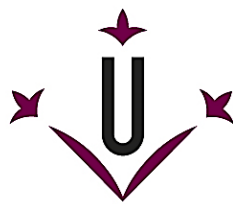
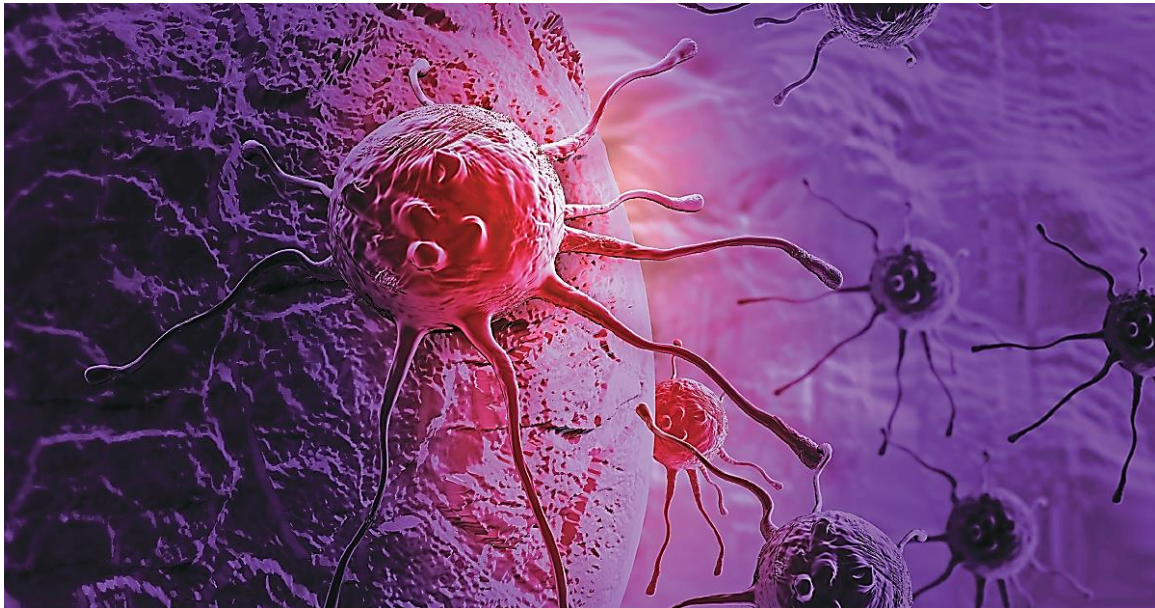


CARACTERIZACIÓN DEL FLUIDO INTERSTICIAL EN DISTINTOS TIPOS TUMORALES. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA COMPOSICIÓN Y DE LAS METODOLOGÍAS DE OBTENCIÓN



Universitat de Lleida



ROSA AYALA BUENO

TUTOR: Dr. ELOI GARÍ MARSOL

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

CURSO ACADÉMICO 2017/2018

UNIVERSIDAD DE LLEIDA

LLEIDA, JULIO DE 2018

ÍNDICE

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS	II
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN.....	IV
RESUM.....	V
ABSTRACT	V
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
3. METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA REVISIÓN.....	3
4. RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA	5
5. CONTENIDO DE LA REVISIÓN	8
5.1. CARACTERIZACIÓN DEL FLUIDO INTERSTICIAL NORMAL Y TUMORAL ...	8
5.1.1. Propiedades físicas y formación	8
5.1.2. Composición y proteoma	10
5.1.2.1. Importancia de los componentes no celulares en el intersticio tumoral como biomarcadores	10
5.1.2.2. Importancia del componente celular en el intersticio tumoral	12
5.1.3. Diferencias locales en órganos del fluido intersticial normal.....	13
5.2. TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DEL FLUIDO INTERSTICIAL TUMORAL	14
5.2.1. Métodos de obtención de TIF <i>in vivo</i>	14
5.2.2. Métodos de obtención de TIF a partir de muestras de tejido fresco	15
5.3. COMPARACIÓN PROTEICA.....	16
5.3.1. Evolución temporal de la técnica.....	17
5.3.2. Metodología de obtención del TIF	19
5.3.3. Carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario y mama	20
6. DISCUSIÓN	23
6.1. Evolución temporal de la técnica	23
6.2. Metodología de obtención del TIF	24
6.3. Carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario y mama.....	25
6.4. Perspectivas futuras	27
7. BIBLIOGRAFÍA	28

LISTA DE SIGLAS Y ACRÓNIMOS

CAFs: fibroblastos asociados a cáncer

2D-DIGE: electroforesis diferencial en dos dimensiones

EGF: factor de crecimiento epidérmico

GAGs: glicosaminoglicanos

HCC: carcinoma hepatocelular

IF: fluido intersticial

iTRAQ: marcaje isobárico de proteínas para cuantificación absoluta

LC: cromatografía líquida

LC-MS/MS: cromatografía líquida capilar acoplada a espectrometría de masas en tándem.

LPS: lipopolisacárido

MALDI-TOF: matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight

MDSCs: células supresoras derivadas de células mieloides

MEC: matriz extracelular

MMPs: metaloproteinasas

MS: espectrometría de masas

NIF: fluido intersticial normal

PBS: buffer fosfato salino

PDGF-BB: isoforma BB del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PGs: proteoglicanos

TAMs: macrófagos asociados al tumor

TGF- β : factor de crecimiento transformante beta

TIF: fluido intersticial tumoral

TILs: linfocitos T citotóxicos infiltrantes del tumor

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, me gustaría expresar mi agradecimiento al tutor que ha guiado este trabajo, el Dr. Eloi Garí. Gracias por su gran dedicación, excelente disponibilidad y profunda amabilidad. Su ayuda y sugerencias han sido esenciales para concluir el grado en Biotecnología.

En segundo lugar, al Dr. Rogelio González y a la investigadora Jessica Pérez, del Centro de Investigación del Cáncer de Salamanca, por haberme permitido realizar las prácticas en su grupo de investigación y por avivar aún más mi interés y pasión por el área oncológica.

Gracias a mi familia, especialmente a mis padres y a mi hermana, por ser los pilares que han estado presentes, en todo momento, a pesar de la distancia. Por su inmenso cariño y apoyo, por escucharme, animarme y, sobre todo, por creer en mí.

Y por último, me gustaría agradecer a mis amigas todos sus consejos, y el haberme acompañado en esta etapa llena de experiencias inolvidables.

RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad del mundo actual. El gran interés por descubrir nuevos mecanismos inherentes al inicio, desarrollo y progresión de la neoplasia ha hecho que la investigación tome un nuevo rumbo marcadamente traslacional: el estudio del microambiente tumoral. Hasta ahora, los cambios en el ambiente neoplásico se estudiaban gracias a los componentes que secretan las células cancerígenas cultivadas *in vitro*, el secretoma. Sin embargo, la perspectiva actual se encuentra orientada principalmente al estudio del intersticio, espacio comprendido entre los órganos del cuerpo humano, y especialmente en la fase fluida del mismo. Es tal la importancia que ha adquirido el intersticio que se ha llegado a considerar como un nuevo órgano. Además, los estudios que se han realizado hasta ahora remarcan la posibilidad de emplear el fluido intersticial tumoral como una prometedora fuente de biomarcadores que permita el diagnóstico de pacientes afectados por un cáncer. En el presente trabajo se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica sobre la composición y relevancia funcional del fluido intersticial tumoral. Además, se han realizado análisis comparativos sobre la metodología de obtención y sobre la composición proteica del fluido intersticial de tres tipos de tumores con amplia incidencia en la actualidad. Con ello, se pretende dilucidar el posible rol que desempeñan las proteínas en la modulación del microambiente del tumor, hecho sumamente importante para desarrollar nuevas terapias antineoplásicas dirigidas a frenar el crecimiento del tumor a nivel local y la metástasis.

RESUM

El càncer és una de les principals causes de mortalitat del món actual. L'interès per descobrir nous mecanismes inherents a l'inici, desenvolupament i progressió de la neoplàsia ha portat a implementar una nova aproximació amb caràcter marcadament traslacional: l'estudi del microambient tumoral. Fins ara, els canvis en l'ambient neoplàsic s'estudiaven gràcies als components que secreten les cèl·lules cancerígenes cultivades *in vitro*, el secretoma. No obstant això, la perspectiva actual es troba orientada principalment a l'estudi de l'interstici, espai comprès entre els òrgans del cos humà, i especialment en la fase fluïda del mateix. És tal la importància que ha adquirit l'interstici que s'ha arribat a considerar com un nou òrgan. A més, els estudis que s'han realitzat fins ara remarquen la possibilitat d'emprar el fluid intersticial tumoral com una prometedora font de biomarcadors que millorin el diagnòstic dels pacients amb càncer. En el present treball s'ha dut a terme una revisió bibliogràfica sobre la composició i rellevància funcional del fluid intersticial tumoral. A més, s'han realitzat estudis comparatius sobre la metodologia d'obtenció i sobre la composició proteica de tres tipus de tumors amb àmplia incidència. Amb això es pretén esbrinar el possible paper que exerceixen les proteïnes en la modulació del microambient del tumor, fet summament important per desenvolupar noves teràpies antineoplàsiques dirigides a frenar el creixement del tumor a nivell local i la metastasi.

ABSTRACT

Nowadays, cancer is one of the leading causes of death in the world. The great interest in discovering new mechanisms, which are essential to the initiation, development and progression of neoplasia, led to the commencement of a new translational approach: the study of tumor microenvironment. Up till now, changes in neoplastic environment have been mainly studied by describing the components secreted by *in vitro* cultivated cancer cells, the secretome. However, the current perspective is focused on the study of the interstitium, the space between organs of the human body, and especially its fluid phase. Such is the importance of the interstitium that has been considered as a new organ. Thus, current studies have drawn attention to the tumor interstitial fluid as a promising source of biomarkers for diagnosis of patients affected by cancer. The present work is focused on a bibliographic review of the composition and functional relevance of tumor interstitial fluid. Furthermore, comparative studies regarding the methodology and proteome analysis of broad incidence tumors have been performed. The aim of this project is to elucidate the possible role played by proteins in the modulation of tumor microenvironment. This issue may be relevant to the development of new antineoplastic therapies in order to reduce local tumor growth and metastasis.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es el segundo tipo de enfermedad que ocasiona más muertes en el mundo (Organización Mundial de la Salud, 2017), y se prevé que su incidencia aumentará masivamente en las siguientes décadas (Instituto Nacional del Cáncer, 2017). La transformación maligna de una célula se debe a la acumulación sucesiva de una serie de pequeños cambios en el material genético (mutaciones), y/o a la alteración de los mecanismos de regulación y reparación del daño genético (Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), 2017), lo cual conduce al desarrollo de un tumor. Estos cambios dotan a las células de nuevas características, las cuales son imprescindibles para mantener su supervivencia: inmortalidad debido a la pérdida de la inhibición por contacto, desdiferenciación asociada con una pérdida de función, invasividad a tejidos colindantes, metástasis a tejidos lejanos, proliferación anormal y descontrolada, entre otras. No hay que olvidar que las alteraciones genéticas también son producidas por factores externos carcinogénicos de tipo físico, químico o biológico (Organización Mundial de la Salud, 2017). Es decir, existe una interacción subyacente entre todos los elementos y esta contribuye en gran medida al establecimiento y desarrollo del cáncer.

