diferentes aproximaciones. Muchos antígenos reconocidos por células CD8 se han identificado al transfectar bibliotecas de ADN complementario de células tumorales a células blanco que expresan la molécula HLA apropiada, y entonces se emplean células T antitumorales para identificar los transfectantes apropiados. Alternativamente, los péptidos eluidos de la superficie de las células cancerosas humanas (o de moléculas HLA purificadas a partir de células cancerosas) pueden ser pulsados en APCs, para determinar su especificidad con linfocitos antitumorales específicos. La purificación y secuencia de estos péptidos puede llevar a la identificación de la proteína parental (Rosenberg, 2001). Ambos métodos dependen de la existencia de líneas específicas de linfocitos citotóxicos y generalmente se consideran como los métodos más apropiados para el descubrimiento de antígenos tumorales con potencial en la inmunoterapia, ya que permiten identificar los péptidos que son específicamente reconocidos por los linfocitos CD8⁺, los linfocitos efectores de la inmunidad antitumoral, y cuya respuesta específica es una de las metas de la inmunoterapia anti-tumoral.

Sin embargo, la generación de líneas de linfocitos citotóxicos, indispensable para llevar a cabo estas estrategias, es ardua y complicada, por lo que constituye un obstáculo importante en la identificación de antígenos. Debido a esto, se han propuesto otras aproximaciones para el aislamiento e identificación de antígenos tumorales, entre las que se incluyen técnicas genómicas y proteómicas (Le Naour, 2007).

Una tecnología genómica de amplio uso, que aprovecha la formación de auto-anticuerpos contra tumores, es el análisis serológico de librerías de expresión de ADNc de tumores humanos (SEREX), la cual se basa en la búsqueda de auto-anticuerpos en el suero de pacientes con cáncer, contra una biblioteca de expresión hecha con el RNA de un tumor autólogo. Esta estrategia está limitada por la necesidad de construir bibliotecas de expresión y el análisis generalmente se restringe a uno o pocos pacientes. Otra desventaja es que tampoco permite la caracterización de anticuerpos dirigidos contra posibles modificaciones post-traduccionales. De la misma forma, los microarreglos de ADNc están limitados por el hecho de que la actividad transcripcional en la célula tumoral no refleja necesariamente la actividad de la proteína, ya que las interacciones proteína-proteína y las modificaciones post-traduccionales pueden alterar los patrones proteicos encontrados en circulación (Le Naour, 2001).

Una vez identificado un antígeno tumoral, la segunda fase en el desarrollo de vacunas contra el cáncer es la evaluación de la capacidad del antígeno candidato para estimular una respuesta inmune relevante dirigida contra el tumor. Para lograrlo se llevan a cabo pruebas *in vitro* e *in vivo*, y la principal expectativa es que los resultados del modelo pre-clínico se correlacionen al antígeno en cuestión con eficacia clínica (Clay *et al*, 2001; Hobeika *et al* 2001; Nagorsen y Marincola, 2002; Lyerly, 2003; Keilholz *et al*, 2006). No existe hasta el momento un modelo único ni estandarizado de evaluación de antígenos candidatos, las pruebas empleadas son numerosas y variadas (Tabla II). Sin embargo existe un lineamiento básico, es importante monitorear la respuesta celular y humoral al antígeno (Keilholz *et al*, 2002).

TABLA II

Estrategias en la vacunación contra el cáncer¹

I.	Antígenos solos, con o sin adyuvantes Péptidos Gangliósidos Idiotipos de inmunoglobulinas
II.	Células dendríticas Péptidos, idiotipos de inmunoglobulina Lisados de tumor ADN o ARN
III.	Células tumorales con o sin modificaciones Autólogas Alogénicas Mezcla de autólogas-alogénicas
IV.	Híbridos tumor-células presentadoras de antígeno
V.	ADN solo (ADN desnudo), virus recombinantes (adenovirus, vaccinia, otros)

¹Adaptado de Espinoza-Delgado, 2002.

A pesar de los modestos resultados logrados con los protocolos clínicos y preclínicos con antígenos tumorales a la fecha, persiste la convicción de que los antígenos asociados o específicos a tumor encierran un gran potencial, no solo para el diagnóstico sino también en la difícil área de la terapia antitumoral (Ko *et al*, 2003; Lollini *et al*, 2006). A la luz de los recientes hallazgos en las áreas de inmuno-vigilancia y tolerancia inmunológica, se han propuesto nuevas estrategias que incluyen el empleo de antígenos tumorales combinados con moléculas co-estimuladoras de linfocitos T o por otro lado la supresión de la subpoblación de linfocitos T reguladores, quienes

parecen estar involucrados en la tolerancia a células tumorales (Zitvogel *et al*, 2006; Zou, 2006).

4.3. La proteómica como herramienta de investigación.

La proteómica puede definirse en forma muy simple como el estudio de las proteínas; sin embargo, esta definición puede ampliarse: la proteómica es el conjunto de técnicas aplicadas al estudio de la totalidad de proteínas encontradas en un tipo celular en una condición particular (Brusic *et al*, 2007). Esta definición incluye también a todas las isoformas y modificaciones post-traduccionales de una proteína, la descripción estructural de las proteínas y su ordenamiento en niveles de complejidad (Del Boccio y Urbani, 2005), así como los metabolitos (Patterson, 2004).

El término “proteómica” describe también al conjunto de técnicas que permiten el estudio de las proteínas, y la electroforesis bidimensional se considera la herramienta fundamental y representativa de la proteómica, más no la única. Este es un punto importante, ya que la proteómica difícilmente puede considerarse un área de origen reciente: la electroforesis bidimensional tiene más de 30 años de haberse descrito, la espectrometría de masas tiene alrededor de un siglo en constante desarrollo, la degradación de Edman fue descrita en 1950 y la técnica de *Western Blot* se ha empleado por más de 20 años en laboratorios alrededor del mundo. Sin embargo, estas técnicas han avanzado significativamente en términos de eficiencia, sensibilidad, reproducibilidad y disminución de tiempo y costos, lo que a su vez se refleja en el potencial de la proteómica para resolver problemas. Estos progresos llegan a su vez en

un momento oportuno, en la era post-genómica se reconoce que si bien la descripción del genoma ha sido un parte-aguas en la investigación biológica, también ha hecho evidente que no todas las respuestas se pueden encontrar a nivel genético, por lo que la descripción del proteoma es el siguiente gran desafío de la biología, especialmente por las dificultades técnicas que implica (Tabla III).

TABLA III
Comparación entre la Genómica y Proteómica¹

	Genómica	Proteómica
Propiedades		
Función proteica	No	Si
Identificación de modificaciones post-transcripcionales	No	Si
Detección de isoformas	No	Si
Resolución espacial y temporal	No	Si
Aproximación experimental		
Cantidad de material requerido	5×10^3 células	5×10^7 células
Pasos para amplificación	Si	No
Análisis high throughput	Si	(si)
Factibilidad de microdisectar poblaciones celulares	Si	cuestionable

¹Adaptado de Seliger y Kellner, 2002

Áreas de investigación prometedoras en la proteómica son:

- 1) la descripción de alteraciones en la expresión proteica, a nivel tisular, celular y subcelular, en complejos proteicos y en fluidos biológicos;
- 2) la identificación de nuevos blancos terapéuticos y
- 3) reducción en el tiempo de espera para el desarrollo de drogas a través de estrategias más efectivas para evaluar el efecto terapéutico y la toxicidad (Hanash, 2003).

La proteómica puede clasificarse en proteómica de expresión o comparativa, proteómica estructural y proteómica funcional. La *proteómica de expresión* es el estudio cualitativo y cuantitativo de la expresión de proteínas entre muestras sujetas a condiciones variantes. En esta estrategia, se compara la expresión del proteoma total o de subproteomas entre diferentes muestras. La *proteómica estructural* es el estudio de la localización subcelular de las proteínas y de las interacciones proteína-proteína mediante la purificación de orgánulos o complejos, y la posterior identificación de sus componentes mediante espectrometría de masas. La *proteómica funcional* se encarga del estudio y caracterización de un grupo de proteínas determinado, proporcionando información importante sobre señalización, mecanismos de la enfermedad o interacciones proteína-fármaco (Issaq, 2001, Brea *et al*, 2007).

La proteómica proporciona nuevas oportunidades para la búsqueda e identificación de antígenos. Se pueden considerar dos situaciones para su aplicación: en una, el objetivo es descubrir nuevos biomarcadores (auto-antígenos o auto-anticuerpos), o bien, el objetivo es evaluar la relevancia de marcadores putativos que ya han sido

descritos, es decir, la investigación puede estar orientada al descubrimiento o a probar hipótesis. Las aproximaciones actuales orientadas al descubrimiento, usualmente siguen dos estrategias para caracterizar las proteínas contenidas en una muestra: el análisis “*top down*” de proteínas intactas y las aproximaciones “*bottom-up*” de digestión proteolítica compleja (Figura 1). Las aproximaciones “*top down*” incluyen la electroforesis bidimensional diferencial y la combinación de geles 2-D y *Western blotting* 2-D, para la identificación de auto-antígenos (SERPA, AMIDA, etc). Las aproximaciones “*bottom-up*” incluyen esquemas diversos para la separación de proteínas y péptidos, como cromatografía de intercambio iónico, fase reversa y de afinidad (Caron *et al*, 2007).

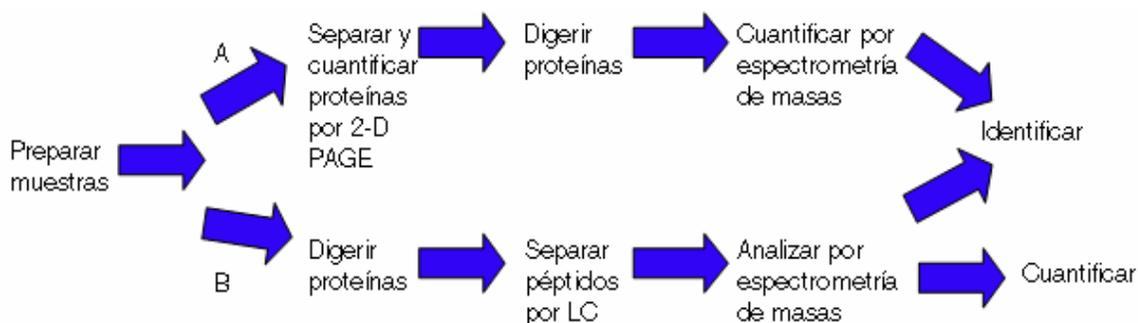


Figura 1. Diagrama de flujo de las estrategias proteómicas, A) *Top Down*, B) *Bottom Up*

4.3.1. Electroforesis bidimensional

Esta técnica permite la separación simultánea de varios miles de proteínas celulares de tejido tumoral o líneas celulares tumorales (O'Farrell, 1975; Klose, 1975). A pesar de haber sido descrita hace poco más de 30 años, una serie de factores se han conjuntado para reavivar el interés por esta técnica. Estos factores incluyen la introducción de tiras con gradiente de pH inmovilizados (IPG), el desarrollo de software

para al análisis de las imágenes de geles bidimensionales, y los avances técnicos en el área de espectrometría de masas orientada a la identificación de proteínas (Görg *et al*, 2000, 2004; Hayduk *et al*, 2002; Wittmann-Liebold, 2006).

Esta técnica separa proteínas de acuerdo a dos propiedades independientes; en la primera dimensión, isoelectroenfoque (IEF), las proteínas se separan de acuerdo a su punto isoeléctrico (pI), mientras que en la segunda dimensión, electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE), las proteínas son separadas de acuerdo a su peso molecular (Mw). Cada mancha en el ordenamiento bidimensional resultante corresponde a una sola proteína en la muestra. Se pueden separar miles de proteínas diferentes y se obtiene información sobre el pI, el peso molecular relativo, y la concentración de proteína (Chen *et al*, 2007). El ordenamiento de manchas en un gel bidimensional es característico de una muestra dada y como tal, una “huella digital” susceptible de análisis diferencial (Figura 2).

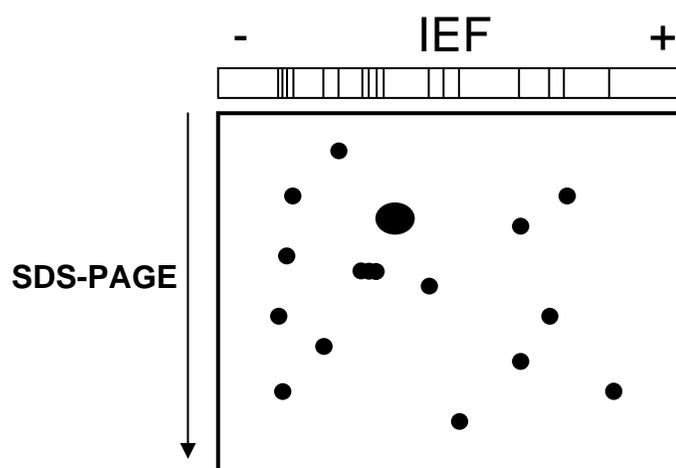


Figura 2. Electroforesis bidimensional de proteínas.

Un avance significativo en la aplicación de geles bidimensionales ha sido el desarrollo de la técnica DIGE (expresión diferencial basada en gel, por sus siglas en inglés) desarrollada por Amersham Biosciences. Su principal propósito es mejorar la reproducibilidad de los experimentos. En la técnica DIGE, dos extractos de proteína son marcadas covalentemente con cianina fluorescente, Cy2, Cy3 y Cy5. Las proteínas marcadas se mezclan y separan en el mismo gel bidimensional, así las muestras con diferente marcaje se pueden comparar en un mismo gel (Viswanathan *et al*, 2006; Shen *et al*, 2008)

4.3.2. Espectrometría de masas de péptidos y proteínas

En la actualidad, la espectrometría de masas (MS) es el método más sensible para la caracterización estructural de biomoléculas. El principio de la MS es la medición de la relación masa/carga de iones en fase gaseosa. Los espectrómetros de masas son instrumentos capaces de producir y separar iones de acuerdo a su relación masa/carga (m/z). Los principales componentes de un espectrómetro de masas son la fuente de ionización, el analizador, detector, procesador de datos y las bombas de vacío. El principal adelanto técnico que hizo posible el empleo de la espectrometría de masas al estudio y análisis de las proteínas, fue el desarrollo de dos nuevas técnicas de ionización a finales de los 1980's. La ionización por *electrospray* (ESI) y la desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI), permitieron por primera vez la adquisición de espectros de masa con cantidades mínimas de péptidos y proteínas (Zhou y Veenstra, 2008; Cañas *et al*, 2006, Jonsson, 2001).

4.3.2.1.Desorción/ionización mediante láser asistida por matriz (MALDI).

Esta es una técnica amigable para identificar proteínas mediante huella de masa peptídica (PMF). En esta técnica, las masas de péptidos trípticos, generados después de degradación enzimática de proteínas separadas en gel, son medidas con gran exactitud (100 ppm o mayor). La mezcla es entonces sublimada con un láser, se confieren cargas eléctricas a las moléculas y los iones-muestra se introducen en un analizador que resuelve los fragmentos, en base de su relación masa-carga (m/z). El analizador de Tiempo de Vuelo (TOF) es el analizador de masa más simple. Consiste esencialmente en un tubo de vuelo al alto vacío. Los iones, acelerados con energías iguales, vuelan a lo largo del tubo con diferente velocidad, la cual es inversamente proporcional a sus masas. El espectro de masas obtenido permite la identificación de proteínas al comparar las masas experimentales calculadas con espectros depositados en una base de datos de proteínas (Fontana *et al*, 2006; Cañas *et al*, 2007).

4.3.2.2.Ionización por *Electrospray* y espectrometría de masas en *tándem* (ESI-MS/MS)

Cuando no es posible identificar inequívocamente una proteína mediante MALDI-TOF, puede usarse Ionización mediante *Electrospray* (ESI), esta es una herramienta de separación poderosa, la cual incluso en presencia de muchos otros péptidos co-detectados, puede seleccionar, aislar, fragmentar y secuenciar un solo ión peptídico. El *electrospray* es un método de ionización suave, adecuado para combinar métodos cromatográficos con espectrometría de masas (Jonsson, 2001). La metodología

ESI genera iones moleculares intactos de moléculas en solución, al acoplar una columna de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) directamente a un espectrómetro de masas. En un experimento MS/MS los analizadores de masa están ordenados en serie, ya sea espacialmente (sector, triple cuádruplo e instrumentos híbridos), o en tiempo (trampas) (Griffiths *et al*, 2001). De esta forma, los adelantos en instrumentación, como los analizadores de triple cuádruplo con fuentes de ión robustas y analizadores de masa de lectura rápida, permiten la identificación y cuantificación de proteína con gran sensibilidad (subpicomoles como límite de detección) y alta reproducibilidad (Fontana *et al*, 2006).

4.4. Aplicación de la proteómica en la investigación del cáncer.

El término “proteoma del cáncer” se refiere a la colección de proteínas expresadas por una célula cancerosa dada y debe ser considerada como una entidad altamente dinámica dentro de la célula, que influye en una variedad de actividades celulares. De ahí que la proteómica del cáncer tiene como objetivo no sólo identificar, catalogar y caracterizar proteínas relevantes, sino también entender cómo interactúan para afectar el inicio y la progresión metastática (Alessandro *et al*, 2005). Al estudio de las proteínas y sus interacciones en las células cancerosas mediante tecnologías proteómicas, se le llama Oncoproteómica (Cho, 2007)

En forma específica, las principales aplicaciones y desafíos de la proteómica aplicada a la investigación del cáncer incluyen:

- i) la obtención de los perfiles de expresión proteómica de tumores, células y fluidos tumorales,
- ii) microarreglos de proteínas;
- iii) mapeo de vías de señalización del cáncer;
- iv) farmacoproteómica;
- v) biomarcadores para el diagnóstico, determinación de etapas, monitoreo de la enfermedad y la respuesta terapéutica; y
- vi) la respuesta inmune al cáncer (Kolch, 2005)

La obtención de los perfiles de expresión proteómica del cáncer está estrechamente vinculada al área de los biomarcadores y antígenos tumorales. El término biomarcador se refiere a cualquier indicador biológico que refleje una enfermedad, pero no necesariamente está involucrado en el proceso patológico en si (Whelan *et al*, 2006), y es una de las áreas que mayor impulso ha ganado gracias a la proteómica (Diamandis, 2003; Shau *et al*, 2003; Marko-Varga *et al*, 2005; Hirano *et al*, 2006; Copier *et al*, 2006; Pan *et al*, 2005; Lee *et al*, 2006; Lescuyer *et al*, 2007; Cowan y Vera, 2008). Se han empleado estrategias proteómicas para explorar biomarcadores en cáncer de ovario (Wu *et al*, 2006), pancreático (Okusaka *et al*, 2006); carcinoma nasofaríngeo (Ho *et al*, 2006), y cáncer gástrico (Ren *et al*, 2006).

4.5. Estrategias proteómicas en la búsqueda de antígenos tumorales.

Para definir antígenos tumorales, las estrategias más empleadas se han basado en la obtención de geles bidimensionales y su posterior análisis, comparativo o serológico

(Figura 3), mientras que otras aproximaciones se han enfocado en analizar los productos de secreción de las células tumorales.

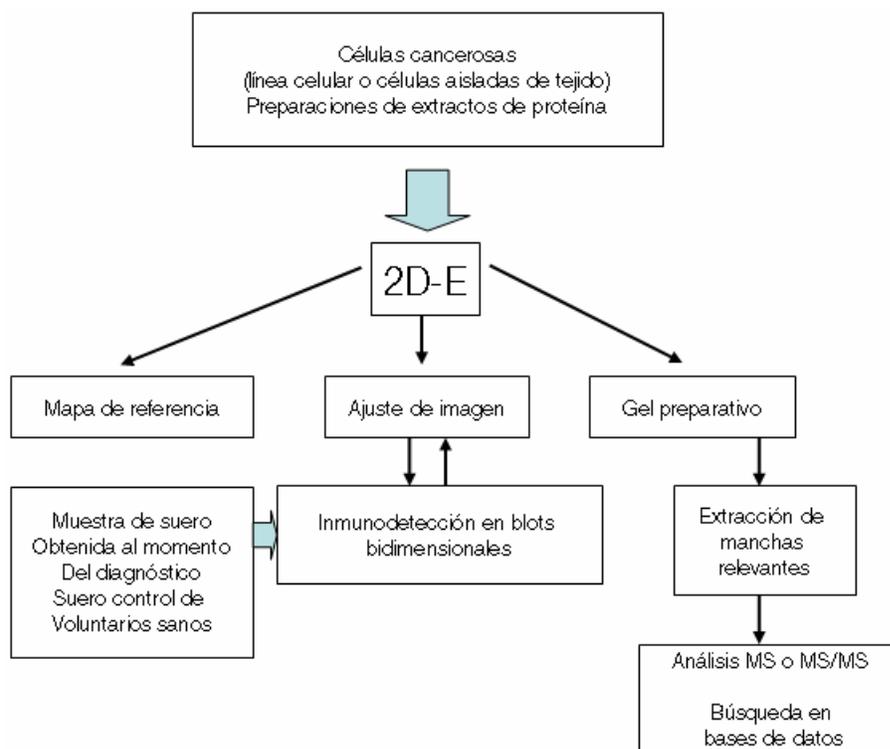


Figura 3. Estrategias proteómicas en la búsqueda de antígenos tumorales.

