



**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del
Instituto Politécnico Nacional**

Unidad Zacatenco

Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular

**“Detección de marcadores de la transición epitelio-mesénquima
en células malignas provenientes de líquido ascítico de pacientes
con Cáncer de Ovario Epitelial (COE)”**

TESIS

Que presenta

Q.F.B. Irving Ulises Martínez Vargas

Para obtener el grado de

Maestro en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular

Directora de Tesis:

Dra. Patricia Talamás Rohana

DEDICATORIAS

A Dios

Por permitirme llegar hasta este punto en mi vida, por darme las herramientas necesarias para salir adelante, por ponerme retos que sin duda han enriquecido mi vida y me han convertido en el hombre que hoy soy.

A mis padres

Por su incansable lucha para que saliera adelante, por sus sacrificios, por apoyarme incondicionalmente en mis decisiones, por enseñarme el valor de los principios. Siempre estaré infinitamente agradecido de tenerlos como padres.

A mis suegros

Por confiar en mí para hacer feliz a su hija y ella a mí. Por su apoyo incondicional en cada una de nuestras decisiones, por sus consejos. En ustedes encontré una segunda familia.

A mi esposa

Gracias por todos los momentos que vivimos juntos, por tus consejos y por tu paciencia. Tu apoyo ha sido fundamental para el desarrollo de este proyecto. Gracias por apoyar mis metas y de alguna manera hacerlas tuyas. Te amo.

AGRADECIMIENTOS

Al CINVESTAV

Por proporcionarnos una formación académica de excelencia y brindarnos nuevas oportunidades.

A la Dra. Patricia Talamás Rohana

Por confiar en mi capacidad para realizar este proyecto de maestría dentro de su laboratorio de investigación, por compartir conmigo su experiencia y enseñarme que el éxito se logra con voluntad y dedicación.

Al M. en C. Juan Carlos Osorio Trujillo

Gracias por mostrar interés en cada uno de mis experimentos y por discutir conmigo los resultados de cada uno de ellos, sin duda fue enriquecedor.

A la Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez

Por su incansable labor diaria en el trabajo del laboratorio, por siempre estar disponible para escuchar, compartir su conocimiento y sobretodo apoyar incondicionalmente el desarrollo de este proyecto.

A la Dra. Dolores Gallardo Rincón

Por su importante contribución intelectual en este trabajo, su gestión en la obtención de muestras y su compromiso con este trabajo.

A mis asesores, la **Dra. Rosa María del Ángel** y el **Dr. José Eduardo Pérez Salazar** por los comentarios y recomendaciones siempre oportunos, que sin duda fueron enriquecedores de este trabajo.

A mis compañeros estudiantes del laboratorio, por sus consejos.

A la Fundación Miguel Alemán A. C.

Por el financiamiento proporcionado para el desarrollo de este proyecto a través del estímulo a la investigación médica “Miguel Alemán Valdés”.

Al CONACYT

Por el financiamiento proporcionado a través de la beca # 451419 durante el periodo de maestría.

ABREVIATURAS

AF	alexa fluor
BRCA1	gen asociado a cáncer de mama 1
BRCA2	gen asociado a cáncer de mama 2
BV	violeta brillante
CaCl	cloruro de calcio
CaOv	cáncer de ovario
CD	grupo de diferenciación
COE	cáncer de ovario epitelial
CXCL14	ligando de quimiocina CXC 14
CXCL4	ligando de quimiocina CXC 4
CXCL6	ligando de quimiocina CXC 6
CXCL8	ligando de quimiocina CXC 8
DEPC	policarbonato de di-etilo
DL	dylight
DNA	ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidérmico
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FITC	isocianato de fluoresceína
GAPDH	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GSK3-B	cinasa glucógeno sintetasa 3 beta
h	hora
H2O	agua
HIF1-A	factor inducible por hipoxia 1 alfa
IFI	inmunofluorescencia indirecta
IHFI	inmunohistofluorescencia indirecta
IL-10	interleucina 10
IL-1B	interleucina 1 beta
IL-6	interleucina 6

IL-8	interleucina 8
LA	líquido ascítico
MAPK	proteína cinasa activa por mitógenos
min	minuto
ml	mililitro
mm	milímetro
mM	milimolar
mQ	mili Q
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
NH ₄ Cl	cloruro de amonio
nm	nanómetro
°C	grados Celsius
PB	pacific blue
PBS	amortiguador de fosfatos
PCR	reacción en cadena de polimerasa
PE	ficoeritrina
pH	potencial de hidrógeno
rpm	revoluciones por minuto
STAT3	transductor de señal y activador de la transcripción 3
TBS-T	amortiguador de tris con Tween
TEM	transición epitelio-mesénquima
TGF-β	factor de crecimiento transformante beta
TME	transición mesénquima-epitelio
VEGF	factor de crecimiento del endotelio vascular

ÍNDICE

I.	Resumen.....	X
II.	Abstract.....	XII
III.	Introducción.....	1
	1.1 Generalidades del cáncer de ovario.....	1
	1.2 Factores de riesgo del cáncer de ovario.....	1
	1.3 Origen del cáncer de ovario.....	2
	1.4 Etapas clínicas del cáncer de ovario.....	2
	1.5 Diagnóstico.....	4
	1.6 Tratamiento.....	4
	1.7 Líquido ascítico y microambiente tumoral.....	5
	1.8 Transición epitelio-mesénquima.....	5
	1.9 Propiedades de las células en transición epitelio-mesénquima...	10
IV.	Antecedentes.....	12
V.	Justificación.....	15
VI.	Hipótesis.....	16
VII.	Objetivos.....	17
	7.1 Objetivo general.....	17
	7.2 Objetivos particulares.....	17
VIII.	Grupo de estudio.....	18
IX.	Estrategia metodológica.....	19
X.	Materiales y Métodos.....	20
	10.1 Obtención de muestras.....	20
	10.2 Obtención de cultivos primarios de células de LA.....	20
	10.3 Inmunofluorescencia indirecta.....	21
	10.4 Citometría de flujo multicolor.....	22
	10.5 Aislamiento de RNA total.....	22
	10.6 RT-PCR.....	23
	10.7 Inmunohistofluorescencia indirecta.....	24
XI.	Resultados.....	26

11.1	Las células de LA presentan un fenotipo intermedio.....	26
11.2	Las células malignas de LA en cultivo presentan un fenotipo intermedio.....	28
11.3	La proporción de células malignas en LA es variable en cada paciente.....	30
11.4	La expresión de los factores de transcripción asociados a la TEM varía en cada paciente.....	33
11.5	Las células en LA presentan un fenotipo diferente al que presentan las células del tejido tumoral.....	33
XII.	Discusión.....	36
XIII.	Conclusiones.....	42
XIV.	Perspectivas.....	43
XV.	Referencias.....	44

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. TEM en cáncer.....	7
Figura 2. Características de las células epiteliales y mesenquimales.....	8
Figura 3. Inducción de la TEM.....	9
Figura 4. Factores de transcripción que regulan la TEM.....	9
Figura 5. Propiedades de las células en TEM.....	11
Figura 6. Inducción de la TEM por el LA.....	14
Figura 7. Expresión de E-cadherina y vimentina en células de LA.....	27
Figura 8. Fenotipo de las células malignas provenientes de LA (PC5).....	29
Figura 9. Proporción de células malignas en LA de pacientes con COE.....	31
Figura 10. Expresión de mRNA de los factores de transcripción asociados a la TEM.....	34
Figura 11. Expresión de E-cadherina y vimentina en tejido tumoral.....	35

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Etapas clínicas de acuerdo a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia.....	3
Tabla 2. Información de las pacientes.....	20
Tabla 3. Secuencia de nucleótidos empleados para PCR.....	24
Tabla 4. Proporción de células malignas con fenotipo epitelial, mesenquimal e intermedio en LA.....	32

I. RESUMEN

El cáncer de ovario (CaOv) es la principal causa de mortalidad por cáncer ginecológico. La mayoría de las pacientes con CaOv, se diagnostican en etapa avanzada (IIIC y IV). El tratamiento es quirúrgico, enfocado a remover la mayor parte de la masa tumoral que se encuentra en la cavidad abdominopélvica y quimioterapia adyuvante basada en platino y taxanos, sin embargo, a pesar de esto, las pacientes recurren en periodos variables con una enfermedad más agresiva y resistencia a la quimioterapia y sólo el 46 % sobrevive más de 5 años. La acumulación de liquido ascítico (LA) es una característica común en las pacientes de etapas avanzadas y se relaciona con mal pronóstico. Además, se ha reportado que el LA induce la transición epitelio-mesénquima (TEM) y que constituye una fuente importante de células malignas. Por lo anterior, en el presente proyecto se decidió evaluar la presencia y proporción de células malignas con fenotipo epitelial (E-cadherina⁺), mesenquimal (vimentina⁺) e intermedio (E-cadherina⁺/vimentina⁺) en el LA de pacientes con COE. Se evaluó por IFI la expresión de las proteínas E-cadherina y vimentina en células de LA para detectar cada uno de los fenotipos. Además, se determinó la proporción de células malignas con los fenotipos antes mencionados mediante un panel de tinción multicolor para citometría de flujo empleando los marcadores CD45, PAX8, WT1, E-cadherina y vimentina. Adicionalmente, se detectó la expresión de mRNA de los factores de transcripción involucrados en la TEM por RT-PCR. Finalmente, se evaluó la presencia de E-cadherina y vimentina en tejido tumoral y se comparó con los fenotipos de las células malignas en LA. Los resultados por IFI mostraron que las células en LA presentan un fenotipo intermedio. Por otro lado, los resultados de citometría de flujo mostraron que la proporción de células malignas en LA es diferente en cada paciente y que las células malignas en suspensión presentan predominantemente un fenotipo mesenquimal. Además el patrón de expresión de factores de transcripción asociados a la TEM varía en cada paciente pero confirma el estado en transición y que la expresión de E-cadherina y vimentina en tejido tumoral no es la misma que en células de LA. Estos resultados sugieren que el análisis del tejido tumoral podría no ser suficiente para el establecimiento de la etapa clínica y el tratamiento de las pacientes

con COE, además de que las células con fenotipo en transición, presentes en el LA, podrían contribuir a la quimiorresistencia y recurrencia.

II. ABSTRACT

Ovarian cancer (OvCa) is the leading cause of death from gynecological cancer. The majority of patients with OvCa are diagnosed at an advanced stage (IIIC and IV). The treatment is surgical, focused on removing most of the tumor mass found in the abdominopelvic cavity and adjuvant chemotherapy based on platinum and taxanes; despite this, patients recur in variable periods with more aggressive disease and resistance to chemotherapy and only 46% survive more than 5 years. The accumulation of ascitic fluid (AF) is a common characteristic in patients of advanced stages and it is related to poor prognosis. In addition, it has been reported that AF induces epithelial-mesenchymal transition (EMT) and it is an important source of malignant cells. Therefore, in the present project the presence and proportion of malignant cells with epithelial (E-cadherin⁺), mesenchymal (vimentin⁺) and intermediate (E-cadherin⁺/vimentin⁺) phenotype in the AF of patients with EOC was determined. The expression of the E-cadherin and vimentin proteins in LA cells was evaluated by IFI to detect each of the phenotypes. In addition, the proportion of malignant cells with phenotypes aforementioned was determined through a multicolor staining panel for flow cytometry using CD45, PAX8, WT1, E-cadherin and vimentin. Additionally, the mRNA expression of the transcription factors involved in EMT was detected by RT-PCR. Finally, the presence of E-cadherin and vimentin in tumor tissue was evaluated and compared with the malignant cell phenotypes in AF. The results by IFI showed that cells in AF present an intermediate phenotype. On the other hand, the results of flow cytometry showed that the proportion of malignant cells in LA is different in each patient and that the malignant cells in suspension phase have predominantly a mesenchymal phenotype. In addition, the expression pattern of transcription factors associated with EMT varies among patients but confirms the state in transition and that the expression of E-cadherin and vimentin in tumor tissue is not the same as in AF cells. These results suggest that the analysis of the tumor tissue could not be sufficient for the establishment of the clinical stage and the treatment of the patients with EOC; besides cells in transition, present in the AF, could contribute to chemoresistance and recurrence.

III. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades del cáncer de ovario

El cáncer de ovario (CaOv) es la principal causa de muerte por cáncer ginecológico¹. Mundialmente se registran alrededor de 238,719 casos cada año, mientras que en México se estima aproximadamente 4,000 casos nuevos cada año². Sin embargo, se considera que esta neoplasia está subestimada en comparación con otros tipos de cáncer ampliamente conocidos como el cáncer de mama y el de cuello uterino³.

1.2 Factores de riesgo

El riesgo de padecer esta enfermedad en la población general es de 1.8%, mientras que cuando existen casos familiares aislados de cáncer de mama u ovario el riesgo aumenta al 5%³. La edad es el principal factor de riesgo para esta enfermedad con una incidencia del 80% en las mujeres post-menopáusicas. Por otro lado, el tabaquismo, una dieta rica en grasa, un estilo de vida sedentario y el uso de talco también aumentan el riesgo de padecer esta enfermedad. Particularmente, los factores hormonales y reproductivos tales como: la nuliparidad, la menarca temprana, la menopausia tardía y la terapia de reemplazo hormonal pueden aumentar el riesgo de 6%-20%^{4,5}. Finalmente, el 90% de las pacientes con cáncer de ovario tienen un modelo etiológico multifactorial, asociado con los factores antes mencionados, sin embargo, en el 10% de las mujeres con este padecimiento oncológico la etiología recae en un origen hereditario. Por ejemplo, el síndrome mama-ovario hereditario, el cual representan el 90% del cáncer de ovario hereditario, se asocia principalmente a mutaciones germinales de los genes BRCA1 y BRCA2. El riesgo de padecer este tipo de cáncer cuando se presentan mutaciones o deleciones en los genes BRCA1 es de 40%-50%, mientras que para BRCA2 es de 20%-30%⁶.

1.3 Origen del cáncer de ovario

El CaOv es un término no específico para una variedad de tumores que involucran al ovario. Existen diferentes tipos de cáncer de ovario dependiendo del tipo celular a partir del cual se origina el tumor: de células epiteliales, de células estromales-gonadales y de células germinales. Del 90%-95% del cáncer de ovario es de origen epitelial (COE), y éste se puede subdividir en 5 subtipos histológicos: seroso papilar de alto grado, seroso papilar de bajo grado, endometriode, mucinoso y de células claras. El subtipo histológico seroso papilar de alto grado es el más común, representando aproximadamente el 75% del COE⁷.