El núcleo del tumor reside en la célula madre cancerígena, responsable de iniciar y mantener el tumor. Hasta hace pocas décadas, la tendencia de los tratamientos antineoplásicos se dirigía especialmente a la destrucción de aquellas células cancerígenas que se dividen frecuentemente (medicina tradicional o convencional). A pesar de frenar el desarrollo del tumor y lograr la reducción de su masa, estos tratamientos no eliminan las células madre cancerígenas, lo cual promueve el reinicio del tumor. Por tanto, una de las nuevas tendencias para evitar la resistencia innata y la reincidencia del tumor es focalizar el tratamiento antineoplásico en la destrucción específica de las células madre cancerígenas (Crea, Duhagon, Farrar, & Danesi, 2011) y, en consecuencia, crear nuevas terapias personalizadas y dirigidas.

Por otro lado, es necesario recalcar que la inmensa mayoría de las estrategias y tendencias actuales se dirigen al origen del problema: la célula cancerígena. Sin embargo, no hay que olvidar que la transformación maligna, el crecimiento del tumor, la resistencia onco-farmacológica y, principalmente, la invasión y la metástasis dependen en gran medida del microambiente tumoral (Khawar, Kim, & Kuh, 2015).

El microambiente está formado por el conjunto de células, moléculas y estructuras (vasos sanguíneos, matriz extracelular, etc.) que intervienen en el crecimiento y diseminación tumoral (Instituto Nacional del Cáncer, 2018). En la definición de microambiente juega un papel muy importante el espacio intersticial o intersticio, puesto que es allí donde todos los elementos que lo constituyen pueden establecer una gran red de interacciones. El

intersticio, término que generalmente se aplica a los tejidos conectivos y de soporte del cuerpo, se encuentra localizado fuera de los vasos sanguíneos y linfáticos y de las células parenquimales (Wagner & Wiig, 2015). Este espacio físico comprendido entre células, consta principalmente de dos fases: el fluido intersticial (IF) y las moléculas estructurales que componen la matriz extracelular (MEC).

La matriz extracelular forma una red tridimensional que engloba a todos los órganos, tejidos y células del organismo. Este componente tiene funciones muy importantes, como protección, nutrición, inervación, angiogénesis, permite el establecimiento de interacciones celulares e inmunológicas, fibrosis y regeneración tisular, además de proporcionar sostén mecánico de los tejidos y activar los mecanismos epigenéticos celulares (Álvaro, Noguera-Salvá, & Fariñas-Guerrero, 2010). Una alteración de las propiedades físicas de la matriz extracelular debido, por ejemplo, a una interacción entre los fibroblastos estromales y las células malignas, contribuye a la progresión del tumor (Spill, Reynolds, Kamm, & Zaman, 2016).

El fluido intersticial contiene una gran cantidad de moléculas disueltas (nutrientes, sustancias de desecho, proteínas, lípidos, enzimas, etc.) procedentes de las células o de los procesos de intercambio que se llevan a cabo entre las células y los capilares sanguíneos, las cuales modulan la respuesta inmune (Wagner & Wiig, 2015). Es destacable el hecho de que los procesos tumorales modifican la composición del fluido intersticial y alteran la dinámica de las interacciones entre todos los elementos que lo constituyen. Hasta ahora, este componente del microambiente no ha sido casi considerado en los estudios. Sin embargo, el fluido intersticial tumoral refleja fielmente las condiciones fisiológicas y patológicas del tejido afectado (Celis et al., 2004), hecho más que suficiente para convertirlo en uno de los principales focos de estudio en el ámbito de la clínica del cáncer como una innegable fuente de biomarcadores.

2. OBJETIVOS

El contenido del presente trabajo se basa en una revisión bibliográfica que permita estudiar todos aquellos aspectos inherentes a la temática tratada: el fluido intersticial tumoral.

El primer objetivo es revisar en la literatura la importancia del microambiente celular, en concreto, el fluido intersticial tumoral, para entender el comportamiento de las células cancerígenas.

En segundo lugar, se pretende realizar un estudio comparativo de la composición del fluido intersticial en distintos tumores sólidos, e intentar correlacionar los cambios observados con la agresividad tumoral y la metástasis, o la resistencia onco-farmacológica.

Por último, se determinará si el tipo de metodología de obtención del fluido intersticial tumoral influye en la composición del mismo, hecho sumamente importante para afinar al máximo el diagnóstico del paciente.

3. METODOLOGÍA EMPLEADA EN LA REVISIÓN

La metodología empleada en la búsqueda de los artículos que contienen información general y suficiente para caracterizar la temática tratada, el fluido intersticial, se ha realizado fundamentalmente en tres bases de datos: *Web of Science*, *PubMed* y *Scopus*. Sin embargo, es necesario destacar que la mayoría de los artículos empleados en la revisión bibliográfica han sido obtenidos a partir de las dos primeras bases de datos.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, en un principio la búsqueda bibliográfica estaba dirigida a la caracterización general del fluido intersticial normal (NIF). No obstante, lo que realmente interesaba es el fluido intersticial tumoral (TIF). Por ello, con el objetivo de ampliar al máximo el marco de información disponible para realizar el presente trabajo, se han realizado búsquedas en diversas páginas web de organismos oficiales como el *Instituto Nacional del Cáncer (NIH)*, *Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)*, *American Cancer Society (ACS)*, *American Association for Cancer Research (AACR)* y el *Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)*. En este último organismo citado, el motor de búsqueda se basó en localizar artículos de revistas sobre el tema tratado a partir de las bases de datos bibliográficas del *CSIC*, en concreto las revistas de *Biomedicina (IME)* y las revistas de *Ciencia y Tecnología (ICYT)*. Sin embargo, no se tuvo prácticamente éxito. Por ello, se utilizaron otros buscadores web de artículos y revistas científicas revisadas: *BioMed Central (BMC)*, *Future Medicine*.

Durante todo el proceso de búsqueda bibliográfica se han empleado palabras clave y sinónimos para contextualizar la temática tratada, como *interstitial fluid (IF)*, *tumor interstitial fluid (TIF)*, *microenvironment*, *metastasis*, *cancer*, *proteome analysis*, etc. además de utilizar directamente las siglas *IF* o *TIF*. Con el objetivo principal de afinar al máximo el número de artículos relevantes encontrados, la búsqueda no solo se ha realizado en inglés, sino que, en algunas ocasiones, también se ha empleado el castellano en bases de datos hispanas como la del *CSIC*.

Por otro lado, también es importante recalcar la necesidad de realizar diferentes combinatorias entre las palabras clave empleadas, así como la utilización de operadores booleanos como *AND*, *OR* y *NOT*. Este tipo de estrategia de búsqueda fue empleada en las bases de datos mencionadas anteriormente para encontrar artículos científicos centrados en el TIF de un tipo de neoplasia concreta y que además, contuvieran listas del proteoma tumoral de interés para el posterior trabajo de meta-análisis. Por ejemplo, se introdujeron los términos *TIF proteome AND breast cancer AND microenvironment analysis*.

Dado que el meta-análisis se encuentra orientado hacia tres tipos de comparaciones (comparación del mismo tumor, comparación entre métodos de obtención y comparación de tumores diferentes) de TIF de neoplasias malignas de pacientes, la búsqueda bibliográfica se centró en un primer momento en el cáncer hepatocelular y en el cáncer de mama, destinando este último para la comparación de las técnicas de obtención de TIF. Sin embargo, tras una exhaustiva búsqueda de las listas de dichos artículos no se logró encontrar ninguna relacionada con el cáncer de mama y con otra técnica diferente a la de elución. Como último recurso, se decidió buscar en las bases de datos de *Google Académico* y *PubMed* introduciendo otros términos de búsqueda como *human breast cancer* y variando la técnica de obtención de TIF, así como a partir de la bibliografía de otros artículos empleados en la revisión. Tras no obtener los resultados deseados para la comparación de las metodologías de obtención, se decidió reorientar la búsqueda hacia otro tipo de cáncer común en mujeres, el cáncer de ovario.

La comparación de las listas que contienen información sobre el proteoma tumoral se realizó a partir de funciones específicas de Excel de detección de duplicados. Para ello, se tuvo que unificar previamente el código de acceso asociado a cada una de las proteínas de la lista al de la base de datos de *UniProt*. Posteriormente, tras obtener un número de proteínas coincidentes en los tres tipos de comparaciones, se emplearon diagramas de Venn para reflejar visualmente los resultados coincidentes.

Para finalizar el proceso de meta-análisis se empleó la base de datos de *Gene Ontology Consortium* (GO) con el objetivo de caracterizar lo máximo posible el proteoma tumoral coincidente de los tres tipos de cáncer comparados (carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario y cáncer de mama) en relación a los procesos biológicos, componente celular, función molecular desempeñada, y vías del reactoma. Esta base de datos permite asociar el listado de proteínas proporcionado al conjunto de proteínas humanas de referencia que se encuentran anotadas en los grupos de clasificación mencionados anteriormente. Para ello, se utilizó el sistema de clasificación PANTHER de GO. El resultado de la clasificación muestra el porcentaje de proteínas del listado analizado que se esperaba encontrar relacionado en cada proceso biológico, celular, etc. Asimismo, también se refleja el porcentaje de enriquecimiento en función de si el número de proteínas del listado encontradas es superior (+) o inferior (-) a las esperadas, teniendo en cuenta siempre dos parámetros estadísticos: P-value y False Discovery Rate (FDR). Todo ello, permitió plantear relaciones entre los proteomas tumorales del fluido intersticial, hecho que contribuyó a entender más profundamente el desarrollo de los procesos neoplásicos.

4. RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA

La búsqueda del material bibliográfico empleado para realizar el presente trabajo, ha permitido demostrar la importancia del tema tratado hasta la actualidad, el fluido intersticial tumoral. La *Figura 1* muestra que el número de publicaciones científicas sobre este tema concreto ha sido creciente y continua a lo largo de los años. Es necesario destacar que existen publicaciones anteriores a 1990, sin embargo, no son muy relevantes debido a que el número de publicaciones ha sido escaso e intermitente.

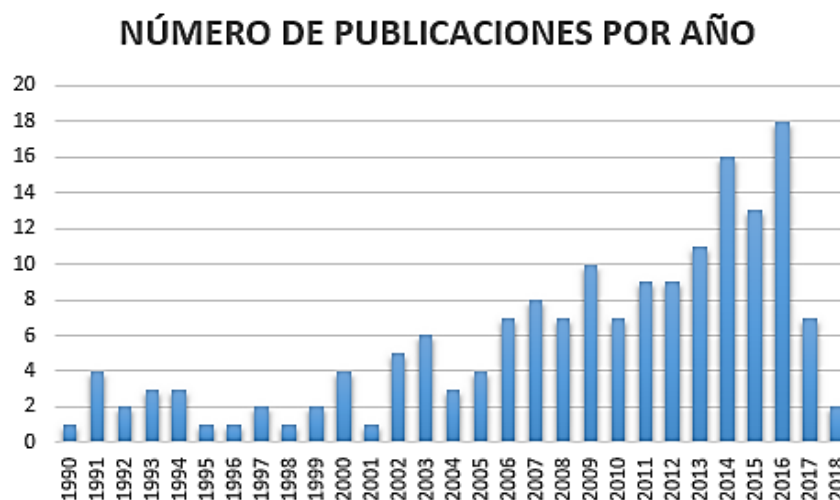


Figura 1: Número de publicaciones por año específicas sobre “tumor interstitial fluid” (TIF) descritas en la base de datos de Web of Science.