4.5.1. Comparación de proteomas mediante análisis de imagen

La proteómica comparativa, también llamada de expresión diferencial es un ejemplo de aproximación “*top down*”: se obtienen geles bidimensionales de muestras en condiciones variantes y se emplea el análisis computacional de imagen para explorar variaciones en la diversidad y los niveles de expresión de las proteínas expresadas por la muestra problema y un control, donde generalmente el problema es una muestra que ha recibido algún tratamiento o sufrido una transformación. Para el caso del cáncer, la

muestra problema consiste de células tumorales, mientras que el control son células sanas del mismo tejido. El análisis de imagen computacional requiere el empleo de software comercial; estos programas tienen funciones básicas, como la identificación y cuantificación de manchas en los geles bidimensionales, cálculo de los P_i y M_w experimentales, y sobre todo la comparación entre geles y grupos experimentales de geles. Con esta información, se pueden tomar decisiones respecto a la expresión diferencial entre una muestra y otra (Hayduk *et al*, 2002; Wang *et al*, 2006). Esta aproximación se ha empleado para estudios con líneas de cáncer de mama (Huber *et al*, 2003) y gliomas (Vogel *et al*, 2005) entre otros.

La técnica de expresión diferencial mediante fluorocromos DIGE se evaluó en un modelo celular de cáncer de mama que sobre-expresa ErbB-2; esta es una metodología con marcaje de triple tinción de geles y, mediante el análisis de estos con el programa DeCyder, se identificaron proteínas diferencialmente expresadas en un periodo de tiempo de estimulación con factores de crecimiento, las cuales podrían potencialmente estar involucradas en la transformación celular mediada por ErbB-2. Las proteínas diferencialmente expresadas se identificaron como Hsp27, Hsp70, carbamoil fosfato sintetasa, citoqueratina 17, L-plastina, glutaminasa, copina III, aldosa-reductasa, proteína rica en leucina, T-plastina, Helicasa ADN p50, Lamina B, entre otras (Gharbi *et al*, 2002).

Lenaerts *et al* (2007) llevaron a cabo un estudio en el que compararon los patrones de expresión proteica de las células Caco-2 con los patrones obtenidos a partir de células epiteliales intestinales del intestino grueso y delgado humano, buscando

determinar la idoneidad de las células Caco-2 como modelo de estudio *in vitro*. Llevaron a cabo electroforesis bidimensional y análisis de imagen con el programa PDQuest, el análisis de *cluster* y principales componentes mostró que la expresión global de proteínas difiere entre las líneas celulares y las células de epitelio intestinal, lo cual parece reflejar la adaptación de las células en cultivo. El análisis detallado de los patrones obtenidos de células Caco-2 y células epiteliales de intestino delgado, mostró un empalme considerable, lo cual indica que Caco-2 es útil como modelo *in vitro*.

También se ha analizado el cáncer epitelial de ovario mediante proteómica comparativa. Gagné *et al* (2007) utilizaron dos estrategias proteómicas complementarios, análisis iTRAQ, electroforesis bidimensional y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en *tándem*, para analizar dos líneas celulares de cáncer de ovario TOV-81D y TOV-112D, las cuales por su diferente grado de transformación, reflejan los cambios observados durante la metástasis del tumor. Mediante electroforesis bidimensional y análisis de imagen con el programa PDQuest, se determinaron 65 proteínas diferencialmente expresadas entre ambas líneas; estas proteínas se identificaron y se reconocieron la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa, anexina I y calponina H2, entre otras.

Para determinar posibles marcadores de cáncer gástrico, Zhang *et al* (2007) analizaron 10 pares de muestras clínicas de tejido gástrico, extrajeron las proteínas y las separaron mediante electroforesis bidimensional. Los patrones obtenidos fueron analizados con el programa 2D Image Master y se encontraron 12 proteínas sobre-expresadas y 13 con expresión disminuida; estas proteínas se identificaron mediante

MALDI-TOF-TOF. Entre las proteínas cuya expresión disminuye en cáncer gástrico se encontró a MAWD *binding protein* (MAWBP), siendo este estudio la primera vez que se le reporta en cáncer gástrico. Otras proteínas diferencialmente expresadas en cáncer gástrico incluyeron: las sobre-expresadas; catepsina D, Hsp27, calponina 1 y aldehído deshidrogenada; mientras entre las sub-expresadas fueron acil-Coa-deshidrogenasa, anexina 1 y carbonil reductasa 1.

El análisis comparativo de 3 líneas celulares de leucemia mielógena crónica; LAMA84, K562 y KCL22, reveló que estas 3 líneas, aunque representan el mismo fenotipo patológico, muestran características en sus perfiles proteómicos que sugieren diferentes subclases fenotípicas de leucemia. Empleando electroforesis bidimensional y espectrometría de masas, los autores detectaron 191 manchas que correspondían a 142 proteínas diferentes; de estas, el 63% fueron proteínas relacionadas al cáncer y 74% fueron descritas por primera vez para células de leucemia. La línea LAMA84 expresaba preferencialmente proteínas de conducta invasiva, mientras que K562 y KCL22 expresaban principalmente proteínas de resistencia a drogas (Fontana *et al*, 2007).

Con el objetivo de determinar los mecanismos detrás de la resistencia a imatinib, una droga que se emplea en el tratamiento de la leucemia mielógena crónica (CML), se llevó a cabo un estudio comparativo de las líneas de CML LAMA84s y LAMA84r sensible y resistente a imatinib, respectivamente. Se identificaron 44 proteínas diferencialmente expresadas, las cuales pertenecen a 5 categorías funcionales:

- 1) chaperonas y proteínas de choque térmico,
- 2) proteínas que interactúan con ácidos nucleicos,

- 3) proteínas estructurales,
- 4) señalización celular y
- 5) enzimas metabólicas.

En forma remarcable, observaron la sobreexpresión de varias proteínas que forman complejos con la proteína Bcr-Abl, la cual es marcador de transformación neoplásica en células hematopoyéticas pluripotenciales (Ferrari *et al*, 2007).

El hepatocarcinoma humano también se ha analizado mediante una estrategia proteómica (Feng *et al*, 2007). Para lograrlo, se obtuvieron geles bidimensionales de la línea de hepatocarcinoma SMMC-7721 y los perfiles obtenidos se analizaron con el programa Image Master 2D Elite; de las proteínas expresadas diferencialmente, lograron identificar 21 mediante espectrometría MALDI-TOF. Entre las proteínas así identificadas, se encontraron mitofilina, proteína ERp29 del retículo endoplásmico, proteína I nuclear del complejo ubiquinolcitocromo C reductasa, enoil CoA hidratasa peroxisomal, peroxiredoxina-4 y precursor de la transferasa 1 de la CoA 3-oxoácido, las cuales fueron reportadas por primera vez en este estudio.

Para identificar las proteínas involucradas en la resistencia a adriamicina, se compararon los perfiles proteómicos de las líneas celulares SGC790/ADR (que es resistente a adriamicina) y la línea celular parental SGC7901. Se encontraron 16 proteínas expresadas diferencialmente entre ambas líneas; entre ellas, la anexina I y la nucleofosmina (NPM1), esta última asociada con el fenómeno de multiresistencia a drogas (Yang *et al*, 2007)

4.5.2. Búsqueda mediante auto-anticuerpos

Entre las aproximaciones experimentales en la identificación de antígenos tumorales con gran interés por su enfoque multidisciplinario, están aquellas que emplean la inmunidad humoral contra tumores como un filtro que permite dirigir la búsqueda hacia moléculas que constituyan blancos potenciales de inmunidad antitumoral, entre el vasto número de proteínas presentes (Seliger y Kellner, 2002). *In vivo*, la respuesta humoral es una de las armas de nuestro sistema inmune para combatir a los patógenos y las células transformadas. Por ello, el suero de los individuos que han tenido contacto con patógenos infecciosos o que han desarrollado problemas malignos, contiene anticuerpos específicos de la enfermedad dirigidos contra epítopes antigénicos. Dada la presencia de tales anticuerpos en pacientes, es posible aprovechar esto para desarrollar tecnologías genómicas y proteómicas para el aislamiento de antígenos asociados a tumor (Anderson y LaBaer, 2005; Lu *et al*, 2008). SEREX es un ejemplo de tecnología genómica que aprovecha la presencia de auto-anticuerpos en la sangre de pacientes de cáncer.

La presencia de estos auto-anticuerpos también se ha empleado en conjunción con técnicas propias de la proteómica. Las proteínas separadas mediante electroforesis bidimensional se transfieren a membranas y se emplea el suero de pacientes de cáncer como anticuerpo primario en ensayos *Western Blot*, donde se evalúa en forma individual la presencia de anticuerpos que reaccionen contra las proteínas separadas en la membrana. Los auto-antígenos son detectados usando un anticuerpo secundario dirigido contra la inmunoglobulina IgM o IgG, seguidos por auto-radiografía. Las proteínas que

reaccionan en forma específica con el suero de pacientes de cáncer se localizan en los geles bidimensionales, teñidos con plata por súper imposición con el *blot*, o mediante análisis de imagen computacional. Las proteínas se extraen del gel, se digieren y son identificadas por análisis de espectrometría de masas y/o secuenciación de aminoácidos. Esta estrategia permite el análisis individual de un gran número de suero de pacientes, así como también la determinación de la existencia de auto-antígenos relevantes. Además, una estrategia con base proteómica permite distinguir isoformas de una proteína, así como la detección de auto anticuerpos dirigidos contra modificaciones post-traduccionales de blancos específicos. Esta estrategia ha sido aplicada con éxito a diferentes tipos de cáncer, como neuroblastoma, leucemia aguda, mama, páncreas, carcinoma de células escamosas de esófago, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de células renales, carcinoma de cabeza y cuello y carcinoma hepatocelular según se describe a continuación.

Prasannan *et al* (2000), utilizaron electroforesis bidimensional y *Western blot* para identificar proteínas del tumor que estimularan una respuesta humoral en pacientes de neuroblastoma y encontraron evidencia de péptidos de β -tubulina inmunogénicos, los cuales podrían tener utilidad en el diagnóstico e inmunoterapia de este cáncer.

La misma estrategia fue empleada por Cui *et al* (2005) para identificar proteínas que indujeran una respuesta humoral en pacientes de leucemia aguda. Para esto analizaron el suero de 21 pacientes de reciente diagnóstico de leucemia aguda, 20 pacientes con tumores sólidos y 22 sujetos control sin cáncer para determinar reactividad

contra proteínas de leucemia aguda, resueltas por electroforesis bidimensional. Como resultado, se detectaron anticuerpos dirigidos contra una proteína identificada por espectrometría de masas como Rho GDP *dissociation inhibitor 2* en el suero de 15/21 pacientes con leucemia aguda (72%). En contraste, este anticuerpo se detectó en 1/20 pacientes con tumores sólidos (5%) y en 1/22 controles no cancerosos (4.5%). Otras cinco proteínas se encontraron en alta frecuencia en pacientes de leucemia aguda; estas fueron: γ -actina, CAPZA1, hnRNPL, tubulina α -6 y α -enolasa.

Le Naour, (2001) usando la combinación de electroforesis bidimensional, *Western blot* y espectrometría de masas MALDI-TOF determinaron la presencia de auto-anticuerpos dirigidos contra la proteína oncogénica RS/DJ-1 en el suero de 4 de 30 pacientes con cáncer de mama. El antígeno circulante RS/DJ-1 se detectó rápidamente en suero de 11 de 30 pacientes, recientemente diagnosticados con cáncer de mama.

Para identificar proteínas que inducen una respuesta humoral en cáncer pancreático, se obtuvieron geles bidimensionales de una línea celular de cáncer pancreático (Panc-1), seguido por análisis *Western blot*, en el que se evaluó la presencia de anticuerpos primarios en pacientes. Se analizó el suero de 36 pacientes diagnosticados recientemente con cáncer pancreático, 18 pacientes con pancreatitis crónica, 33 pacientes con otros tipos de cáncer y 15 sujetos sanos. Se detectaron anticuerpos contra una o dos isoformas de calreticulina, identificadas por espectrometría de masas, en el suero de 21 de 36 pacientes con cáncer pancreático. Uno de 18 pacientes de pancreatitis crónica y uno de 15 controles sanos mostraron auto-anticuerpos contra la

isoforma I de calreticulina; ninguno mostró auto-anticuerpos contra la isoforma II. Ningún suero de pacientes con cáncer de colon exhibió reactividad contra ninguna de estas dos proteínas. Uno de 14 sueros de pacientes de adenocarcinoma de pulmón mostró auto-anticuerpos contra la isoforma I de calreticulina; 2 de 14 mostraron auto-anticuerpos contra la isoforma II. Estas observaciones podrían tener utilidad para el diagnóstico temprano del cáncer (Hong *et al*, 2004).

Para identificar nuevos antígenos tumorales en carcinoma de células escamosas de esófago (ESCC), Fujita *et al* (2006) analizaron la línea celular TE-2 y el suero de pacientes con ESCC. Las proteínas TE-2 se separaron con electroforesis bidimensional, seguido por *Western blot*, en el cual se probó el suero de pacientes con ESCC, controles sanos y pacientes con otros tipos de cáncer. Las manchas positivas se extrajeron de geles teñidos con plata y se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. El suero de pacientes con ESCC produjo múltiples manchas reactivas, una de las cuales fue identificada como peroxiredoxina (Prx). Análisis *Western blot* contra Prx VI recombinante, mostró reactividad en el suero de 15 de 30 pacientes (50%) con ESCC y 2 de 30 (6.6%) individuos sanos. Se encontraron auto-anticuerpos contra Prx VI en el suero de 1 de 30 (3.3) pacientes con otros tipos de cáncer (colon).

Para identificar proteínas que inducen una respuesta humoral en cáncer de pulmón, Brichory *et al* (2001a) solubilizaron proteínas de una línea celular de adenocarcinoma de pulmón y de tumores de pulmón, las separaron mediante electroforesis bidimensional y mediante *Western blot* probaron la presencia de auto-anticuerpos. Se analizaron sueros de 54 pacientes recién diagnosticados con cáncer de

pulmón y 60 pacientes de otros tipos de cáncer y 61 controles de individuos no cancerosos. El suero del 60% de pacientes de adenocarcinoma de pulmón y 33% de pacientes con carcinoma de pulmón de células escamosas, pero ninguno de los controles no cancerosos, exhibieron reactividad IgG contra proteínas identificadas como anexina I y II glicosiladas. Análisis histoquímico mostró que la anexina I se expresaba difusamente en células neoplásicas en tejido tumoral de cáncer de pulmón, mientras que anexina II era predominante en la superficie celular.

Posteriormente, Brichory *et al* (2001b) aplicaron esta estrategia proteómica a muestras de adenocarcinoma de pulmón que resolvieron por electroforesis bidimensional y probaron la reactividad del suero de 64 pacientes de diagnóstico reciente, 99 pacientes con otros tipos de cáncer y 71 controles no-cancerosos. Con excepción de los controles, se detectaron auto-anticuerpos contra una proteína identificada por espectrometría de masas como PGP 9.5 en el suero de 9 de 64 pacientes con cáncer de pulmón. PGP 9.5 es un polipéptido neuroespecífico previamente propuesto como marcador para cáncer de pulmón de células pequeñas, basado en su expresión en tejido tumoral.

Klade *et al* (2001) compararon los proteomas de células renales no tumorales y células de carcinoma (RCC) mediante electroforesis en dos dimensiones (2-DE) y tinción de plata. Los patrones proteicos fueron marcadamente diferentes (800 manchas en RCC contra 1400 manchas en riñón). Análisis *Western blot* en dos dimensiones reveló cinco manchas específicas de RCC, con reactividad reproducible con suero de pacientes RCC, pero no en suero control de donadores sanos. Dos de estos antígenos se aislaron con 2-DE preparativo, y se identificaron mediante secuenciación de Edman de

péptidos trípticos. El primer antígeno, SM22- α , es una proteína de unión a actina de función desconocida que se expresa predominantemente en células del músculo liso. Análisis de hibridación *in situ* reveló que SM22- α no se expresa en las células malignas sino en las células mesenquimales del estroma tumoral. El segundo antígeno representa a la anhidrasa carbónica I (CAI), una isoforma que no se expresa usualmente en el riñón.

Unwin *et al* (2003) aplicaron al carcinoma de células renales esta misma estrategia de electroforesis bidimensional, *Western blot* y espectrometría de masas, a la cual denominaron Evaluación Serológica y Proteómica de la Respuesta de Anticuerpos (SPEAR, por sus siglas en inglés). Mediante electroforesis bidimensional separaron muestras tumorales y normales de riñón y las analizaron por *immunoblotting* utilizando suero autólogo de pacientes. Mediante la estrategia SPEAR se detectaron varios inmunógenos candidatos en pacientes con enfermedad avanzada; estas proteínas incluían, anexinas I y IV, fosforilasa de timidina, anhidrasa carbónica I, Mn-superóxido dismutasa y *Major Vault Protein* (MVP).

Gires *et al* (2004) describieron una tecnología para identificación de nuevos blancos moleculares, basada en la inmunoprecipitación de antígenos específicos de enfermedad por anticuerpos en suero autólogo, seguido por separación electroforética en dos dimensiones, y su identificación vía espectrometría de masas. Esta tecnología fue denominada AMIDA (identificación de antígenos mediada por anticuerpos, en inglés). Analizaron un total de seis carcinomas de células escamosas del tracto aerodigestivo superior. Una vez que se excluyó a las inmunoglobulinas y proteínas solubles de suero,

quedaron 27 antígenos potencialmente asociados a tumor, lo que representó al 70-80% de todas las proteínas identificadas por espectrometría de masas MALDI-TOF. Estas 27 proteínas identificadas pueden asignarse a uno de los tres siguientes grupos:

- I) Proteínas ya definidas como antígenos asociados a tumor, como grp78, o proteínas asociadas con inmunidad autoagresiva, como nucleoproteína AHNAK, viventina y hsc70;
- II) Proteínas de función conocida, las cuales no se han asociado con cáncer, como tropomiosina alfa y elongina A2;
- III) Proteínas de función desconocida, como las proteínas KIAA y la proteína hipotética de 41.3 kDa.

En resumen, AMIDA hace uso de la inmunoprecitación como un filtro para reducir masivamente la complejidad de la mezcla de proteínas y seleccionar las proteínas de importancia inmunológica, para ser separadas por 2-D PAGE.

Takashima *et al* (2006), emplearon una combinación de proteómica y SEREX para detectar auto-anticuerpos que pudieran servir como marcadores de diagnóstico para carcinoma hepatocelular (HCC). En este estudio, se utilizaron 15 muestras pareadas de tejido HCC y sus correspondientes tejidos hepáticos no tumorales, así como cinco muestras de tejido hepático normal. Las proteínas de las muestras fueron separadas por 2-D PAGE, transferidas a membranas PVDF y probadas con suero autólogo. Al comparar el patrón de cada *immunoblot*, identificaron cuatro manchas inmuno-reactivas con una mayor intensidad de tinción en tejidos tumorales que en tejidos no tumorales y tejido sano. Las proteínas correspondientes en los geles bidimensionales se identificaron por LC-MS/MS. Estas proteínas inmuno-reactivas corresponden a la proteína de 70 kDa

de choque térmico (HSP70), gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, peroxiredoxina y manganeso superóxido dismutasa (Mn-SOD)

4.5.3. Análisis de fluidos biológicos y medios condicionados celulares

Un requisito importante que debe cumplir un biomarcador potencial es el de encontrarse en circulación en el plasma sanguíneo, de forma tal que sea sencillo la colección de muestras para su posterior análisis. Se sabe que los tumores secretan proteínas al medio que las rodea; estas proteínas difunden y llegan hasta los fluidos biológicos, entre ellos la sangre. Diagnosticar el cáncer mediante perfiles proteicos en fluidos biológicos es un concepto atractivo, por lo que tiene lógica analizar las proteínas secretadas por las células tumorales para buscar antígenos tumorales potenciales.

La secreción no es el único mecanismo por el cual las células tumorales liberan proteínas al entorno extracelular. La proteólisis de ectodominios es un mecanismo de regulación de la actividad celular, en donde se liberan moléculas de la superficie celular a través de cortes enzimáticos con proteasas o lipasas, o bien mediante exocitosis de vesículas derivadas de la membrana (Figura 4). Este fenómeno se presenta en diversos tipos celulares y las proteínas liberadas son variadas: citocinas y sus receptores, factores de crecimiento y sus receptores, moléculas de adhesión celular, receptores Fc y receptores acoplados a proteínas G. Estas proteínas tienen funciones diversas e importantes, de ahí el interés de entender este mecanismo (Kiessling y Gordon, 1998; Arribas y Borroto, 2002). Se ha observado que las aberraciones en el proceso de proteólisis de ectodominios están ligadas a procesos patológicos, entre ellos el cáncer.

