



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

**UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR**

**“Importancia de las integrinas, la haptoglobina y la  
fucosilación en el cáncer epitelial de ovario”**

**T E S I S**

Que presenta

**M. en C. Julio César Villegas Pineda**

**Para obtener el Grado de  
Doctor en Ciencias en Infectómica y Patogénesis Molecular**

**Directora de la tesis:**

**Dra. Patricia Talamás Rohana**

Ciudad de México, México

Septiembre del 2016

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Patricia Talamás Rohana**, por haberme dado la oportunidad y la confianza para formar parte de su grupo de trabajo por 5 años, por haberme corregido en los momentos necesarios y por ser mi guía e iniciadora en el camino de la ciencia.

A mis asesores: **Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano** (DIPM), **Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez** (DIPM), **Dr. Nicolás Villegas Sepúlveda** (DBM) y **Dra. Dolores Gallardo Rincón** (INCan), por su gran apoyo en todo momento durante la realización del proyecto.

Al **CONACyT** que me brindó el apoyo económico (**número de beca: 347078**) necesario para llevar a cabo mis estudios de Doctorado en el Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV.

A los integrantes del laboratorio de la Dra. Talamás: **M. en C. Carlos Osorio Trujillo**, **Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez**, **M. en C. Mayra Herrera Martínez**, **M. en C. Alfredo Toledo Leyva** y **Tec. en Investigación Belem de Luna Vergara**, así como al apoyo secretarial brindado por **Irma Edith Miranda Orea**.

## DEDICATORIAS

A **Dios**, por mantenerme en el camino recto, por permitirme terminar esta importante etapa académica y ponerme futuros retos que con su ayuda se convertirán en logros.

A mis padres: **David Villegas Hernández** y **Yesenia Pineda Suazo**, por su apoyo incondicional y por alentarme en todo momento.

## ABREVIATURAS

CEO	Cáncer epitelial de ovario
h	Hora
HGSC	Carcinoma seroso de alto grado
LGSC	Carcinoma seroso de bajo grado
MEC	Matriz extracelular
min	Minuto
nm	Nanómetro
PLE	Periodo libre de enfermedad
SG	Sobrevivencia general

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.....</b>	<b>10</b>
<b>Figura 2.....</b>	<b>14</b>
<b>Figura 3.....</b>	<b>15</b>
<b>Figura 4.....</b>	<b>17</b>
<b>Figura 5.....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 6.....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 7.....</b>	<b>43-44</b>
<b>Figura 8.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 9.....</b>	<b>46-47</b>
<b>Figura 10.....</b>	<b>48</b>
<b>Figura 11.....</b>	<b>49-50</b>
<b>Figura 12.....</b>	<b>51</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.....</b>	<b>36</b>
<b>Tabla 2.....</b>	<b>38</b>
<b>Tabla 3.....</b>	<b>39</b>
<b>Tabla 4.....</b>	<b>40</b>
<b>Tabla 5.....</b>	<b>42</b>

## CONTENIDO

<b>I. RESUMEN.....</b>	<b>v</b>
<b>II. ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>III. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>IV. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>26</b>
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>27</b>
<b>VI. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>28</b>
<b>VII. OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>29</b>
<b>VIII. METODOLOGÍA.....</b>	<b>30</b>
<b>IX. RESULTADOS.....</b>	<b>35</b>
<b>X. DISCUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>XI. RESUMEN DE RESULTADOS.....</b>	<b>56</b>
<b>XII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>XIII. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>58</b>
<b>XIV. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>59</b>

## I. RESUMEN

El cáncer epitelial de ovario (CEO) es la forma más letal entre los cánceres ginecológicos. Para tratar de clasificar morfológicamente este tipo de neoplasia, los diferentes tipos de carcinoma ovárico se agrupan de acuerdo a su histotipo. Existen proteínas claves para el desarrollo de la enfermedad, tales como las integrinas, las cuales son receptores transmembranales conformados por dos subunidades, una  $\alpha$  y una  $\beta$ . Pertenecen a la familia de proteínas de adhesión, sin embargo también poseen funciones a nivel intracelular, ya que por medio de diferentes cascadas de señalización, son capaces de inducir sobrevivencia, proliferación, diferenciación, migración y adhesión, entre otras. Otra proteína involucrada en el proceso neoplásico es la haptoglobina total y/o fucosilada, la cual en condiciones fisiológicas evita la oxidación de la hemoglobina. También se ha observado que actúa como proteína de fase aguda y recientemente se ha sugerido como biomarcador para diferentes cánceres, entre ellos el CEO. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la importancia de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$  y determinar si existe correlación de estas proteínas, la haptoglobina y la fucosilación con el CEO. Se determinó la presencia de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$ , así como de haptoglobina y de fucosilación en 20 biopsias de pacientes con CEO. Al analizar la expresión proteica y la fucosilación encontramos una asociación estadísticamente significativa entre estas variables y la presencia de la enfermedad, lo que significa que el CEO promueve la sobre-expresión de estas proteínas y del proceso de fucosilación. Adicionalmente, las integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  se silenciaron en la línea celular SKOV-3 empleando morfolinós. Este silenciamiento no afecta la proliferación celular, sin embargo, el silenciamiento de las subunidades  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  reduce significativamente los procesos de migración y de invasión, comparados con las células que no fueron tratadas con morfolinós. La respuesta al carboplatino también se observó alterada, encontrando mayor sensibilidad en los morfantes  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  y mayor resistencia en el morfante  $\beta 3$ . Los resultados de este trabajo sugieren que conocer el perfil de expresión de integrinas podría ayudar al diseño de terapias personalizadas, además que la Hp y la fucosilación tienen el potencial para convertirse en herramientas de diagnóstico y que los anticuerpos monoclonales dirigidos contra integrinas podrían impactar favorablemente en la terapia de pacientes con CEO.