La relevancia científica o el factor de impacto científico-social de estas 167 publicaciones específicas referidas a “*tumor interstitial fluid*” se puede justificar a partir del número de citas por año (*Figura 2*) y a partir del índice-h. Este último parámetro relaciona el número de publicaciones con el número de citas, siendo en este caso de 37.

En contraste con lo anteriormente mencionado, la utilización de los términos “*interstitial fluid*” AND *tumor* para la búsqueda de publicaciones en *Web of Science* dio como resultado un mayor número de publicaciones, en concreto 1330. Esto se debe a que estas caracterizan únicamente el fluido intersticial y lo relacionan con las neoplasias, aunque no tan específicamente como las referidas propiamente al fluido intersticial tumoral. Sin embargo, es importante destacar que en la última década el número de publicaciones y citas anuales también aumenta de manera exponencial.



Figura 2: Número de citas por año específicas sobre “*tumor interstitial fluid*” (TIF) descritas en la base de datos de *Web of Science*.

Tal y como muestra la *Figura 3*, la mayoría de documentos publicados sobre el TIF se corresponden con artículos y revisiones. No obstante, también se pueden encontrar otros tipos de documentos sobre el tema (correcciones, capítulos de libros, notas, etc.), aunque en menor medida.



Figura 3: Tipos de documentos específicos sobre “*tumor interstitial fluid*” (TIF) descritos en la base de datos de *Web of Science*.

Casi la totalidad de las publicaciones empleadas para la caracterización general del fluido intersticial pertenecen a la última década, lo cual es bastante significativo. Hasta ahora el estudio del secretoma constituía la principal línea de investigación dirigida al análisis del microambiente de los procesos neoplásicos. Sin embargo, en este último periodo la investigación oncológica ha ampliado sus barreras y ha tomado un nuevo rumbo hacia la detección de biomarcadores específicos en el fluido intersticial tumoral.

A pesar de este giro novedoso, cabe destacar que el proceso de búsqueda de publicaciones sobre el TIF de un tipo de neoplasia concreta ha sido costoso. Para facilitar el proceso de búsqueda y selección de los mismos, se realizaron consultas sobre los tipos de cáncer más agresivos o en páginas web oficiales sobre cáncer: *SEOM*, *NIH*, etc. entre otras mencionadas en el apartado anterior. Así pues, se escogieron tres tipos de cáncer para obtener las listas para la comparación: carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario y cáncer de mama.

La búsqueda de tres artículos que caracterizaran el fluido intersticial tumoral del carcinoma hepatocelular se realizó inicialmente en la base de datos de *Web of Science* empleando las palabras *TIF hepatocelular carcinoma*, y se obtuvieron 20 resultados. Sin embargo, fue necesario acotar la búsqueda, ya que la mayoría de ellos no contenían la información deseada. Por ello, se introdujeron las mismas palabras clave en *PubMed* obteniendo un máximo de 6 artículos. Dos de los tres artículos escogidos habían sido publicados recientemente y de manera consecutiva (2016 y 2017), mientras que el tercero era más algo más antiguo (2011). Además, es interesante destacar que dos de los tres artículos seleccionados compartían prácticamente la totalidad de los autores. Estos dos aspectos mencionados son bastante relevantes puesto que, por un lado, las publicaciones recientes subrayan la importancia social sobre este tipo de cáncer, mientras que, por otro lado, el hecho de tener en común tantos autores demuestra la gran actividad del grupo de investigación sobre este tipo de neoplasia.

La comparación de la efectividad de las técnicas empleadas en la obtención del fluido intersticial tumoral, se centró en un primer momento en el cáncer de mama. Sin embargo, se descartó este tipo de comparación de métodos en el cáncer de mama ya que todos los estudios localizados habían sido realizados con el método de elución, y el único que se encontró sobre microdiálisis se efectuó en ratones. A pesar de utilizar diferentes combinatorias en los términos de búsqueda (*human interstitial fluid AND breast cancer*, etc.) así como diversas bases de datos (*Web of Science*, *Google Scholar*) no se obtuvieron los resultados deseados. En consecuencia, se reorientó la búsqueda bibliográfica hacia el cáncer de ovario. En *PubMed* se introdujeron las palabras *tumor interstitial fluid AND ovarian cancer proteome analysis*, obteniendo 120 resultados que

permitieron escoger los dos artículos más relevantes descritos con técnicas distintas. Cabe destacar que ambos estudios se realizaron el mismo año (2011), hecho que contribuye positivamente en la comparación, pues permite comparar la eficacia de la técnica empleada dentro del mismo marco temporal.

5. CONTENIDO DE LA REVISIÓN

El espacio intersticial o intersticio comprende un microambiente altamente dinámico, ya que contiene multitud de elementos, tanto en su fase líquida como en su fase sólida. La gran preocupación generada por una de las enfermedades más actuales, el cáncer, ha hecho que la investigación científica tome un nuevo rumbo hacia la identificación de posibles biomarcadores tumorales en este microambiente.

El presente trabajo se centra en la caracterización de la fase líquida del intersticio, y especialmente, en el fluido intersticial tumoral (TIF). En primer lugar, se describirán las propiedades físicas junto con la composición del mismo para poder comprender su rol en la regulación de los procesos que gobiernan la homeostasis del organismo, centrandose más adelante su estudio en los procesos neoplásicos. Seguidamente, se detallarán las técnicas de aislamiento y obtención del TIF, y finalmente se llevará a cabo una comparación a nivel proteico de diversos tipos de cáncer.

5.1. CARACTERIZACIÓN DEL FLUIDO INTERSTICIAL NORMAL Y TUMORAL

5.1.1. Propiedades físicas y formación

Las propiedades de la pared capilar, la presión hidrostática y la concentración de proteínas en los vasos sanguíneos y el intersticio (Wagner & Wiig, 2015) son factores clave que explican los principios básicos de la dinámica de intercambio de fluidos y, en consecuencia, la formación del fluido intersticial. Asimismo, el intercambio de fluido a través de la membrana semipermeable capilar depende principalmente de dos fuerzas opuestas: la presión hidrostática (que promueve la salida del fluido de los capilares) y la presión osmótica coloidal o presión oncótica (que se opone a la salida de fluido). Todos estos factores pueden verse reflejados en la ecuación que formuló Starling hace más de un siglo:

$$J_v = L_p \cdot A \cdot (P_c - P_{if}) - \sigma \cdot (COP_c - COP_{if})$$

Donde J_v representa la capacidad de filtración neta (volumen de flujo de fluido); L_p hace referencia a la conductividad hidráulica capilar; A es el área superficial disponible para la filtración; P_c y P_{if} son las presiones hidrostáticas capilar y del fluido intersticial,

respectivamente; σ es el coeficiente de reflexión osmótica capilar; COP_c y COP_{if} representan las presiones coloidales u oncóticas capilar e intersticial, respectivamente.

Sin embargo, la ecuación de Starling puede verse afectada en procesos inflamatorios y tumorales debido al gran dinamismo que existe en el microambiente de los mismos. Comprender las variaciones de los términos que intervienen en la ecuación de Starling y las causas de las mismas, es fundamental para definir nuevos tratamientos farmacológicos, modificar los actuales o mejorar su suministro. Se sabe que P_{if} es el principal factor que determina la formación del fluido intersticial, y además, este juega un papel sumamente importante en los procesos anteriormente citados.

Del mismo modo, las diferencias en la estructura y la fisiología de los capilares normales y tumorales, y la falta de drenaje linfático en el tumor permiten explicar los siguientes hechos. La aparición de edema en procesos de lesión e inflamación tisular es una consecuencia directa de la reducción de P_{if} , la cual se encuentra asociada a la desnaturalización del colágeno (Wiig & Swartz, 2012). En relación a este último aspecto, es interesante destacar que tanto las integrinas β_1 de unión al colágeno, especialmente las integrinas $\alpha_2\beta_1$ y $\alpha_1\beta_1$, como PDGF-BB juegan un papel esencial en la regulación fisiológica del estado inflamatorio y de P_{if} . En cambio, los tumores sólidos presentan un incremento notable en la P_{if} (10-40 mmHg) en comparación con los tejidos sanos de piel y músculo (-2 a 0 mmHg). Igualmente se ha observado un incremento no homogéneo de la presión TIF en el centro del tumor respecto a la periferia, hecho que dificulta la entrada por convección de los fármacos antineoplásicos (Khawar et al., 2015).

Por otra parte, P_{if} juega un papel importante en el proceso de angiogénesis. Las células del endotelio tumoral forman nuevos vasos anormales y alteran el comportamiento de los pericitos. Estos pericitos disfuncionales depositan componentes de la matriz extracelular en la región perivascular, generando una membrana basal defectuosa (Baronzio, Parmar, Baronzio, & Kiselevsky, 2014). Además, la producción de factores pro-angiogénicos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factores vasoactivos como la bradicinina, óxido nítrico y peroxinitritos, y la disposición no jerárquica de los nuevos vasos formados promueven la permeabilización del endotelio vascular tumoral y, consecuentemente, incrementan el volumen de TIF.

Asimismo se puede afirmar que en los procesos tumorales, la estructura y el contenido de la matriz extracelular pueden verse modificados. En este sentido, las células tumorales destruyen la matriz extracelular preexistente, pero a su vez promueven la formación de una nueva matriz alterada que modifica las propiedades del intersticio. Estos cambios son imprescindibles para iniciar el proceso de metástasis, pues permiten la movilidad de las células cancerígenas hacia una nueva localización, además de modificar la P_{if} .

5.1.2. Composición y proteoma

El intersticio, espacio comprendido entre las células y la membrana de los vasos sanguíneos y linfáticos, se compone principalmente de una fase fluida (IF) y de moléculas estructurales insolubles que forman la matriz extracelular (MEC). Cada una de estas fases está formada por diferentes elementos y sustancias que definen, inevitablemente, el microambiente.

Por un lado, la fase fluida contiene proteínas plasmáticas y electrolitos, además de otras sustancias producidas localmente. Por otro lado, la MEC consta de elementos que intervienen en la modulación de las propiedades biomecánicas del intersticio (soporte estructural, elasticidad, control de la presión osmótica, etc.) como glicosaminoglicanos (GAGs), redes de colágeno y diversas proteínas (proteínas de adhesión, elastina, trombospondinas y lamininas) (Wiig & Swartz, 2012).

No obstante, como es de esperar, la composición y estructura del intersticio varía en procesos patológicos y tumorales, y además, esta también depende del tipo de órgano o localización anatómica del mismo.