Por ejemplo, se ha visto que la proteólisis del ectodominio c-Met se correlaciona con el potencial maligno de una variedad de tumores humanos (Athauda *et al*, 2006) y el corte proteolítico de ectodominios de Nr-CAM estimula la transformación celular ligada a tumorigénesis (Conacci-Sorrell *et al*, 2005). Por ello, las proteínas extracelulares secretadas o liberadas de células tumorales, representan una fuente potencial de biomarcadores y antígenos tumorales (Ahram *et al*, 2004; Kulasingam *et al*, 2007).

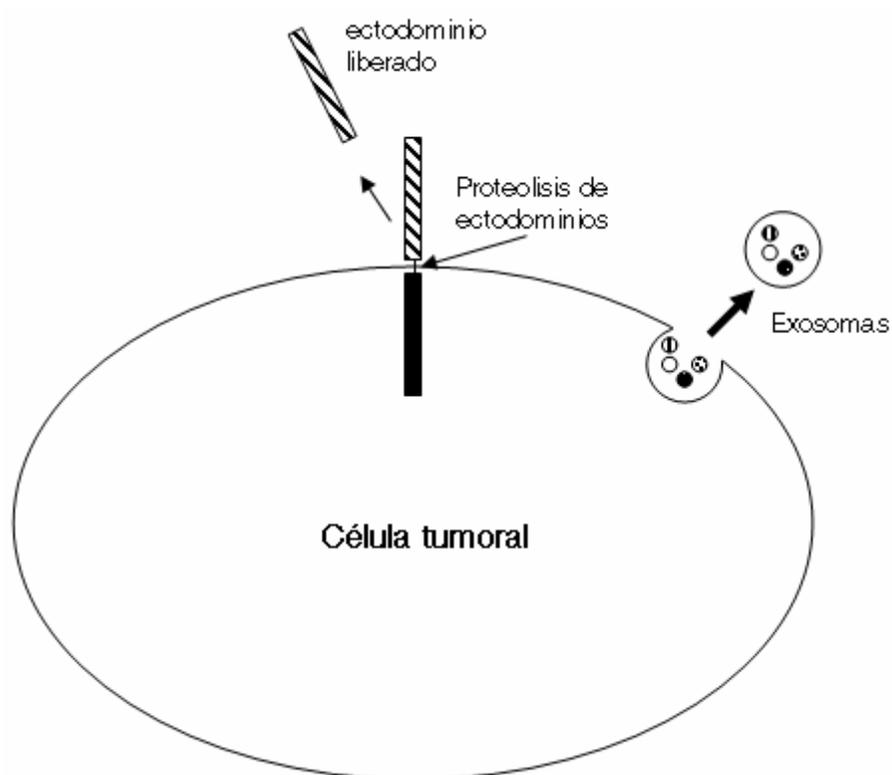


Figura 4. Proteólisis de ectodominios en la membrana celular.

Dado que tanto la secreción como la proteólisis de ectodominios son eventos post-transcripcionales, su análisis usualmente está restringido a las estrategias proteómicas (Guo *et al*, 2002). El análisis de proteínas extracelulares puede llevarse a

cabo en fluidos biológicos como el suero, plasma, líquido cefalorraquídeo, orina, líquido pleural, aspirados de pezón, saliva, ascitis de tumor y medios condicionados de cultivos *in vitro* (Kennedy, 2001). La estrategia proteómica de elección es, por supuesto, la electroforesis bidimensional, para separar las proteínas, y la espectrometría de masas, para la identificación de candidatos; sin embargo, es frecuente ver en la literatura la aplicación de aproximaciones “*bottom up*” en las cuales se aíslan las proteínas, se digieren enzimáticamente y el digerido obtenido se analiza mediante diferentes combinaciones de cromatografía líquida y espectrometría de masas, para determinar las proteínas presentes en la muestra.

Mbeunkui *et al* (2006; 2007) aplicaron una estrategia proteómica “*bottom up*” al estudio de proteínas de secreción en líneas celulares tumorales y líneas isogénicas representativas de progresión en cáncer de mama; ambos estudios arrojaron numerosos marcadores potenciales para el monitoreo de la progresión de cáncer de mama, donde observaron que todas las proteínas detectadas eran producto de secreción no-clásica; adicionalmente, encontraron una asociación consistente de la proteína de unión a galectina-3, con agresividad y progresión de cáncer. Pawlik *et al* en el 2006, analizaron el aspirado de pezón de pacientes de cáncer de mama mediante marcaje isotópico diferencial (ICAT) y espectrometría de masas en *tándem* y encontraron diferencias en la expresión de la proteína de unión a vitamina D.

Kulasingam *et al* (2007) analizaron los medios condicionados de tres líneas celulares (MCF-10A, BT474 y MDA-MB-468) mediante cromatografía de intercambio aniónico, seguida por cromatografía líquida en fase reversa, acoplada a espectrometría

de masas en *tándem*. Encontraron que su protocolo experimental enriquecía significativamente la presencia de proteínas de secreción y aprovecharon la presencia de las kalikreinas 5, 6 y 10, como control interno, de forma tal que pudieron detectar con un alto grado de confiabilidad, la presencia de Her2/neu en las células BT474.

Sardana *et al* (2003) analizaron los medios condicionados de la línea de cáncer pancreático PC3 (AR)6. Fraccionaron las proteínas por cromatografía de intercambio aniónico, tripsinizaron las fracciones y los péptidos tripticos se fraccionaron mediante cromatografía en fase reversa C-18 y las fracciones resultantes se analizaron por ionización *electrospray* y espectrometría de masas en *tándem*. Identificaron una proteína *novel*, Mac-BP, que podría ser utilizada como marcador de cáncer pancreático.

También se han empleado aproximaciones “*bottom up*” para analizar las proteínas contenidas en micropartículas membranales de linfocitos de cáncer de linfocitos B crónico humano. De esta forma, se identificaron 413 proteínas, 117 membranales y muchas de ellas asociadas a procesos patológicos (Miguet *et al*, 2006). Otra aproximación ha sido analizar los exosomas aislados de líquido pleural de pacientes con mesotelioma, cáncer de pulmón, cáncer de mama y de ovario. En este caso, se aislaron los exosomas del líquido pleural mediante gradiente en sucrosa, y las proteínas se separaron mediante electroforesis bidimensional y se identificaron mediante MALDI-TOF y *Western blot*. Así, se identificaron proteínas no reportadas previamente para este fluido, como SNX25, BTG1, PEDF y trombospondina 2 (Bard *et al*, 2004).

4.6. El modelo murino L5178Y

Existe cierta falta de uniformidad en la nomenclatura relacionada con el linfoma murino L5178Y, especialmente en la literatura de los primeros años después de la generación del linfoma y posteriormente por la aparición de líneas derivadas generadas mediante tratamiento exógeno, principalmente con agentes químicos. En la actualidad, se reconoce la existencia de la línea L5178Y, la cual consta de las sub-líneas L5178Y-R (LY-R), L5178Y-S (LY-S) y L5178Y TK+/- clone (3.7.2C). Si bien la sub-línea L5178Y-R como tal se consideraba distinta de la línea original L5178Y obtenida a partir del linfoma, hoy en día se acepta que ambas son una sola línea y es posible encontrar en la literatura el uso indistinto de las denominaciones L5178Y y L5178Y-R (McIlrath *et al*, 2001; Brzóska *et al*, 2006, Evans *et al*, 1987). Para efectos de este trabajo, cuando hablamos del modelo de estudio empleamos el término L5178Y para referirnos al linfoma y como L5178Y-R la línea original radio-resistente y L5178Y-S la sub-línea radio-sensible (Figura 5).

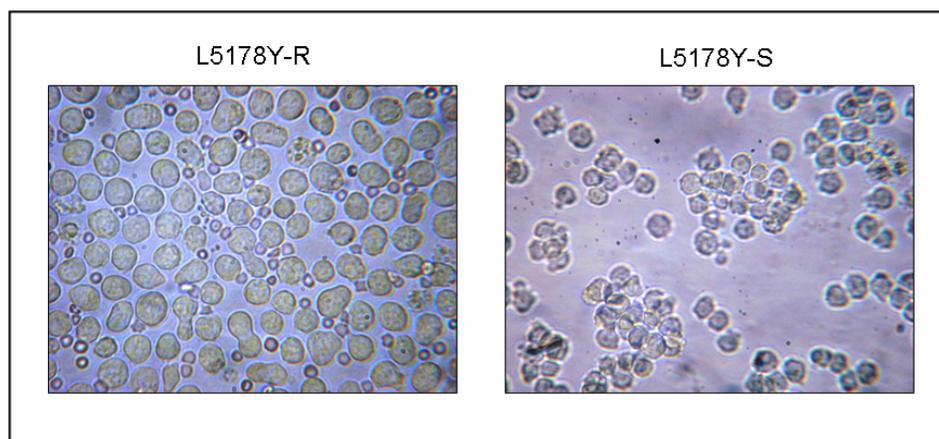


Figura 5. Células LY-R y LY-S en cultivo observadas al microscopio óptico.

El linfoma murino L5178Y, morfológicamente un linfoblastoma, se originó a partir de un tumor tímico inducido con 3-metilcolantreno en ratones DBA/2 (H-2^d); posteriormente se estableció una línea celular L5178Y en suspensión. Las células de la línea L5178Y-R son derivadas de esta línea paterna L5178Y, y tienen entre sus características el ser resistentes a la radiación por rayos X, pero ser sensibles a la luz ultravioleta, calor y algunas drogas potencialmente anti-neoplásicas, por ejemplo cis-PAD, además, son altamente tumorigénicas en ratones DBA/2 (H-2^d).

La sub-línea L5178Y-S fue aislada por primera vez por Alexander y Mikulski en 1961 a partir de un cultivo de células LY-R, después de que este mostrara un incremento espontáneo en su sensibilidad a los efectos citotóxicos de la radiación ionizante. Las células de la sub-línea LY-S son deficientes en procesos de recuperación celular que se activan después de la exposición a radiación ionizante (Beer *et al*, 1983; 1984). Otra característica relevante de esta sub-línea es que ha perdido su capacidad de inducir tumores en ratones, lo cual puede estar relacionado con cambios en sus propiedades inmunológicas, entre ellas la expresión de antígenos de superficie. Esta línea celular por sí sola no se ha aplicado en investigación en forma comparable a la línea LY-R; sin embargo, existe interés en determinar los cambios moleculares ligados a la conversión de sus propiedades celulares (Szumiel, 2005a; -2005b)

La línea L5178Y-R se ha empleado principalmente en análisis de toxicidad celular (evaluación de drogas anti-neoplásicas) y estudios radiológicos. La variabilidad

en la sensibilidad de las sub-líneas derivadas de L5178Y a agentes exógenos, hace de esta un modelo interesante para el estudio de los fenómenos involucrados en tumorigenicidad (Beer *et al*, 1983; -1984).

Junto con la variabilidad observada entre sub-líneas, el linfoma L5178Y posee además la capacidad de entrar en “estado de latencia”, el cual podría definirse de acuerdo a Weinhold *et al* (1979), como “el estado en el cual las células tumorales persisten en su hospedero por periodos prolongados de tiempo con un crecimiento neto mínimo”. Este comportamiento tiene su equivalente clínico en el periodo de remisión, el cual puede haberse prolongado por años, que antecede a la reaparición de tumores que se ha observado en pacientes de cáncer y se cree está relacionado con los mecanismos de evasión tumoral (Trainer y Wheelock, 1984).

Otra característica ampliamente estudiada de esta línea celular es su capacidad de generar nuevas variantes inmunogénicas, al ser tratada con agentes exógenos (Romani *et al*, 1979, 1985; Franco, 1982; Nicolin *et al*, 1976; Gómez-Estrada *et al*, 1977; Fioretti, 1978).

Todas estas propiedades hacen del linfoma L5178Y un modelo con utilidad en el estudio de los factores determinantes de la tumorigenicidad celular. Un requisito fundamental para estos estudios es el reconocimiento y caracterización de los antígenos asociados o específicos a este tumor. Al respecto, se han realizado diversos estudios, aunque ninguno reciente, y la caracterización de los antígenos ha sido pobre, lo que puede atribuirse a las limitaciones intrínsecas a las estrategias experimentales empleadas

(Manson, 1987; Ramos-Damián, 1982; Lamas-Robles *et al*, 1984; Grohmann *et al*, 1992, 1993).

Aunque limitados, los resultados de estos trabajos sugieren la presencia de una o varias glicoproteínas de membrana con propiedades inmunogénicas (Tabla IV), ya que se han reportado hallazgos de glicoproteínas de 64 kD (Rabinovsky y Yang, 1986), 71, 85 y 135 kD (Weinhold y Wheelock, 1982).

TABLA IV.

Antígenos aislados a partir del linfoma L5178Y¹

Antígeno	Localización	Cita
Tubulina (isoformas M β I, and M β II)	Fracción celular polimerizada y no polimerizada	¹ Harada <i>et al</i>
Actina ácida pI 5.1 y 5.3	Matriz nuclear	¹ Nakayasu y Ueda
Glicoproteína de 64 Kd	Fracción soluble y no soluble de membrana	¹ Rabinovsky y Yang
GM2 (gangliotriosilceramida)	Superficie celular	¹ Young <i>et al</i>
Lipoproteína	Microsomas	¹ Goldstein
Antígeno tumoral neoplasia específica (ANE)	Glucocálix	¹ Ramos-Damian

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Origen de los reactivos

El suero fetal bovino (SFB), amortiguador para lisis de células eritrocíticas, NaCl, Tween-20, EGTA y iodoacetamida fueron obtenidos de SIGMA Chemical Co. (ST Louis, MO). EDTA y DTT fueron adquiridos de PROMEGA (Madison WI, USA). Tris, tiourea, agarosa, Coomassie R-250 se adquirieron en MP Biomedicals (Mountain Pkwy, OH, USA), azul de bromofenol y CHAPS fueron adquiridos de Research Organics (Cleveland OH, USA). Urea, anfolitos ZOOM, tiras IPG ZOOM, amortiguador MOPS, amortiguador LDS NuPAGE, agente reductor de muestra, geles Bis-Tris 4-12%, y amortiguador de transferencia fueron obtenidos de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Los kits 2-D Quant y 2-D Clean Up, inhibidores de proteasas, nitrato de plata, tiosulfato de sodio, carbonato de sodio, formaldehido 37% y anticuerpos IgG anti-ratón ECL marcados con peroxidasa fueron adquiridos de Amersham Biosciences (Piscataway, NJ, USA). Membranas PVDF Immobilon PSQ fueron adquiridas de Millipore, Bedford, MA, USA. El sustrato de quimioluminiscencia BM Chemiluminescence Blotting Substrate fue obtenido de Roche Applied Science. Agua ultrapura de grado molecular y medios RPMI 1640 y AIM-V fueron adquiridos de GIBCO (Invitrogen Corp). La resina AG 501-X8, marcadores de peso molecular de rango amplio y marcadores de peso molecular pre-teñidos kaleidoscope fueron adquiridos en Bio-Rad (Hercules, CA). El sistema ZOOM IPGRunner fue adquirido de Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). El

programa computacional PDQuest versión 7.2.1 y el densitómetro GS-800 son productos adquiridos en BioRad (BioRad Laboratories, Hercules CA). La fuente de poder Thermo 4000-V, minisistema vertical para geles EC120 y el módulo para transferencia, se adquirieron de Thermo Electron Corporation (Holbrook, NY). Los anticuerpos anti-fetuina fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology, Inc.

5.2. Material Biológico

5.2.1. Animales de experimentación

Se emplearon ratones hembras Balb/c (H-2^d) de 6 a 8 semanas de edad. Se mantuvieron en un ambiente libre de patógenos y de estrés a 24 °C, bajo un ciclo luz-oscuridad (fase lumínica, 06:00-18:00 horas), y se les proporcionó agua purificada y alimento (Purina, México) *ad libitum*.

5.2.2. Líneas celulares

Las líneas celulares L5178Y-R (linfoma murino DBA/2) y la sublínea celular L5178Y-S fueron adquiridas en American Type Culture Collection. (Rockville, MD). La línea LY-R se mantuvo *in vivo* por medio de transplantes cada 15 días en ratones Balb/c de 6 semanas de edad. La línea LY-S se mantuvo en frascos de cultivo con medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, L-glutamina 1%, y solución de penicilina-

estreptomycin al 5% (referido como medio RPMI 1640 completo) a 37 °C, en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ y aire.

5.3. Estrategia de trabajo

5.3.1. Subfraccionamiento celular de las líneas L5178Y-R y L5178Y-S

Con el objetivo de fraccionar las proteínas totales y enriquecer la fracción de proteínas de membrana, se empleó ultracentrifugación diferencial para preparar una fracción cruda de membranas y usarla como la fuente inicial de proteínas que habrían de solubilizarse (Deutscher y Murria, 1990).

Alícuotas de 1 mL de una suspensión con una densidad celular de aproximadamente 1×10^8 se prepararon en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL y se centrifugaron a 700 g por 5 min; los paquetes celulares resultantes se resuspendieron en amortiguador de homogenización (Tris 50 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 150 mM, DTT 5 mM, cóctel de inhibidores de proteasas 1:100) y se homogenizaron con 50 a 100 golpes de pistilo en un homogenizador Dounce. El rompimiento celular se monitoreó en microscopio óptico. El porcentaje de ruptura celular se estimó con hematocitómetro, comparando el número de células antes y después de la homogenización. Los núcleos y células sin romper del homogenado se removieron centrifugando la suspensión a 3000 g por 10 min; el sobrenadante se centrifugó a 20,000 g durante 20 min; posteriormente, el sobrenadante post-mitocondrial se centrifugó a 100,000 g por 60 min a 4°C, donde el sobrenadante contenía la fracción

citoplasmática y el precipitado la fracción membrana (Figura 6). Posteriormente, la fracción de membrana obtenida se resuspendió en 1 mL de amortiguador de extracción (urea 4 M, Tris 50 mM pH 7.6, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, NaCl 150 mM, cóctel de inhibidores de proteasas 1:100) y se incubaron a 4°C con agitación moderada; al término de esta, la suspensión se centrifugó a 16,000 g durante 15 min y los sobrenadantes, que contienen las proteínas periféricas de membrana, se recuperaron y se almacenaron a -70°C hasta su uso.

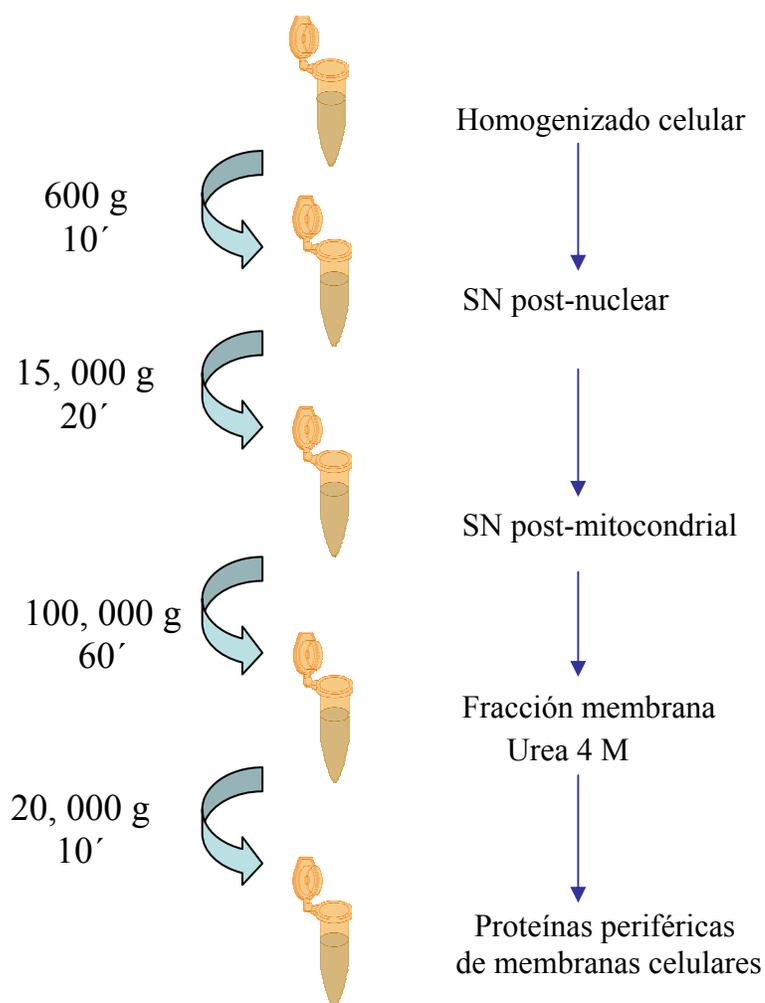


Figura 6. Ultra-centrifugación diferencial para la obtención de proteínas periféricas de membrana de las células LY-R y LY-S.