Originalmente se considera que la superficie del ovario es el origen de este tipo de tumores, la teoría más aceptada del origen del cáncer de ovario es la “ovulación incesante”. Esta teoría sugiere que el daño constante a la superficie epitelial del ovario incrementa la inflamación y cambios en los niveles hormonales los cuales generan condiciones de estrés oxidativo, que causan daño en el DNA. Adicionalmente, los mecanismos de reparación de tejido pueden llevar a cambios metaplásicos hacia un epitelio tipo Mülleriano, lo cual podría representar el primer paso en la transformación neoplásica de estas células^{8,9}.

1.4 Etapas clínicas del cáncer de ovario

El CaOv se clasifica por etapas mediante el sistema FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia). El sistema se basa en los resultados de la cirugía para determinar la extensión del tumor primario, la ausencia o presencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales y la ausencia o presencia de metástasis a distancia. Las características de las etapas clínicas se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Etapas clínicas de acuerdo a la Federación de Ginecología y Obstetricia.	
EC	Descripción
I	Tumor confinado a los ovarios o trompas de Falopio.
IA	Tumor limitado a un ovario (con cápsula ovárica intacta) o trompas de Falopio; sin tumor sobre la superficie del ovario o trompas de Falopio; sin células malignas en ascitis o lavados peritoneales.
IB	Tumor limitado a ambos ovarios (con cápsulas ováricas intactas) o trompas de Falopio; sin tumor sobre la superficie del ovario o trompas de Falopio; sin células malignas en ascitis o lavados peritoneales.
IC	Tumor limitado a uno o ambos ovarios o trompas de Falopio, con alguno de los siguientes subestados: IC1: derrame quirúrgico intraoperatorio. IC2: cápsula rota antes de la cirugía o tumor en la superficie del ovario o trompas de Falopio. IC3: células malignas en ascitis o lavados peritoneales
II	Tumor que involucra uno o ambos ovarios o trompas de Falopio con extensión pélvica debajo del borde pélvico o cáncer peritoneal primario.
IIA	Extensión y/o implantes del tumor en el útero y/o las trompas de Falopio y/o ovarios.
IIB	Extensión del tumor a otros tejidos intraperitoneales pélvicos.
III	Tumor que involucra uno o ambos ovarios o trompas de Falopio o cáncer peritoneal primario con diseminación citológica o histológicamente confinada al peritoneo fuera de la pelvis y/o metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales.
IIIA	Metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales con o sin afectación peritoneal microscópica mas allá de la pelvis. IIIA1: solamente ganglios retroperitoneales positivos (demostrado patológicamente). IIIA1(i): metástasis de hasta 10 mm en su dimensión mayor. IIIA1(ii): metástasis >10 mm en su dimensión mayor. IIIA2: afectación peritoneal microscópica extrapélvica (sobre el borde pélvico) con o sin ganglios linfáticos retroperitoneales positivos.
IIIB	Metástasis peritoneal microscópica mas allá de la pelvis de hasta 2 cm en su dimensión mayor, con o sin metástasis en los ganglios linfáticos retroperitoneales.
IIIC	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis >2 cm en su dimensión mayor, con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales (incluye la extensión del tumor a la cápsula del hígado y el bazo sin afectación parenquimatosa de ninguno de los órganos).
IV	Metástasis distante, incluyendo la metástasis peritoneal. IVA: derrame pleural con citología positiva. IVB: metástasis parenquimatosa y metástasis a órganos extra-abdominales (incluyendo los ganglios linfáticos inguinales y los ganglios linfáticos fuera de la cavidad abdominal.

Modificado de Matulonis *et al* 2016.¹⁰

1.5 Diagnóstico

El CaOv se considera un problema mundial debido a que no existen estrategias efectivas para el diagnóstico oportuno ni síntomas específicos durante las etapas tempranas de la enfermedad. La mayoría de las pacientes presentan síntomas gastrointestinales que por lo general son confundidos con el síndrome de colon irritable. Es por eso que la mayoría de las pacientes son tratadas por especialistas no oncólogos, por lo que pueden pasar de 6-12 meses hasta establecer el diagnóstico correcto³. Lo anterior lleva a que el 60% de las pacientes se diagnostique en etapas avanzadas, cuando ya hay metástasis en los órganos de la cavidad abdominal y en órganos extra-abdominales, mientras que solo 15% se diagnostica cuando el tumor esta confinado a los ovarios. El porcentaje de sobrevivencia a 5 años de las pacientes que se diagnostican en etapas tempranas (I y II) es de alrededor del 90% mientras que las pacientes que se diagnostican en etapas avanzadas (III y IV) es de apenas el 30%¹¹.

1.6 Tratamiento

El tratamiento de las pacientes con CaOv varía dependiendo de la etapa clínica en la que se diagnostique. En el caso de las etapas I y II primero se realiza una cirugía citorreductora y después se da quimioterapia. Por el contrario, para las pacientes en etapas III y IV primero se da quimioterapia adyuvante, después se realiza una cirugía citorreductora para remover la mayor parte de los implantes en la cavidad abdominopélvica y finalmente se vuelve a dar quimioterapia. La quimioterapia estándar está basada en 6 ciclos de carboplatino-paclitaxel. Con base en estos tratamientos, las pacientes se pueden dividir en resistentes o refractarias, las cuales recaen en menos de 6 meses o progresan durante la quimioterapia, ellas tienen pobre pronóstico; las que recaen entre los 6-12 meses tienen un pronóstico intermedio y las que recaen después de los 12 meses tienen un mejor pronóstico, sin que se conozca de manera precisa la razón por la que las pacientes reaccionan de diferente manera al

mismo tratamiento. Adicionalmente, las paciente recurren con una enfermedad más agresiva y resistencia a la quimioterapia, por lo que la media libre de progresión es de 2.5 años y la mediana de supervivencia con diversas líneas de tratamiento es de 4 años^{3,12}.

1.7 Líquido ascítico y microambiente tumoral

En etapas avanzadas es común encontrar pacientes con acumulación de líquido en la cavidad abdominopélvica, este líquido se denomina líquido de ascitis o líquido ascítico (LA). Se considera que este líquido se forma cuando el tumor primario crece hasta invadir el mesotelio; la pérdida de la integridad del mesotelio conlleva a la desregulación de la presión oncótica, y adicional a esto las células malignas que se desprenden del tumor obstruyen los vasos linfáticos regionales, todo lo anterior lleva a la acumulación de LA¹³. Este líquido se encuentra hasta en el 38% de las pacientes con COE y casi todas tienen líquido ascítico en la recurrencia. La presencia de LA correlaciona con la diseminación peritoneal del cáncer de ovario y se considera una señal de enfermedad avanzada y pobre pronóstico¹⁴.

El LA actúa como un reservorio de una compleja mezcla de componentes celulares y factores solubles los cuales proveen un microambiente pro-inflamatorio y favorecen la tumorigénesis^{13,15}. El LA está compuesto por diversos tipos celulares como: células malignas, fibroblastos, células endoteliales, células mesoteliales, leucocitos, etc. Estos tipos celulares a su vez secretan diversos factores de crecimiento como TGF- β , EGF, VEGF, etc., citosinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, etc., quimiocinas como: CXCL4, CXCL6, CXCL8, CXCL14, etc., hormonas, componentes de la matriz extracelular y vesículas extracelulares.

1.8 Transición epitelio-mesénquima

La transición epitelio mesénquima (TEM) es un proceso que se lleva a cabo de manera normal durante el desarrollo embrionario, la reparación de tejidos y en patologías como la fibrosis y el cáncer.

Durante el desarrollo embrionario, las células embrionarias migran de manera constante hacia tejidos y órganos, para ello sufren la TEM. Una vez que las células embrionarias migratorias alcanzan su destino, sufren el proceso contrario, la transición mesénquima-epitelio (TME), para establecerse, proliferar y diferenciarse en diversos tipos celulares. La mayoría de los tejidos se desarrollan a partir de una o más rondas de TEM-TME¹⁶.

Por otro lado, durante la reparación de tejidos las células epiteliales adquieren la capacidad de migración a través de la inducción de una TEM principalmente inducida por la inflamación y las células migratorias en este proceso se instalan en el tejido dañado reconstituyendo el epitelio gracias a la inducción de la TME¹⁷. Sin embargo, durante la fibrosis, la inducción de la TEM genera miofibroblastos con un fenotipo mesenquimal que lleva al daño y degeneración del tejido^{18,19}.

Finalmente, en cáncer, la TEM se lleva a cabo en el tumor primario como un mecanismo importante en la metástasis, llevando a la migración, invasión y extravasación de las células malignas; una vez en circulación, estas células se mantienen con un fenotipo mesenquimal o intermedio que permite la extravasación de las células, la invasión del parénquima en tejido distante y el establecimiento de las células para la generación de un nuevo tumor a través de la activación de la TME²⁰ (Figura 1).

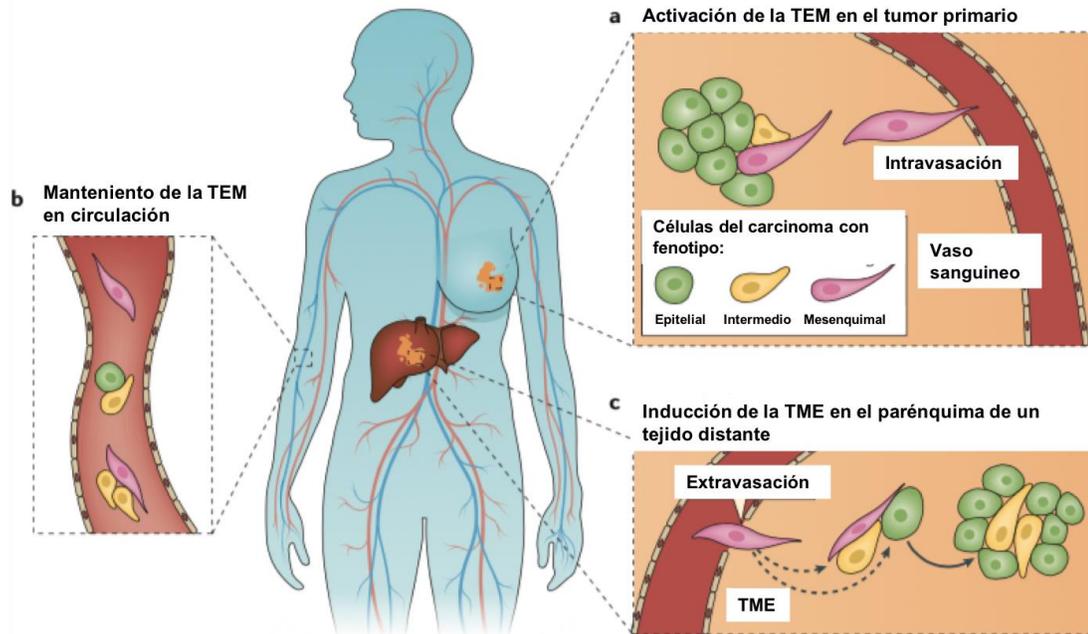


Figura 1. TEM en cáncer. Las células del tumor primario pueden sufrir la TEM. Este proceso puede darse de manera total o parcial, generando células con fenotipo mesenquimal o intermedio las cuales pueden invadir el tejido adyacente al tumor hasta entrar al torrente sanguíneo. Una vez en circulación las células pueden mantener la TEM hasta extravasarse e invadir el parénquima de órganos distantes donde pueden generar un nuevo tumor a través de la activación de la TEM. Modificado de Shibue & Weinberg, 2017²⁰.

A pesar de que la TEM en condiciones normales y patológicas tiene características compartidas, también presenta obvias diferencias, por ello, la TEM se ha dividido en tres tipos diferentes: tipo I: TEM asociado al desarrollo embrionario; tipo II: TEM asociado a la reparación, generación y fibrosis en tejidos y tipo III: asociada a cáncer¹⁶.

La TEM consiste en la trans-diferenciación de células con fenotipo epitelial hacia uno mesenquimal. Las células con fenotipo epitelial tienen una polaridad apical-basolateral, presentan uniones intercelulares con las células adyacentes, tales como: uniones adherentes, uniones estrechas y desmosomas. Adicionalmente las células con este fenotipo presentan un cinturón de actina y los filamentos intermedios son principalmente de tipo citoqueratina. Por el contrario, el fenotipo mesenquimal, presenta una polaridad anterior-posterior, fibras de estrés, placas de adhesión, invadopodios, los filamentos intermedios son principalmente de tipo vimentina y secretan metaloproteasas que permiten la degradación en la matriz extracelular por lo que este fenotipo se considera altamente móvil e invasivo^{20,21} (Figura 2).

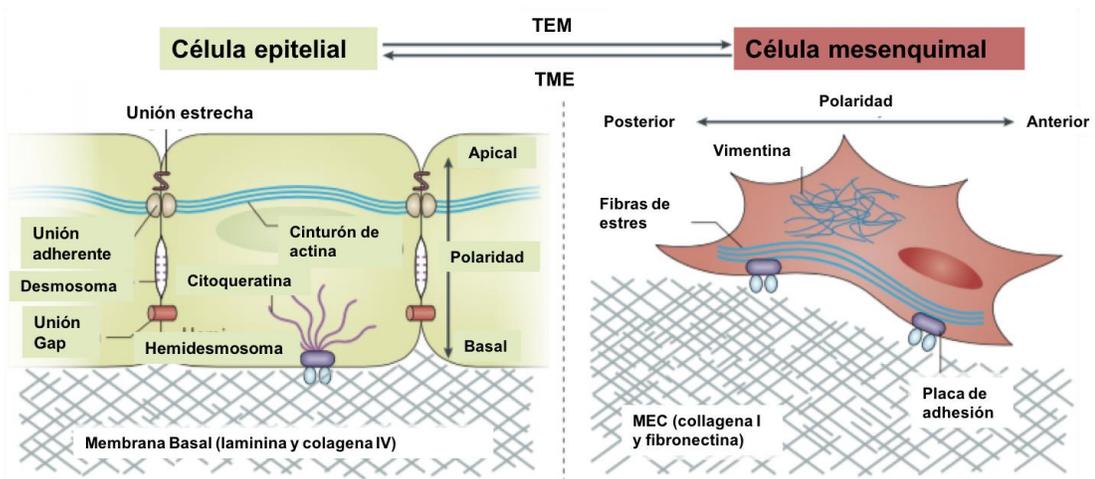


Figura 2. Características de las células epiteliales y mesenquimales. Las células con fenotipo epitelial presentan una polaridad apical-basolateral, presentan uniones intercelulares como: uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones gap, además presentan un cinturón de actina y los filamentos intermedios son principalmente de tipo citoqueratina. Por otro lado, las células mesenquimales presentan una polaridad anterior-posterior, la formación de fibras de estrés, los filamentos intermedios son de vimentina y forman placas de adhesión. Modificado de Shibue & Weinberg, 2017²⁰.