5.1.2.1. Importancia de los componentes no celulares en el intersticio tumoral como biomarcadores

Los GAGs (ácido hialurónico, dermatán sulfato, condroitin sulfato, heparina, heparán sulfato y queratán sulfato) aportan una importante carga negativa al intersticio, modulan el pH del mismo, restringen el flujo de IF y mantienen el gradiente de concentración de morfógenos y factores de crecimiento (Wiig & Swartz, 2012). Todos ellos, a excepción del ácido hialurónico, se encuentran inmovilizados en el intersticio y pueden combinarse con proteínas para formar proteoglicanos (PGs).

Es interesante destacar que la acción promotora o supresora de tumores de los PGs depende de varios factores: el tipo de GAG, la proteína asociada, la localización anatómica, y del tipo, estadio y grado de diferenciación del tumor (Fjeldstad & Kolset, 2005). Esta acción moduladora de los PGs se sustenta en la capacidad de promover el cambio de estructura y organización de la MEC y, en especial, de las redes de colágeno.

La MEC tumoral presenta una gran cantidad de colágeno, cuya producción se ve estimulada por las células tumorales, al igual que de hialuronano, siendo este último el responsable de promover la invasividad y la transición epitelio-mesénquima. Sin embargo, no es común encontrar elastina en la mayoría de tumores, a excepción de tumores malignos de las glándulas salivares, algunos tumores intestinales y carcinoma de mama (Wiig & Swartz, 2012).

Asimismo, en el intersticio tumoral es común encontrar productos de degradación parcial de la MEC, como por ejemplo matriquinas, las cuales proceden de la degradación de elastina y de la membrana basal de colágeno. Estos fragmentos peptídicos regulan procesos fisiológicos, como la cicatrización de heridas, y promueven la invasión tumoral y la angiogénesis (Baronzio et al., 2012). El incremento de la permeabilidad vascular debido a la pérdida de albúmina permite encontrar otros biomarcadores tumorales en el intersticio neoplásico: vesículas de exosomas, micropartículas, péptidos señal, microRNA, y lípidos.

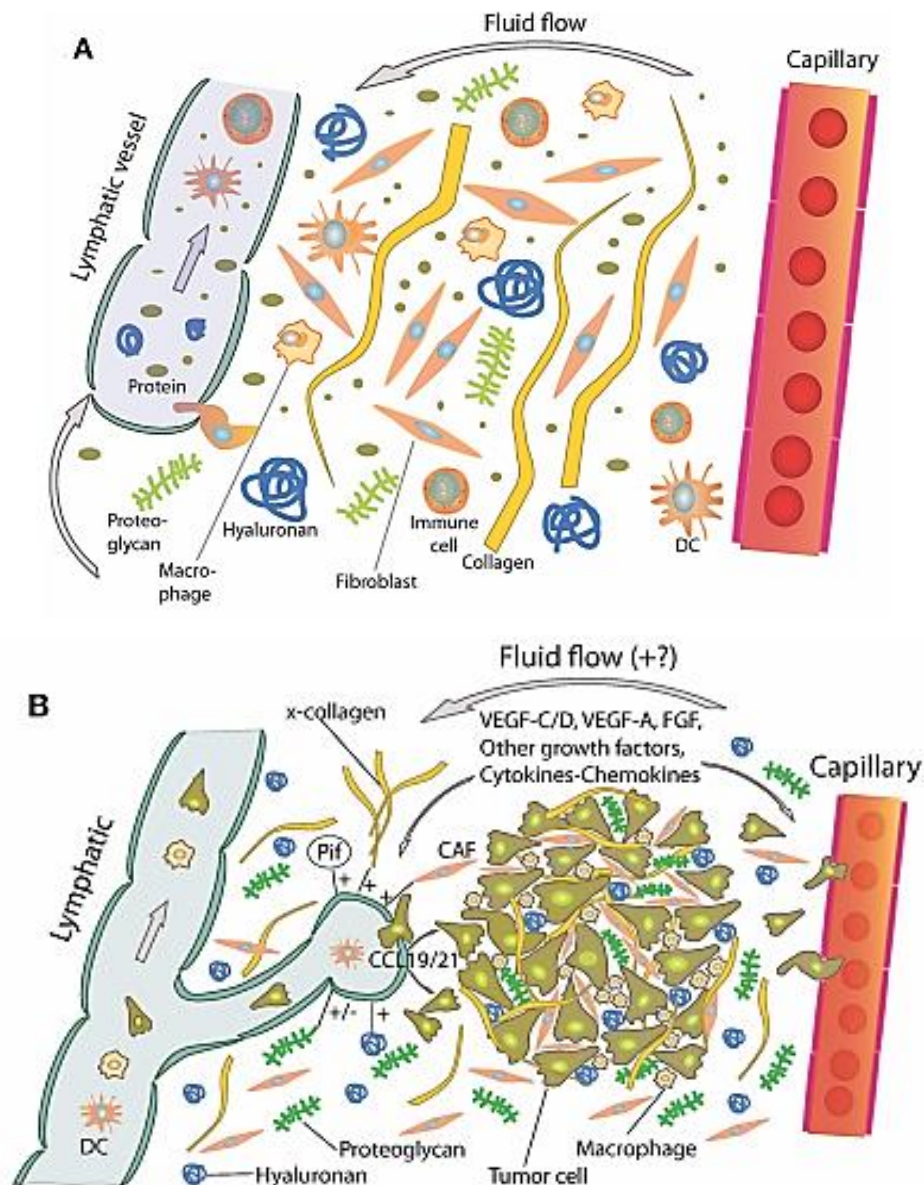


Figura 4: Componentes principales del intersticio normal (A) y tumoral (B). Interrelaciones establecidas entre los diversos elementos que modulan el microambiente. Los símbolos “+” y “-” hacen referencia al efecto que ejercen dichos elementos del microambiente en cuanto a la estimulación o inhibición de la linfangiogénesis. (Wagner & Wiig, 2015).

5.1.2.2. Importancia del componente celular en el intersticio tumoral

Tal y como se observa en la *Figura 4*, la composición del intersticio normal y tumoral es similar en cuanto a los elementos principales que lo constituyen. Sin embargo, los procesos tumorales se caracterizan principalmente por su gran dinamismo, es decir, existe también una gran participación de diversos componentes celulares que proporcionan soporte a las células cancerígenas y además, permiten definir el pronóstico del paciente (Wagner & Wiig, 2015).

No hay que olvidar que muchos de los componentes celulares están involucrados en la remodelación de la MEC tumoral, hecho imprescindible en los procesos de invasión, metástasis y angiogénesis.

Los macrófagos participan activamente en los procesos de inflamación y regeneración de tejidos y, por tanto, contribuyen en la homeostasis del organismo. Sin embargo, para que puedan desarrollar completamente su función deben pasar de un estado de reposo a un estado activo y, consecuentemente diferenciarse hacia los tipos M1 o M2. Esta diferenciación se desencadena como respuesta a la presencia de diferentes moléculas específicas que se encuentran en el microambiente.

Por un lado, el fenotipo M1 se encuentra inducido gracias a la presencia de $\text{INF-}\gamma$ y lipopolisacárido (LPS), permitiendo a los macrófagos producir otras moléculas relacionadas con funciones antitumorales, proinflamatorias y microbicidas. Por otro lado, IL-4 e IL-13 son las moléculas responsables de inducir el cambio de los macrófagos hacia el tipo M2, los cuales secretan moléculas antiinflamatorias como IL-10, $\text{TGF-}\beta$ que les permiten desarrollar funciones como la regeneración de tejidos y la angiogénesis. Sin embargo, el cambio de fenotipo de M1 a M2 también puede estar propiciado por procesos como la fagocitosis de células apoptóticas (Ochoa-Carrillo & Bravo-Cuellar, 2013), así como por la interacción bidireccional subyacente de los macrófagos y el intersticio tumoral (Wagner & Wiig, 2015).

La presencia de actividad M1 o M2 de los macrófagos asociados al tumor (TAMs) permite determinar el pronóstico del paciente, siendo este favorable cuando los TAMs poseen el fenotipo M1 y desarrollan una actividad antitumoral secretando $\text{INF-}\gamma$, IL-1 e IL-6. No obstante, se ha observado que en diversos procesos neoplásicos, como sucede en el cáncer de mama, ovario, cérvix, próstata, pulmón y melanoma (Ochoa-Carrillo & Bravo-Cuellar, 2013) los TAMs adquieren predominantemente una actividad antiinflamatoria (M2) y por tanto, el pronóstico empeora ya que producen factores proangiogénicos como VEGF-A, factor de crecimiento epidérmico (EGF), potentes inmunosupresores como la prostaglandina E2, IL-8, catepsinas, serina proteasas y metaloproteinasas (MMPs) de

tipo 1, 2, 3, 9 y 12 que contribuyen al progreso tumoral. Además, se sabe que los TAMs promueven la linfangiogénesis, que parece estar correlacionada positivamente con la tolerancia inmunológica (Wiig & Swartz, 2012), no solo estimulando la división de las células de los vasos linfáticos cuando se incorporan a la lámina endotelial, sino también a nivel molecular debido a la producción de VEGF-C y VEGF-D (Ochoa-Carrillo & Bravo-Cuellar, 2013).

Otra población celular importante para definir el pronóstico favorable del paciente son los linfocitos T CD8⁺, los linfocitos T CD4⁺ y los linfocitos T citotóxicos infiltrantes del tumor (TILs). Sin embargo, la acción antitumoral linfocitaria se ve anulada debido a la presencia de células supresoras derivadas de células mieloides (MDSCs). Por un lado, las MDSCs producen enzimas como la arginasa (ARG1) y la óxido nítrico sintasa 2 (NOS2) para suprimir la activación de los linfocitos T CD8⁺ mientras que, por otro lado, son capaces de inducir el cambio de fenotipo a M2 de los TAMs (Wagner & Wiig, 2015).

Por último, cabe destacar la importante función que desempeñan los fibroblastos en los procesos tumorales, denominándose dentro de este contexto como fibroblastos asociados a cáncer (CAFs). Además, estos tienen una gran plasticidad, puesto que su diferenciación a un fenotipo más contráctil (miofibroblasto) en los procesos neoplásicos es dependiente de la presencia de TGF- β . Su importancia radica en que estos son responsables de modular la composición de la MEC alterando su dinamismo y reorganización: incrementan la secreción de proteínas de la MEC, MMPs, factores angiogénicos como VEGF y citoquinas protumorales (Wiig & Swartz, 2012). Como consecuencia directa de la participación de los mismos, se crea un tipo de reacción de feedback positivo que contribuye en la formación de un estroma reactivo que, tal y como se ha mencionado anteriormente, recuerda en gran medida a las respuestas inflamatorias (Wiig, Tenstad, Iversen, Kalluri, & Bjerkvig, 2010).

5.1.3. Diferencias locales en órganos del fluido intersticial normal

Tal y como se ha comentado anteriormente, la composición y estructura del intersticio varía en procesos patológicos y tumorales. Además, también es lógico esperar que estas presenten diferencias según el tipo de órgano o localización anatómica del mismo. El creciente interés sobre el microambiente tumoral ha permitido localizar suficientes artículos para caracterizarlo a nivel proteómico, sin embargo, sería interesante encontrar datos relevantes sobre el fluido intersticial normal (NIF) específico de diversos órganos.