5.3.2. Obtención de proteínas del fluido ascítico LY-R y medios condicionados LY-R y LY-S

Para la obtención de líquido ascítico del linfoma L5178Y, se inocularon 5×10^6 células LY-R por ratón y se mantuvieron en observación durante 13 días, después de los cuales los animales fueron sacrificados para extraer el líquido ascítico de la cavidad peritoneal por aspiración con jeringa de 10 mL, 21 G. El líquido de ascitis se colectó en un tubo cónico estéril con tapón de rosca (50 mL) que contenía 10 mL de amortiguador de fosfatos (PBS) a pH 7.2, el cual se mantuvo en frío durante la colección del líquido peritoneal, y se centrifugó a 2000 rpm, 4°C durante 10 min. El sobrenadante libre de células se colectó en un tubo estéril nuevo, y se guardó a -20 °C hasta su uso.

Se colectaron por separado cultivos de células LY-R y LY-S; las células se centrifugaron y lavaron tres veces en medio RPMI y se sembraron en medio AIM-V libre de suero, se cultivaron durante 24 h y entonces se tomaron 5 mL de medio condicionado de cultivos LY-R y LY-S, y se liofilizaron y guardaron en refrigeración. Posteriormente, se resuspendieron en un volumen de agua desionizada estéril igual al 20% del volumen inicial (1 mL) y se tomaron pequeñas alícuotas para su cuantificación. El resto se guardó a -20 °C.

5.3.3. Inmunización de ratones con las líneas celulares L5178Y y L5178Y-S

Para el protocolo de inmunización, se emplearon procedimientos que causaran el menor estrés y malestar a los animales. Se seleccionó el uso de células completas como inmunógeno y su inoculación por vía intraperitoneal, ya que de acuerdo a nuestra experiencia, esta forma de inoculación no requiere una excesiva manipulación y resulta en menor estrés para los animales durante la inmunización. En este protocolo no se incluyó el uso de adyuvante, ya que su empleo en inmunizaciones vía intraperitoneal está asociado con estrés y malestar para los animales. Se emplearon ratones Balb/c hembra de 6 a 8 semanas de edad. El inmunógeno consistió en una suspensión de células LY-R y de LY-S, de las cuales se llevaron a cabo 3 inoculaciones por vía intraperitoneal por ratón; el vehículo empleado fue PBS. Se inmunizaron 3 grupos de 5 ratones cada uno: LY-R, LY-S y el control; en el caso de este último, sólo se inoculó el vehículo. En la Tabla V se presenta el esquema de inmunización.

Día	0	10	20	32
Inmunización	5×10^6 células/ratón			
Refuerzo (1)		2×10^6 células/ratón		
Refuerzo (2)			2×10^6 células/ratón	
Recolección de muestra				Sangrado

Tabla V. Esquema de inmunización para la obtención de sueros policlonales.

La obtención de las muestras se llevó a cabo por punción cardiaca terminal. Las muestras de sangre se colocaron en una incubadora a 37°C durante 30 min y se dejaron durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, el suero se transfirió de los tubos de colección a tubos de microcentrifuga de 1.5 mL y se almacenaron a -20°C hasta su empleo.

5.3.4. Análisis SDS-PAGE y *Western blotting* de proteínas de membrana LY-R y LY-S, de fluido ascítico y medios condicionados.

Se obtuvieron los patrones proteicos en una dimensión de las muestras a estudiar en geles de poliacrilamida al 10 y 18% y en gradiente 4-12%, bajo condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). Se cuantificó el contenido de proteína de la fracción membrana de cada tipo celular y fluido ascítico y medios condicionados LY-R y LY-S con el kit 2-D Quant, se prepararon alícuotas que contuvieran 100 µg de proteína en amortiguador muestra y se calentaron a 95°C por 5 min en termomixer (Eppendorf). Se cargaron 10 µL de cada muestra por carril y 10 µL de marcador de peso molecular de rango amplio diluido 1:20 (Bio-Rad), en geles duplicados y se corrieron en un sistema Tris-glicina-SDS. Una vez finalizado el corrimiento, un gel fue teñido con azul de Coomassie (Tabla VI) y el otro se transfirió a membrana PVDF en un módulo de transferencia con amortiguador Tris-Glicina-SDS pH 8.0 a 25 V durante dos horas.

Paso	Reactivo	Duración
Fijación	Metanol, ácido acético	25 min
Tinción	Solución de trabajo azul de Coomassie	20 min
Destinción rápida	Metanol, ácido acético	
Destinción lenta	Metanol, ácido acético	

Tabla VI. Protocolo para tinción con azul de Coomassie.

Las membranas se prepararon para llevar a cabo la hibridización, incubándolas con solución bloqueadora (leche descremada en polvo al 2% y Tween 20 al 0.1%, en PBS) durante 2 h, se lavaron y a continuación se incubaron con suero policlonal anti-LY-R, anti-LY-S, o con suero control normal de ratones Balb/c (dilución 1:20) durante la noche. Después de tres lavados con PBS-Tween, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, dilución 1:10,000 (Amersham Biosciences, UK) durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron en dos ocasiones con PBS-Tween, y en una ocasión con PBS y se incubaron brevemente con substrato de quimioluminiscencia y se expusieron con película radiográfica Kodak T-MAT G/RA de uno a cinco minutos. Los patrones revelados se compararon con los patrones teñidos con azul de Coomassie para determinar diferencias.

5.3.5. Obtención de geles bidimensionales de las líneas celulares L5178Y-R, L5178Y-S y fluido ascítico LY-R

5.3.5.1. Preparación de las muestras para 2D SDS-PAGE

El extracto soluble de proteínas asociadas a membrana, se cuantificó con el kit 2-D Quant. De acuerdo a los resultados, se tomaron alícuotas que contuvieran 60 μg de proteínas y se precipitaron y limpiaron de contaminantes, sales y ácidos nucleicos, con el kit 2-D Clean Up. Las proteínas precipitadas se solubilizaron en un volumen de 300 μL de amortiguador de rehidratación de muestras (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2%, anfolinas 1%, azul de bromofenol 0.002%, DTT 40 mM) para proceder con el SDS-PAGE bidimensional.

5.3.5.2. Primera dimensión: Isoelectroenfoque

Se emplearon tiras no lineares (NL) para isoelectroenfoque ZOOM IPG de 7 cm, con un gradiente de pH de 3-10; las tiras se rehidrataron en forma pasiva durante la noche, empleando los casetes del equipo IPG Runner de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. En forma breve, las muestras para el isoelectroenfoque se cargaron en carriles individuales en el casete y a continuación se introdujo una tira en cada carril con muestra, comenzando por el extremo ácido y cuidando de no formar burbujas. Cada muestra consistió en aproximadamente 30 μg de proteína en 140 μL de amortiguador de

rehidratación. Para los geles preparativos, se cargaron 60 μg de proteína en 140 μL de amortiguador de rehidratación.

Una vez finalizada la rehidratación, el casete se inserto en la unidad IPG Runner, y se agregaron 600 mL de agua desionizada a la cámara externa, la unidad IPG Runner (Figura 7b) se conectó a la fuente de poder Thermo 4000-V, a la cual se conectó además a un adaptador para microamperaje Thermo EC, esto permitió el funcionamiento de la fuente de poder en condiciones de corriente extremadamente baja. La corrida se efectuó de acuerdo a los parámetros previamente programados en la unidad (Cuadro 3), para 1200 volts/hora final. Al finalizar la corrida, se retiró el casete de la unidad IPG Runner y se procedió a equilibrar las muestras para la segunda dimensión.

Voltaje (V)	Alcanzado*	Duración (min)
200	200	20
450	449	15
750	750	15
2000	1151	45

* Indica el voltaje real alcanzado durante el isoelectroenfoco.

Tabla VII. Programa para isoelectroenfoco de muestras con un pH amplio (3-10) en la fuente de poder Thermo 400-V.

Una vez finalizado el isoelectroenfoco, se preparó amortiguador de muestras LDS diluyéndolo de 4x a 1x en agua desionizada, a continuación se le añadió 1 mL del agente reductor de muestra (10X) a cada 9 mL de amortiguador de muestra LDS, en un

tubo cónico. Se colocó la bandeja para equilibrar sobre el casete y se selló con fuerza; a esta bandeja, se le añadieron 5 mL del amortiguador LDS con agente reductor a través del orificio. Se incubó durante 15 min a temperatura ambiente con agitación constante, y entonces se decantó la solución reductora. Se preparó una solución alquilante de iodoacetamida 125 mM disolviendo 232 mg de iodoacetamida fresca en 10 mL del amortiguador de muestra LDS en un tubo cónico de 15 mL y se añadieron 5 mL de esta solución alquilante a través del orificio de la bandeja y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente, con agitación constante. Posteriormente, se decantó la solución alquilante y se removió la bandeja adherida al casete. Una vez hecho esto, se procedió a realizar un SDS-PAGE para la segunda dimensión, según se describe a continuación.

5.3.5.3. Segunda dimensión: Electroforesis SDS/PAGE

Para la separación en la segunda dimensión, se emplearon geles de poliacrilamida en gradiente 4-12% NuPAGE Novex Bis-Tris. Una vez que las tiras IPG se equilibraron, se cortaron los extremos plásticos a ras del gel, y la tira se deslizó con mucho cuidado, con la ayuda de una pequeña espátula en el pozo del gel y se alineó apropiadamente, para fijar bien la tira, se añadieron aproximadamente 400 μ L de agarosa 0.5% en el pozo, y se esperó a que solidificara. El casete se colocó en la cámara de electroforesis (Figura 7b) y se añadieron 600 mL de amortiguador de corrida NuPAGE 1x a la cámara externa y 100 mL a la cámara interna, se añadieron 0.5 mL de antioxidante NuPAGE a la cámara interna y se cargaron 10 μ L de marcadores de peso molecular (Biorad, Hercules CA) en el pozo correspondiente. Se colocó la tapa de la

cámara y se conectaron los cables del electrodo a la fuente de poder. Se corrió el gel SDS-PAGE a 200 V por 40-50 min. Al finalizar la corrida, los geles analíticos se fijaron y tiñeron con plata, y los preparativos con azul de Coomassie.

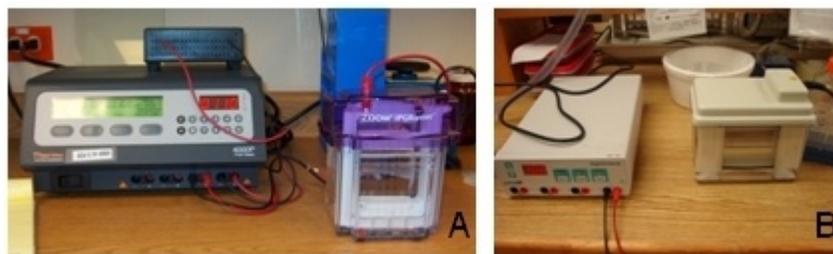


Figura 7. Equipo para electroforesis bidimensional usado en este trabajo (A) isoelectroenfoque de proteínas (B) electroforesis en gel de poliacrilamida.

5.3.5.4. Tinción de los geles bidimensionales analíticos con nitrato de plata.

Se colocó el gel de poliacrilamida en una bandeja con solución de fijación (metanol 50%/ácido acético 5%) y se incubó durante 20 min en agitación constante. Se retiró el gel de la solución de fijación y se colocó en un recipiente con agua destilada. Se realizó un lavado del gel con metanol durante 10 min, y posteriormente se lavó con agua desionizada durante 2 h. Se colocó el gel en la solución de sensibilización (tiosulfato de sodio pentahidratado 0.02%) durante 1 min, al término del cual se lavó con agua desionizada durante 1 min, se repitió el lavado en una ocasión. Se colocó el gel en la solución de tinción (nitrato de plata 0.1%) durante 20 min a 4 °C, al término del cual se cambió la bandeja para lavar gel con agua desionizada durante 1 min. Se agregó solución de revelado en una bandeja (Na_2CO_3 2%, formaldehído 0.04%) en la cual se

colocó el gel de 3 a 5 min, se mantuvo en agitación constante hasta la aparición de las bandas y cuando estas alcanzaron la intensidad deseada, se agregó solución de detención (ácido acético 5%) a una temperatura de 4 - 8°C y se dejó en agitación hasta que dejaron de aparecer burbujas (Shevshenko, 1996). Una vez teñido el gel, se secó para su digitalización y almacenamiento.

5.3.6. Análisis de imagen mediante el software PDQuest

5.3.6.1. Procesamiento de imagen

Para su digitalización, los geles se escanearon con un densitómetro de imagen GS800 (BioRad, Hercules CA), con una resolución de 300 dpi (píxeles por pulgada) y profundidad de 8 bits y se almacenaron en formato TIFF (Tagged Image File Format). Las imágenes se procesaron y analizaron con el programa PDQuest versión 7.2.1 (BioRad, Hercules, CA, USA). Se crearon imágenes consenso de los geles, comparando y ajustando manualmente las manchas de cuatro geles distintos (n=4) por cada línea celular, tomando las manchas comunes a todos ellos.

5.3.6.2. Determinación de punto isoelectrico y tamaño molecular de las manchas en los geles bidimensionales

Para calcular el punto isoelectrico y peso molecular de las proteínas resueltas en los geles bidimensionales de membrana de las células LY-R y LY-S se emplearon los estándares 2D SDS-PAGE de Bio-Rad. Se obtuvieron geles bidimensionales (n=2) de

una mezcla de estándares que incluyó conalbumina blanca de huevo de gallina, albúmina sérica bovina, actina de músculo bovino, GAPDH de músculo de conejo, anhidrasa carbónica bovina, inhibidor de tripsina de soya y mioglobina equina, y que cubre un rango de punto isoelectrico de 4.5 a 8.5, y un rango de tamaño molecular de 17.5 a 76 kD. Los geles se tiñeron con plata y se digitalizaron, las imágenes se procesaron en PDQuest y se asignaron los valores de punto isoelectrico y peso molecular a cada una de las manchas conocidas, para crear así un entramado con información que se transfirió a otros miembros (geles LY-R y LY-S), lo que permitió correlacionar los datos de los estándares y así calcular los PI y Mw en los geles experimentales LY-R y LY-S (Figura 8).

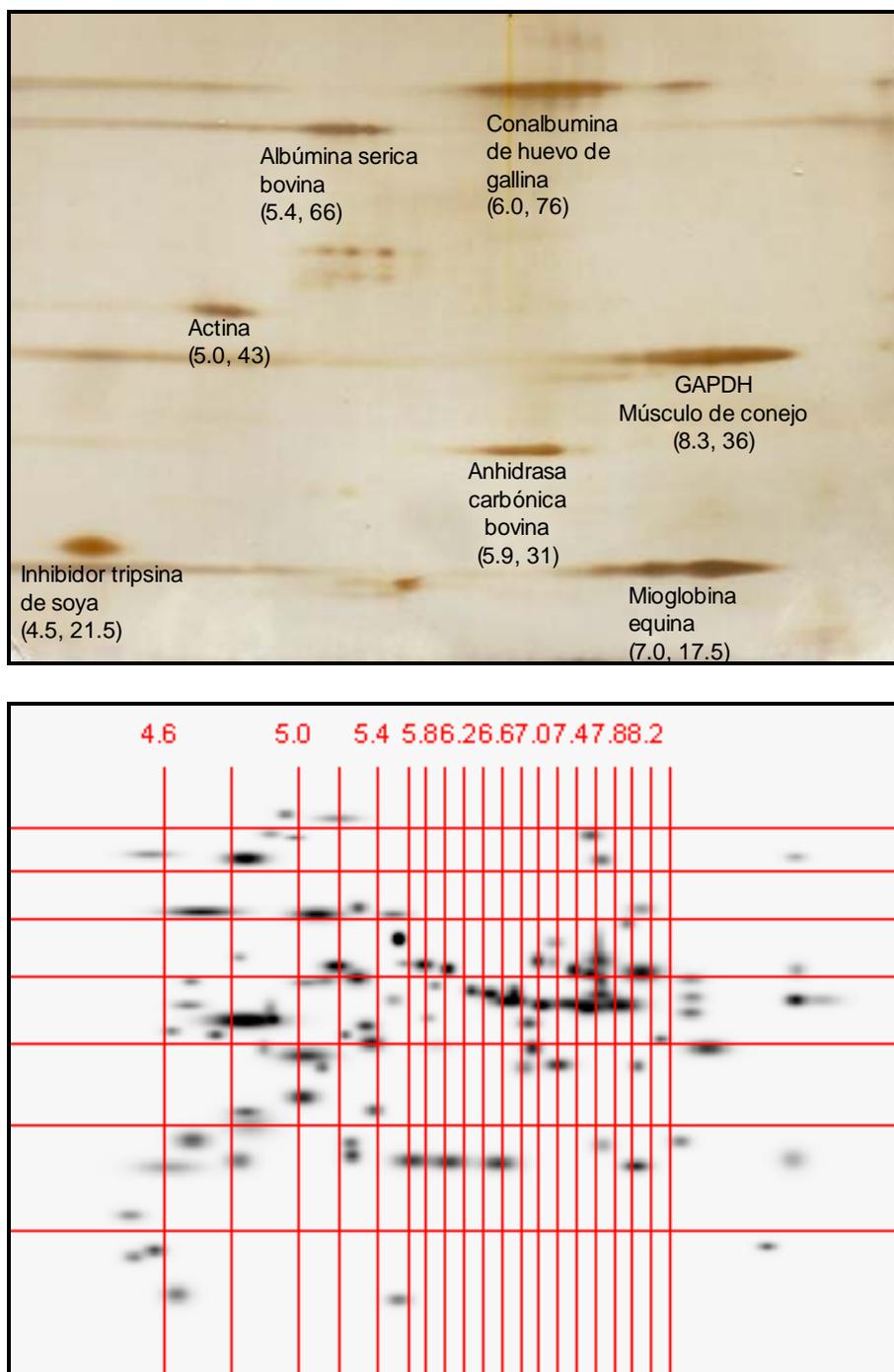


Figura 8. Determinación de punto isoelectrico y peso molecular en geles bidimensionales. Panel superior, gel bidimensional representativo de los estándares 2D; panel inferior: entramado con los valores de pI y Mw para el cálculo de datos entre geles.

5.3.7. Inmunodetección de proteínas antigénicas mediante 2D Western Blot

5.3.7.1. Electrotransferencia de geles bidimensionales a membranas PVDF.

Con mucho cuidado se desensambló el casete para retirar el gel, el cual se sumergió en un recipiente con amortiguador de transferencia NuPAGE 1X. En otro recipiente con el mismo tipo de amortiguador se colocaron esponjas, papel filtro y en un recipiente por separado, también con amortiguador, se equilibró la membrana PVDF P^{SQ}, el sándwich se preparó dentro de un recipiente con amortiguador de transferencia NuPAGE 1X. Cada electrotransferencia se efectuó a 15 V constantes durante una hora y 30 minutos a temperatura ambiente. Una vez concluida la transferencia, se sacó el módulo para separar el gel de la membrana PVDF P^{SQ}. La membrana se dejó secar durante una noche a temperatura ambiente, antes de efectuar ensayos de inmunodetección.

5.3.7.2. Inmunodetección de proteínas antigénicas de las células LY-R y LY-S y fluido ascítico LY-R.

Para la detección de inmunidad humoral contra las células tumorales LY-R y LY-S, se transfirieron las proteínas obtenidas en los geles bidimensionales a membranas PVDF Immobilon-P^{SQ}. Para la hibridización, las membranas se prepararon incubándolas con solución bloqueadora (leche descremada en polvo al 2% y Tween 20 al 0.1%, en PBS) durante 2 h, se lavaron y a continuación se incubaron con suero policlonal anti-LY-R

(1:20), suero policlonal anti-LY-S (1:20) o con suero control normal de ratones Balb/c (dilución 1:20) durante toda la noche, en agitación a 4 °C. Después de 3 lavados con solución bloqueadora, las membranas se incubaron con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, dilución 1:5000, durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se lavaron en tres ocasiones con PBS-Tween, y en una ocasión con PBS y se incubaron durante un minuto con sustrato de quimioluminiscencia y se expusieron con película radiográfica Kodak T-MAT G/RA de 1 a 5 min. Los patrones revelados, tanto del problema como el control, se compararon directamente con los respectivos patrones de los geles bidimensionales teñidos con plata, para así determinar diferencias en la respuesta humoral a las proteínas presentes en las membranas.