Este proceso puede inducirse por diversos factores de crecimiento (TGF- β , HGF, FGF, EGF, IGF-1, etc.) o por hipoxia y componentes de la matriz extracelular (muchos de los cuales se encuentran en el LA). Como resultado de la acción de estos factores se ha encontrado que se activan diversas vías de señalización, dentro de las que destacan TGF- β , Notch, Wnt- β -catenina, RTKs, etc. (Figura 3). Estas vías de señalización inducen la pérdida de marcadores epiteliales (E-cadherina, claudinas, ocludinas, citoqueratinas, etc.) y la ganancia de marcadores mesenquimales (N-cadherina, vimentina, fibronectina, etc.) a través de la expresión de los factores de transcripción Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2, entre otros, los cuales regulan positivamente la expresión de genes mesenquimales y negativamente la expresión de genes epiteliales²² (Figura 4).

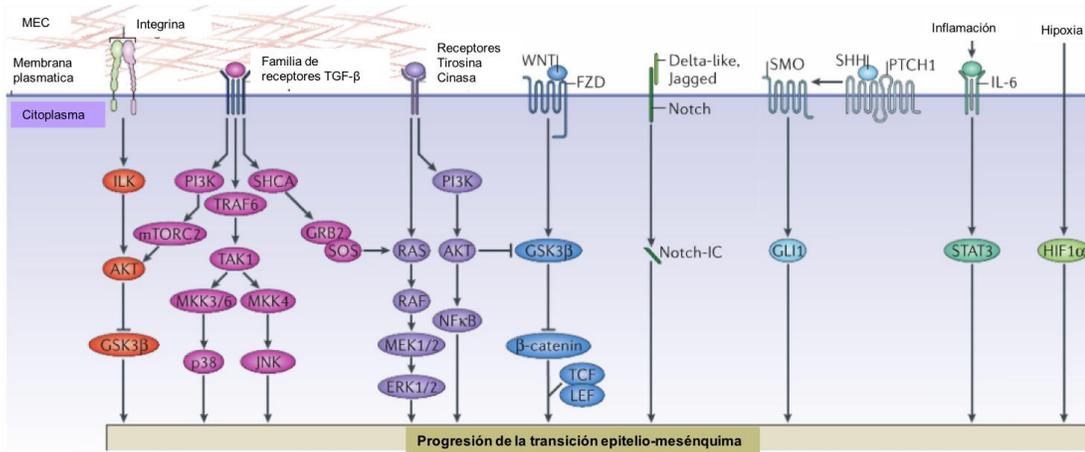


Figura 3. Inducción de la TEM. La TEM se puede inducir por diversos componentes tales como: componentes de la matriz extracelular, proteínas de la familia de TGF- β , factores de crecimiento, inflamación e hipoxia. La unión de los diferentes ligandos a sus respectivos receptores activan diversas vías de señalización las cuales activan a proteínas de la familia de las MAPK y desactivan cinasas como GSK3- β , así como la regulación de otras proteínas como: β -catenina, STAT3, y HIF1- α . MAPK (*Mitogen Associated Proteína Kinase*), GSK3- β (*Glycogen Synthase Kinase 3-beta*), STAT3 (*Signal Transducer and Activator of Transcription 3*), HIF1- α (*Hypoxia Inducible Factor 1-alpha*). Modificado de Lamouille *et al*, 2014²².

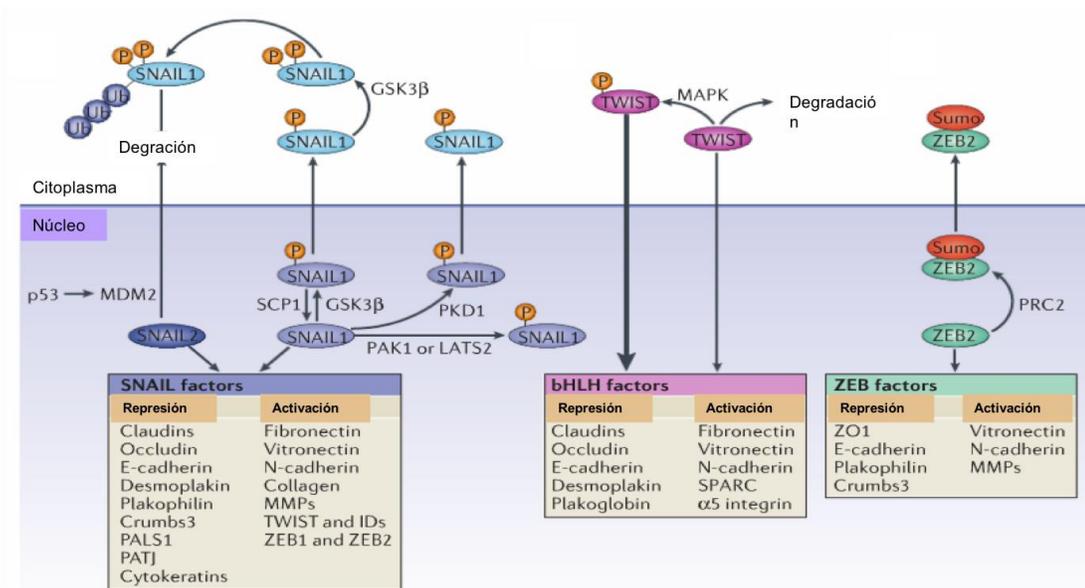


Figura 4. Factores de transcripción que regulan la TEM. La activación de las MAPKs y la desactivación de la cinasa GSK3- β modulan la localización y degradación de los factores de transcripción Snail1, Snail2 (Slug) y Twist. Estos factores de transcripción reprimen la expresión de proteínas que forman las uniones intercelulares tales como: claudinas, ocludinas, E-cadherina, entre otras, y activan la expresión de Fibronectina, N-cadherina, Vitronectina, MMPs, etc. MAPK (*Mitogen Associated Proteína Kinase*), GSK3- β (*Glycogen Synthase Kinase 3-beta*), MMP (*Matrix Metalloproteinas*). Modificado de Lamouille *et al*, 2014²².

1.9 Propiedades de las células en transición epitelio-mesénquima

La TEM es un proceso altamente dinámico dentro del cual puede ocurrir una pérdida parcial de los marcadores epiteliales, así como la adquisición también parcial, de las características de un fenotipo mesenquimal, por lo que en este caso se habla de la inducción de una TEM parcial y la generación de células con fenotipo intermedio o híbrido; estos fenotipos se conocen como “metaestables”, reflejando la flexibilidad de las células para fluctuar entre ambos fenotipos¹⁹. La existencia de estos fenotipos refleja el balance del proceso de TEM, sugiere una compleja regulación, sobretodo epigenética²³ y se ha asociado con la activación de otros procesos adicionales a la migración e invasión.

La expresión de los factores de transcripción de la TEM en tumores no invasivos sugiere que estos factores podrían tener funciones oncogénicas, afectando el desarrollo del tumor primario, incluso sin que haya invasión y metástasis²⁴.

Por ejemplo, se ha encontrado que los factores de transcripción de la TEM promueven el escape de la senescencia inducida por oncogenes²⁵, impiden la apoptosis²⁶ y permiten la sobrevivencia de células malignas a diferentes tipos de estrés²⁷.

Adicionalmente los factores de transcripción de la TEM se han visto involucrados en la generación de CSCs (Cancer Stem Cells), una población celular que se considera capaz de autorrenovarse y generar poblaciones celulares “no-stem” en un tumor^{28,29}. La relación de la TEM con generación de CSCs se ve sustentada debido a la capacidad de formar tumores por células en transición con fenotipo intermedio. Finalmente, las células malignas con fenotipo intermedio y mesenquimal, presentan resistencia a agentes quimioterapéuticos, a comparación de las células malignas con fenotipo epitelial, las cuales se consideran sensibles a estos agentes, lo anterior debido a un aumento en la expresión de proteínas antiapoptóticas y proteínas transportadoras conocidas como bombas de expulsión de fármacos²⁰. Las propiedades de las células malignas en TEM se muestran en la Figura 5.

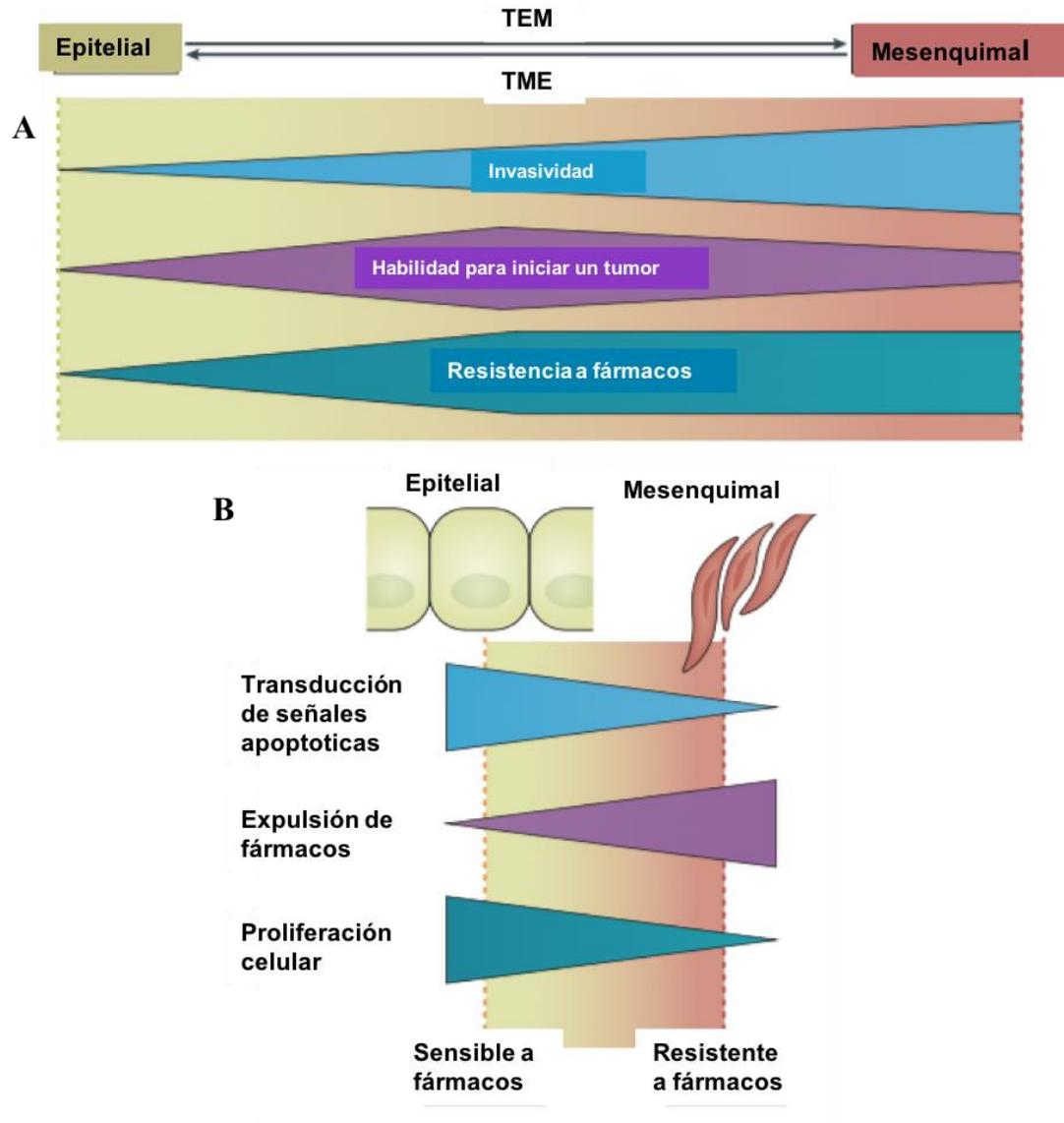


Figura 5. Propiedades de las células malignas en TEM. **A)** Las células con fenotipo mesenquimal son más invasivas que las de fenotipo intermedio. Las células con fenotipo intermedio presentan una elevada capacidad de generar un tumor, mientras que tanto las células con fenotipo intermedio y mesenquimal son resistentes a fármacos, comparado con células con fenotipo epitelial. **B)** Las células con fenotipo mesenquimal son más resistentes a la apoptosis, presentan una elevada expulsión de fármacos y una disminución en la proliferación celular comparado con células con fenotipo epitelial. Modificado de Shibue & Weinberg, 2017²⁰.

IV. ANTECEDENTES

El cáncer de ovario epitelial se origina del epitelio que recubre los ovarios, este epitelio está sometido a un estrés constante durante la ovulación, se considera que después de la ovulación se forman quistes de inclusión que se cree dan origen al cáncer de ovario. Por ello, la teoría de la ovulación incesante es la más aceptada para el origen de este cáncer⁹. El epitelio ovárico es considerado un epitelio altamente dinámico, debido a que su constante daño genera mecanismos de reparación que involucran el proceso de la TEM. En este sentido, se considera que la TEM debe ser un proceso perfectamente regulado que permita activarse y desactivarse sin el riesgo de desarrollar una neoplasia¹⁹.

Estudios basados en la expresión de E-cadherina como marcador epitelial y vimentina como marcador mesenquimal han encontrado que en tejido sano, tumores benignos, tumores limítrofes y tumores malignos la expresión de E-cadherina es de 16.7%, 57.1%, 50% y 16.7%, respectivamente, mientras que la de vimentina es 83.3%, 57.1%, 50% y 66.7%, respectivamente. Por otro lado, el RNA de los factores de transcripción Snail, Slug y Twist se encuentran sobreexpresados en tumores benignos y malignos, comparado con tejido sano³⁰.

En algunos modelos de cáncer de ovario *in vitro* se ha encontrado que diversas moléculas inducen la TEM tales como: KPNA2³¹, MUC4³², BMP4³³, Endotelina 1³⁴, TGF- β ³⁵, MDM2³⁶, entre otras proteínas; miRNAs: miR-429³⁷, miR-216a³⁸, etc.; lípidos como el ácido lisofosfatídico³⁹, así como por líquido ascítico^{40,41}, el cual contiene una gran cantidad de componentes celulares y factores solubles que podrían inducir la TEM por diversas vías^{13, 15, 22, 40, 41}.

Strauss y cols. (2011), establecieron cultivos primarios de biopsias de tumor y líquido ascítico; en este estudio se encontró que los cultivos primarios presentan células con fenotipo epitelial, mesenquimal e intermedio, y al purificar la población con fenotipo intermedio encontraron que estas células presentaban marcadores de CSCs⁴².