A pesar de la intensa búsqueda de información que se ha realizado sobre el NIF, no se han encontrado las publicaciones deseadas, salvo una publicación del año 1964 elaborada con modelos animales (Gullino, Clark, & Grantham, 1964). Sin embargo, este

estudio contiene datos interesantes ya que, por un lado, su objetivo se centra en la comparación del medio normal y tumoral de poblaciones celulares para establecer diferencias y relaciones entre el TIF, el flujo sanguíneo, el NIF subcutáneo, el fluido peritoneal y la linfa; y por otro lado, la comparativa no solo se centra a nivel proteómico, sino que ofrece otro amplio enfoque sobre las propiedades del fluido intersticial (color, viscosidad, contenido de glucosa, ácido láctico, urea, aminoácidos, etc.).

5.2. TÉCNICAS DE OBTENCIÓN DEL FLUIDO INTERSTICIAL TUMORAL

El contenido de los vasos linfáticos puede parecer un buen candidato para el análisis de sus constituyentes, ya que su composición representa con gran similitud el microambiente del fluido intersticial. Sin embargo, no se puede tener en cuenta debido a la pérdida de funcionalidad del drenaje de los vasos linfáticos en el tumor (Wagner & Wiig, 2015). No obstante, el estudio del fluido intersticial permite determinar, de manera cuantitativa y cualitativa, la presencia y ausencia de diversos componentes en el microambiente normal y tumoral que permitan explicar minuciosamente el estado fisiológico del paciente.

La utilización de la técnica más adecuada para cada tipo de neoplasia permitirá hallar de forma más rápida y precisa biomarcadores específicos de aquel proceso neoplásico, explicar las diferencias de agresividad entre subtipos tumorales, entender el desarrollo y progreso tumoral y, en consecuencia, adjudicar un tratamiento concreto.

5.2.1. Métodos de obtención de TIF *in vivo*

Las primeras técnicas empleadas para aislar el TIF fueron el método del globo o *balloon method*, que determina la presión del tejido y la presión TIF, el método de la aguja o también denominado método microcapilar, y el método de la cápsula. Con este último método se puede determinar la variación de la composición del TIF a medida que el tumor se desarrolla (Baronzio et al., 2014).

El método de microdiálisis, empleado originalmente para aislar IF de muestras de cerebro (Wagner & Wiig, 2015), se fundamenta en introducir un microcatéter en el tejido tumoral por el cual circula un líquido a baja velocidad. La punta del microcatéter está formada por una membrana semipermeable con un *cutoff* de peso molecular de 20-100 kDa, la cual permite la difusión pasiva de las sustancias presentes en el TIF (muchas de ellas producidas por el propio tumor) recogiénolas en el líquido dializado, que posteriormente son separadas y analizadas mediante cromatografía líquida (LC) y espectrometría de masas, respectivamente. Sin embargo, hay que tener especial cuidado en este método con la recogida de macromoléculas, ya que su concentración en el dializado es muy baja,

y por tanto no representativa. Además, se debe tener presente que la introducción del microcatéter desencadena una reacción inflamatoria que altera inevitablemente el contenido del IF recogido.

Tabla 1: Otras posibles técnicas de obtención de TIF *in vivo* (Wiig et al., 2010).

MÉTODO EMPLEADO	PRINCIPAL APLICACIÓN	VENTAJAS	DESVENTAJAS	OBSERVACIONES
Wick method	Medición de la presión oncótica y tumoral en el tejido	Medición directa	Sangrado, daño celular, reacción inflamatoria	La implantación crónica es más representativa que la aguda
Capilar de vidrio	Recolección de IF similar a edema	Simple	Recolección de tejido sano, vascular y de los márgenes del tumor	Presencia de altos niveles de enzimas intracelulares

La *Tabla 1* muestra otros tipos de métodos que son factibles para obtener IF. No obstante, el método más utilizado para conseguir IF *in vivo* es el de la ultrafiltración capilar porque es simple, permite ahorrar tiempo, es apto para obtener moléculas muy pequeñas, y la concentración de proteínas tumorales recogida refleja fielmente la concentración de las mismas en el tejido (Wagner & Wiig, 2015). En esta técnica, la extracción del IF o TIF se basa en aplicar una presión negativa a una sonda (Baronzio et al., 2014), la cual posee una membrana con un *cutoff* molecular de 400 kDa que permite la recogida de proteínas que constituyen el secretoma (Wiig et al., 2010).

5.2.2. Métodos de obtención de TIF a partir de muestras de tejido fresco

Es común emplear el método de centrifugación para obtener biomarcadores proteicos representativos del TIF de tumores ováricos metastásicos o no metastásicos y tumores inflamatorios (Baronzio et al., 2014), así como para el análisis del secretoma tumoral. Sin embargo, es necesario destacar que el hecho de someter un tejido biopsiado con alto contenido en colágeno a altas fuerzas G restringe la eliminación de macromoléculas (Wiig & Swartz, 2012), por tanto esta técnica no es apta para todos los tejidos. Además, es necesario validar la composición del fluido intersticial obtenido para descartar la posible presencia de contaminantes celulares.

El método de elución del tejido tiene especial interés para aislar TIF, ya que permite realizar un buen análisis proteómico a partir de una gran variedad de muestras de tejidos. Esta técnica se fundamenta en cortar en pequeños fragmentos el tejido biopsiado, lavarlos e incubarlos con un buffer salino (PBS) durante el tiempo requerido y finalmente centrifugar el contenido. El principal problema que puede tener esta técnica radica en la dudosa procedencia de los péptidos y proteínas a analizar, puesto que el hecho de cortar el tejido tumoral puede liberar componentes intracelulares que contaminen el fluido recogido (Wagner & Wiig, 2015).

La última técnica destacada para analizar TIF es la cromatografía líquida capilar acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS), pudiendo ser empleada para detectar la presencia de contaminantes, como proteínas intracelulares, en el TIF obtenido de muestras de tejidos por alguno de los métodos descritos anteriormente, ya sean *in vitro* o *in vivo*. Con este método se ha realizado un interesante estudio a partir de muestras congeladas y no congeladas de uno de los cánceres femeninos más letales, el carcinoma de ovario (Haslene-Hox et al., 2011) que se utilizará posteriormente en el meta-análisis.

5.3. COMPARACIÓN PROTEICA

La incansable búsqueda de una solución para la cura del cáncer ha generado un nuevo enfoque en la investigación científica: la identificación de biomarcadores proteicos específicos en el intersticio tumoral. Esta aproximación, marcadamente traslacional, ha surgido de la combinación de técnicas de la proteómica y la bioinformática, pues ambas permiten analizar en profundidad los procesos neoplásicos, ofrecer un diagnóstico temprano y acertado del paciente, y además promover el desarrollo de fármacos específicos.

Hasta ahora, las investigaciones apuntaban hacia la identificación de posibles biomarcadores tumorales en plasma/suero y otros fluidos biológicos (líquido ascítico, linfa, aspirados mamarios, etc.). Indudablemente, este objetivo se ha conseguido. Sin embargo, la complejidad que caracteriza a dichos fluidos dificulta en gran medida la búsqueda de nuevos biomarcadores. El TIF, como medio de comunicación entre las células de los tejidos y órganos afectados y la circulación sanguínea y linfática, contiene moléculas específicas que no solo son secretadas por las células tumorales, sino que también proceden de células estromales y del sistema inmunitario, componentes de la MEC, etc. Además, este rico microambiente acaba con el problema de la baja especificidad y sensibilidad que se obtenía tras analizar los otros fluidos biológicos, ya que las proteínas asociadas al proceso neoplásico no se encuentran tan diluidas en el TIF. No obstante, no hay que olvidar que esta nueva aproximación clínica puede completarse con el análisis de los fluidos anteriormente mencionados.

Teniendo en cuenta todos estos aspectos, se han escogido tres de los cánceres más frecuentes y con elevados índices de mortalidad en los que se analizará el contenido proteico tumoral presente en sus respectivos fluidos intersticiales. En primer lugar, se realizará el estudio comparativo de tres TIF de carcinoma hepatocelular para comparar temporalmente la evolución de la técnica de obtención del TIF. En segundo lugar, se comparará la efectividad en la obtención de posibles biomarcadores proteicos utilizando dos TIF de carcinoma de ovario obtenido mediante dos técnicas diferentes. Por último,

con el objetivo de identificar biomarcadores comunes que puedan justificar metástasis, agresividad, etc., se realizará una triple comparación del proteoma tumoral de los dos tumores sólidos analizados y el cáncer de mama, todos ellos obtenidos a partir de la misma técnica.

Es importante destacar que, actualmente no se ha realizado ningún estudio comparativo similar (ni en relación a las técnicas, ni entre TIF de diferentes procesos neoplásicos), sino que únicamente se han llevado a cabo análisis proteómicos comparativos entre NIF u otros fluidos y TIF de una neoplasia concreta. Por lo tanto, los resultados y conclusiones obtenidos en el meta-análisis son significativos dentro del contexto del análisis del microambiente tumoral.

5.3.1. Evolución temporal de la técnica

El carcinoma hepatocelular (HCC) se considera el cáncer hepático de origen primario con mayor tasa de mortalidad en el mundo, menos del 50% de los pacientes sobreviven en un marco temporal de 5 años. La aparición de este tipo de tumor maligno, que afecta a personas adultas de ambos sexos, se encuentra altamente relacionada con pacientes que presentan cirrosis o hepatitis B y C crónicas.

Hasta ahora, la detección temprana de la patología neoplásica se ha llevado a cabo mediante la identificación de niveles elevados de ciertos biomarcadores en plasma/suero, principalmente alfa-fetoproteína (AFP) y des-gamma carboxiprotrombina (DGP). Sin embargo, estos biomarcadores no permiten discriminar HCC de las otras patologías hepáticas no neoplásicas. Esto repercute de manera negativa, ya que en muchas ocasiones el cáncer se encuentra muy avanzado y cuando este se detecta, el pronóstico del paciente es poco favorable e irreversible.

Teniendo en cuenta estos aspectos, se pretenden encontrar biomarcadores proteicos específicos en el TIF que permitan discriminar sin ninguna duda la patología neoplásica descrita. En la *Figura 5*, se compara el perfeccionamiento de la técnica de elución para la obtención de TIF de tres listas diferentes en función de la cantidad de posibles biomarcadores coincidentes en un determinado margen temporal.

En la primera lista que se utilizó para la comparación se emplearon muestras de TIF y NIF de 8 pacientes con HCC (Hsieh et al., 2011). Además, es necesario destacar que en esta los autores emplearon primero dos técnicas proteómicas cuantitativas (2D-DIGE y arrays de anticuerpos) para detectar la expresión proteica diferencial, y seguidamente la espectrometría de masas para la identificación de dichos biomarcadores detectados (MALDI-TOF). No obstante, los dos artículos restantes, (Sun et al., 2016) y (Zhang et al., 2017), empleaban técnicas proteómicas más actuales. Ambos utilizaron la técnica del

iTRAQ, fraccionamiento por LC y finalmente análisis por MS/MS. El artículo publicado en 2016 empleó muestras de TIF y NIF de 6 pacientes con HCC y iTRAQ de 4-plex, mientras que en el más reciente se analizaron muestras de TIF y NIF de 16 pacientes con iTRAQ de 8-plex.