5.3.8. Identificación de las proteínas de interés por espectrometría de masas

Para la identificación de la proteína candidato, se aprovecho su presencia en el fluido ascítico donde su abundancia relativa es mayor que en la fracción celular LY-R, se obtuvieron dos geles bidimensionales preparativos de 60 µg de proteína de fluido ascítico LY-R, se tiñeron con azul de Coomassie y se extrajo la mancha de interés con extremo cuidado de no contaminar la muestra con queratinas. La muestra se colocó en un tubo de 1.5 mL nuevo, no autoclaveado y se envió a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su identificación, primero por huella de masa peptídica y posteriormente por LC-MS/MS. Brevemente, las muestras extraídas de gel se redujeron con DDT 50 mM, alquilaron con iodoacetamida y se digirieron con

tripsina, los péptidos resultantes se desalaron usando puntillas ZipTip (Millipore Corp) y se concentraron en un Speed-Vac SPD 1010 de Thermoelectron (San José, CA). La muestra se analizó con un espectrómetro de masas con trampa de iones Finnigan LCQ, y los espectros MS/MS se analizaron con el programa Sequest de Finnigan

5.3.9. Detección de fetuina en las fracciones LY-R, L-YS y ascitis LY-R

Para confirmar la identificación de fetuina-A en la membrana de células LY-R y en ascitis, adquirimos anticuerpos policlonales IgG de cabra dirigidos contra un epítipo localizado en el extremo carboxilo de fetuina-A murina; adicionalmente, probamos las proteínas de membrana LY-S. Se corrieron 10 µg por carril de proteínas de membrana LY-R y LYS y proteínas de ascitis LY-R en geles de poliacrilamida al 10 % y se transfirieron a membranas de PVDF como ya fue descrito, y las membranas se probaron con anti-fetuina como anticuerpo primario a una dilución 1:500, de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

5.3.10. Purificación de la proteína seleccionada

5.3.10.1. Obtención de fluido ascítico

Según se describió previamente, el mantenimiento del linfoma LY-R requiere del transplante de células tumorales de ratón a ratón aproximadamente cada 15 días. Al

efectuar estos trasplantes se recuperaba el fluido ascítico y se almacenaba en tubos cónicos estériles de 50 ml a -70° hasta su empleo.

5.3.10.2. Preparación de la muestra para cromatografía

Se descongelaron alícuotas de líquido ascítico y se centrifugaron a 6000 rpm durante 10 min para clarificar las muestras, después se prepararon alícuotas de 12.5 mL del líquido ascítico LY-R y se liofilizaron y posteriormente guardaron en refrigeración a 4°C hasta su uso. Posteriormente, las alícuotas se resuspendieron en un volumen de Tris-HCl 20 mM pH 8.0 igual al 20% del volumen inicial (2.5 mL) y se tomaron pequeñas alícuotas para su cuantificación y el resto se guardó en congelación a -20°C .

5.3.10.3. Cromatografía de intercambio aniónico

Alícuotas de fluido ascítico de dos mg resuspendidas en amortiguador Tris-HCl 20 mM, pH 8.0 se aplicaron a una columna c10/10 con 10 cm de cama de resina CaptoQ, equilibrada con Tris-HCl 20 mM, pH 8.0. La elución de la columna se realizó con un flujo de 0.5 mL/min, se aplicó un gradiente salino con NaCl 1M y se colectaron fracciones de 4 y 2 mL en un equipo automatizado, la detección de la proteína se realizó a 280 nm con una sensibilidad de una unidad óptica. Se determinó la fracción del eluyente que contenía el antígeno mediante SDS- PAGE y análisis *Western blot* con anticuerpos anti-LY-R y anti-fetuína. Las fracciones en las que se detectó el antígeno se cuantificaron y se prepararon alícuotas para su liofilización y almacenamiento a -80°C .

5.3.10.4. Análisis SDS-PAGE y *Western blotting* de las fracciones cromatográficas.

Se obtuvieron los patrones proteicos de cada una de las fracciones obtenidas por cromatografía de intercambio aniónico en geles de poliacrilamida al 10% bajo condiciones desnaturalizantes (Laemmli, 1970). De cada fracción colectada, se tomaron 250 μL y se precipitaron con acetona -20°C durante la noche; Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 12,000 g y 4°C y el precipitado se resuspendió en 100 μL de amortiguador de muestra y se calentó a 95°C por 5 min en un termomixer. Se cargaron 10 μL de cada muestra por carril y 10 μL de marcador de peso molecular de rango amplio diluido 1:20 para el gel que fue teñido, y 3 μL de marcador preteñido. Se corrieron geles por duplicado en un sistema Tris-glicina-SDS. Una vez finalizado el corrimiento, un gel fue teñido con azul de Coomassie y el otro se transfirió a membrana PVDF y se llevó a cabo *Western blot* como ya se describió previamente. Las membranas se probaron con suero policlonal anti-LYR (1:20) o anti-fetuina (1:500) como anticuerpo primario y anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa, dilución 1:5000. Las membranas se revelaron mediante quimio-luminiscencia. Los patrones revelados se compararon con los patrones teñidos con azul de Coomassie para determinar la fracción cromatográfica donde eluyó el antígeno.

6. RESULTADOS

Para evaluar la expresión diferencial de los antígenos expresados por las células LY-R y LY-S, se separaron las proteínas de membrana de LY-R y LY-S, así como las proteínas de ascitis LY-R y los medios condicionados de cultivos de ambos tipos celulares en geles de acrilamida en una y dos dimensiones. Después de un análisis preliminar con SDS-PAGE y *Western Blot*, se descartó el análisis en dos dimensiones de los medios condicionados. Se obtuvieron geles bidimensionales de las proteínas de membrana de células LY-R y LY-S, así como de fluido ascítico LY-R. Algunos geles se tiñeron para obtener los mapas de referencia de cada línea celular, otros geles de transfirieron para llevar a cabo análisis *Western blot*. Los inmunoproteomas de membrana de cada línea celular se compararon con los mapas de referencia de proteínas de membrana LY-R y LY-S y ascitis LY-R para localizar las proteínas reactivas que se identificarían por espectrometría de masas. Una vez identificado un antígeno candidato, se eligió cromatografía de intercambio aniónico para purificarlo como parte de su caracterización.

6.1. Análisis de las proteínas de la fracción membranal de las células LY-R y LY-S.

El primer paso en este proyecto fue estandarizar una metodología reproducible para la obtención de proteínas de membrana para los geles bidimensionales. Decidimos emplear ultracentrifugación para enriquecer la fracción de membranas de las células LY-R y LY-S y extraer las proteínas de membrana con una solución amortiguada de urea 4

M, los patrones proteicos de cada una de las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE (Figura 9). Encontramos que el método de extracción cumplió nuestras expectativas en cuanto a la conveniencia de la fracción membrana como material para electroforesis bidimensional. Una ventaja adicional es que nos permitió obtener un mejor rendimiento que otros métodos probados, en general por cada 1×10^8 células procesadas recuperamos de 600 a 800 μg de proteínas en un volumen aproximado de 250 μL .

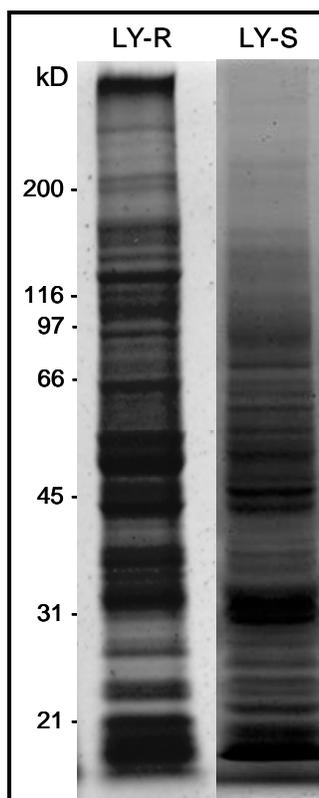


Figura 9. SDS-PAGE de las proteínas de la fracción membrana de las células LY-R y LY-S.

6.2. Inmunodetección en una dimensión de proteínas antigénicas de membrana LY-R y LY-S

Se llevó a cabo un análisis preliminar de las proteínas de las células LY-R y LY-S en una dimensión, esto fue útil no sólo para estandarizar las condiciones de trabajo para los ensayos de inmunodetección, también nos permitió observar la reactividad contra los sueros policlonales. Probamos los sueros no sólo contra su correspondiente fracción membranal, también los analizamos en forma cruzada y pudimos observar que el suero policlonal anti-LY-R reconoce una banda ubicada debajo de los 66 kD, tanto en la fracción LY-R, como en la fracción LY-S. Esta banda no fue reconocida por el suero policlonal anti-LY-S o el suero control de ratones sanos (Figura 10).

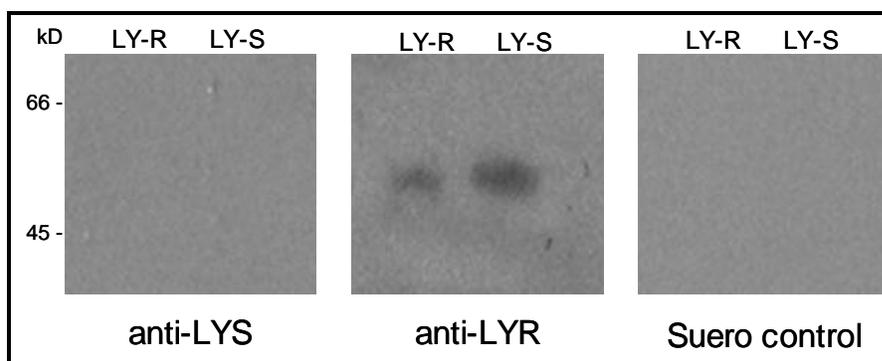


Figura 10. Análisis *Western blot* de proteínas de membrana de las células LY-R y LY-S. En la parte superior se indican los carriles de proteínas y en la parte inferior se indica el suero contra el cual fueron probadas.

6.3. Análisis de las proteínas de fluido ascítico LY-R y medios condicionados de células LY-R y LY-S.

Para la detección de antígenos secretados obtuvimos los patrones electroforéticos de las proteínas de fluido ascítico LY-R y medios condicionados de cultivos LY-R y LYS (Figura 11). Los geles fueron transferidos a membranas PVDF y empleamos los sueros policlonales anti-LY-R y anti-LY-S en ensayos de inmunodetección. No se observaron bandas reactivas en los medios condicionados, sin embargo, entre las proteínas del fluido ascítico se observó una banda reactiva por debajo de los 66 kD, esta observación fue reproducible a través de los ensayos (Figura 12). Esta banda coincide por su migración con la banda reactiva observada entre las proteínas de membrana de células LY-R. En conjunto, estas observaciones se consideraron evidencia de la presencia de un antígeno en la membrana de las células LY-R el cual probablemente era secretado al medio extracelular, en este caso, el fluido ascítico.

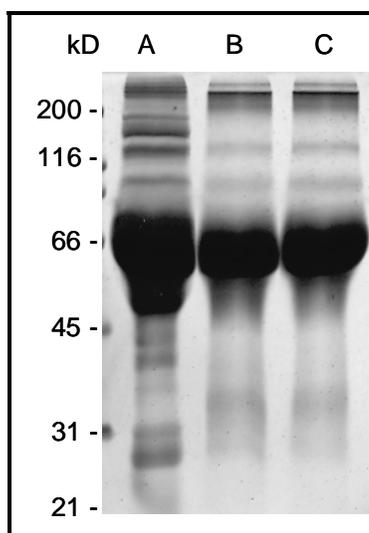


Figura 11. SDS-PAGE de (a) fluido ascítico LY-R, (b) medio condicionado de cultivos de células LY-R, (c) medios condicionados de cultivos de células LY-S.

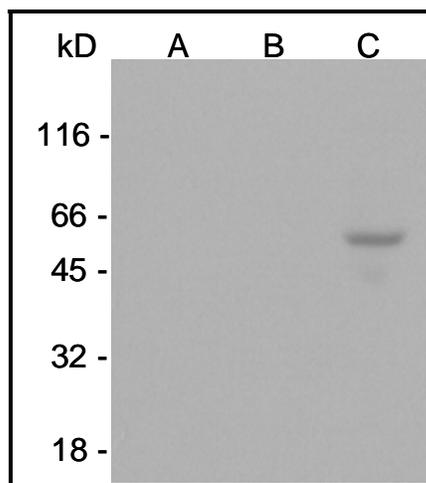


Figura 12. Análisis *Western blot* de: (a) medio condicionado de cultivos de células LY-R, (b) y células LY-S, (c) fluido ascítico LY-R.

6.4. Obtención de los mapas proteómicos de membrana de las líneas LY-R, LY-S y fluido ascítico LY-R.

Para obtener los mapas de referencia de las proteínas membranales LY-R y LY-S, llevamos a cabo un análisis de imagen computacional de los geles bidimensionales de ambas líneas y se crearon imágenes consenso con el programa PDQuest (Figura 13). Se examinaron las manchas proteicas detectadas en cuatro geles por cada línea celular ($n=4$) y se ajustaron las manchas coincidentes entre el grupo de geles en forma manual, para así construir una imagen con todas las manchas comunes (Figura 14). Posteriormente, se repitió el proceso de análisis y ajuste manual de manchas entre los geles *master* de cada línea celular. Empleando los mismos parámetros de detección, se encontraron 94 manchas en los geles LY-R y 64 manchas en los geles LY-S; de estas

manchas, 50 se encontraron únicamente en LY-R en comparación con los geles LY-S, mientras que 25 manchas fueron específicas para geles LY-S, en comparación con los geles LY-R. Para el análisis de los geles bidimensionales de fluido ascítico LY-R (n=2) se establecieron parámetros específicos para la detección de manchas y según lo esperado, los patrones proteicos fueron menos complejos que los de proteínas de membrana, con un total de 31 manchas proteicas detectadas (Figura 15). Durante la detección de manchas en forma automática, se asignaron números a cada mancha, denominados SSPs (acrónimo del inglés *standard spot numbers*), esto con el fin de identificación numérica. En la tabla VIII se describe la distribución por punto isoeléctrico y tamaño molecular de las manchas determinadas como específicas para cada línea celular. Como puede observarse en la figura 13, la mayoría de las manchas se encuentran en la zona de punto isoeléctrico de 4.5 a 6.4 y en la región comprendida entre los 20 y 60 kD.

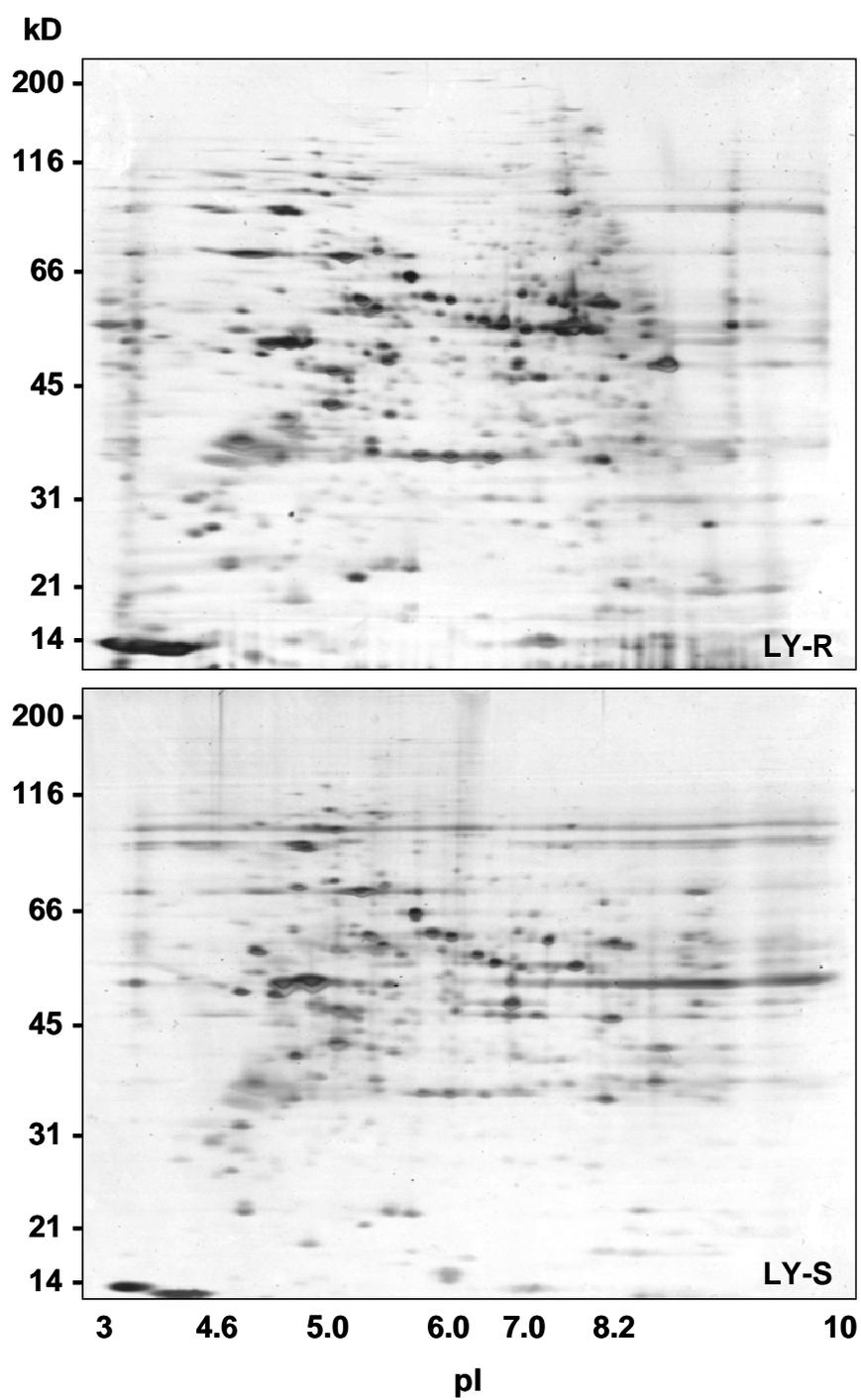


Figura 13. Geles bidimensionales representativos de las proteínas de membrana de líneas LY-R y LY-S teñidos con nitrato de plata.

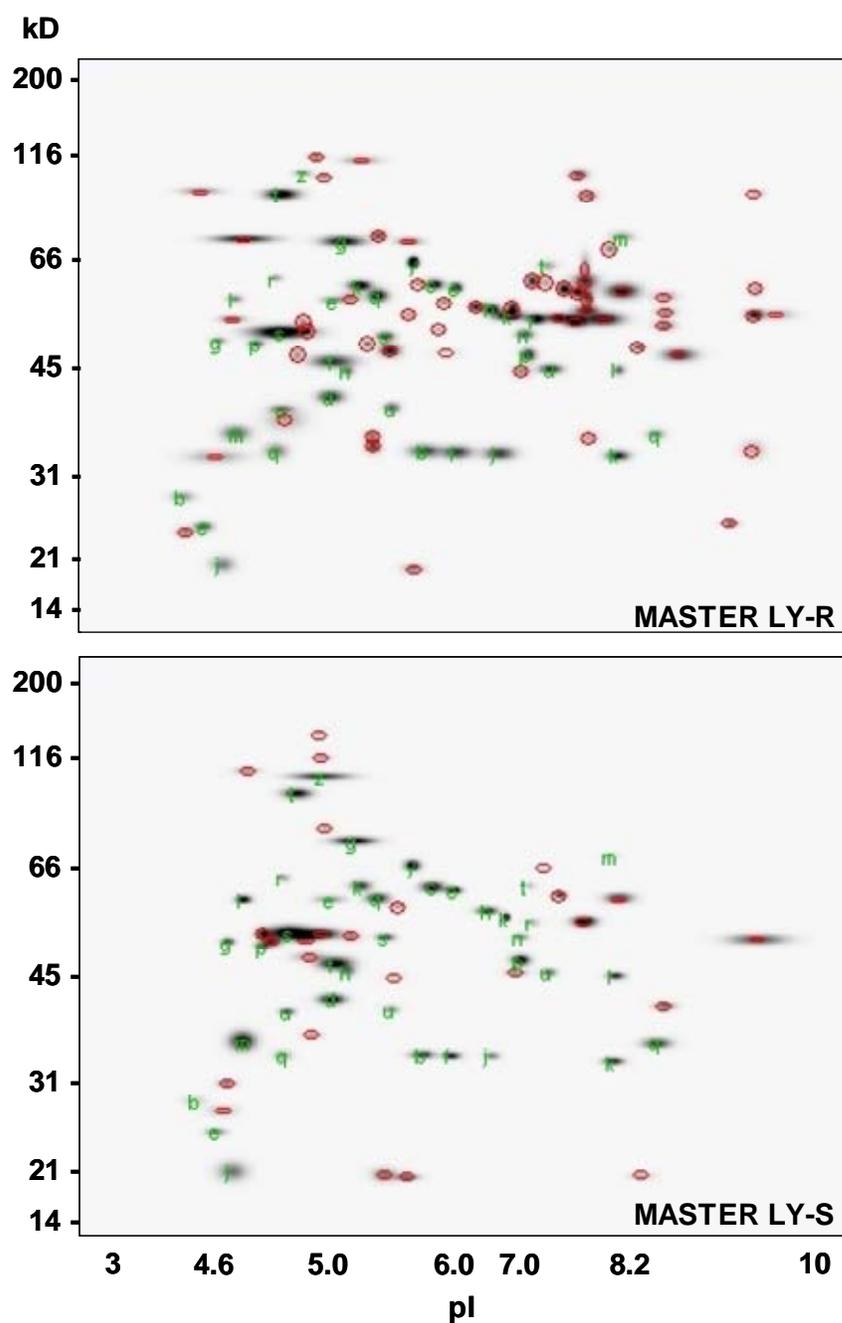


Figura 14. Mapas proteómicos de membrana de las líneas LY-R y LY-S, las manchas específicas de cada línea celular se encuentran encerradas en círculos, mientras que las manchas coincidentes en ambos tipos celulares se encuentran acompañadas de una letra que las identifica.