Por otro lado, un estudio de células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de ovario encontró que previo a la cirugía, las pacientes presentaban 18% de células circulantes con fenotipo epitelial y un 30% con fenotipo en transición. Sin embargo, después de la quimioterapia basada en platino las células con fenotipo en transición aumentan hasta el 52%, mientras que las células con fenotipo epitelial disminuyen al 14%. Los autores de este artículo concluyen que la quimioterapia basada en platinos selecciona las células tumorales circulantes en transición, lo cual podría reflejar una evolución hacia resistencia a la quimioterapia⁴³.

En el laboratorio, se emplea el LA y la línea celular SKOV-3 como un modelo de estudio. Al respecto, Toledo Leyva en su tesis de doctorado (2017) encontró que 5 LAs diferentes inducían un cambio morfológico en estas células hacia un fenotipo alargado, tipo fibroblasto con abundantes prolongaciones. Este cambio morfológico sugería la inducción de la TEM, por el LA. Para confirmarlo, evaluó la expresión de E-cadherina y vimentina en células SKOV-3 en medio y LA. Encontró que la expresión de E-cadherina es ligera en medio y aumenta un poco en LA, pero su localización es citoplasmática y no en membrana, lo cual sugiere que no está cumpliendo su función normal. Sin embargo, la proteína vimentina está ausente en la condición de medio, mientras que en la condición de LA las células muestran claramente filamentos de esta proteína. Adicionalmente corroboró por western blot la presencia de ambos marcadores en células SKOV-3 estimuladas con tres LAs diferentes, confirmando que solo las células estimuladas con LA expresan vimentina. Lo anterior confirmó que el LA induce la TEM en la línea celular SKOV-3. Debido a los resultados anteriores Toledo Leyva decidió evaluar células provenientes de LA de dos pacientes diferentes, encontrando que éstas sólo expresaron la proteína vimentina⁴⁴ (Figura 6). Lo anterior sugiere que las células en el LA poseen un fenotipo mesenquimal.

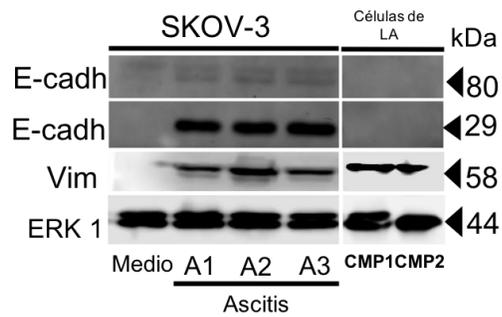
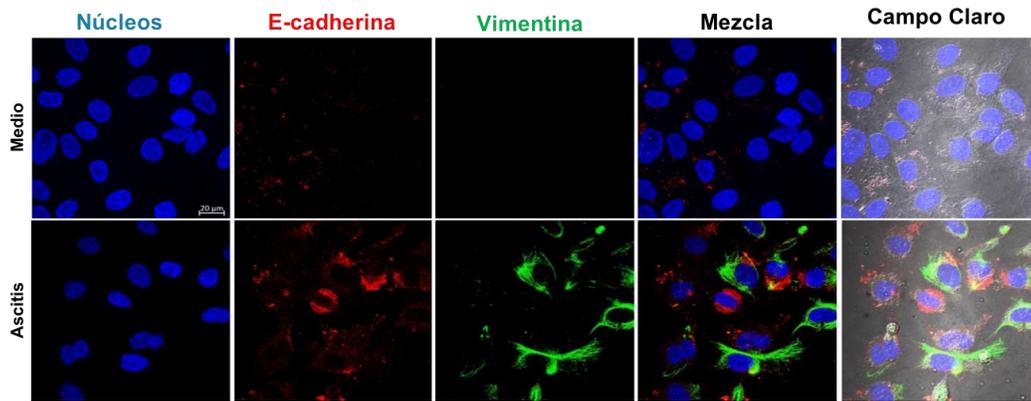


Figura 6. Inducción de la TEM por LA de pacientes con COE. A) Inmunofluorescencia de células SKOV-3 en medio y en LA. El LA induce la expresión del marcador mesenquimal vimentina, la cual se muestra en filamentos, mientras que en las células en medio esta proteína no se expresa. **B)** Western blot de células SKOV-3 en medio y en 3 LA y CMP de los LA diferentes. La expresión de vimentina solo se muestra en las células incubadas en LA. Las CMP solo muestran expresión vimentina y no de E-cadherina. CMP (*Células Malignas de Paciente*). Modificado de Toledo Leyva Tesis de Doctorado 2017⁴⁴.

V. JUSTIFICACIÓN

El tratamiento del cáncer de ovario es quirúrgico, enfocado a remover la mayor parte de la masa tumoral encontrada en la cavidad abdominopélvica y quimioterapia adyuvante basada en platino y taxanos; a pesar de esto, las pacientes recurren en periodos variables con una enfermedad mas agresiva y resistencia a la quimioterapia y solo 46% sobrevive mas de 5 años.

Las células malignas mesenquimales contribuyen a la metástasis. Adicionalmente se sabe que la TEM está relacionada con la resistencia a la apoptosis, la quimioterapia, terapia dirigida e inmunoterapia.

Por lo anterior resulta relevante la detección de células malignas con fenotipo epitelial, mesenquimal o estados intermedios en el líquido ascítico de pacientes con COE con el propósito de establecer la proporción de los fenotipos antes mencionados y a mediano plazo conocer su relación con la resistencia a la quimioterapia y el periodo de recurrencia.

VI. HIPÓTESIS

El líquido ascítico de las pacientes con cáncer de ovario epitelial contiene células malignas con fenotipo epitelial, mesenquimal o intermedio y que expresan diversos marcadores de la transición epitelio-mesénquima.

VII. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Detectar la proporción de células malignas con fenotipo epitelial, mesenquimal o intermedio así como los marcadores de la TEM en células malignas provenientes de LA.

7.2 Objetivos particulares

1. Detectar la proporción de células malignas con fenotipo epitelial, mesenquimal e intermedio en LA de pacientes con COE.
2. Evaluar la expresión del RNA mensajero de los marcadores de la TEM en células provenientes de LA de pacientes con COE.
3. Detectar la presencia de células con fenotipo epitelial, mesenquimal e intermedio en tejido tumoral de pacientes con COE.

VIII. GRUPO DE ESTUDIO

Para este estudio se obtuvieron los diferentes tipos de muestra con base en los siguientes criterios:

Criterio de inclusión:

Pacientes con diagnóstico de cáncer de ovario que presenten líquido ascítico y que aún no reciban tratamiento.

Criterio de exclusión:

Pacientes con diagnóstico de cáncer de ovario que presenten líquido ascítico que estén bajo tratamiento o que lo hayan recibido.

Criterio de eliminación:

Pacientes que presenten líquido ascítico pero que no tengan diagnóstico de cáncer de ovario.

IX. ESTRATEGIA METODOLÓGICA



X. MATERIAL Y MÉTODOS

10.1 Obtención de muestras

Las muestras de LA y tejido tumoral utilizadas en este estudio se obtuvieron del Instituto Nacional de Cancerología (INCan) con base en el protocolo aprobado por los comités de Bioética y Científico del INCan (009/029/GOI) (CB/549/09). Las pacientes fueron seleccionadas por la Dra. Dolores Gallardo Rincón y el Dr. Antonio Bahena, médicos oncólogos adscritos al Departamento de Oncología Médica del INCan. El LA y el tejido tumoral se obtuvieron por personal médico calificado previa firma de la Carta de Consentimiento Informado para cada una de las pacientes. Se analizaron 9 líquidos ascíticos y tres muestras de tejido tumoral (Tabla 2).

Tabla 2. Información de las pacientes						
ID	No. de Expediente	Fecha	Dx histológico	EC	LA	TT
PC1	172404	03/07/17	Seroso papilar alto grado	IVB	+	-
PC2	174194	12/10/17	Seroso papilar alto grado	IVB	+	+
PC3	174190	19/10/17	Seroso papilar alto grado	IIIC	+	+
PC4	174367	26/10/17	Seroso papilar alto grado	IVA	+	+
PC5	180166	19/01/18	Seroso papilar alto grado	IVB	+	-
PC6	180600	23/02/18	Endometroide	IVA	+	-
PC7	180648	02/03/18	Seroso papilar alto grado	IVB	+	-
PC8	180267	07/03/18	Seroso papilar alto grado	IVA	+	-
PC9	180852	09/03/18	Seroso papilar alto grado	IVB	+	-

EC: Etapa clínica, LA: líquido ascítico, TT: tejido tumoral

10.2 Obtención de cultivos primarios de células de LA

El líquido ascítico se recolectó en cajas de cultivo T-75, las cuales permanecieron a temperatura ambiente durante el traslado al laboratorio. El LA se centrifugó a 4 000 rpm por 10 min a 4 °C y se almacenó a -70 °C hasta su uso. Una porción de LA se

mantuvo en la caja de cultivo para lograr la adhesión de células suspendidas en el mismo. Las células permanecieron en condiciones de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂ hasta por 3 semanas, con cambios de LA (centrifugado) de la misma paciente cada 7 días.

10.3 Inmunofluorescencia indirecta

Previo a centrifugar el LA para su almacenamiento, se colocaron 2 ml de LA sobre cubreobjetos limpios y estériles dentro de cajas de Petri de 35 mm, las cuales permanecieron en condiciones de cultivo a 37 °C y 5% de CO₂. Después de 24 h se retiró al LA, las células se lavaron con PBS tres veces y se fijaron con *p*-formaldehído al 4% por 1 h a 37 °C. Enseguida se retiró el *p*-formaldehído, las células se lavaron tres veces con PBS y se permeabilizaron con Tritón X-100 al 0.2% en PBS por 15 min a temperatura ambiente (TA). Posteriormente las células se lavaron y se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 5% en PBS por 1 h a TA. Las células se lavaron tres veces y se incubaron con los anticuerpos primarios: rata anti-E-cadherina (No. Cat. SC-59778, Santa Cruz Biotechnology) en una dilución 1:100 y ratón anti-Vimentina (No. Cat. MA5-11883, Thermo Fisher Scientific) en una dilución 1:100 en PBS toda la noche a 4 °C. Las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos secundarios: cabra anti IgG de Rata-FITC (No. Cat. 81-9511, Invitrogen™) y burro anti IgG de ratón-AF595 (No. Cat. A21203, Invitrogen™) por 1 h a TA en oscuridad. Finalmente, las células se lavaron tres veces con PBS, se incubaron con Hoechst 33342 (No. Cat.62249, Thermo Fisher Scientific) por 20 min a TA en la oscuridad, se lavaron tres veces con PBS y se montaron en portaobjetos con VectaShield (No. Cat. H-1000, Vector). Las laminillas se observaron en el microscopio confocal Carl Zeiss LSM-7000. Las imágenes obtenidas se analizaron con el software Zen Pro.

10.4 Citometría de flujo multicolor

El LA se centrifugó a 1500 rpm por 3 min, la pastilla celular se lavó dos veces con PBS y se resuspendió en 15 ml de amortiguador de lisis de eritrocitos (NH₄Cl 155 mM, NaHCO₃ 12 mM y EDTA 0.1 mM), se incubó por 5 min a TA, enseguida se agregaron 15 ml de PBS para parar la reacción de lisis. Las células se centrifugaron a 1500 rpm por 3 min y se lavaron tres veces con solución de lavado (PBS-EDTA 5mM/SFB 0.5%). Después, las células se incubaron por 30 min a TA en agitación suave con los anticuerpos primarios: ratón anti-CD45-BV510 (No. Cat. 563204, BD Horizon™) y ratón anti E-cadherina-AF647 (No. Cat. 563571, BD Pharmingen™), enseguida las células se lavaron 3 veces. Posteriormente, las células se fijaron por 10 min a TA con *p*-formaldehído al 1%; se lavaron tres veces y se incubaron con los anticuerpos primarios: ratón anti-WT1-PE (No. Cat. NBP2-47931PE, Novus Biologicals), ratón anti-PAX8-DL405 (No. Cat. NBP2-54539V, Novus Biologicals) y ratón anti-Vimentina-AF488 (No. Cat. 563571, BD Pharmingen™) diluidos en solución de permeabilización (BD Perbeabilization solution II) por 30 min a TA. A continuación, las células se lavaron y se resuspendieron en PBS-EDTA 5 mM. Las muestras se analizaron en el citometro de flujo Cytotflex LX (Beckman Coulter) en el Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales (LaNSE) del CINVESTAV. Los resultados obtenidos se analizaron utilizando el software Kaluza (Beckman Coulter).

10.5 Aislamiento de RNA total

El LA se centrifugó a 1500 rpm, las células obtenidas se lavaron tres veces con PBS, y se lisaron con 1 ml de Trizol® (No. de Cat. 10296028, Thermo Fisher Scientific). La fase de separación se dejar reposar por 5 min a TA, con la finalidad de permitir la disociación de los complejos nucleoprotéicos. Posteriormente, se adicionaron 20 µl de cloroformo, se realizó un ciclo de vortex/reposo vigorosamente (15 seg/15 seg) por 3 min. La muestra se centrifugó a 6,000 rpm por 15 a 4 °C y se procedió a retirar la fase acuosa. Posteriormente la fase acuosa se transfirió a otro tubo y se adicionaron 500 µl de isopropanol para precipitar el RNA. Se homogenizó y se incubó 10 min a

TA, se centrifugó a 6,000 rpm por 10 min a 4 °C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla se lavó con 1 ml de etanol al 75%. Se centrifugó a 3,500 rpm por 5 min a 4 °C. La pastilla de RNA obtenida se secó por 4 min y se resuspendió en 20 µl de agua DEPC. Se incubó por 15 min a 55 °C-60 °C y se almacenó a -20 °C. La concentración de RNA se determinó por espectrofotometría a 260 nm. La integridad de RNA se confirmó en geles de agarosa al 1%.

10.6 RT-PCR

A partir de RNA se sintetizó cDNA utilizando el First Strand cDNA Synthesis Kit (No. Cat. K1612, Thermo Scientific) de acuerdo con las instrucciones el fabricante. Se tomaron 5 µg de RNA total de cada paciente, se adicionó 1 µl de oligo dT, y se llevó a 12 µl con agua DEPC. La mezcla se incubó a 65 °C durante 5 min. Posteriormente, se adicionaron 4 µl de amortiguador de reacción 5X First Strand, 1 µl de dNTP's, 1 µl de inhibidor de RNA ribolock (20u/µl), 1 µl de la enzima M-MuLV transcriptasa reversa (20u µl) y se incubó a 37 °C durante 60 min y a 70 °C por 5 min en el termociclador iCycler (Bio-Rad).