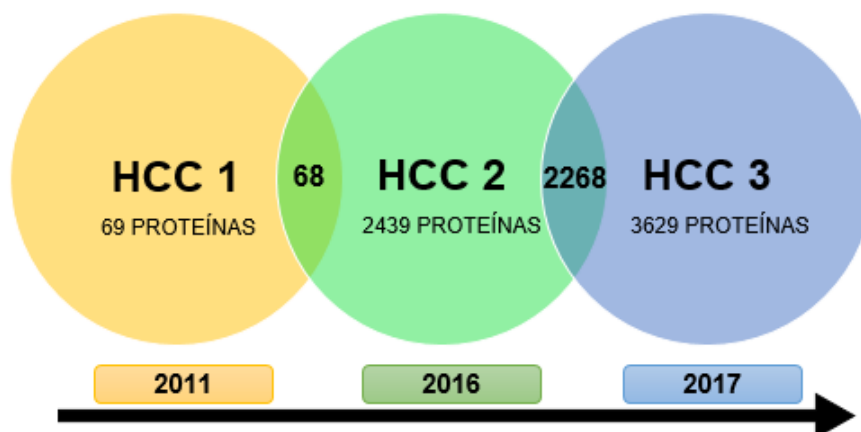


Figura 5: Diagrama de Venn lineal en el que se muestra la evolución temporal de la técnica de elución en la obtención de muestras de TIF de HCC. Las listas de TIF comparadas proceden de los artículos citados a continuación: HCC 1 (Hsieh et al., 2011), HCC 2 (Sun et al., 2016), HCC 3 (Zhang et al., 2017).

Es importante reclacar que antes de realizar las comparaciones fue necesario refinar la lista de proteínas de TIF correspondiente al año 2011 (contenía inicialmente 104 proteínas tumorales), ya que algunas isoformas de la misma proteína estaban identificadas con el mismo código alfa numérico de UniProt y por tanto aparecían como duplicados.

En cuanto a los resultados que se muestran en la *Figura 5* cabe destacar que cada estudio posterior contiene prácticamente la totalidad de proteínas tumorales del anterior. En concreto, el estudio correspondiente al 2016 contiene casi la totalidad de proteínas tumorales (98'6%) de las del estudio de 2011, y más de la mitad de las del 2017 (62'5%).

Finalmente, con el objetivo de facilitar las comparaciones posteriores sobre TIF de diferentes cánceres, se llevó a cabo la comparación conjunta de los tres listados de proteínas de TIF de HCC analizados. De esta manera, se generó un nuevo listado de HCC que contiene únicamente las 67 proteínas coincidentes. Los resultados de dicha comparación se muestran visualmente en el diagrama de Venn (*Figura 6*).

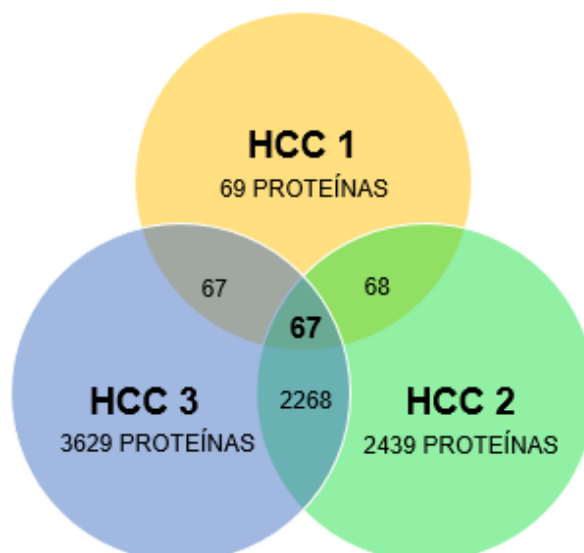


Figura 6: Diagrama de Venn en el que se muestran las proteínas coincidentes entre los tres listados de TIF de HCC. Las listas de TIF comparadas proceden de los artículos citados a continuación: HCC 1 (Hsieh et al., 2011), HCC 2 (Sun et al., 2016), HCC 3 (Zhang et al., 2017).

5.3.2. Metodología de obtención del TIF

El cáncer epitelial o carcinoma de ovario, neoplasia ginecológica maligna más letal, ocupa la sexta posición en el ranking mundial (Asociación Española Contra el Cáncer, 2018). Aunque se detecta comúnmente en mujeres de edad media no es extraño encontrarlo en mujeres jóvenes, cuya supervivencia se encuentra estrechamente influenciada por el tipo histológico (seroso, adenocarcinoma, mucinoso y germinal). La detección temprana de esta neoplasia a partir de muestras de TIF es un reto que contribuirá a mejorar tanto la supervivencia como la calidad de vida de las mujeres afectadas.

La *Figura 7* muestra el número de proteínas comunes de TIF de carcinoma de ovario obtenidos por dos técnicas diferentes, elución (Hoskins et al., 2011) y centrifugación (Haslene-Hox et al., 2011). Ambos artículos emplearon muestras de tejido tumoral sin necrosis o inflamación aparente, y las pacientes no recibieron quimioterapia ni radioterapia. Asimismo, el procedimiento proteómico de análisis empleado en ambos fue LC-MS/MS.

En relación a los resultados obtenidos en la comparación, se observa que en ambos métodos coinciden un número relativamente alto de proteínas tumorales (284 proteínas). Sin embargo, esta cantidad supone un porcentaje de proteínas coincidentes de solo el 50% (elución) y del 37% (centrifugación). Sorprendentemente, se obtiene una mayor cantidad de proteínas tumorales en el TIF obtenido por centrifugación, a pesar de que la técnica de elución sea la más descrita por la literatura y utilizada en los estudios.

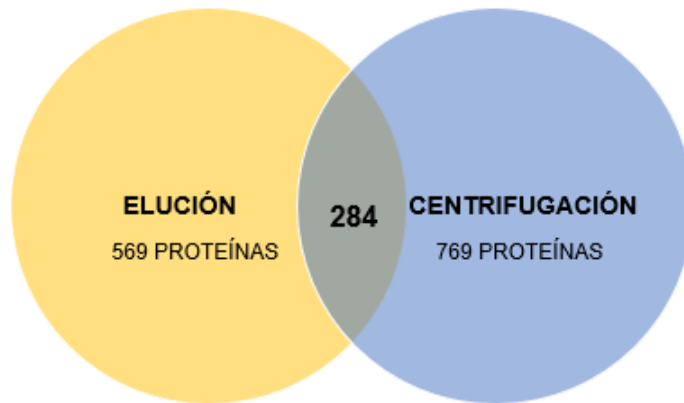


Figura 7: Diagrama de Venn en el que se muestran las proteínas coincidentes entre los tres listados de TIF de carcinoma de ovario. Las listas de TIF comparadas proceden de los artículos citados a continuación: elución (Hoskins et al., 2011) y centrifugación (Haslene-Hox et al., 2011).

5.3.3. Carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario y mama

El cáncer de mama es el principal tumor maligno que causa la muerte de miles de mujeres, tanto en España como a nivel mundial (Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM)., 2017). Es crucial, pero insuficiente, realizar diversos estudios de detección temprana (mamografía, ecografía, etc.) en mujeres que presentan ciertos factores de riesgo. Por tanto, el desarrollo de nuevos métodos más sensibles que complementen las pruebas mencionadas contribuye a frenar la progresión del cáncer en dichos grupos. En particular, se propone el análisis del microambiente tumoral como principal estrategia de *screening*.

Con el objetivo de determinar si existen proteínas del fluido intersticial tumoral comunes que justifiquen la persistencia del cáncer o incluso una posible metástasis, se analizaron tres listas de TIF obtenidas por elución de las neoplasias malignas seleccionadas: cáncer de mama (Gromov et al., 2010), carcinoma de ovario (Hoskins et al., 2011) y carcinoma hepatocelular. Tal y como se mencionó en el apartado 5.3.1., la lista de TIF de esta última neoplasia contiene únicamente las proteínas tumorales comunes a los tres HCC anteriormente analizados. Asimismo, es conveniente mencionar que fue necesario eliminar las variantes de proteínas repetidas de la lista de TIF de cáncer de mama (que contenía inicialmente 110 proteínas) para evitar errores durante la comparación que conllevarían a una mala interpretación de los resultados. En la *Figura 8* se muestra el resultado tras la comparación de dichas listas.

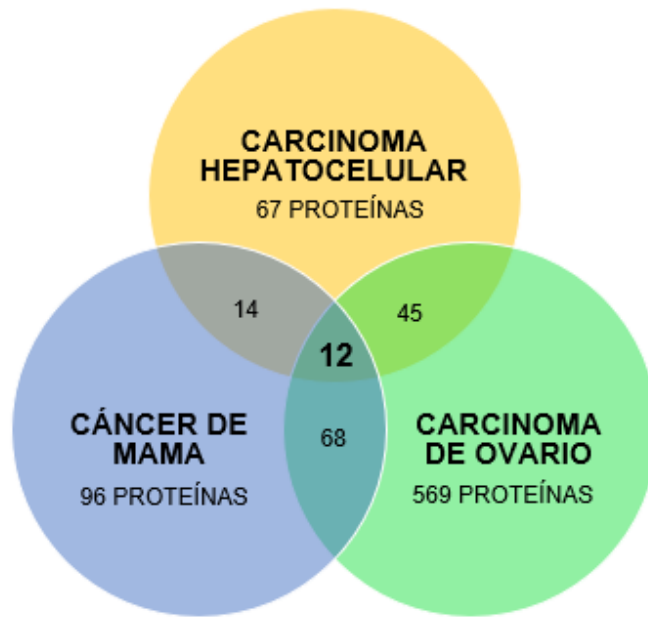


Figura 8: Diagrama de Venn en el que se muestran las proteínas coincidentes entre los tres listados de TIF obtenidos por elución de tres cánceres diferentes. Dos de las listas de TIF comparadas proceden de los artículos citados a continuación: cáncer de mama (Gromov et al., 2010) y carcinoma de ovario (Hoskins et al., 2011). Se empleó la lista de TIF de carcinoma hepatocelular generada tras la comparación de los tres listados de TIF del apartado 5.3.1.

Es interesante destacar que las 12 proteínas comunes representan un 12'5%, 2'1% y 17'9% de proteoma tumoral común en el cáncer de mama, carcinoma de ovario y carcinoma hepatocelular, respectivamente. No obstante, como es de esperar, este porcentaje se incrementa al analizar por separado dos de los tipos de cáncer. Por ejemplo, las 68 proteínas coincidentes de los dos cánceres ginecológicos representan un 70'8% del total de proteínas del cáncer de mama (96 proteínas) y un 12% del total en el carcinoma de ovario (569 proteínas). El mismo criterio comparativo se puede aplicar al resto de combinaciones restantes: 14'6% y 20'9% entre cáncer de mama y HCC, y 7'9% y 67'2% entre carcinoma de ovario y HCC, respectivamente.

Tabla 2: Lista de las 12 proteínas coincidentes en los tres tipos de cánceres analizados.