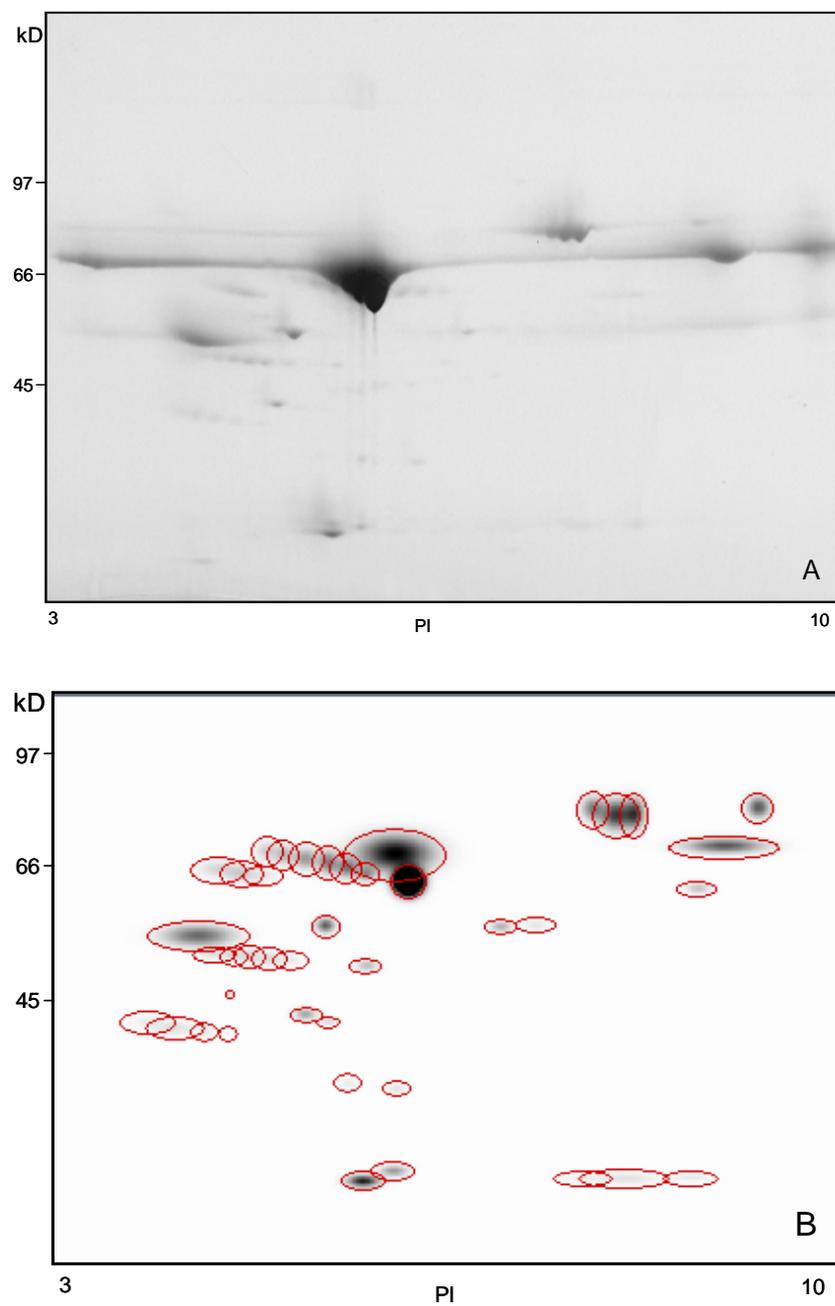


Figura 15. Análisis de imagen de las proteínas de fluido ascítico LY-R: (A) gel bidimensional representativo teñido con azul de Coomassie, (B) gel *master*, las manchas detectadas están encerradas en elipses.

Tabla VIII

Distribución de manchas proteicas específicas para cada línea celular, de acuerdo a su punto isoeléctrico y tamaño molecular.

kD	LY-R	LY-S	LY-R	LY-S	LY-R	LY-S	LY-R	LY-S
PI	4.5-5.4		5.5-6.4		6.5-7.4		7.5-8.5	
90-99	2	1	-	-	-	-	-	-
80-89	1	1	2	-	-	-	2	-
70-79	2	-	1	-	-	-	-	-
60-69	-	-	1	-	3	-	5	-
50-59	4	5	4	1	2	-	5	-
40-49	2	3	1	-	1	-	-	-
30-39	3	3	-	-	-	-	1	-
20-29	1	1	1	-	-	-	-	1

6.5. Análisis *Western blotting* bidimensional de las proteínas de membrana LY-R y LY-S.

Se llevó a cabo el análisis de detección de manchas en *blots* LY-R. Hasta un total de 25 manchas fueron reconocidas en las membranas LY-R por suero policlonal anti-LYR, pero no por suero anti-LY-S o suero control de ratones sanos (Figura 16); 4 manchas se consideraron inespecíficas y se descartaron, dado que se encontraron también en membranas probadas con suero normal (Figura 16B). De las manchas detectadas, dos en particular se consideraron inmunodominantes, dado que se detectaron en forma repetida a través de los ensayos y fueron también detectadas en 3 experimentos preliminares con suero de ratones portadores del linfoma LY-R (datos no mostrados). Estas manchas se localizaron alrededor de los 55 kDa con un punto isoeléctrico en el rango de 4.8-5.2 (Figura 16A). En contraste, no se observaron manchas reactivas en las membranas LY-S probadas con suero policlonal anti-LY-S (Figura 16C). Las membranas LY-S probadas con suero control normal revelaron una mancha reactiva que coincide con una de las manchas observadas en las membranas LY-R probadas con suero normal sano (Figura 16D). Las membranas que fueron negativas en los ensayos *Western blot* fueron probadas con β -actina para excluir fallas durante la transferencia y detección (datos no mostrados). También se evaluó la reactividad de suero anti-LY-R contra las proteínas de membrana LY-S y suero anti-LY-S contra proteínas de membrana LY-R. Se encontró que el suero anti-LY-R reconoce la misma mancha de interés (fetuina) entre las proteínas LY-S, como fue observado con las proteínas LY-R,

mientras que el suero anti-LYS no reconoció manchas en las membranas LY-R (datos no mostrados). Esto confirmó las observaciones hechas en los ensayos *Western blot* en una dimensión.

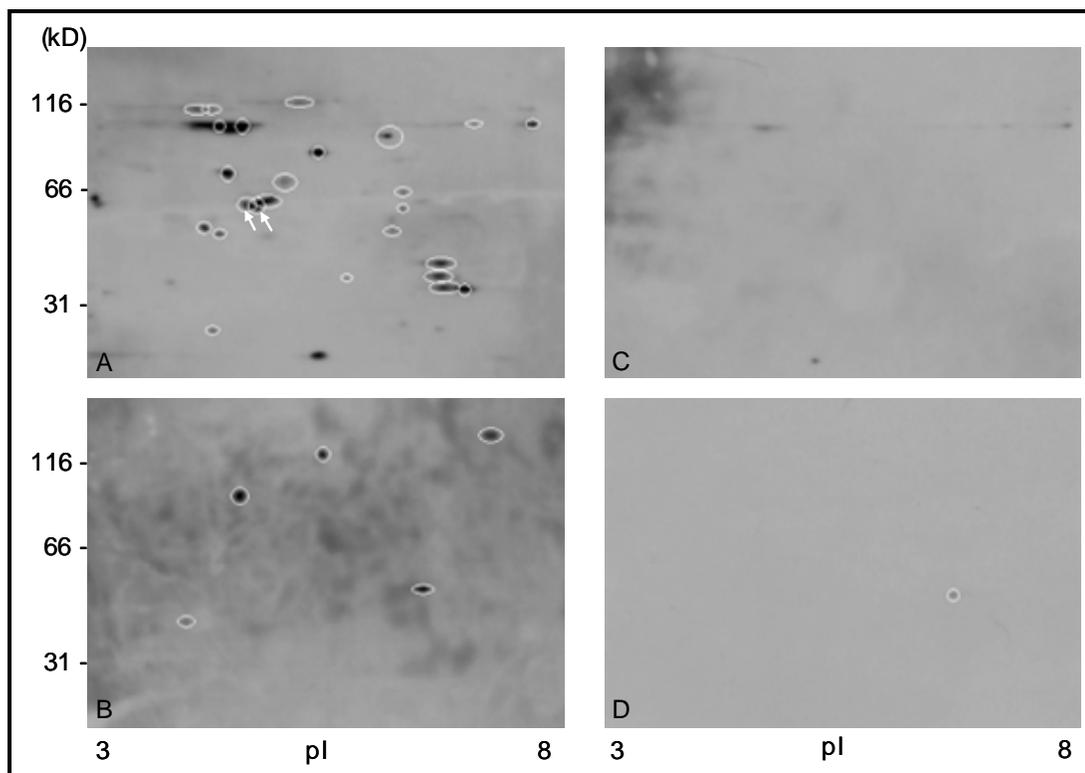


Figura 16. Análisis *Western blot* bidimensional de la expresión de antígenos de membrana en las células LY-R y LY-S. (A) proteínas de membrana LY-R + suero policlonal anti-LY-R, (B) proteínas de membrana LY-R + suero control, (C) proteínas de membrana LY-S + suero policlonal anti-LY-S, D) proteínas de membrana LY-S + suero control. Los *blots* fueron escaneados y procesados con el programa PDQuest para recortar área, filtrar imagen y detección de manchas. Las manchas reactivas se muestran encerradas en elipses blancas, las flechas blancas apuntan a un par de manchas dominantes que corresponden al antígeno identificado.

6.6. Análisis *Western blot* de fluido ascítico de ratones portadores del tumor LY-R.

Se analizaron las proteínas presentes en el fluido ascítico de los ratones portadores de tumor LY-R y se observó un grupo de cinco manchas que reaccionaron específicamente contra el suero LY-R y no con suero de ratón sano. Este grupo de manchas mostraron un patrón conocido como *train spots* que puede ser producido por isoformas de una proteína (Figura 17), los números SSP para estas manchas fueron 1301, 1302, 1303, 2301, 2302, obtenidas en geles bidimensionales de ascitis LY-R (Figura 18).

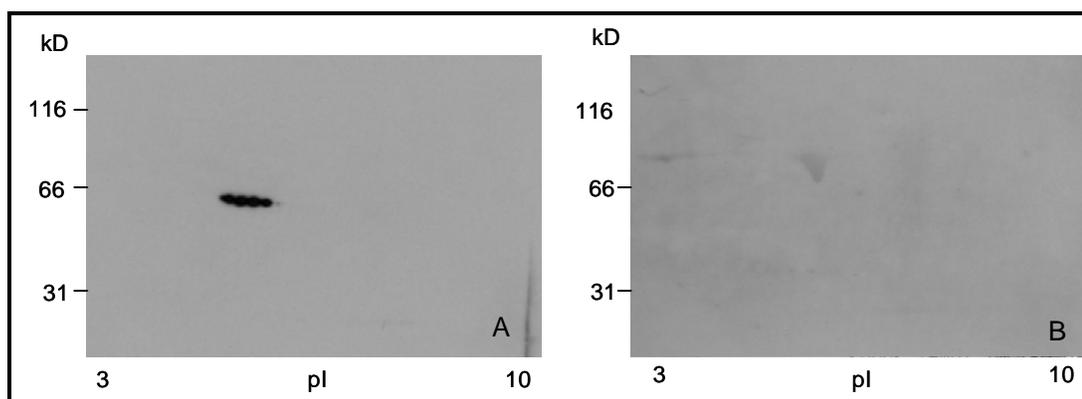


Figura 17. Análisis *Western blot* bidimensional de la expresión de antígenos de membrana en el fluido ascítico LY-R. (A) proteínas de fluido ascítico LY-R + suero policlonal anti-LYR, (B) proteínas de fluido ascítico LY-R + suero control.

6.7. Comparación de los inmunoproteomas de membrana de las células LY-R, LY-S y ascitis LY-R.

Comparamos los inmunoproteomas obtenidos de membrana y ascitis LY-R probados con suero anti-LY-R; para lograrlo, se superimpusieron manualmente los *blots* de membrana y fluido ascítico, guiándose por la posición de los marcadores moleculares (Figura 18). Se observó que las manchas reactivas 1301 y 1302 de los *blots* de ascitis LY-R coincidían con la posición de dos manchas reactivas en los *blots* de membrana LY-R, lo que sugiere que la proteína reconocida por los auto-anticuerpos LY-R está presente en membrana de células LY-R y en ascitis de ratones portadores del linfoma LY-R. Seleccionamos las manchas reactivas encontradas en ascitis LY-R, dado que estas permitían una muestra adecuada para su identificación.

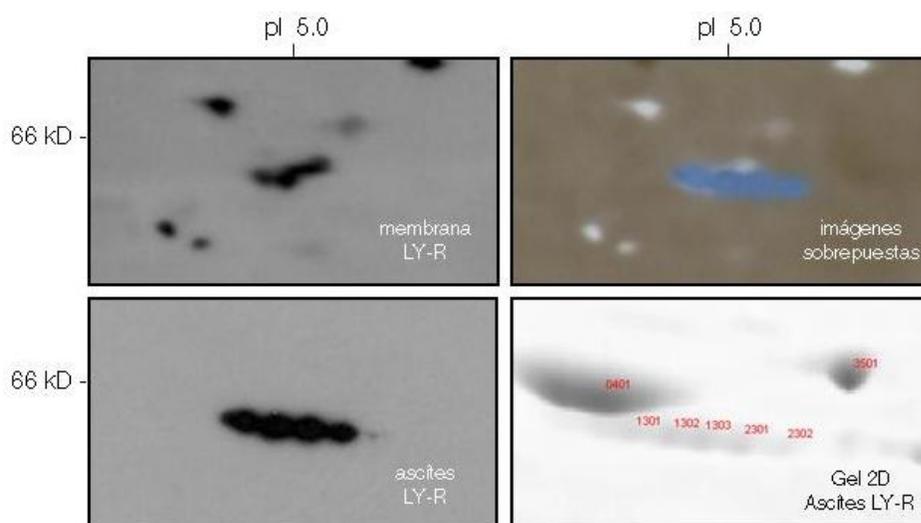


Figura 18. De acuerdo a la comparación de *blots* y geles bidimensionales se determino la presencia del antígeno de interés tanto en membrana como fluido ascítico LY-R.

6.8. Identificación de la proteína candidato por espectrometría de masas.

Para su identificación se extrajo la mancha de interés de un gel bidimensional preparativo y se envió a la Unidad de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM para su identificación mediante análisis por huella de masa peptídica y, al fallar esta, posteriormente por LC-MS/MS.

6.8.1. Análisis del antígeno candidato mediante huella de masa peptídica

La muestra fue digerida y los péptidos trípticos fueron analizados mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Figura 19). La lista de masas moleculares obtenidas fue sometida a una búsqueda en los bancos de datos públicos, utilizando el programa Maldi-Ettan y Prospector. Los resultados de dicha búsqueda arrojaron cinco candidatos potenciales (Tabla IX). Sin embargo, el número de péptidos detectados fue muy pequeño, siete con buena resolución y exactitud, y no se pudo obtener la identificación inequívoca del antígeno, por lo que se decidió analizar la muestra mediante espectrometría LC-MS/MS.

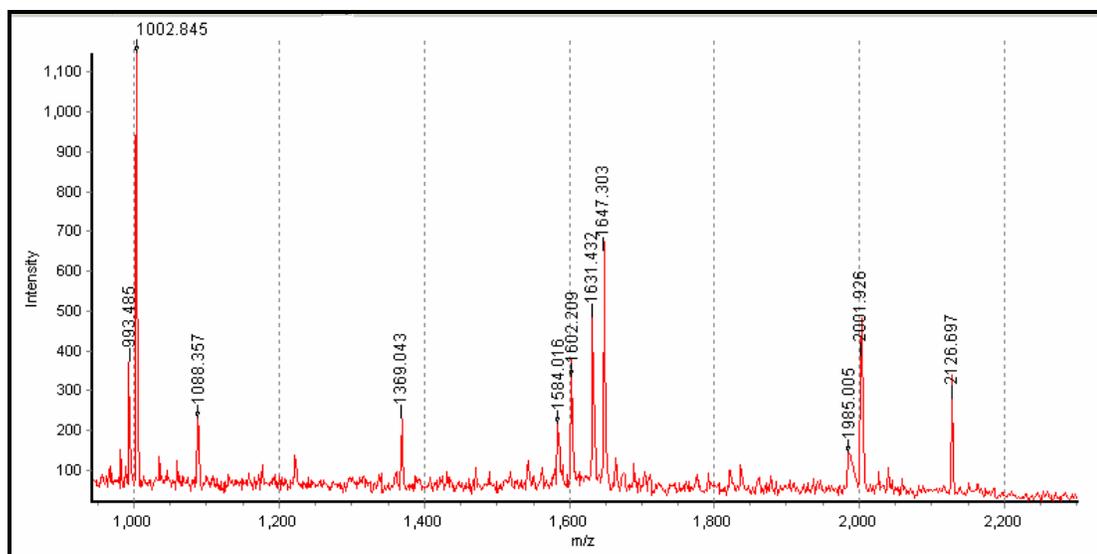


Figura 19. Espectro de masas original de la mezcla de péptidos trípticos determinados por el espectrómetro MALDI-TOF.

Tabla IX.

Candidatos arrojados por el análisis MALDI-TOF

- 1 Nombre: Homologo C17orf49 Proteína de unión a ADN de potencial no caracterizado
MW: 17997 Da pI: 6.7
- 2 Nombre: precursor de la subunidad gamma del receptor de acetilcolina
MW: 58746 Da pI: 6.5
- 3 Nombre: Proteína Intraflagelar de transporte 81
MW: 79286 Da pI: 8.9
- 4 Nombre: Factor gama de maduración glial (GMF-gamma)
MW: 16748 Da pI: 5.6
- 5 Nombre: Proteína Arginina deiminasa tipo-4 (EC 3.5.3.15)
MW: 74449 Da pI: 7.2

6.8.2. Análisis del antígeno candidato mediante LC-MS/MS

La muestra fue identificada como alfa-2-HS-glicoproteína de *Mus musculus*. Se verificaron manualmente 53 aminoácidos para verificación de la identidad (Figura 20).

```

      10           20           30           40           50           60
MKS LV L L L L C F  AQLWGCQSAP  QGTGLGFREL  ACDDPEAEQV  ALLAVDYLNÑ  HLLQGFKQVL

      70           80           90           100          110          120
NQIDKVKVWS  RRPFGVVYEM  EVDTLETTCH  ALDPTPLANC  SVRQLTEHAV  EGDCDFHILK

      130          140          150          160          170          180
QDGQFRVMHT  QCHSTPDSAĒ  DVRKLCPRCP  LLTPFNNTNV  VHTVNTALAA  FNTQNNNGTYF

      190          200          210          220          230          240
KLVEISRAQN  VPLPVSTLVE  FVIAATDCTA  KEVTDPAKCN  LLAEKQHGFĈ  KANLMHNLGG

      250          260          270          280          290          300
EEVSVACKLF  QTQPQPANAN  AVGPVPTANA  ALPADPPASV  VVGPVVVPRĠ  LSDHRTYHDL

      310          320          330          340
RHAFSPVASV  ESASGETLHS  PKVGQPGAAG  PVSPMCPGRĪ  RHFKI

```

Figura 20. Secuencia de la alfa-2-HS-glicoproteína [*Mus musculus*]. Los aminoácidos subrayados (53) fueron secuenciados manualmente.

6.9. Detección de fetuina-A mediante *Western blotting*

Se encontró que la fetuina-A se expresaba en muestras de membrana LY-R y LY-S, así como también en las proteínas de ascitis de ratones portadores del tumor LY-R (Figura 21).

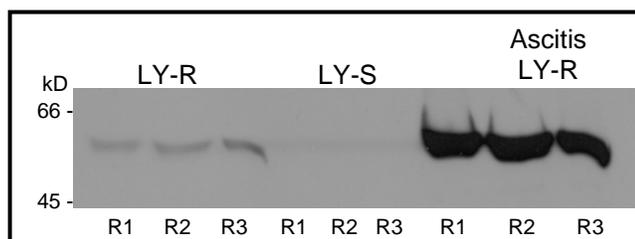


Figura 21. Detección de fetuina-A en la fracción membranal de células LY-R y LY-S, y fluido ascítico LY-R.