El cDNA obtenido se empleó para la amplificación de los mensajeros deseados utilizando el reactivo PCR Master Mix (No. Cat. K0171, Thermo Fisher Scientific). Se realizó una mezcla con un volumen final de 20 µl de la siguiente manera: 10 µl de PCR Master Mix 2X, 3 µl de oligos sentido, 3 µl de oligos antisentido, 3 µl de cDNA y 1 µl de agua DEPC. Los productos de amplificación se visualizaron en un gel de agarosa al 2% con 0.02% de bromuro de etidio. Como control positivo de la reacción y de carga de cDNA se realizó la amplificación de GAPDH.

Para el diseño de los oligonucleótidos adecuados para la amplificación de los mensajeros de E-cadherina, N-cadherina, vimentina, snail, slug, twist, zeb1 y zeb2 se utilizó el software PRIMER3 (<http://primer3.ut.ee/>) y la base de datos Primer BLAST-NCBI, con base en la secuencia canónica de *Homo sapiens* (Tabla 3).

Tabla 3. Secuencia de oligonucleótidos empleados para PCR			
Mensajero	Sentido	Antisentido	Producto
E-cadh	TGGACAGGGAGGATTTGAG	AGGCTGTGCCTTCCTACAGA	458 pb
N-cadh	ACAGTGGCCACCTACAAAGG	GGATTGCCTTCCATGTCTGT	724 pb
Vimentina	TCGCCAACTACATCGACAAG	GCTTCAACGGCAAAGTTCTC	625 pb
Snail	TTTACCTTCCAGCAGCCCTA	CCAGGCTGAGGTATTCCTTG	415 pb
Slug	GAGCATACAGCCCCATCACT	CTCCCCCGTGTGAGTTCTAA	479 pb
Twist	GTCCGCAGTCTTACGAGGAG	CTAGTGGGACGCGGACAT	314 pb
Zeb1	GCACCTGAAGAGGACCAGAG	TGGTGATGCTGAAAGAGACG	537 pb
Zeb2	TCCTAATATCCGCCTGTCG	TCAGCAGTTCATCGGAGTTG	512 pb

Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los mensajero de E-cadherina, N-cadherina, Vimentina, Snail, Slug, Twist, Zeb1 y Zeb2 se diseñaron con base en la secuencia canónica de *Homo sapiens* empleando el software PRIMER3 y la base de datos Primer BLAST-NCBI.

10.7 Inmunohistofluorescencia indirecta

A través de la gestión realizada por la Dra. Dolores Gallardo, fue posible obtener cortes de tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario epitelial embebidos en parafina, los cuales fueron proporcionados por el Dr. José Chanona Vilchis del Departamento de Patología del INCan, posterior al diagnóstico histológico. El tejido se desparafinó a 60 °C toda la noche. Posteriormente, los cortes histológicos fueron colocados en xilol durante 5 min en tres ocasiones. Las laminillas se hidrataron en soluciones descendentes de etanol (absoluto, 95%, 90%, 80% y 70%) durante 5 min c/u. Después las laminillas se incubaron en PBS por 30 min. La recuperación antigénica se realizó utilizando un amortiguador de tripsina (0.1%, CaCl₂ 0.1% pH 7.8 en H₂O mQ) durante 30 min a TA en cámara húmeda. Los cortes se lavaron 2 veces con TBS-T durante 5 min c/u. Los cortes se incubaron con Sudan Negro al 0.3% en H₂O mQ por 10 min a TA para reducir la autofluorescencia tisular. Se lavaron tres veces con TBS-T. Enseguida los cortes se permeabilizaron con PBS-Tritón X-100 al 0.2% por 10 min y se lavaron tres veces con TBS-T. Para bloquear

los sitios de unión inespecíficos, las muestras se bloquearon con BSA al 5% en TBS-T durante 30 min a TA. Posteriormente, se lavaron y se incubaron con los anticuerpos primarios (anti-E-cadherina y anti-vimentina) descritos en la sección de inmunofluorescencia indirecta. Los anticuerpos se diluyeron 1:50 en Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4, con BSA al 1%, Tween 0.1% y se incubaron toda la noche a 4 °C. A continuación se lavaron tres veces con TBS-T por 5 min c/u y se incubaron por 1 h a TA en cámara húmeda y en obscuridad con los anticuerpos secundarios: cabra anti-IgG de rata-FITC (No. Cat. 81-9511, Invitrogen™) y cabra anti-IgG de Ratón-PB (No. Cat. P31582, Invitrogen™) en una dilución 1:50 en Tris-HCl 0.05M, pH 7.4. Se lavaron tres veces con TBS-T durante 5 min. Los núcleos se tiñeron con yoduro de propidio (No. Cat. P1304MP, Thermo Fisher Scientific) por 30 min a TA en una dilución 1:1000. Se lavó tres veces y se montó con 15 µl de VectaShield (No. Cat. H-1000, Vector). Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su análisis. Las muestras se analizaron utilizando el microscopio confocal Carl Zeiss LSM 700, y las imágenes obtenidas se procesaron mediante el software Zen Pro.

XI. RESULTADOS

11.1 Las células de LA presentan un fenotipo intermedio

Al observar al microscopio las células provenientes de los LAs de las diferentes pacientes, se encontró que éstas presentaban morfologías diferentes. Las células de la PC1, PC2, PC4 y PC6 mostraron una morfología alargada, mientras que en general, las células de la PC1, PC3, PC7 se observaron con morfología redondeada. Por otro lado, en la PC5 se encontraron células multinucleadas (Figura 7). Para detectar la presencia de células con fenotipo epitelial, mesenquimal o intermedio en las células provenientes de LAs se evaluó la expresión de las proteínas E-cadherina (como marcador de fenotipo epitelial; en color verde) y vimentina (como marcador de fenotipo mesenquimal; en color rojo). Las células de todas las pacientes mostraron expresión de E-cadherina y vimentina, lo cual sugiere un fenotipo intermedio.

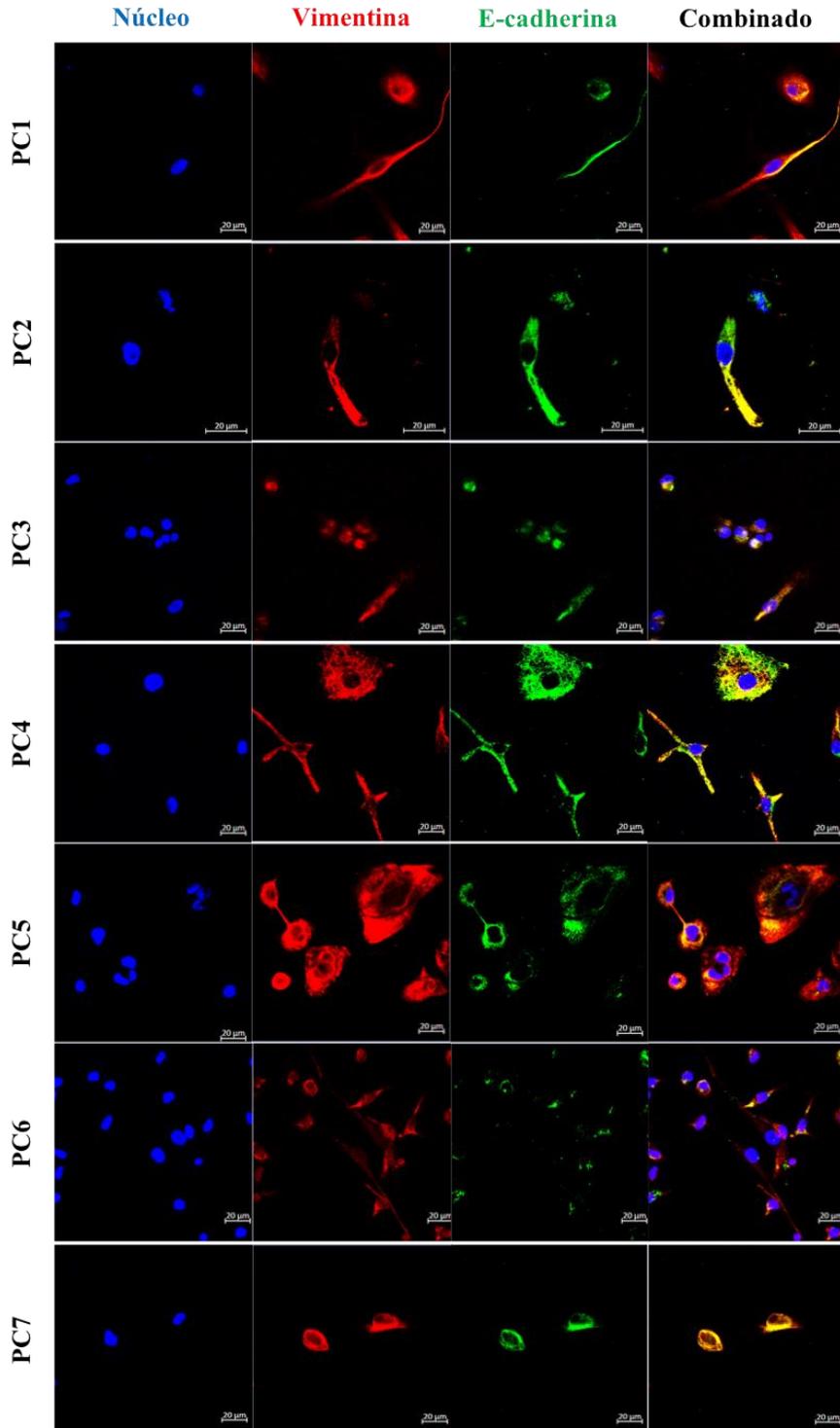


Figura 7. Expresión de E-cadherina y vimentina en células de LA. Todas las pacientes muestran expresión de ambos marcadores, por lo que se consideran células con fenotipo intermedio. Células con forma alargada se encontraron en las pacientes PC1, PC2, PC4 y PC6. Células con morfología redondeada se encontraron en las pacientes PC1 PC3 y PC7. Células multinucleadas se encontraron en PC5. *Vimentina (Rojo)*, *E-cadherina (Verde)*, *Núcleos (Azul)*. Barra = 20 μ m.

11.2 Las células malignas de LA en cultivo presentan un fenotipo intermedio.

Con el fin de evaluar la TEM en las células presentes en el LA de las diferentes pacientes, fue necesario realizar pasos secuenciales de tinción para seleccionar las poblaciones celulares de interés. Como primer paso se evaluó la presencia de CD45⁴⁶ como marcador de leucocitos, mismos que fueron descartados del análisis. Enseguida se buscaron los marcadores PAX8 y WT1⁴⁷⁻⁵² como marcadores de células malignas (de manera individual o en combinación) para identificar a la población celular de interés. Enseguida se procedió a buscar los marcadores específicos de la TEM, es decir, E-cadherina y vimentina para determinar el fenotipo celular en transición⁵³.

En el caso de la PC5, al momento de recibir el LA, una fracción de éste se colocó en caja de cultivo y se mantuvo en esta condición durante tres semanas. Otra fracción de esta muestra se procesó a las 24 h de haber colocado el LA conteniendo a las células en cubreobjetos para su análisis por IFI. El análisis por microscopía confocal mostró que las células presentaban la expresión de ambos marcadores, es decir, E-cadherina y vimentina. Posteriormente, se evaluaron las células provenientes de LA que permanecieron en condiciones de cultivo durante tres semanas. Esta muestra presentó una proporción baja de leucocitos, ya que la mayoría de las células, al momento del estudio, no expresaron CD45. Sin embargo, estas células resultaron positivas para el marcador tumoral WT1, por lo que se consideraron células malignas. Al evaluar la expresión de E-cadherina y vimentina en la población de células malignas se observó que la mayoría presentaba un fenotipo intermedio (E-cadh⁺/Vim⁺) (Figura 8). Lo anterior, confirmó los resultados obtenidos por IFI.

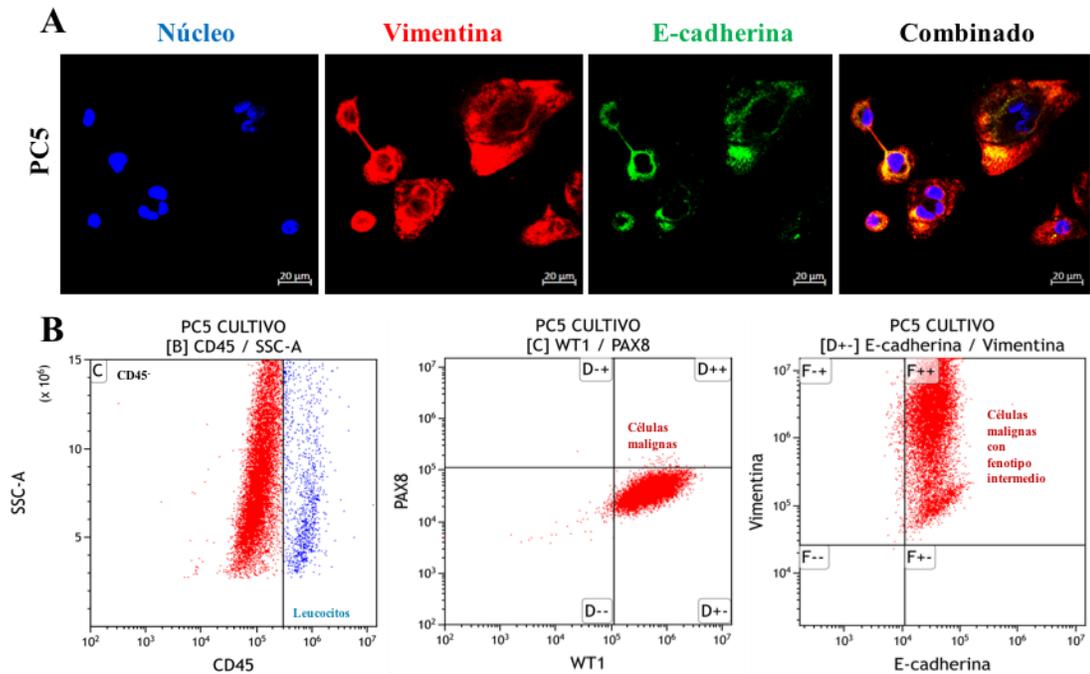


Figura 8. Fenotipo de las células malignas provenientes de LA (PC5). A) Células de LA de la misma paciente analizadas por IFI 24 h después de la recepción de la muestra. Núcleos (Azul), Vimentina (Rojo), E-cadherina (Verde). **B)** Células de líquido ascítico (PC5) permanecieron en cultivo con LA por 3 semanas, posteriormente las células se analizaron con el panel de anticuerpos detallado en métodos. Leucocitos ($CD45^+$), Células malignas ($WT1^+$), Células malignas con fenotipo intermedio ($E-cadherina^+/Vimentina^+$).