UniProt entry	Protein name
P31948	Stress-induced-phosphoprotein 1
P60709	Actin, cytoplasmic 1
O75874	Isocitrate dehydrogenase [NADP] cytoplasmic
P30101	Protein disulfide-isomerase A3
P60174	Triosephosphate isomerase
P30041	Peroxiredoxin-6
P78417	Glutathione S-transferase omega-1
P32119	Peroxiredoxin-2
Q06830	Peroxiredoxin-1
O00299	Chloride intracellular channel protein 1
P06753	Tropomyosin alpha-3 chain
Q14019	Coactosin-like protein

Finalmente, se analizaron las 12 proteínas comunes a los tres tipos de cánceres estudiados (*Tabla 2*) con el objetivo de determinar si estas desempeñan funciones claves generales o específicas en el proceso de transformación, invasión, resistencia oncofarmacológica, etc. Para ello, se empleó la herramienta *PANTHER* de la base de datos de *Gene Ontology Consortium* y se clasificaron en función de su proceso biológico, componente celular, función molecular y vías de reactoma en las que participan. En la *Figura 9* se muestran únicamente los resultados estadísticamente significativos de dicha clasificación ($FDR < 0.05$).

A	Homo sapiens (REF)	upload 1 (Hierarchy) NEW! (?)					
PANTHER GO-Slim Molecular Function	#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
antioxidant activity	35	4	.02	> 100	+	4.92E-09	9.45E-07
peroxidase activity	25	3	.01	> 100	+	4.60E-07	4.41E-05
oxidoreductase activity	503	4	.29	13.94	+	1.41E-04	9.03E-03

B	Homo sapiens (REF)	upload 1 (Hierarchy) NEW! (?)					
PANTHER GO-Slim Cellular Component	#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
actin cytoskeleton	203	3	.12	25.91	+	1.90E-04	1.22E-02

C	Homo sapiens (REF)	upload 1 (Hierarchy) NEW! (?)					
Reactome pathways	#	#	expected	Fold Enrichment	+/-	raw P value	FDR
Detoxification of Reactive Oxygen Species	32	3	.02	> 100	+	9.16E-07	1.82E-03

Figura 9: Clasificación de las 12 proteínas coincidentes en los tres tipos de cáncer analizados según la base de datos de *Gene Ontology Consortium*, en cuanto a la función molecular (A), componente celular (B) y vías de reactoma (C). Solo se muestran los resultados estadísticamente significativos ($FDR < 0.05$).

En relación a los resultados obtenidos de la clasificación (*Figura 9*), es interesante mencionar varios aspectos. En primer lugar, se destaca la ausencia de resultados estadísticamente significativos en relación a los procesos biológicos en los que pueden estar involucradas las proteínas coincidentes. En segundo lugar, las proteínas comunes en los tres tipos de cáncer muestran un alto grado de enriquecimiento, especialmente aquellas con actividad peroxidasa, antioxidante y detoxificadora de ROS (> 100).

6. DISCUSIÓN

6.1. Evolución temporal de la técnica

En primer lugar, es interesante destacar que la evolución temporal de la técnica de elución es muy positiva ya que, en un margen temporal de tan solo 6 años se han conseguido identificar 52'6 veces más proteínas presentes en el microambiente tumoral. Probablemente, este hecho no se debe tanto a la técnica empleada en la obtención de TIF (elución), sino a la mejora tan significativa de las técnicas proteómicas de procesamiento y análisis de las muestras. Es decir, inicialmente se utilizaba la electroforesis bidimensional combinada con la espectrometría de masas (artículo 2011), que se basa en separar las proteínas por electroforesis, recortar y digerir con una proteasa los *spots* que contienen las proteínas de interés hasta obtener péptidos, los cuales son analizados mediante MS. Sin embargo, las nuevas técnicas proteómicas empleadas (iTRAQ y LC-MS/MS) permiten ahorrar los pasos de separación previa de las proteínas, simplificar el procedimiento de identificación y analizar todo el conjunto proteico, tal y como describen los artículos de 2016 y 2017.

En segundo lugar, los resultados obtenidos de la comparación temporal de las tres listas de HCC son los esperados, ya que cada artículo que se ha publicado posteriormente engloba casi la totalidad del conjunto proteico del anterior. En concreto, el artículo publicado en 2016 incluye un 97'1% de las proteínas tumorales del artículo de 2011 (69 proteínas) y un 62'5% de las proteínas totales del artículo de 2017 (3629 proteínas).

Un último aspecto a mencionar respecto a la evolución temporal es que en los dos artículos más recientes sobre HCC, la mayoría de los autores son comunes. Este hecho aporta un valor añadido a la comparación, pues muestra el interés del grupo por identificar nuevos biomarcadores de la neoplasia estudiada. Además, en un periodo de apenas un año se han identificado un 32'8% (1190 proteínas) más de proteínas tumorales utilizando la misma técnica proteómica mencionada (iTRAQ y LC-MS/MS). Si bien, cabe resaltar que la identificación de estas 1190 nuevas proteínas en 2017 se puede deber, probablemente, a las diferencias proteómicas existentes en el equipo empleado para el análisis de las muestras de TIF. En el artículo del 2016 se empleó el espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 5800, sin embargo fue necesario tratar previamente las muestras procedentes de la cromatografía líquida; mientras que en el del 2017 se utilizó un espectrómetro de masas más novedoso, Q-Exactive HF (Orbitrap), que al operar con la fuente de ionización de electrospray acaba con el problema de tratamiento previo.

Por tanto, la utilización de un tipo de equipo u otro influye significativamente en la cantidad de proteínas identificadas en el TIF. Aunque aparentemente el mejor equipo sea el del

artículo de 2017 dado el gran número de proteínas identificadas, es necesario valorar la complejidad que podría suponer el análisis posterior de los resultados.

6.2. Metodología de obtención del TIF

Es importante recordar que existen numerosas técnicas que pueden ser aplicadas para la obtención del fluido intersticial tumoral, aunque las dos técnicas más empleadas en la obtención del TIF de carcinoma de ovario son elución y centrifugación. Curiosamente, no se ha encontrado ningún artículo durante la revisión donde hagan estudios comparativos del rendimiento de estas dos técnicas. Es por ello que en este trabajo se ha realizado esta comparativa a partir de los datos presentes en la literatura. Se quería responder una cuestión básica: ¿qué grado de coincidencia hay en la composición proteica del TIF de un mismo tipo de tumor obtenido por elución o centrifugación?

En primer lugar, los resultados obtenidos en la comparación muestran que ambas técnicas permiten obtener un alto número de proteínas en el microambiente tumoral (569 empleando la técnica de elución y 769 en la de centrifugación).

En segundo lugar, cabe destacar la sorprendente diferencia entre ambos métodos. Con la técnica de centrifugación se han conseguido identificar 200 proteínas (26%) más que con la de elución, a pesar de que esta última sea la más utilizada en todos los estudios bibliográficos consultados. Este hecho se puede explicar por la cantidad de pasos intermedios que se tienen que realizar para obtener finalmente el fluido intersticial. Por un lado, la técnica de elución requirió cortar las piezas quirúrgicas en pequeños trozos hasta obtener entre 0'25-0'50 gramos de tejido, lavarlas 5 min con 5 mL de PBS e incubarlas en 1 mL de PBS durante 1 h a 37°C. Tras 2 min de centrifugación a 1000x g para eliminar los restos celulares, se guardó el sobrenadante obtenido a – 80°C. Por otro lado, las muestras de TIF que se obtuvieron empleando la técnica de centrifugación fueron directamente centrifugadas 10 min a 106x g, y el fluido, sin restos de células sanguíneas, se almacenó a – 80°C.

Esta evidente diferencia entre los protocolos de ambas técnicas repercute indudablemente en el rendimiento del proceso de obtención del TIF, ya que a medida que se incrementan los pasos el rendimiento disminuye. Por una parte, el TIF obtenido por elución se encuentra bastante diluido, por lo que sería necesario aplicar más pasos para concentrarlo; y además, el hecho de trocear previamente la muestra de tejido suele ocasionar daño celular excesivo que produce un cambio en la composición del TIF. Por otra parte, la técnica de centrifugación evita el posible daño celular centrifugando a bajas fuerzas G. Sin embargo, esto puede ocasionar una separación insuficiente de los

componentes y, como consecuencia, un enriquecimiento innecesario de las muestras de TIF con otros componentes.

En tercer lugar, la baja coincidencia de proteínas tumorales entre ambas técnicas (284 proteínas) que muestran los resultados analizados también se puede ver justificada por los aspectos discutidos anteriormente. Además, hay que añadir un aspecto obvio, aun siendo el mismo tipo de tumor los datos de elución y centrifugación provenían de pacientes distintos, y por tanto con diferencias en el fondo genético. Por tanto, para establecer un estudio comparativo fiable sería necesario comparar la misma muestra, dos piezas del mismo tumor, con los dos métodos. Actualmente, este tipo de experimento se lleva a cabo en el grupo de ciclo celular con tumores escamosos de piel.

A modo de conclusión, las diferencias encontradas entre ambos métodos son suficientes para determinar qué tipo de técnica sería la más óptima o recomendable para la obtención del TIF. Esto será determinante para ofrecer un diagnóstico adecuado del paciente afectado. Sin embargo, no se debe olvidar que los métodos de obtención de TIF dependen del tipo de tejido u órgano afectado por la neoplasia, y no es aconsejable ofrecer una técnica general para el mismo. Por tanto, en un futuro sería conveniente realizar un estudio extensivo de este tipo con diferentes tipos de cáncer.

6.3. Carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario y mama

Los resultados de la triple comparación entre diferentes tipos de cáncer son, cuanto menos, sorprendentes. Existen 12 proteínas tumorales comunes en los tres tipos de cáncer analizados, las cuales se corresponden con unos porcentajes de proteína total del 2'1% en el caso del carcinoma de ovario, 12'5% en el cáncer de mama y 17'9% en el carcinoma hepatocelular. Este hecho es remarcable ya que, por un lado, indica que el resto de proteínas que no coinciden a la vez en los tres son específicas de cada tipo de cáncer, mientras que por otro lado, es probable que estas 12 proteínas jueguen un papel crucial y básico en el desarrollo del cáncer como tal.

Con el objetivo de dilucidar este último aspecto mencionado, se analizaron estos 12 resultados en base a diversos criterios de clasificación de la base de datos de *Gene Ontology Consortium* y *PANTHER* (función molecular, componente celular, proceso biológico y vías de reactoma). Los resultados de la clasificación son los esperados, puesto que la mayoría de las proteínas tumorales identificadas tienen actividad enzimática. En concreto, la clasificación según función molecular desempeñada y posibles vías de reactoma, muestra que muchas de ellas poseen actividad antioxidante, peroxidasa y oxidorreductasa. Estas funciones son absolutamente esenciales, ya que las células cancerígenas son capaces de reprogramar su metabolismo, superactivándolo,

con el objetivo de proliferar continuamente. Este hecho provoca la creación de un estroma reactivo, el cual contiene multitud de especies reactivas de oxígeno (ROS) que, aunque son necesarias para promover el tumor activando oncogenes y desactivando genes supresores de tumores (Gómez Quiroz, 2008), su exceso debe ser neutralizado por estas proteínas para permitir la supervivencia celular. Por tanto, también es lógico encontrar una relación vinculante entre los resultados de clasificación según función molecular y vías de reactoma.