6.10. Purificación de un antígeno asociado al linfoma L5178Y-R

Para la purificación de la proteína, se empleó el fluido ascítico como material de inicio y se logró una purificación parcial del mismo mediante cromatografía de intercambio aniónico (Figura 22). La presencia del antígeno en esta fracción se verificó por SDS-PAGE y *Western blot* con anti-suero LYR y anticuerpos comerciales contra fetuina-A. Estos resultados mostraron la necesidad de un segundo paso de purificación por lo que se explora la posibilidad de emplear cromatografía de exclusión molecular, o cromatografía líquida de alta resolución.

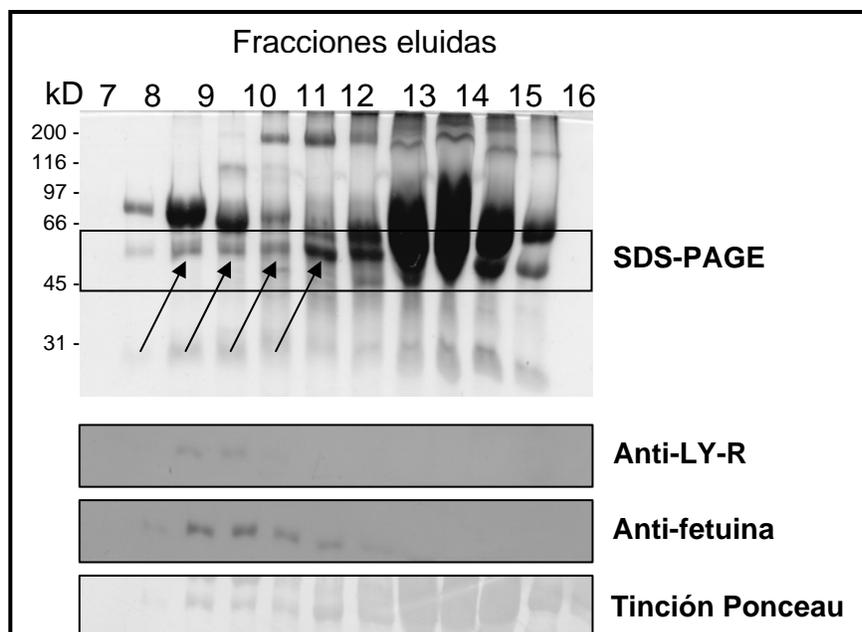


Figura 22. Cromatografía de intercambio aniónico de las proteínas del fluido ascítico peritoneal LY-R. Las flechas indican la banda correspondiente al antígeno.

7. DISCUSIÓN

En el presente estudio, se exploró la expresión de antígenos en las células de las líneas murinas LYR y LY-S buscando antígenos diferencialmente expresados; para lograr este objetivo, empleamos una estrategia con base proteómica en la que utilizamos electroforesis dimensional para separar las proteínas de la fracción membranal de las células LY-R y LY-S y las proteínas contenidas en el fluido ascítico de tumores LY-R peritoneales. Posteriormente, en ensayos *Western blot* se evaluó el reconocimiento de estas proteínas por anticuerpos policlonales anti-LY-R, anti-LY-S y suero control de animales sanos. De esta forma, se detectó un grupo de manchas proteicas presente en la fracción de membrana y fluido ascítico LY-R, reconocida únicamente por suero policlonal anti-LY-R. Este grupo se identificó por LC-MS/MS como alfa-2HS glicoproteína, también conocida como fetuina-A y contertripina en ratón.

Fetuina-A es una glicoproteína secretada por el hígado y una de las principales proteínas séricas; es una proteína de fase aguda reversa, ya que sus niveles en suero disminuyen significativamente durante el estado inflamatorio (Lebreton *et al*, 1979). Fue descrita por primera vez en el suero de fetos bovinos, de ahí el nombre fetuina, y posteriormente se reportó la existencia de homólogos en humanos, ratas y ratones. Aunque es descrita como una proteína fetal, aparentemente no tiene un papel importante durante la embriogénesis. Sin embargo, existe evidencia según la cual fetuina-A es un factor crítico en la regulación de la osteogénesis, específicamente en la prevención de la calcificación de tejido blando (Binkert *et al*, 1999). La fetuina-A también tiene un papel

en la resistencia a la insulina (Mathews *et al*, 2006; Mori *et al*, 2006; Stefan *et al*, 2006), y es considerada un biomarcador de daño renal agudo (Devarajan, 2007) y enfermedad renal crónica (Mehrotra, 2007).

En fechas recientes, ha ido en aumento la evidencia que apoya un papel activo de fetuina-A en la promoción del cáncer, aunque el mecanismo de acción aun no es claro. Una de las primeras indicaciones sobre la potencial función de fetuina-A en cáncer provino de la observación del efecto estimulador de la fetuina en la proliferación celular (Nie, 1992). Aun mas, recientemente se demostró el papel de fetuina en carcinogénesis de piel (Leite-Browning, 2004) y tumorigénesis de carcinoma de pulmón de Lewis (Kundranda *et al*, 2005) en ratones nulos para fetuina. Estos estudios probaron que la fetuina-A exógena y sistémica influye en el número y tamaño de los tumores. También hay evidencia del papel de la fetuina en cáncer humano; por ejemplo, se ha detectado fetuina-A que expresa el antígeno sialil Lewis en la línea de carcinoma hepatocelular HepG2 (Higai *et al*, 2003). La alfa-2-HS- glicoproteína también se expresa diferencialmente en el fluido del aspirado de pezón de pacientes con cáncer de mama (Pawlik *et al*, 2006), esto sugiere la posibilidad de que las alteraciones en los niveles de expresión de fetuina-A sean de relevancia para el cáncer humano.

En el presente trabajo, describimos el hallazgo de una forma inmunogénica de la glicoproteína fetuina-A, como un antígeno tumoral asociado a las células tumorigénicas LY-R, pero no a las células no tumorigénicas LY-S. También encontramos fetuina-A inmunogénica en el fluido de ascitis peritoneal de ratones que portan el linfoma

L5178Y-R y, dadas las condiciones experimentales, esto sugiere secreción o proteólisis de ectodominios membranales de las células tumorales.

Sería de interés elucidar si la fetuina inmunogénica unida a la membrana LY-R es expresada y secretada por estas células tumorales o, si la fetuina sistémica producida en el hígado se une a las células tumorales y entonces sufre alteraciones mediadas por la actividad del hígado, célula tumoral o la matriz extracelular. La fetuina-A se une a la membrana de las células tumorales a través de receptores anexina II y VI (Kundranda *et al*, 2004) y en la presencia de Ca^{+2} promueve la adhesión y activa la vía de señalización cinasa PI3/Akt y la proliferación (Kundranda *et al*, 2005). La activación de las vías de señalización Akt se ha involucrado en oncogénesis, malignidad y radioresistencia (Fujiwara *et al*, 2007). También se ha reportado que la unión de fetuina a la membrana celular activa la liberación de galectina-3 intracelular en células de carcinoma mamario (Zhu y Ochieng, 2001). Galectina-3 es una proteína de unión a β -galactósidos con un papel importante en las interacciones entre células y matriz extracelular, progresión tumoral y metástasis (Prieto *et al*, 2006). También se ha demostrado que la asialofetuina, la forma deasilada de fetuina, pero no la fetuina, induce el rápido incremento de galectina-3 en la superficie celular de células de cáncer de mama y próstata, lo que sugiere que el efecto de la fetuina-A sobre las células cancerosas puede depender de la sialificación de los dominios carbohidrato (Glinsky *et al*, 2003)

También es de interés elucidar el origen de la inmunogenicidad de la fetuina-A asociada con las células LY-R. Aunque las células LY-S no estimularon la formación de

anticuerpos contra fetuina-A, análisis *Western blot* con anticuerpos comerciales anti-fetuina y la comparación de patrones en geles 2-DE, revelaron la presencia de fetuina-A en ambos tipos celulares. Esto sugiere que la fetuina inmunogénica asociada a las células LY-R podría ser el producto de alteraciones estructurales en la cadena aminoacídica o en la porción carbohidrato. Hay datos disponibles que sugieren que cambios en los niveles de sialificación podrían ocurrir en la fetuina asociada a las células LY-R, dado que se observó que ratones portadores del linfoma L5178Y mostraban un aumento en los niveles de actividad de transferasas de ácido N-acetilneuramínico de fetuina (Bosmann et al, 1975) y que estos niveles se correlacionaban con un incremento en la tasa de crecimiento del tumor. Aun más, el desarrollo del linfoma L5178Y se ha evitado mediante la inmunización con células LY-R a las que se ha removido los grupos sialil mediante tratamiento con neuraminidasa (Ramos-Damián et al, 1980), lo que indica un papel potencial de las alteraciones en sialificación en las propiedades tumorales de las células LY-R. También existe la posibilidad de que diferencias en los niveles de expresión de fetuina-A entre las líneas celulares, sea la responsable por la antigenicidad de la fetuina-A asociada a las células LY-R. Esto se apoya en los resultados obtenidos durante el análisis *Western blot* con anticuerpos anti-fetuina, dado que las muestras de membrana LY-S mostraron una intensidad de señal débil para fetuina-A en comparación con las muestras LY-R. Alteraciones en los niveles de fetuina-A se han asociado con cáncer previamente (Ribom et al, 2003).

8. CONCLUSIONES

Se estableció una estrategia que combina el uso de herramientas proteómicas, como electroforesis bidimensional y *Western blotting*, para el aislamiento de antígenos de tumor. Mediante dicha estrategia se detectó e identificó una forma inmunogénica de la proteína sérica alfa 2 -HS glicoproteína asociada a la membrana de las células tumorigénicas del linfoma L5178Y-R, pero no a las células no tumorigénicas L5178Y-S. Se requieren estudios adicionales para establecer el papel que juega esta forma inmunogénica de fetuina en la tumorigenesis del linfoma L5178Y-R, y si esta fetuina inmunogénica se expresa en otras formas de cáncer.

LITERATURA CITADA

- Ahram M, Adkins JN, Auberry DL, Wunschel DS, Springer DL. 2005. A proteomic approach to characterize protein shedding. *Proteomics* 5(1):123-31.
- Alessandro R, Fontana S, Kohn E, De Leo G. 2005. Proteomic strategies and their application in cancer research. *Tumori* 91(6):447-55.
- Alexander P, Mikulski ZB. 1961. Mouse lymphoma cells with different radiosensitivities. *Nature* 192: 572-573
- Anderson KS and LaBaer J. 2005. The Sentinel Within: Exploiting the Immune System for Cancer Biomarkers. *J Proteome Res* 4:1123-1133
- Arribas J, Borroto A. 2002. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* 102(12):4627-38.
- Athauda G, Giubellino A, Coleman JA, Horak C, Steeg PS, Lee MJ, Trepel J, Wimberly J, Sun J, Coxon A, Burgess TL, Bottaro DP. 2006. c-Met ectodomain shedding rate correlates with malignant potential. *Clin Cancer Res* 12(14 Pt 1):4154-62.
- Bard MP, Hegmans JP, Hemmes A, Luider TM, Willemsen R, Severijnen LA, van Meerbeeck JP, Burgers SA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN. 2004. Proteomic analysis of exosomes isolated from human malignant pleural effusions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 31(1):114-21.
- Beer JZ, Budzicka E, Niepokojczycka E, Rosiek O, Szumiel I, Walicka M. 1983. Loss of tumorigenicity with simultaneous changes in radiosensitivity and photosensitivity during *in vitro* growth of L5178Y murine lymphoma cells. *Cancer Res.* 43:4736-42.
- Beer JZ, Jacobson ED, Evans HH, Szumiel I. 1984. X-ray and UV mutagenesis in two L5178Y cell strains differing in tumorigenicity, radiosensitivity, and DNA repair. *Br J Cancer Suppl* 6:107-11.
- Berzofsky JA, Terabe M, Oh S, Belyakov IM, Ahlers JD, Janik JE, Morris JC. 2004. Progress on new vaccine strategies for the immunotherapy and prevention of cancer. *J Clin Invest* 113(11):1515-25.
- Binkert C, Demetriou M, Sukhu B, Szweras M, Tenenbaum HC, Dennis JW. 1999. Regulation of osteogenesis by fetuin. *J. Biol. Chem* 274: 28514-28520.
- Bocchia M, Bronte V, Colombo MP, De Vincentis A, Di Nicola M, Forni G, Lanata L, Lemoli RL, Massaia M, Rondelli D, Zanon P, Tura Z. 2000. Antitumor vaccination: where we stand. *Haematologica* 85:1172-1206.

- Bosmann HB, Spataro AC, Myers MW. 1975. Serum and host liver activities of glycosidases and sialyltransferases in animals bearing transplantable tumours. *Res. Commun Chem Pathol Pharmacol* 12: 499-512.
- Brea D, Cristobo I, Sobrino T, Rodríguez-González R, Mosquera E, Moldes O, Castillo J. 2007. Application of proteomics to neurological diseases. *Neurologia* 22(3): 170-9.
- Brichory F, Beer D, Le Naour F, Giordano T, Hanash S. 2001. Proteomics-based identification of protein gene product 9.5 as a tumor antigen that induces a humoral immune response in lung cancer. *Cancer Res.* 61(21):7908-12.
- Brichory FM, Misek DE, Yim AM, Krause MC, Giordano TJ, Beer DG, Hanash SM. 2001. An immune response manifested by the common occurrence of annexins I and II autoantibodies and high circulating levels of IL-6 in lung cancer. *PNAS* 98(17):9824-9.
- Brusic V, Marina O, Wu CJ, Reinherz EL. 2007. Proteome informatics for cancer research: from molecules to clinic. *Proteomics* 7(6): 976-91.
- Brzóska K, Kruszewski M, Szumiel I. 2006. Nonhomologous end-joining deficiency of L5178Y-S cells is not associated with mutation in the ABCDE autophosphorylation cluster. *Acta Biochim Pol* 53: 233-236
- Bystryn JC. 2002. Vaccines for melanoma. *Dermatol Clin* 20(4):717-25.
- Cañas B, López-Ferrer D, Ramos-Fernández A, Camafeita E, Calvo E. 2006. Mass spectrometry technologies for proteomics. *Brief Funct Genomic Proteomic* 4(4):295-320.
- Caron M, Choquet-Kastylevsky G, Joubert-Caron R. 2007. Cancer immunomics using autoantibody signatures for biomarker discovery. *Mol Cell Proteomics* 6(7):1115-22.
- Chen B, Dong JQ, Chen YJ, Wang JM, Tian J, Wang CB, Zou SQ. 2007. Two dimensional electrophoresis for comparative proteomic analysis of human bile. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 6(4):402-6.
- Cho WC. 2007. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Mol Cancer* 2: 6:25.
- Clay TM, Hobeika AC, Mosca PJ, Lyerly HK, Morse MA. 2001. Assays for Monitoring Cellular Immune Responses to Active Immunotherapy of Cancer. *Clin Cancer Res* 7: 1127–1135.
- Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze'ev A. 2002. Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma

and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev.* 16(16):2058-72.

- Copier J, Whelan M, Dalglish A. 2006. Biomarkers for the development of cancer vaccines: current status. *Mol Diagn Ther* 10(6):337-43.
- Cowan ML, Vera J. 2008. Proteomics: advances in biomarker discovery. *Expert Rev Proteomics* 5(1):21-3.
- Cui JW, Li WH, Wang J, Li AL, Li HY, Wang HX, He K, Li W, Kang LH, Yu M, Shen BF, Wang GJ, Zhang XM. 2005. Proteomics-based identification of human acute leukemia antigens that induce humoral immune response. *Mol Cell Proteomics* 4(11):1718-24.
- Davis ID, Jefford M, Parente P, Cebon J. 2003. Rational approaches to human cancer immunotherapy. *Leukoc Biol* 73(1):3-29.
- Del Boccio P, Urbani A. 2005. Homo sapiens proteomics: clinical perspectives. *Ann Ist Super Sanita* 41(4): 479-82.
- Deutscher M, Murray P. 1990. *Methods in Enzymology, Volume 182: Guide to Protein Purification.* John N. Abelson (Editor), Melvin I. Simon (Editor). 1st Edition. Academic Press Inc. San Diego.
- Devarajan, P. 2007. Proteomics for Biomarker Discovery in Acute Kidney Injury. *Semin. Nephrol.* 27: 637-651.
- Diamandis EP. 2003. Point: Proteomic patterns in biological fluids: do they represent the future of cancer diagnostics? *Clin Chem* 49(8):1272-5.
- Espinoza-Delgado I. 2002. Cancer vaccines. *Oncologist* 3:20-33.
- Evans, H.H., Ricanati, M., Min-Fen H. 1987. Deficiency in DNA repair in Mouse lymphoma strain L5178Y-S. *PNAS* 84:7562-7566
- Feng Y, Tian ZM, Wan MX, Zheng ZB. 2007. Protein profile of human hepatocarcinoma cell line SMMC-7721: identification and functional analysis. *World J Gastroenterol.* 13(18):2608-14.
- Ferrari G, Pastorelli R, Buchi F, Spinelli E, Gozzini A, Bosi A, Santini V. 2007. Comparative proteomic analysis of chronic myelogenous leukemia cells: inside the mechanism of imatinib resistance. *Proteome Res* 6(1):367-75.
- Ferriols Lisart F, Ferriols Lisart R, Colomina Rodriguez J. 1997. Inmunoterapia Tumoral. *Vacunas y Terapia Génica. Farm Hosp* 21 (3): 166-170.

- Fioretti MC, Romani L, Taramelli D, Goldin A. 1978. Antigenic properties of lymphoma sublines derived from a drug-treated immunogenic L5178Y leukemia. *Transplantation* 26: 449-51.
- Fontana S, Alessandro R, Barranca M, Giordano M, Corrado C, Zanella-Cleon I, Becchi M, Kohn EC, De Leo G. 2007. Comparative proteome profiling and functional análisis of chronic myelogenous leukemia cell lines. *J Proteome Res* 6(11):4330-42.
- Fontana S, De Leo G, Sedic M, Kraljevic Pavelic S, Alessandro R. 2006. Proteomics in antitumor research. *Drug Discov Today* 3(4):441-449.
- Franco P, Veronese F, Levi F, Goldin A, Nicolin A. 1982. Antibody-dependent cellular cytotoxicity against drug-induced antigens in L5178Y mouse lymphoma. *Br J Cancer* 46(2):173-9.
- Fujita Y, Nakanishi T, Hiramatsu M, Mabuchi H, Miyamoto Y, Miyamoto A, Shimizu A, Tanigawa N. 2006. Proteomics-based approach identifying autoantibody against peroxiredoxin VI as a novel serum marker in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 12(21):6415-20.
- Fujiwara K, Iwado E, Mills GB, Sawaya R, Kondo S, Kondo Y. 2007. Akt inhibitor shows anticancer and radiosensitizing effects in malignant glioma cells by inducing autophagy. *Int J Oncol* 31: 753-760.
- Gagné JP, Ethier C, Gagné P, Mercier G, Bonicalzi ME, Mes-Masson AM, Droit A, Winstall E, Isabelle M, Poirier GG. 2007. Comparative proteome analysis of human epithelial ovarian cancer. *Proteome Sci*. 5:16.
- Gharbi S, Gaffney P, Yang A, Zvelebil MJ, Cramer R, Waterfield MD, Timms JF. 2002. Evaluation of two-dimensional differential gel electrophoresis for proteomic expression analysis of a model breast cancer cell system. *Mol Cell Proteomics* 1(2):91-8.
- Gires O, Münz M, Schaffrik M, Kieua C, Rauch J, Ahlemann M, Eberle D, Mack B, Wollenberg B, Lang S, Hofmann T, Hammerschmidt W, Zeidler R. 2004. Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology. *Cell Mol Life Sci* 61:1198-1207
- Glinsky VV, Glinsky GV, Glinskii OV, Huxley VH, Turk JR, Mossine VV, Deutscher SL, Pienta KJ, Quinn TP. 2003. Intravascular metastatic cancer cell homotypic aggregation at the sites of primary attachment to the endothelium. *Cancer Res* 63: 3805-3811.
- Goldstein, LT. 1976. Immunological studies of the murine lymphoma L5178Y in its syngeneic host. Tesis. Universidad de Pennsylvania.