11.3 La proporción de células malignas en LA es variable en cada paciente

Debido a que la detección de E-cadherina y vimentina por IFI, así como la evaluación del fenotipo de células malignas por citometría de flujo se realizó en células que se adhirieron al vidrio y a cajas de cultivo respectivamente, pensamos que el factor adhesión podría influir en la expresión de marcadores epiteliales, tales como E-cadherina. Por lo anterior, decidimos evaluar la presencia y proporción de células malignas de líquido ascítico de pacientes con COE lo más pronto posible después de su obtención, de este modo se analizó el fenotipo de las células malignas en LA en suspensión (como originalmente se encuentran en las pacientes con COE) sin que el factor adhesión influyera.

Se analizaron 4 pacientes (PC6, PC7, PC8, PC9). Los resultados muestran que el LA de las diferentes pacientes contiene, leucocitos (CD45⁺), células malignas (PAX⁺/WT1⁻), (PAX⁺/WT1⁺) y (PAX8⁻/WT1⁺), así como células no malignas (PAX8⁻/WT1⁻).

De manera general, todas las pacientes mostraron una gran cantidad de leucocitos, sin embargo, la proporción de células malignas y no malignas varió en cada paciente. Particularmente, en la PC6 se encontraron 2 poblaciones de células malignas (PAX8⁺/WT1⁺). Una población (identificada en color morado) mostró un fenotipo mesenquimal, mientras que otra población (identificada en color verde) presentó fenotipos epitelial, mesenquimal e intermedio; adicionalmente esta población también contenía células dobles negativas (E-cadh⁻/Vim⁻). En el caso de las PC7 y PC9 solo hay una pequeña proporción de células malignas (WT1⁺), sin embargo, esta pequeña proporción presentó un fenotipo claramente mesenquimal (Vim⁺). Por otro lado, aunque la PC8 no presentó células malignas, esta población mostró fenotipo mesenquimal (Figura 9).

En todas las muestras de LA de las pacientes con COE se encontró una proporción variable de células no malignas (PAX8⁻/WT1⁻) (Figura 9).

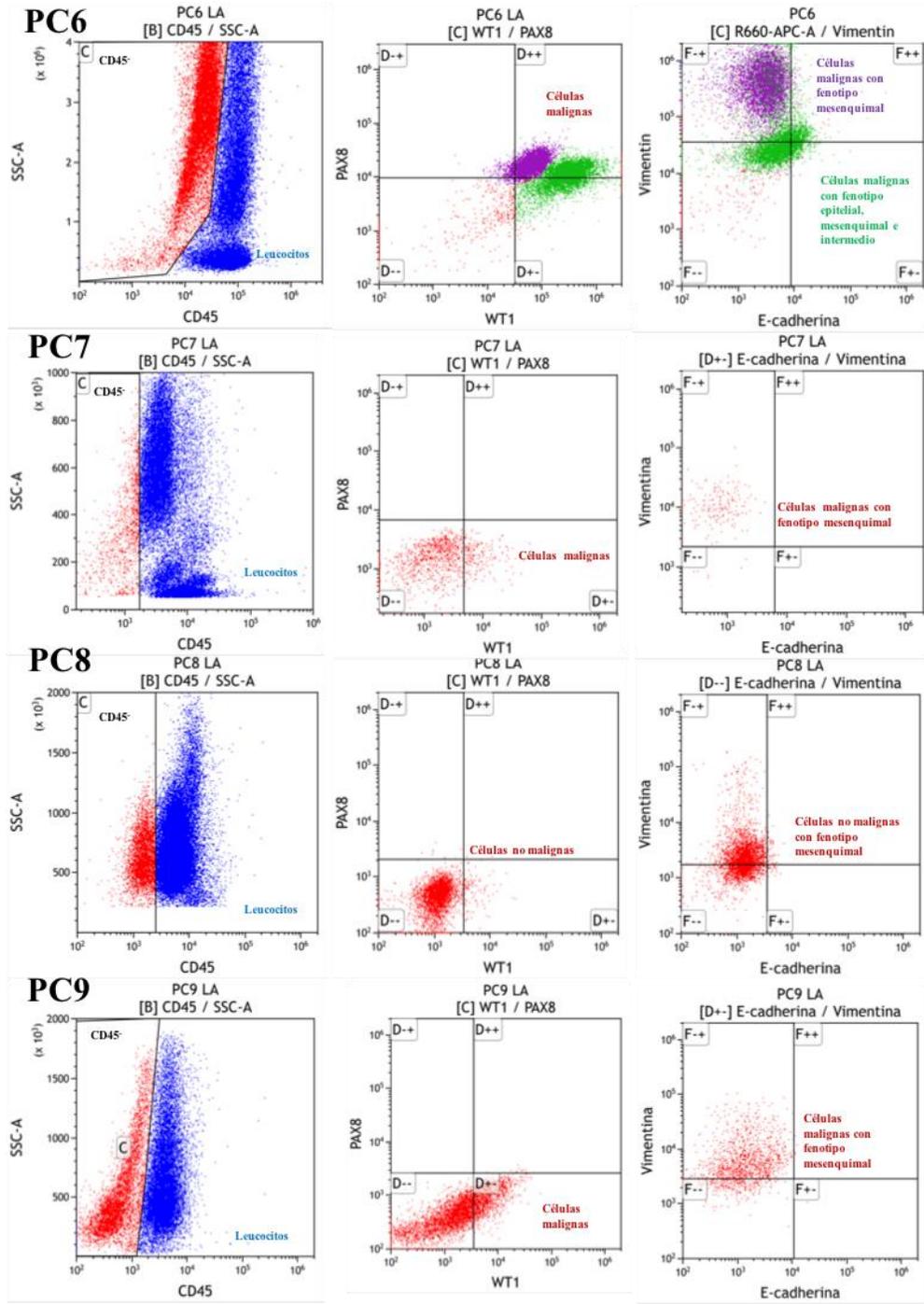


Figura 9. Proporción de células malignas en LA de pacientes con COE. Células provenientes de LA analizadas inmediatamente después de su recepción. A) PC6 B) PC7, C) PC8, D) PC9. Leucocitos (CD45⁺), Células malignas (PAX⁺/WT1⁻), (PAX⁺/WT1⁺) y (PAX8⁻/WT1⁺). Células no malignas (PAX8⁻/WT1⁻). Fenotipo epitelial (E-cadh⁺/Vim⁻), Fenotipo mesenquimal (E-cadh⁻/Vim⁺), Fenotipo intermedio (E-cadh⁺/Vim⁺).

Para determinar la proporción de leucocitos, células malignas con fenotipo epitelial, mesenquimal e intermedio se partió de un mismo número de células (500,000). Las muestras se analizaron bajo las mismas condiciones y por triplicado. Los resultados mostraron que la proporción de leucocitos fue de 10% para la PC5, 60% en la PC6, 94% en la PC7, 90% en la PC8 y 70% en la PC9. Adicionalmente la proporción de células malignas fue de 80% para la PC5, 39% en la PC6, >1% para la PC7 y PC8 y de 8% para la PC9. La distribución de los fenotipos epitelial, mesenquimal e intermedio de las células malignas fue 1%, 0% y 79% respectivamente para la PC5, 2%, 35% y 2% para la PC6; 0%, >1% y 0% para la PC7 y PC8; y de 0%, 4% y 0% para la PC9 (Tabla 4).

Tabla 4. Proporción de células malignas con fenotipo epitelial, mesenquimal e intermedio							
ID	Dx histológico	EC	Leucocitos	CME	CMM	CMI	CMT
5*	Seroso papilar alto grado	IVB	10%	1%	0	79%	80%
6	Endometroide	IVA	60%	2%	35%	2%	39%
7	Seroso papilar alto grado	IVB	94%	0%	<1%	0%	<1%
8	Seroso papilar alto grado	IVA	90%	0%	<1%	0%	<1%
9	Seroso papilar alto grado	IVB	70%	0%	4%	0%	8%

(*) Células en cultivo, **EC** etapa clínica; **CME** células malignas epiteliales; **CMM** células malignas mesenquimales; **CMI** células malignas con fenotipo intermedio; **CMT** células malignas totales.

11.4 La expresión de los factores de transcripción asociados a la TEM varía en cada paciente.

Para determinar si las células provenientes de LA presentaban los factores de transcripción asociados a la TEM se decidió evaluar los niveles de mRNA de los factores snail, slug, twist, zeb1 y zeb2, así como de E-cadherina, vimentina y N-cadherina. Debido a la baja cantidad de células obtenida en algunas pacientes, solo se analizó la expresión del mRNA de estos factores en 3 pacientes (PC7, PC8 y PC9).

Los resultados mostraron que las células de LA de las pacientes con COE muestran una expresión diferencial de los mensajeros evaluados. Particularmente, la expresión de E-cadherina resultó baja en las PC7 y PC8, mientras que la PC9 muestra una expresión elevada. En el caso de N-cadherina, la PC7 y PC8 no mostraron expresión, mientras que en las células de la PC9 si hubo amplificación del mRNA correspondiente. En tanto que en todas las pacientes hubo expresión del mRNA para vimentina. En el caso de los factores de transcripción, las PC7 y PC9 no expresaron snail y twist, por el contrario, la PC8 mostró la expresión de ambos snail y twist. Finalmente, todas las pacientes mostraron expresión de slug, zeb1 y zeb2 (Figura 10).

11.5 Las células malignas de LA presentan un fenotipo diferente al que expresan las células en tejido tumoral

Para determinar si la presencia de células malignas con los diferentes fenotipos encontrados en LA refleja la expresión de los fenotipos en el tejido tumoral, se evaluó la expresión de los marcadores E-cadherina y vimentina por IHFI en tejido tumoral de 3 pacientes (PC2, PC3 y PC4).

En el tejido tumoral de la PC2, se encontró que la expresión de vimentina no fue homogénea; al mismo tiempo, en esta muestra se encontró una expresión mínima de E-cadherina. Esto contrasta con la expresión de estos marcadores en las células de LA, donde claramente se expresaron ambos marcadores (Figura 11 A). Por otro lado, el tejido tumoral de la PC3 solo muestra expresión para vimentina y no para E-cadherina, por el contrario las células de LA de la misma paciente presentan ambos

marcadores (Figura 11 B). Finalmente, en el caso del tejido tumoral de la PC4 no se encontró expresión de E-cadherina ni de vimentina, lo cual contrasta totalmente con las células de LA (Figura 11 C).

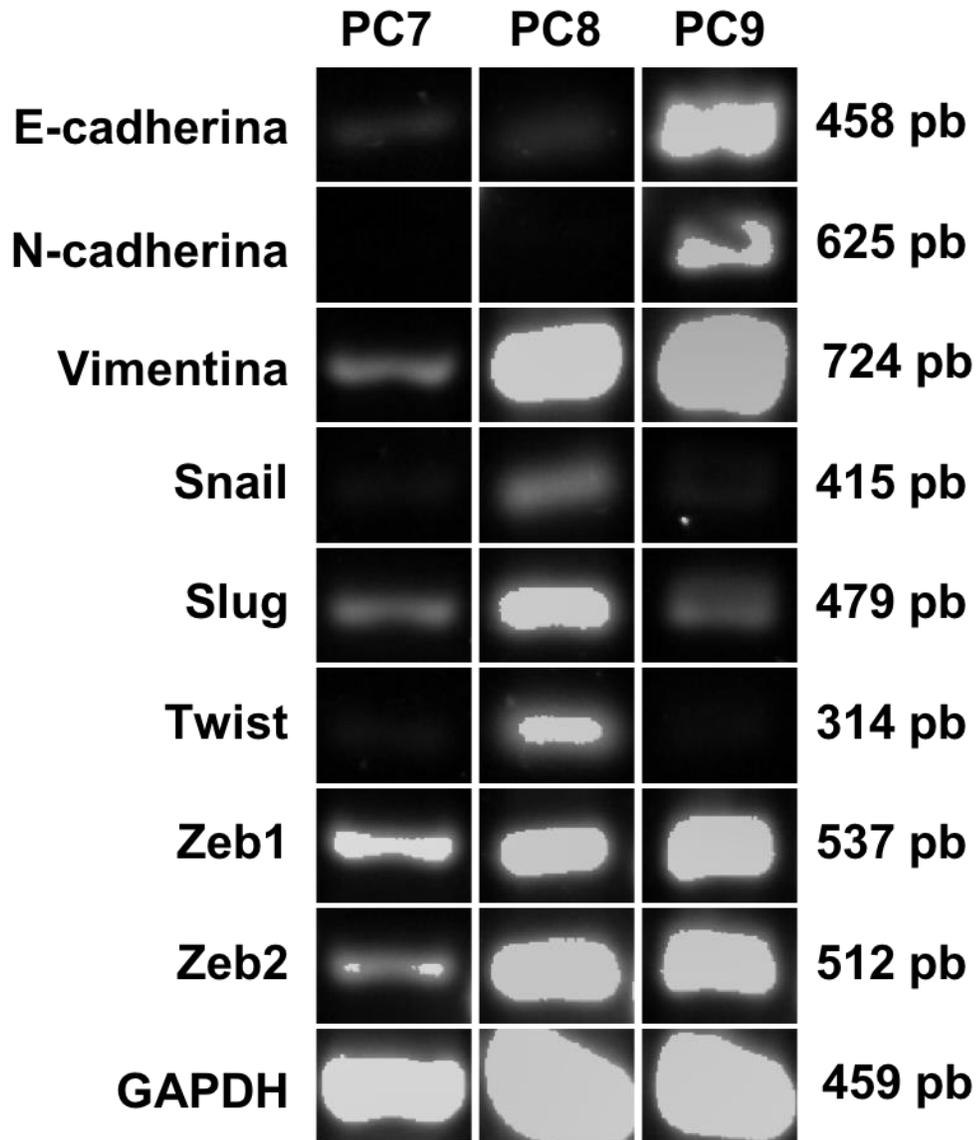


Figura 10. Expresión de mRNA de factores de transcripción asociados a la TEM. 3 paciente diferentes (PC7, PC8, PC9) muestran expresión diferencial de los marcadores de la TEM (E-cadh, N-cadh, Vim) y de los factores asociados a la TEM (Snail, Slug, Twist, Zeb1, Zeb2).