Concretamente, las peroxirredoxinas 1, 2 y 6 adquieren mucha importancia en el desarrollo de los procesos neoplásicos por diversas razones. La peroxirredoxina 1 protege al ADN del daño oxidativo y de posibles mutaciones, se encuentra sobreexpresada en multitud de cánceres, y en carcinomas concretamente se ha comprobado que desempeña una función inhibitoria de la apoptosis. El hecho de que estas proteínas sean comunes en los tres tipos de cáncer comparados y que también estén presentes en otros estudios de cánceres agresivos (Li, Wang, Zhang, Wang, & Cheng, 2013), confirma su rol esencial en los procesos neoplásicos malignos y aporta un valor añadido al estudio de carcinoma de ovario analizado (Haslene-Hox et al., 2011), pues en este resaltan la peroxirredoxina 1 como biomarcador tumoral.

En cuanto al componente celular, 3 de las 12 proteínas comunes identificadas en los tres tipos de cáncer forman parte del citoesqueleto de actina: *Actin, cytoplasmic 1* (actina y proteína relacionada con la actina), *tropomyosin alpha-3 chain* (proteína motora de unión a actina), *coactosin-like protein* (proteína no motora de unión a actina). El citoesqueleto de actina adquiere una gran importancia en los procesos celulares, pues participa activamente en fenómenos de división celular, adhesión y migración. Por tanto, el hecho de encontrar estas proteínas clave en el TIF confirma la capacidad de invasión y metástasis en los procesos carcinogénicos.

Otro aspecto destacable de la comparación es que el cáncer de mama comparte 68 proteínas tumorales (70'8%) con el carcinoma de ovario. Este resultado es esperado, ya que, según la literatura, estos cánceres se encuentran bastante relacionados, especialmente si ambos son de tipo hereditario. Por tanto, es de esperar que la coincidencia del proteoma tumoral del carcinoma hepatocelular (gastrointestinal) con una de las dos neoplasias restantes sea bastante menor. Esto se cumple con TIF de cáncer mama, pero no con el de ovario: el carcinoma hepatocelular comparte un 67'2% de su proteoma con el carcinoma de ovario, y un 20'9% con el cáncer de mama. Estos resultados son sorprendentes, ya que a la hora del análisis se tiene en cuenta que son cánceres primarios. Si bien, es cierto que en el caso de una posible metástasis, los primeros órganos afectados son el hígado, el pulmón y el hueso. Por tanto, no se puede

descartar que algunas de las muestras TIF de los pacientes analizados estuviesen en un estadio con un grado determinado de invasión.

6.4. Perspectivas futuras

Debido a la gran importancia que está adquiriendo la búsqueda de nuevos biomarcadores tumorales a partir de fuentes prometedoras como el TIF, sería interesante realizar estudios sobre TIF de los principales órganos y tejidos que sufren metástasis primaria. Con ello, se conseguiría aclarar el papel de los biomarcadores implicados en invasión tumoral y evasión del sistema inmunitario.

Asimismo, otra futura perspectiva sería la comparación del fluido intersticial de una neoplasia maligna estudiada, por ejemplo el carcinoma de ovario, con otra de tipo benigno, como el leiomioma (Ura et al., 2017). De esta manera, podrían encontrarse nuevas dianas farmacológicas, ya que no solo se identificarían los biomarcadores que contribuyen en un proceso neoplásico maligno sino también en los benignos.

Por último, sería conveniente identificar otros componentes de tipo no proteico presentes en el microambiente tumoral a partir de una aproximación metabólica o lipídica. Así, se podría dilucidar el papel que estos desempeñan en el proceso neoplásico, hecho que permitiría establecer posibles relaciones entre todos los elementos presentes en este complejo ambiente.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Álvaro, T., Noguera-Salvá, R., & Fariñas-Guerrero, F. (2010). La matriz extracelular: de la mecánica molecular al microambiente tumoral (parte II). *Revista Española de Patología*, 43(1), 24–32. <http://doi.org/10.1016/j.patol.2009.12.002>
- Asociación Española Contra el Cáncer. (2018). *Evolución del cáncer de ovario*. Recuperado de <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-ovario/evolucion-cancer-ovario>
- Baronzio, G., Parmar, G., Baronzio, M., & Kiselevsky, M. (2014). Tumor interstitial fluid: Proteomic determination as a possible source of biomarkers. *Cancer Genomics and Proteomics*, 11(5), 225–238. Recuperado de <http://cgp.iarjournals.org/content/11/5/225.full.pdf+html>
- Baronzio, G., Schwartz, L., Kiselevsky, M., Guais, A., Sanders, E., Milanesi, G., ... Freitas, I. (2012). Tumor interstitial fluid as modulator of cancer inflammation, thrombosis, immunity and angiogenesis. *Anticancer Research*, 32(2), 405–414. Recuperado de <http://ar.iarjournals.org/content/32/2/405.full.pdf+html>
- Celis, J. E., Gromov, P., Cabezón, T., Moreira, J. M. A., Ambartsumian, N., Sandelin, K., ... Gromova, I. (2004). Proteomic Characterization of the Interstitial Fluid Perfusing the Breast Tumor Microenvironment. *Molecular & Cellular Proteomics*, 3(4), 327–344. <http://doi.org/10.1074/mcp.M400009-MCP200>
- Crea, F., Duhagon, M. A., Farrar, W. L., & Danesi, R. (2011). Pharmacogenomics and cancer stem cells: A changing landscape? *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(8), 487–494. <http://doi.org/10.1016/j.tips.2011.03.010>
- Fjeldstad, K., & Kolset, S. (2005). Decreasing the Metastatic Potential in Cancers - Targeting the Heparan Sulfate Proteoglycans. *Current Drug Targets*, 6(6), 665–682. <http://doi.org/10.2174/1389450054863662>
- Gómez Quiroz, L. E. (2008). *Especies Reactivas de Oxígeno y Cáncer. Radicales libres y estrés oxidativo. Aplicaciones médicas*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/272291911_Especies_Reactivas_de_Oxigeno_y_Cancer
- Gromov, P., Gromova, I., Bunkenborg, J., Cabezón, T., Moreira, J. M. A., Timmermans-Wielenga, V., ... Celis, J. E. (2010). Up-regulated Proteins in the Fluid Bathing the Tumour Cell Microenvironment as Potential Serological Markers for Early Detection of Cancer of the Breast. *Molecular Oncology*, 4(1), 65–89. <http://doi.org/10.1016/j.molonc.2009.11.003>

- Gullino, P. M., Clark, S. H., & Grantham, F. H. (1964). The Interstitial Fluid of Solid Tumors. *Cancer Research*, 24(5), 780–797. Recuperado de <http://cancerres.aacrjournals.org/content/24/5/780.full-text.pdf>
- Haslene-Hox, H., Oveland, E., Berg, K. C., Kolmannskog, O., Woie, K., Salvesen, H. B., ... Wiig, H. (2011). A new method for isolation of interstitial fluid from human solid tumors applied to proteomic analysis of ovarian carcinoma tissue. *PLoS ONE*, 6(4), 1–9. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019217>
- Hoskins, E. R., Hood, B. L., Sun, M., Krivak, T. C., Edwards, R. P., & Conrads, T. P. (2011). Proteomic analysis of ovarian cancer proximal fluids: Validation of elevated peroxiredoxin 1 in patient peripheral circulation. *PLoS ONE*, 6(9), 1–7. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0025056>
- Hsieh, S. Y., He, J. R., Yu, M. C., Lee, W. C., Chen, T. C., Lo, S. J., ... Chiu, C. T. (2011). Secreted ERBB3 isoforms are serum markers for early hepatoma in patients with chronic hepatitis and cirrhosis. *Journal of Proteome Research*, 10(10), 4715–4724. <http://doi.org/10.1021/pr200519q>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2017). *Estadísticas del cáncer*. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/estadisticas>
- Instituto Nacional del Cáncer. (2018). *Definición de microambiente tumoral*. Recuperado de <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/microambiente-tumoral>
- Khawar, I. A., Kim, J. H., & Kuh, H. J. (2015). Improving drug delivery to solid tumors: Priming the tumor microenvironment. *Journal of Controlled Release*, 201, 78–89. <http://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.12.018>
- Li, S., Wang, R., Zhang, M., Wang, L., & Cheng, S. (2013). Proteomic analysis of non-small cell lung cancer tissue interstitial fluids. *World Journal of Surgical Oncology*, 11(1), 1. <http://doi.org/10.1186/1477-7819-11-173>
- Ochoa-Carrillo, F. J., & Bravo-Cuellar, A. (2013). Macrófagos, ángeles o demonios. *Gamo*, 12(1), 3–5. Recuperado de <http://132.248.9.34/hevila/Gacetamexicanadeoncologia/2013/vol12/no1/1.pdf>
- Organización Mundial de la Salud. (2017). *Cáncer*. Recuperado de <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2017). *Las cifras del cáncer en España*. SEOM.

- Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM). (2017). *¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla?* Recuperado de <https://www.seom.org/es/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla?start=2>
- Spill, F., Reynolds, D. S., Kamm, R. D., & Zaman, M. H. (2016). Impact of the physical microenvironment on tumor progression and metastasis. *Current Opinion in Biotechnology*, *40*, 41–48. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2016.02.007>
- Sun, W., Xing, B., Guo, L., Liu, Z., Mu, J., Sun, L., ... He, F. (2016). Quantitative Proteomics Analysis of Tissue Interstitial Fluid for Identification of Novel Serum Candidate Diagnostic Marker for Hepatocellular Carcinoma. *Scientific Reports*, *6*(26499), 1–8. <http://doi.org/10.1038/srep26499>
- Ura, B., Scrimin, F., Franchin, C., Arrigoni, G., Licastro, D., Monasta, L., & Ricci, G. (2017). Identification of proteins with different abundance associated with cell migration and proliferation in leiomyoma interstitial fluid by proteomics. *Oncology Letters*, *13*(5), 3912–3920. <http://doi.org/10.3892/ol.2017.5943>
- Wagner, M., & Wiig, H. (2015). Tumor Interstitial Fluid Formation, Characterization, and Clinical Implications. *Frontiers in Oncology*, *5*(May), 1–12. <http://doi.org/10.3389/fonc.2015.00115>
- Wiig, H., & Swartz, M. A. (2012). Interstitial Fluid and Lymph Formation and Transport: Physiological Regulation and Roles in Inflammation and Cancer. *Physiological Reviews*, *92*(3), 1005–1060. <http://doi.org/10.1152/physrev.00037.2011>
- Wiig, H., Tenstad, O., Iversen, P., Kalluri, R., & Bjerkvig, R. (2010). Interstitial fluid: the overlooked component of the tumor microenvironment? *Fibrogenesis & Tissue Repair*, *3*(1), 12. <http://doi.org/10.1186/1755-1536-3-12>
- Zhang, J., Hao, N., Liu, W., Lu, M., Sun, L., Chen, N., ... He, F. (2017). In-depth proteomic analysis of tissue interstitial fluid for hepatocellular carcinoma serum biomarker discovery. *British Journal of Cancer*, *117*(11), 1676–1684. <http://doi.org/10.1038/bjc.2017.344>