- Gómez-Estrada H, López-de la Rosa LM, Becerril-Meza G, Arellano-Blanco J, Fernández-Quintero P. 1977. Immunogenicity of L5178Y cells modified by different reagents. *Arch Invest Med* 8:113-22.
- Görg A, Obermaier C, Boguth G, Harder A, Scheibe B, Wildgruber R, Weiss W. 2000. The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 21(6):1037-53.
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 4(12):3665-85.
- Greten TF, Jafee EM. 1999. Cancer vaccines. *J Clin Oncol* 17(3): 1047-1060.
- Griffiths WJ, Jonsson AP, Liu S, Rai DK, Wang Y. 2001. Electrospray and tandem mass spectrometry in biochemistry. *Biochem J* 355(Pt 3):545-61.
- Grohmann U, Binaglia L, Puccetti P, Fioretti MC. 1993. Cell-mediated immunity to chemically xenogenized tumors VI. The effect of cell treatment with retroviral env antisense oligonucleotides. *Int J Immunopharmacol* 15:567-72.
- Grohmann U, Puccetti P, Romani L, Binaglia L, Bianchi R, Belladonna ML, Ullrich SJ, Appella E, Fioretti MC. 1992. Immunogenic tumor variants induced by drug treatment of the L5178Y lymphoma: search for serologically defined antigens at the clonal level. *Int J Cancer* 52:372-7.
- Guo L, Eisenman JR, Mahimkar RM, Peschon JJ, Paxton RJ, Black RA, Johnson RS. 2002. A proteomic approach for the identification of cell-surface proteins shed by metalloproteases. *Mol Cell Proteomics*. 1(1):30-6.
- Hanash S. 2003. Disease proteomics. *Nature*. 422(6928): 226-32.
- Harada F, Matsuzaki F, Yahara I. 1986. Occurrence of two beta-tubulin isoforms with different polymerizing abilities in L5178Y cells. *Exp Cell Res*. 166(2):265-78.
- Hayduk EJ, Choe LH, Lee KH. 2002. Proteomics tools in discovery-driven science. *Curr Sci* 83:7 841-844.
- Higai K, Shibukawa K, Muto S, Matsumoto K. 2003. Targeted proteo-glycomics analysis of Sialyl Lewis X antigen expressing glycoproteins secreted by human hepatoma cell line. *Anal Sci* 19: 85-92.
- Hirano T, Kato H. 2006. Present status of clinical proteomic analysis for the early detection and determination of therapeutic strategy in lung cancer. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 12(1):4-9.

- Ho DW, Yang ZF, Wong BY, Kwong DL, Sham JS, Wei WI, Yuen AP. 2006. Surface-enhanced laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry serum protein profiling to identify nasopharyngeal carcinoma. *Cancer* 107(1):99-107.
- Hobeika AC, Clay TM, Mosca PJ, Lyerly HK, Morse MA. 2001. Quantitating therapeutically relevant T-cell responses to cancer vaccines. *Crit Rev Immunol* 21(1-3): 287-97.
- Hong SH, Misek DE, Wang H, Puravs E, Giordano TJ, Greenon JK, Brenner DE, Simeone DM, Logsdon CD, Hanash SM. 2004. An autoantibody-mediated immune response to calreticulin isoforms in pancreatic cancer. *Cancer Res.* 64(15):5504-10.
- Huber M, Bahr I, Kratzschmar JR, Becker A, Muller EC, Donner P, Pohlenz HD, Schneider MR, Sommer A. 2004. Comparison of proteomic and genomic analyses of the human breast cancer cell line T47D and the antiestrogen-resistant derivative T47D-r. *Mol Cell Proteomics* 3: 43-55.
- Issaq HJ. 2003. Application of separation technologies to proteomics research. *Adv Prot Chem* 65: 249-269.
- Jonsson AP. 2001. Mass spectrometry for protein and peptide characterisation. *Cell Mol Life Sci* 58(7):868-84.
- Kawakami Y, Wang X, Shofuda T, Sumimoto H, Tupesis J, Fitzgerald E, Rosenberg S. 2001. Isolation of a new melanoma antigen, MART-2, containing a mutated epitope recognized by autologous tumor-infiltrating T lymphocytes. *J Immunol*, 166: 2871–2877.
- Keilholz U, Martus P, Scheibenbogen C. 2006. Immune Monitoring of T-Cell responses in Cancer Vaccine Development. *Clin Cancer Res* 12(7 Pt 2): 2346s-2352s.
- Keilholz U, Weber J, Finke JH, Gabrilovich DI, Kast WM, Disis ML, Kirkwood JM, Scheibenbogen C, Schlom J, Maino VC, Lyerly HK, Lee PP, Storkus W, Marincola F, Worobec A, Atkins MB. 2002. Immunologic monitoring of cancer vaccine therapy: results of a workshop sponsored by the Society for Biological Therapy. *J Immunother.* 25(2): 97-138.
- Kennedy S. 2001. Proteomic profiling from human samples: the body fluid alternative. *Toxicol Lett* 120(1-3):379-84.
- Kiessling LL, Gordon EJ. 1998. Transforming the cell surface through proteolysis. *Chem Biol* 5(3):R49-62.
- Klade CS, Voss T, Krystek E, Ahorn H, Zatloukal K, Pummer K, Adolf GR. 2001. Identification of tumor antigens in renal cell carcinoma by serological proteome analysis. *Proteomics* 1(7):890-8.

- Klose J. 1975. Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals. *Humangenetik* 26:231-243.
- Ko BK, Kawano K, Murray JL, Disis ML, Efferson CL, Kuerer HM, Peoples GE, Ioannides CG. 2003. Clinical studies of vaccines targeting breast cancer. *Clin Cancer Res.* 9(9): 3222-34.
- Kolch W, Mischak H, Pitt AR. 2005. The molecular make-up of a tumour: proteomics in cancer research. *Clin Sci* 108:369-383.
- Kulasingam V, Diamandis EP. 2007. Proteomics analysis of conditioned media from three breast cancer cell lines: a mine for biomarkers and therapeutic targets. *Mol Cell Proteomics* 6(11):1997-2011.
- Kundranda MN, Henderson M, Carter KJ, Gorden L, Binhazim A, Ray S, Baptiste T, Shokrani M, Leite-Browning ML, Jahnhen-Dechent W, Matrisian LM, Ochieng J. 2005. The serum glycoprotein fetuin-A promotes Lewis lung carcinoma tumourigenesis via adhesive-dependent and adhesive-independent mechanisms. *Cancer Res.* 65: 499-506.
- Kundranda MN, Ray S, Saria M, Friedman D, Matrisian LM, Lukyanov P, Ochieng J. 2004. Annexins expressed on the cell surface serve as receptors for adhesion to immobilized fetuin-A. *Biochim Biophys Acta* 1693: 111-123.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685
- Lamas-Robles C, Mejia-Arreguin S, Gómez-Estrada H, González-Mendoza A. 1984. Obtention of Sm antigen from L5178 murine lymphoma malignant cells. *Arch Invest Med* 15(3):259-65.
- Le Naour F. 2001. Contribution of proteomics to tumor immunology. *Proteomics* 1: 1295-1302.
- Le Naour F. 2007. Identification of tumor antigens by using proteomics. *Methods Mol Biol* 360:327-34.
- Lebreton JP, Joisel F, Raoult JP, Lannuzel B, Rogez JP, Humbert G. 1979. Serum concentration of human alpha 2 HS glycoprotein during the inflammatory process: evidence that alpha 2 HS glycoprotein is a negative acute-phase reactant. *J. Clin. Invest* 64:1118-1129.
- Lee HJ, Lee EY, Kwon MS, Paik YK. 2006. Biomarker discovery from the plasma proteome using multidimensional fractionation proteomics. *Curr Opin Chem Biol.* 10(1):42-9.

- Leite-Browning ML, McCawley LJ, Jahnen-Dechent W, King LE Jr, Matrisian LM, Ochieng J. 2004. Alpha 2-HS glycoprotein (fetuin-A) modulates murine skin tumourigenesis. *Int. J. Oncol.* 25: 319-324.
- Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman EC. 2007. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics* 8:91.
- Lescuyer P, Hochstrasser D, Rabilloud T. 2007. How shall we use the proteomics toolbox for biomarker discovery? *J Proteome Res* 6(9):3371-6.
- Lewis JJ. 2004. Therapeutic cancer vaccines: Using unique antigens. *PNAS* 101:14653-14656.
- Lollini PL, Cavallo F, Nanni P, Forni G. 2006. Vaccines for tumour prevention. *Nat Rev Cancer* 6(3):204-16.
- Lu H, Goodell V, Disis ML. 2008. Humoral Immunity Directed against Tumor-Associated Antigens As Potential Biomarkers for the Early Diagnosis of Cancer. *J Proteome Res* 7(5):2168.
- Lyerly HK. 2003. Quantitating cellular immune responses to cancer vaccines. *Semin Oncol* 30(3 Suppl 8): 9-16.
- Manson LA. 1987. Novel tumor-specific antigen(s) response observed in a syngeneic lymphoma-bearing host. *Cancer Detect Prev Suppl.* 1:111-20.
- Mareel M, Leroy A. 2003. Clinical, cellular, and molecular aspects of cancer invasion. *Physiol Rev* 83(2):337-76.
- Marko-Varga G, Lindberg H, Löfdahl CG, Jönsson P, Hansson L, Dahlbäck M, Lindquist E, Johansson L, Foster M, Fehniger TE. 2005. Discovery of biomarker candidates within disease by protein profiling: principles and concepts. *J Proteome Res* 4(4):1200-12.
- Mathews ST, Rakhade S, Zhou X, Parker GC, Coscina DV, Grunberger G. 2006. Fetuin-null mice are protected against obesity and insulin resistance associated with aging. *Biochem Biophys Res Commun.* 350:437-443.
- Mbeunkui F, Fodstad O, Pannell LK. 2006. Secretory protein enrichment and analysis: an optimized approach applied on cancer cell lines using 2D LC-MS/MS. *J Proteome Res* 5(4):899-906.
- Mbeunkui F, Metge BJ, Shevde LA, Pannell LK. 2007. Identification of differentially secreted biomarkers using LC-MS/MS in isogenic cell lines representing a progression of breast cancer. *J Proteome Res* 6(8):2993-3002.

- Mellrath J, Bouffler SD, Samper E, Cuthbert A, Wojcik A, Szumiel I, Bryant PE, Riches AC, Thompson A, Blasco MA, Newbold RF, Slijepcevic P. 2001. Telomere Length Abnormalities in Mammalian Radiosensitive Cells. *Cancer Res* 61, 912-915
- Mehrotra, R. 2007. Emerging role for fetuin-A as contributor to morbidity and mortality in chronic kidney disease. *Kidney Int.* 72: 137-140.
- Miguet L, Pacaud K, Felden C, Hugel B, Martinez MC, Freyssinet JM, Herbrecht R, Potier N, van Dorsselaer A, Mauvieux L. 2006. Proteomic analysis of malignant lymphocyte membrane microparticles using double ionization coverage optimization. *Proteomics* 6(1):153-71.
- Mori K, Emoto M, Yokoyama H, Araki T, Teramura M, Koyama H, Shoji T, Inaba M, Nishizawa Y. 2006. Association of serum fetuin-A with insulin resistance in type 2 diabetic and nondiabetic subjects. *Diabetes Care* 29: 468.
- Nagorsen D, Marincola FM. 2002. How to analyze ex vivo T-cell responses in cancer patients. *In Vivo* 16(6): 519-25.
- Nakayasu H, Ueda K. 1986. Preferential association of acidic actin with nuclei and nuclear matrix from mouse leukemia L5178Y cells. *Exp Cell Res* 163(2):327-36.
- Nicolin A, Franco P, Testorelli C, Goldin A. 1976. Immunosensitivity and histocompatibility antigens in drug-altered leukemic cells. *Cancer Res* 36:222-7.
- Nie, Z. 1992. Fetuin: its enigmatic property of growth promotion. *Am. J. Physiol.* 263: 551-562.
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 250:4007-4021.
- Okusaka T, Yamada T, Maekawa M. 2006. Serum tumor markers for pancreatic cancer: the dawn of new era? *JOP* 7(4):332-6.
- Pan S, Zhang H, Rush J, Eng J, Zhang N, Patterson D, Comb MJ, Aebersold R. 2005. High throughput proteome screening for biomarker detection. *Mol Cell Proteomics* 4(2):182-90.
- Patterson, SD. 2004. How much of the proteome do we see with discovery-based proteomics methods and how much do we need to see? *Current Proteomics* 1:3-12
- Pawlik TM, Hawke DH, Liu Y, Krishnamurthy S, Fritsche H, Hunt KK, Kuerer HM. 2006. Proteomic analysis of nipple aspirate fluid from women with early-stage

breast cancer using isotope-coded affinity tags and tandem mass spectrometry reveals differential expression of vitamin D binding protein. *BMC Cancer*, 6:68.

- Prasanna L, Misek DE, Hinderer R, Michon J, Geiger JD, Hanash SM. 2000. Identification of β -tubulin isoforms as tumor antigens in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 6:3949-3956
- Prieto VG, Mourad-Zeidan AA, Melnikova V, Johnson MM, Lopez A, Diwan AH, Lazar AJ, Shen SS, Zhang PS, Reed JA, Gershenwald JE, Raz A, Bar-Eli M. 2006. Galectin-3 expression is associated with tumour progression and pattern of sun exposure in melanoma. *Clin Cancer Res* 12:6709-6715.
- Rabinovsky ED, Yang TJ. 1986. Effects of horse and fetal calf serum on the expression of tumor-associated antigen and tumorigenicity of L5178Y leukemia/lymphoma cells. *Leuk Res* 10:1331-1340.
- Ramos-Damián ME, Gómez-Estrada H, Hernández-Delgado J, Tapia-Arizmendi L, Feria-Velasco A. 1980. Location of tumoral antigens in L5178Y murine lymphoma cells. *Arch Invest Med* 11:425-434
- Ren H, Du N, Liu G, Hu HT, Tian W, Deng ZP, Shi JS. 2006. Analysis of variabilities of serum proteomic spectra in patients with gastric cancer before and after operation. *World J Gastroenterol* 12(17):2789-92.
- Ribom D, Westman-Brinkmalm A, Smits A, Davidsson P. 2003. Elevated levels of alpha-2-Heremans-Schmid glycoprotein in CSF of patients with low-grade gliomas. *Tumour Biol* 24(2): 94-9.
- Romani L, Fioretti MC, Bonmassar E. 1979. *In vitro* generation of primary cytotoxic lymphocytes against L5178Y leukemia antigenically altered by 5-(3, 3'-dimethyl-1 triazeno)-imidazole-4-carboxamide *in vivo*. *Transplantation* 28:218-22.
- Romani L, Puccetti P, Fioretti MC, Mage MG. 1985. Humoral response against murine lymphoma cells xenogenized by drug treatment *in vivo*. *Int J Cancer* 36:225-31.
- Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. 2004. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med* 10(9): 909-15.
- Rosenberg SA. 2001. Progress in human tumour immunology and immunotherapy. *Nature* 411(6835): 380-4.
- Rosenberg SA. 2004. Shedding light on immunotherapy for cancer. *N Engl J Med* 350(14):1461-3.
- Sardana G, Marshall J, Diamandis EP. 2007. Discovery of candidate tumor markers for prostate cancer via proteomic analysis of cell culture-conditioned medium. *Clin Chem* 53(3):429-37.

- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M. 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem* 68: 850-858.
- Schmidt W, Buschle M, Zauner W, Kirlappos H, Mechtler K, Trska B, Birnstiel ML. 1997. Cell-free tumor antigen peptide-based cancer vaccines. *PNAS* 94: 3262–3267.
- Seliger B, Kellner R. 2002. Design of proteome-based studies in combination with serology for the identification of biomarkers and novel targets. *Proteomics* 2: 1641-1651.
- Shau H, Chandler GS, Whitelegge JP, Gornbein JA, Faull KF, Chang HR. 2003. Proteomic profiling of cancer biomarkers. *Brief Funct Genomic Proteomic* 2(2):147-58.
- Shen SH, Gu LJ, Liu PQ, Ye X, Chang WS, Li BS. 2008. Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins between K562 and K562/ADM cells. *Chin Med J* 121(5):463-8.
- Skinner KA. 2005. Antitumor vaccines: of mice and men? *Ann Surg Oncol* 12(7):511-2.
- Stefan N, Hennige AM, Staiger H, Machann J, Schick F, Kröber SM, Machicao F, Fritsche A, Häring HU. 2006. Alpha2-Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is associated with insulin resistance and fat accumulation in the liver in humans. *Diabetes Care* 29: 853-857.
- Szumiel I. 2005a. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 1: General Characteristics. *Int J Radiat Biol* 81: 339-352.
- Szumiel I. 2005b. L5178Y sublines: a look back from 40 years. Part 2: Response to ionizing radiation. *Int J Radiat Biol* 81:353-365.
- Takashima M, Kuramitsu Y, Yokoyama Y, Iizuka N, Harada T, Fujimoto M, Sakaida I, Okita K, Oka M, Nakamura K. 2006. Proteomic analysis of autoantibodies in patients with hepatocellular carcinoma. *Proteomics* 6(13):3894-900.
- Trainer DL, Wheelock EF. 1984. Characterization of L5178Y cell phenotypes isolated during progression of the tumor-dormant state in DBA2 mice. *Cancer Res* 44(7):2897-906.
- Unwin RD, Harnden P, Pappin D, Rahman D, Whelan P, Craven RA, Selby PJ, Banks RE. 2003. Serological and proteomic evaluation of antibody responses in the identification of tumor antigens in renal cell carcinoma. *Proteomics* 3(1):45-55.
- Viswanathan S, Unlü M, Minden JS. 2006. Two-dimensional difference gel electrophoresis. *Nat Protoc* 1(3):1351-8.

- Vogel TW, Zhuang Z, Li J, Okamoto H, Furuta M, Lee YS, Zeng W, Oldfield EH, Vortmeyer AO, Weil RJ. 2005. Proteins and protein pattern differences between glioma cell lines and glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res* 11:3624-32.
- Wang Y, Hanley R, Klemke RL. 2006. Computational methods for comparison of large genomic and proteomic datasets reveal protein markers of metastatic cancer. *J Proteome Res* 5:907-15.
- Weinhold KJ, Miller DA, Wheelock EF. 1979. The tumor dormant state comparison of L5178Y cells used to establish dormancy with those that emerge after its termination. *J Exp Med* 149:745-757
- Weinhold KJ, Wheelock EF. 1982. Cross-reacting antigens on L5178Y cells which serve as targets for cytotoxic T-lymphocyte lysis during establishment of the tumor dormant state. *Cancer Res* 42:3607-16.
- Whelan M, Ball G, Beattie C, Dalgleish A. 2006. Biomarkers for development of cancer vaccines. *Personalized Medicine* 3(1):79-88
- Wittmann-Liebold B, Graack HR, Pohl T. 2006. Two-dimensional gel electrophoresis as tool for proteomics studies in combination with protein identification by mass spectrometry. *Proteomics* 6(17):4688-703.
- Wu SP, Lin YW, Lai HC, Chu TY, Kuo YL, Liu HS. 2006. SELDI-TOF MS profiling of plasma proteins in ovarian cancer. *Taiwan J Obstet Gynecol* 45(1):26-32.
- Wulfkuhle JD, Liotta LA, Petricoin EF. 2003. Proteomic applications for the early detection of cancer. *Nat Rev Cancer* 3(4):267-75.
- Yang F, Yang XF. 2005. New concepts in tumor antigens: their significance in future immunotherapies for tumors. *Cell Mol Immunol* 2(5):331-41.
- Yang YX, Hu HD, Zhang DZ, Ren H. 2007. Identification of proteins responsible for the development of adriamycin resistance in human gastric cancer cells using comparative proteomics analysis. *J Biochem Mol Biol* 40(6):853-60.
- Young WW Jr, Tamura Y, Johnson HS, Miller DA. 1983. Decreased glycolipid antigen expression in lymphoma cell variants escaping from anti-glycolipid serotherapy. *J Exp Med*. 157(1):24-33.
- Yu Z, Restifo NP. 2002. Cancer vaccines: progress reveals new complexities. *J Clin Invest* 110:289-294.
- Zhang J, Kang B, Tan X, Bai Z, Liang Y, Xing R, Shao J, Xu N, Wang R, Liu S, Lu Y. 2007. Comparative analysis of the protein profiles from primary gastric tumors

and their adjacent regions: MAWBP could be a new protein candidate involved in gastric cancer. *J Proteome Res* 6(11):4423-32.

Zhou M, Veenstra T. 2008. Mass spectrometry: m/z 1983-2008. *Biotechniques*. 44(5):667-8, 670.

Zhu WQ, Ochieng J. 2001. Rapid release of intracellular galectin-3 from breast carcinoma cells by fetuin. *Cancer Res* 61: 1869-1873.

Zitvogel L, Tesniere A, Kroemer G. 2006. Cancer despite immunosurveillance: immunoselection and immunosubversion. *Nature reviews* 6: 715-727.

Zou W. 2006. Regulatory T cells, tumor immunity and immunotherapy. *Nature reviews* 6: 295-307.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Diana Elia Caballero Hernández

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Microbiología

Tesis: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE UN INMUNÓGENO ASOCIADO AL LINFOMA L5178Y

Campo de Estudio: Ciencias Naturales

Datos Personales: Nacida en Monterrey, Nuevo León un 8 de Marzo, hija de Aristeo Caballero Ramírez y Maria Isabel Hernández Rangel.

Educación: Egresada de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Biólogo en 2000, primer lugar de generación. Maestría en Ciencias en Inmunobiología, grado obtenido en 2003, premio UANL a la mejor tesis de maestría en el área de Ciencias Naturales.

Experiencia Profesional: Maestra de Asignatura “A” de la Facultad de Salud Pública y Nutrición, Universidad Autónoma de Nuevo León 2005-2007.

APENDICE

ARTICULO PUBLICADO