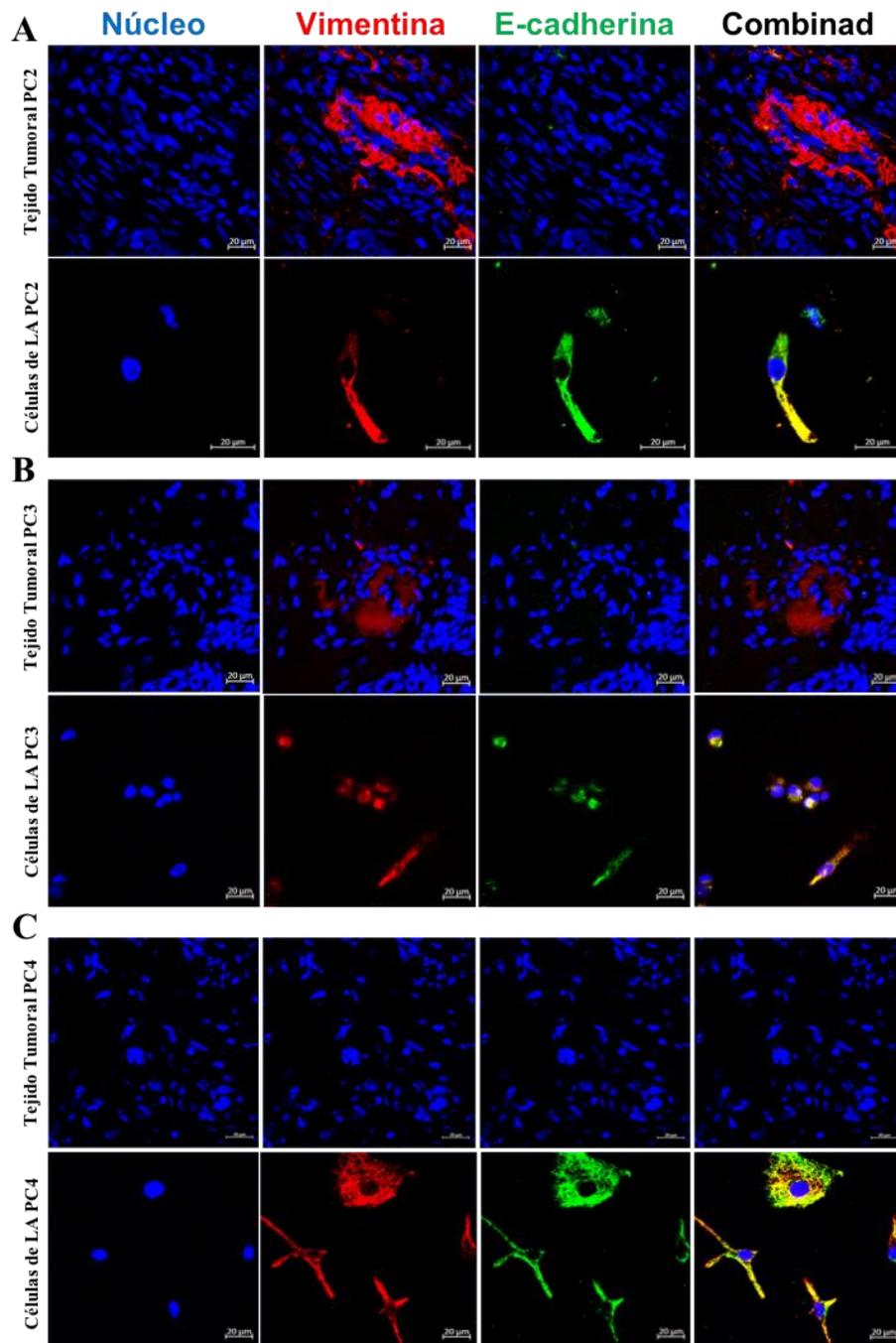


Figura 11. Expresión de E-cadherina y vimentina en tejido tumoral. A) Tejido tumoral y células de LA de PC2. B) Tejido tumoral y células de LA de PC3. C) Tejido Tumoral y células de LA de PC4.

XII. DISCUSIÓN

El cáncer de ovario es un problema de salud a nivel mundial debido a que no existen síntomas específicos durante las etapas tempranas de la enfermedad ni estrategias adecuadas para su diagnóstico oportuno. Lo anterior lleva a que alrededor del 60% de las pacientes se diagnostique cuando ya hay metástasis, mientras que solo un 15% se diagnostica cuando la enfermedad está confinada a los ovarios¹¹. En etapas avanzadas las pacientes presentan acumulación de LA en la cavidad abdominopélvica la cual está relacionada con pobre pronóstico¹⁴. Sin embargo, no se conoce de manera precisa la razón de por qué el LA se relaciona con el pobre pronóstico, a pesar de que se destaca como una posible fuente de información para entender la patogénesis de la enfermedad.

Estudios previos del LA se han enfocado en caracterizar sus componentes solubles tales como: factores de crecimientos, citosinas, quimiocinas, hormonas, ácidos nucleicos, etc.¹³ Estos componentes se consideran importantes inductores de la TEM. En el laboratorio, Toledo Leyva (2017) confirmó que el LA de pacientes con COE induce el proceso de TEM en la línea celular SKOV-3. Así mismo, encontró que las células provenientes de LA expresaban vimentina y no E-cadherina, lo cual sugiere que las células podrían presentar predominantemente un fenotipo mesenquimal.

Por lo anterior, en este estudio se decidió evaluar la presencia y proporción de células malignas con fenotipo epitelial, mesenquimal e intermedio en LA y en tejido tumoral. El primer abordaje de este proyecto fue evaluar la presencia de las proteínas E-cadherina y vimentina, como marcadores epitelial y mesenquimal respectivamente. Para ello se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta con doble marcaje en las células provenientes de LA que se adherían a cubreobjetos. Con estos ensayos se encontró que las células que se adherían al vidrio presentaban diferente morfología, células alargadas tipo fibroblasto, células redondeadas y células multinucleadas y que además éstas presentaban un fenotipo intermedio (E-cadh⁺/Vim⁺) (Fig. 7). Estos resultados difieren ligeramente de lo encontrado

previamente por Ho M.C. y cols. (2011), quienes reportaron la presencia de 2 poblaciones de células provenientes de LA, una con fenotipo epitelial y otra con fenotipo mesenquimal, utilizando como marcador epitelial la citoqueratina 18 y como marcador mesenquimal la vimentina mediante IFI por marcaje individual. Sin embargo, las células analizadas permanecieron en cultivo en medio DMEM/F12 y M199 y se analizaron hasta el tercer pase⁵⁴. A pesar de que el cultivo de células podría seleccionar las células malignas del LA, la condición de cultivo prolongado y el uso de medio de cultivo convencional podrían afectar la expresión de los marcadores analizados debido a la plasticidad celular que poseen las células en TEM^{16,19}.

A diferencia del trabajo de Ho M.C. y cols. (2012), en este trabajo, se colocó el LA sobre cubreobjetos de manera que las células permanecieran en su microambiente original (el LA) y fueron procesadas a las 24 h de cultivo, reduciendo la influencia del tiempo de cultivo en la expresión de las proteínas analizadas.

A pesar de que se considera que el LA es un fuente importante de células malignas, diversos estudios han indicado que el LA es fuente de diversos tipos celulares tales como células mesoteliales, fibroblastos, células endoteliales, leucocitos, entre otros⁴⁰. Por lo anterior, se realizó una revisión bibliográfica en la búsqueda de marcadores de células malignas de cáncer de ovario epitelial, encontrando que PAX8 y WT1 son proteínas que permiten identificar células malignas de cáncer de ovario de otros tipos de cáncer⁴⁷⁻⁵². Se diseñó entonces un panel de tinción multicolor para citometría de flujo que permitiera conocer la proporción de células malignas con fenotipo epitelial, mesenquimal o intermedio el cual se describe de manera detallada en la sección de métodos.

Primero, se evaluaron células provenientes de LA que permanecieron en cultivo por tres semanas en LA (PC5). Se encontró que la mayoría de las células en cultivo eran células malignas, debido a que expresaban WT1, además estas células presentaban un fenotipo intermedio. Estos resultados concuerdan con lo observado por IFI para las células de LA de la misma pacientes. Adicionalmente, estos resultados son similares

a los encontrados por Strauss y cols. (2011), quienes establecieron cultivos primarios de LA encontrando células malignas con fenotipo intermedio, las cuales también expresaron marcadores de CSCs⁴².

Previamente se ha considerado que las células en TEM presentan una gran plasticidad, y que el factor adhesión puede contribuir a la expresión de marcadores epiteliales, tales como E-cadherina. Por ello, se evaluó el fenotipo de las células malignas en suspensión inmediatamente después de la recepción de la muestra. Los resultados de esta evaluación indican que la proporción de células malignas en el LA es variable en cada paciente. Para la PC6, PC7, PC8 y PC9 la proporción de células malignas fue de 39%, <1%, <1% y 8% respectivamente. La razón de la diferencia en la proporción podría corresponder al subtipo histológico de cada una de las muestras. Por ejemplo, la PC6 tiene un subtipo histológico endometroide el cual se ha reportado se disemina lentamente comparado con el subtipo histológico seroso papilar de alto grado, que es el diagnóstico histológico que presentan las PC7, PC8 y PC9. Entonces, la presencia de una baja proporción de células malignas en LA podría indicar la elevada capacidad de las células para instalarse y generar implantes de los órganos de la cavidad abdominopélvica. Sin embargo, se requiere el análisis detallado del reporte de la cirugía citorreductora para confirmar lo antes mencionado.

A pesar de que la proporción de células malignas en LA varía en cada paciente, las células malignas presentan preferentemente un fenotipo mesenquimal en LA cuando permanecen en suspensión. El análisis de las células de manera inmediata después de su recepción permitió evitar la influencia de la adhesión celular a la expresión de marcadores epiteliales como E-cadherina. Por ello, los resultados de citometría de flujo de las células de LA de la PC5, PC6 y PC7, así como los resultados de IFI de las mismas PC7 confirman la plasticidad de las células mesenquimales y sugieren la capacidad de revertir hacia un fenotipo intermedio o epitelial.

Las células malignas con fenotipo intermedio y mesenquimal están relacionadas con la resistencia a la apoptosis, resistencia a agentes quimioterapéuticos, terapia dirigida

e inmunoterapia²⁰. Particularmente, Chebouti I. y cols. (2017), encontraron que 18% de las células tumorales circulantes en pacientes presentaba un fenotipo epitelial y 30% un fenotipo en transición antes de la cirugía y la quimioterapia, sin embargo, después de la quimioterapia basada en platino las células con fenotipo en transición aumentan hasta el 52%, mientras que las células con fenotipo epitelial disminuyen al 14%. Estos indican que la quimioterapia basada en platinos selecciona las células en transición y que podría reflejar la evolución hacia quimiorresistencia⁴³. Al tomar esto en consideración para la interpretación de los resultados obtenidos en este trabajo, se podría sugerir que la PC6 que presente un 35% de células malignas con fenotipo mesenquimal y un 2% con fenotipo intermedio y la PC9 que presenta un 4% de células malignas con fenotipo mesenquimal podrían ser refractarias a la quimioterapia o podrían progresar en menor tiempo con respecto a la PC7 y PC8 que presentan menos del 1% de células malignas mesenquimales en LA. Sin embargo, aún no sabemos si un porcentaje tan pequeño de células mesenquimales podría ser suficiente para desarrollar quimiorresistencia.

En los ensayos de citometría de flujo encontramos que todas las pacientes presentaron una proporción de células con fenotipo mesenquimal que no son positivas a los dos marcadores de células tumorales que usamos en este estudio. Esta población celular podría corresponder a fibroblastos, células endoteliales o células mesoteliales, las cuales también pueden expresar vimentina o a una población de células malignas que no expresa PAX8 ni WT1. Para diferenciar entre los tipos celulares antes mencionados en próximas pacientes, se plantea utilizar los marcadores FAP (proteína activada de fibroblastos) para identificar fibroblastos, CD31 para células endoteliales y calretinina para las células mesoteliales respectivamente.

Los resultados de RT-PCR mostraron que las células de LA expresan de manera diferencial los factores de transcripción asociados a la TEM. A pesar de que los factores de transcripción de la TEM se consideran redundantes en el mantenimiento del fenotipo en transición, también se han relacionado a otros procesos como su participación en la adquisición de la pluripotencialidad, la resistencia a la apoptosis y

a la quimioterapia¹⁹⁻²³. Por ejemplo, los factores de transcripción Twist y Zeb pueden prevenir la senescencia inducida por oncogenes²⁹; la sobreexpresión de Snail o Twist en células epiteliales de mama induce la TEM y la expresión de marcadores de células “stem”²⁸. Por otro lado, estos factores también contribuyen a la resistencia a la apoptosis^{26,55}. Esto hace pensar que la expresión diferencial de los mRNA en las células de LA podría deberse a que las células en los LAs tienen propiedades diferenciales en las pacientes.

Se encontró que todas las pacientes expresan los mensajeros de los factores Zeb1 y Zeb2; éstos se consideran factores tardíos en la TEM, lo cual sugiere que las células en LA podrían estar en la etapa final de la TEM. Adicionalmente, ha demostrado que el bloqueo del factor de transcripción Zeb1 en líneas celulares de cáncer de ovario resistentes a paclitaxel reestablece su sensibilidad a este compuesto⁵⁶. Esto sugiere que el factor de transcripción Zeb1 participa en la quimiorresistencia.

Debido a que el tejido tumoral se analiza de manera detallada durante la clínica oncológica y que además es la principal fuente de información para el diagnóstico y el diseño del tratamiento, se evaluó la presencia de los marcadores E-cadherina y vimentina en el tejido tumoral de tres pacientes y se comparó con la expresión de estas mismas proteínas en células de LA. Se encontró que las células del tejido tumoral poseen un fenotipo diferente al de las células en los LAs respectivos. Estos resultados difieren de lo encontrado en otros tipos de tumor como en el caso de cáncer de mama, donde los tumores primarios y secundarios expresan de manera conjunta E-cadherina y vimentina⁵³. Sin embargo, para el caso del cáncer de ovario estos marcadores no se analizan de manera simultánea en ambos tipos de muestras (tejido tumoral y líquido de ascitis) por lo que los estudios de la detección de los fenotipos antes mencionados son escasos.

Finalmente, el tratamiento del cáncer de ovario es quirúrgico, enfocado en remover la mayor parte de la masa tumoral encontrada en los órganos de la cavidad abdominopélvica y terapia adyuvante basada en platino y taxanos. A pesar de esto, las pacientes recurren en periodos variables con una enfermedad más agresiva y

resistente a la quimioterapia, sin conocer de manera precisa la causa de este fenómeno. Se sabe que las pacientes en etapas avanzadas y en la recurrencia, presentan LA y los resultados de este trabajo indican que el LA de las pacientes con COE presenta una proporción diferente de células malignas, además, la mayoría de las células malignas en LA presenta un fenotipo mesenquimal. Se sabe que las células malignas con fenotipo mesenquimal son resistentes a la apoptosis y a la quimioterapia, comparadas con las células epiteliales. Por ello resulta relevante su detección en las pacientes con COE, debido a que estas células podrían en cierta medida participar en el desarrollo de la resistencia a la quimioterapia y su presencia correlacionar con el periodo de recurrencia.

El tratamiento del COE se diseña con base en el subtipo histológico del tumor y la etapa clínica de las pacientes. El tejido tumoral se analiza para la expresión de los marcadores PAX8 y WT1 para confirmar el origen del tumor y adicionalmente se evalúan otras moléculas como vimentina, para determinar si el tumor presenta características mesenquimatosas, mientras que el LA solo se analiza para la detección de células malignas como un parámetro requerido para la estadificación de las pacientes. Los resultados de este trabajo muestran que las células del tumor, son negativas para E-cadherina y solo en algunas pacientes son positivas para vimentina en algunas regiones del tumor, mientras que en los LA analizados en este trabajo, las células malignas presentan un fenotipo mesenquimal o intermedio. Lo anterior sugiere que la evaluación del tejido tumoral podría no ser suficiente para el diseño del tratamiento de las pacientes con COE y que el análisis del fenotipo de las células en LA podría apoyar el diseño del tratamiento y mejorar el la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global. Sin embargo, se requiere dar seguimiento a las pacientes analizadas en este trabajo, así como un mayor número de muestra para confirmar esta hipótesis.

XIII. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que en el 100% de las muestras de LAs analizadas las células expresaron los marcadores de la TEM, es decir, se trata de un fenómeno generalizado. En el caso de células adheridas al vidrio, éstas presentan un fenotipo intermedio al igual que las células que permanecen en cultivo. Por otro lado, la proporción de células malignas en LA (analizadas en suspensión) varía en cada paciente así como la distribución de los diferentes fenotipos (epitelial, mesenquimal e intermedio); sin embargo, predominan los fenotipos intermedio y mesenquimal. Además, el patrón de expresión de los factores de transcripción asociados a la TEM también varía en cada paciente pero confirma el estado en transición de las células en LA y finalmente, las células de LA presentan principalmente un fenotipo mesenquimal e intermedio, lo cual difiere con lo encontrado en el tejido tumoral.

XIV. PERSPECTIVAS

Ampliar el panel de marcadores con anticuerpos anti-CD31, anti-FAP y anti-calretinina para detectar células endoteliales, fibroblastos y células mesoteliales respectivamente.

Aumentar el número de muestras en estudio.

Hacer un análisis de correlación de las poblaciones celulares encontradas con el periodo de recurrencia y la resistencia a la quimioterapia.

XV. REFERENCIAS

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics 2012. (2012). *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 62(1):10-29.
2. World Health Organization. Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide, Globocan 2012. Sitio Web. Consultado Mayo 2018. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>
3. Gallardo-Rincón, D. et al. (2016). Epidemiological overview, advances in diagnosis, prevention, treatment and management of epithelial ovarian cancer in Mexico. *Salud Pública de México*. 58(2), 302-308.
4. La Vecchia, C. (2017). Ovarian cancer: epidemiology and risk factors. *European Journal of Cancer Prevention*, 26(1), 55-62.
5. Glance, A. (2009). Ovarian cancer: an overview. *American Family Physician Journal*, 80(6), 609-616.
6. Prat, J., Ribé, A., & Gallardo, A. (2005). Hereditary ovarian cancer. *Human Pathology*, 36(8), 861-870.
7. Kroeger Jr, P. T., & Drapkin, R. (2017). Pathogenesis and heterogeneity of ovarian cancer. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 29(1), 26.
8. Fathalla, M. F. (1971). Incessant ovulation—a factor in ovarian neoplasia?. *The Lancet*, 298(7716), 163.
9. Fathalla, M. F. (2013). Incessant ovulation and ovarian cancer—a hypothesis revisited. *Facts, Views & Vision in ObGyn*, 5(4), 292.
10. Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J., & Karlan, B. Y. (2016). Ovarian cancer. *Nature Reviews. Disease Primers*, 2, 16061.
11. Siegel R, Naishadham D, Jemal A. Cancer Statistics, 2018. (2018). *CA: A Cancer Journal for Clinicians*. 62(1):10-29.
12. American Cancer Society. Sitio web. Consultado Mayo 2018. <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer.html>
13. Kipps, E., Tan, D., & Kaye, S. (2013). Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nature Reviews Cancer*, 13(4), 273–282.

14. Ayantunde AA, Parsons SL. (2007) Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Annals of Oncology*, 18(5):945–9.
15. Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C, Piche A. (2012). Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *American Journal of Cancer Research*, 2(5):566–80.
16. Nieto M.A. (2013). Epithelial Plasticity: A Common Theme in Embryonic and Cancer Cells. *Science*, 342, 1234850.
17. Stone, R. C., Pastar, I., Ojeh, N., Chen, V., Liu, S., Garzon, K. I., & Tomic-Canic, M. (2016). Epithelial-mesenchymal transition in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research*, 365(3), 495-506.
18. Kalluri, R., & Weinberg, R. A. (2010). The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation*, 120(5), 1786-1786.
19. Nieto, M. A., Huang, R. Y. J., Jackson, R. A., & Thiery, J. P. (2016). EMT: 2016. *Cell*, 166(1), 21-45.
20. Shibue, T., & Weinberg, R. A. (2017). EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 14(10), 611.
21. Nieto, M. A. (2011). The ins and outs of the epithelial to mesenchymal transition in health and disease. *Annual review of cell and developmental biology*, 27, 347-376.
22. Lamouille, S., Xu, J., & Derynck, R. (2014). Molecular mechanisms of epithelial–mesenchymal transition. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(3), 178–196.
23. Skrypek, N., Goossens, S., De Smedt, E., Vandamme, N., & Berx, G. (2017). Epithelial-to-mesenchymal transition: epigenetic reprogramming driving cellular plasticity. *Trends in Genetics. Volume? Páginas?*
24. Puisieux, A., Brabletz, T., & Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. *Nature Cell Biology*, 16(6), 488-494.
25. Ansieau, S., Bastid, J., Doreau, A., Morel, A. P., Bouchet, B. P., Thomas, C., ... & Maestro, R. (2008). Induction of EMT by twist proteins as a collateral effect of tumor-promoting inactivation of premature senescence. *Cancer Cell*, 14(1), 79-89.

26. Maestro, R., Dei Tos, A. P., Hamamori, Y., Krasnokutsky, S., Sartorelli, V., Kedes, L., ... & Hannon, G. J. (1999). Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes & Development*, *13*(17), 2207-2217.
27. Valsesia-Wittmann, S., Magdeleine, M., Dupasquier, S., Garin, E., Jallas, A. C., Combaret, V., ... & Puisieux, A. (2004). Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell*, *6*(6), 625-630.
28. Mani, S. A., Guo, W., Liao, M. J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., ... & Campbell, L. L. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, *133*(4), 704-715.
29. Morel, A. P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE*, *3*(8), e2888.
30. Yi, B. R., Kim, T. H., Kim, Y. S., & Choi, K. C. (2015). Alteration of epithelial-mesenchymal transition markers in human normal ovaries and neoplastic ovarian cancers. *International Journal of Oncology*, *46*(1), 272-280.
31. Huang, L., Zhou, Y., Cao, X. P., Lin, J. X., Zhang, L., Huang, S. T., & Zheng, M. (2018). KPNA2 promotes migration and invasion in epithelial ovarian cancer cells by inducing epithelial-mesenchymal transition via Akt/GSK-3 β /Snail activation. *Journal of Cancer*, *9*(1), 157-165.
32. Ponnusamy, M. P., Lakshmanan, I., Jain, M., Das, S., Chakraborty, S., Dey, P., & Batra, S. K. (2010). MUC4 mucin-induced epithelial to mesenchymal transition: a novel mechanism for metastasis of human ovarian cancer cells. *Oncogene*, *29*(42), 5741–5745.
33. Thériault, B. L., Shepherd, T. G., Mujoomdar, M. L., & Nachtigal, M. W. (2007). BMP4 induces EMT and Rho GTPase activation in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis*, *28*(6), 1153–1162.
34. Rosanò, L., Spinella, F., Di Castro, V., Nicotra, M. R., Dedhar, S., de Herreros, A. G., Natali, P. G., et al. (2005). Endothelin-1 promotes epithelial-to-mesenchymal transition in human ovarian cancer cells. *Cancer Research*, *65*(24), 11649–11657.

35. Rafehi, S., Ramos Valdes, Y., Bertrand, M., McGee, J., Préfontaine, M., Sugimoto, A., DiMattia, G. E., et al. (2016). TGF β signaling regulates epithelial-mesenchymal plasticity in ovarian cancer ascites-derived spheroids. *Endocrine-Related Cancer*, 23(3), 147–159.
36. Chen, Y., Wang, D.-D. D., Wu, Y.-P. P., Su, D., Zhou, T.-Y. Y., Gai, R.-H. H., Fu, Y.-Y. Y., et al. (2017). MDM2 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis of ovarian cancer SKOV3 cells. *British Journal of Cancer*, 117, 1192-1201.
37. Chen, J., Wang, L., Matyunina, L. V., Hill, C. G., & McDonald, J. F. (2011). Overexpression of miR-429 induces mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in metastatic ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology*, 121(1), 200–205.
38. Liu, H., Pan, Y., Han, X., Liu, J., & Li, R. (2017). MicroRNA-216a promotes the metastasis and epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer by suppressing the PTEN/AKT pathway. *OncoTargets and Therapy*, 10, 2701–2709.
39. Ray, U., Roy, S. S., & Chowdhury, S. R. (2017). Lysophosphatidic Acid Promotes Epithelial to Mesenchymal Transition in Ovarian Cancer Cells by Repressing SIRT1. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, 41(2), 795–805.
40. Kim, S., Kim, B., & Song, Y. S. (2016). Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Science*, 107(9), 1173-1178.
41. Yin, T., Wang, G., He, S., Shen, G., Su, C., Zhang, Y., ... & Li, D. (2016). Malignant pleural effusion and ascites induce epithelial-mesenchymal transition and cancer stem-like cell properties via the vascular endothelial growth factor (VEGF)/Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt/Mechanistic target of rapamycin (mTOR) pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 291(52), 26750-26761.
42. Strauss, R., Li, Z. Y., Liu, Y., Beyer, I., Persson, J., Sova, P., ... & Drescher, C. (2011). Analysis of epithelial and mesenchymal markers in ovarian cancer reveals phenotypic heterogeneity and plasticity. *PLoS ONE*, 6(1), e16186.

43. Chebouti, I., Kasimir-Bauer, S., Buderath, P., Wimberger, P., Hauch, S., Kimmig, R., & Kuhlmann, J. D. (2017). EMT-like circulating tumor cells in ovarian cancer patients are enriched by platinum-based chemotherapy. *Oncotarget*, 8(30), 48820-48831.
44. Toledo Leyva A. (2017). Identificación de nuevas proteínas implicadas en el fenotipo agresivo del cáncer de ovario epitelial durante la inducción de la transición epitelio-mesénquima por la ascitis. Tesis de Doctorado. *Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular, Cinvestiva-IPN*, México. 1-115.
45. Toledo-Leyva, A., Villegas-Pineda, J. C., Encarnación-Guevara, S., Gallardo-Rincón, D., & Talamás-Rohana, P. (2018). Effect of ovarian cancer ascites on SKOV-3 cells proteome: new proteins associated with aggressive phenotype in epithelial ovarian cancer. *Proteome science*, 16(1), 3.
46. Bamias, A., Tsiatas, M. L., Kafantari, E., Liakou, C., Rodolakis, A., Voulgaris, Z., ... & Papatheodoridis, G. (2007). Significant differences of lymphocytes isolated from ascites of patients with ovarian cancer compared to blood and tumor lymphocytes. Association of CD3⁺ CD56⁺ cells with platinum resistance. *Gynecologic Oncology*, 106(1), 75-81.
47. Rhodes, A., Vallikkannu, N., & Jayalakshmi, P. (2017). Expression of WT1 and PAX8 in the epithelial tumours of Malaysian women with ovarian cancer. *British Journal of Biomedical Science*, 74(2), 65-70.
48. Hylander, B., Repasky, E., Shrikant, P., Intengan, M., Beck, A., Driscoll, D., ... & Odunsi, K. (2006). Expression of Wilms tumor gene (WT1) in epithelial ovarian cancer. *GynecologicOncology*, 101(1), 12-17.
49. Taube, E. T., Denkert, C., Sehouli, J., Kunze, C. A., Dietel, M., Braicu, I., ... & Darb-Esfahani, S. (2016). Wilms tumor protein 1 (WT1)—Not only a diagnostic but also a prognostic marker in high-grade serous ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 140(3), 494-502.
50. Wang, Y., Wang, Y., Li, J., Yuan, Z., Yuan, B., Zhang, T., ... & Zheng, W. (2013). PAX8: a sensitive and specific marker to identify cancer cells of ovarian origin for patients prior to neoadjuvant chemotherapy. *Journal of Hematology & Oncology*, 6(1), 60.

51. Nonaka, D., Chiriboga, L., & Soslow, R. A. (2008). Expression of pax8 as a useful marker in distinguishing ovarian carcinomas from mammary carcinomas. *The American Journal of Surgical Pathology*, 32(10), 1566-1571.
52. Chai, H. J., Ren, Q., Fan, Q., Ye, L., Du, G. Y., Du, H. W., ... & Cheng, Z. P. (2017). PAX8 is a potential marker for the diagnosis of primary epithelial ovarian cancer. *Oncology Letters*, 14(5), 5871-5875.
53. Yamashita, N., Tokunaga, E., Iimori, M., Inoue, Y., Tanaka, K., Kitao, H., ... & Maehara, Y. (2018). Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*.
54. Ho, C. M., Chang, S. F., Hsiao, C. C., Chien, T. Y., & Shih, D. T. B. (2012). Isolation and characterization of stromal progenitor cells from ascites of patients with epithelial ovarian adenocarcinoma. *Journal of Biomedical Science*, 19(1), 23.
55. Vega, S., Morales, A. V., Ocaña, O. H., Valdés, F., Fabregat, I., & Nieto, M. A. (2004). Snail blocks the cell cycle and confers resistance to cell death. *Genes & development*, 18(10), 1131-1143.
56. Sakata, J., Utsumi, F., Suzuki, S., Niimi, K., Yamamoto, E., Shibata, K., ... & Kajiyama, H. (2017). Inhibition of ZEB1 leads to inversion of metastatic characteristics and restoration of paclitaxel sensitivity of chronic chemoresistant ovarian carcinoma cells. *Oncotarget*, 8(59), 99482.