## II. ABSTRACT

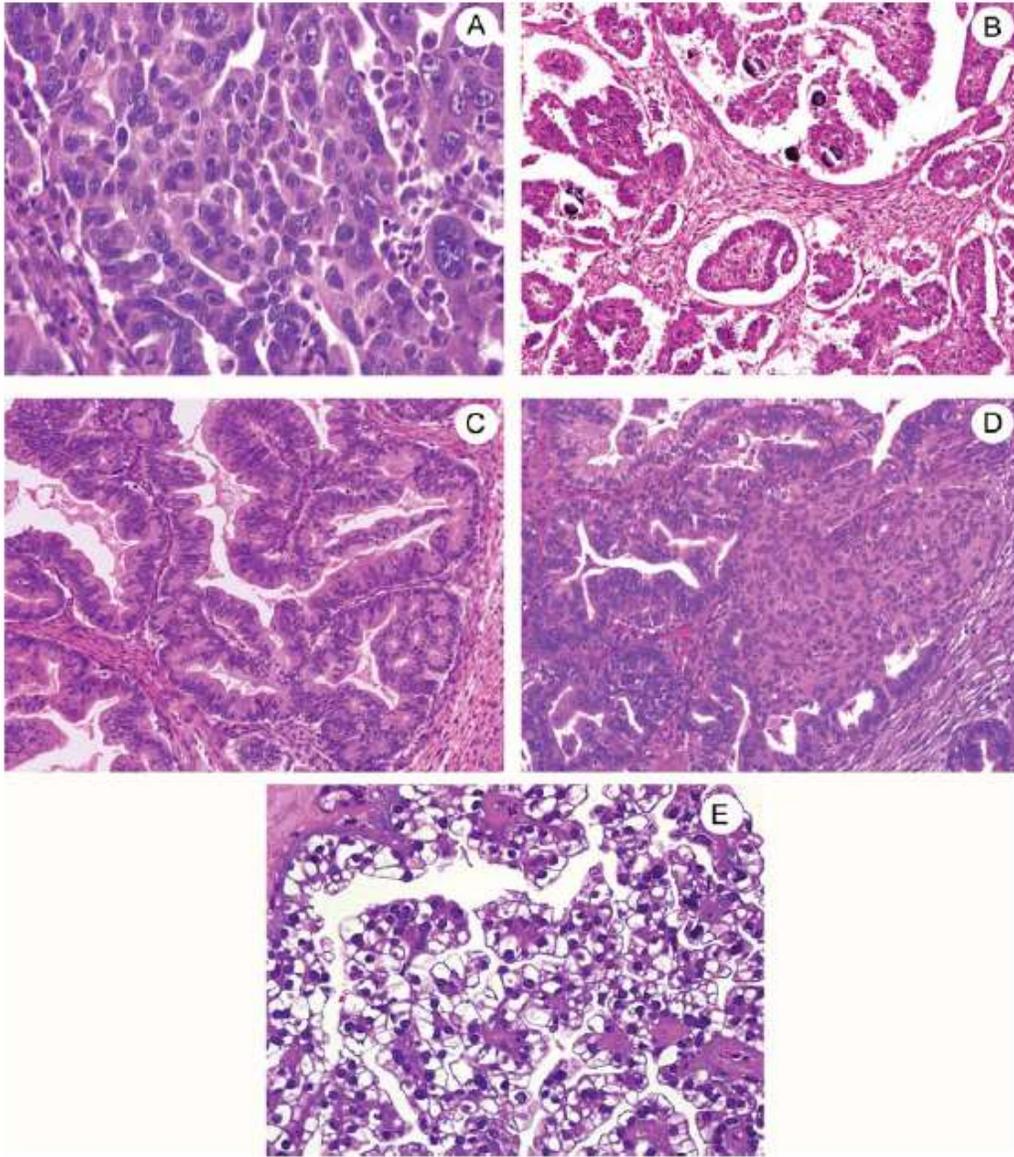
Epithelial ovarian cancer (EOC) is the most lethal form among gynecologic cancers. To try to morphologically classify this type of neoplasia, different types of ovarian carcinoma are grouped according to their histotype. There are key proteins for the development of the disease, such as integrins, which are transmembrane receptors comprised of two subunits, alpha and beta. They belong to the family of adhesion proteins, but also have intracellular functions; they are able to induce, through different signaling cascades, different processes such as survival, proliferation, differentiation, migration, adhesion, etc. Another protein involved in the neoplastic process is haptoglobin (Hp) and its fucosylated isoforms, which under physiological conditions prevent oxidation of hemoglobin. It has also been observed that Hp acts as an acute phase protein and recently has been suggested as a biomarker for different cancers, including EOC. The aim of this study was to evaluate the relevance of  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  and  $\alpha V\beta 3$  integrins and to determine whether there was a correlation of these proteins, Hp and fucosylation with EOC. The presence of  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  and  $\alpha V\beta 3$  integrins was determined as well as haptoglobin and fucosylation in 20 biopsies from patients with EOC. The analysis of protein expression and fucosylation showed a statistically significant association between these variables and the presence of the disease, meaning that the EOC promotes the overexpression of these proteins and of the fucosylation process. Additionally,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  and  $\beta 3$  integrins were silenced in the SKOV-3 cell line using morpholines. Noting that this silencing did not affect cell proliferation and that blocking the translation of the  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  subunits significantly reduced the migration and invasion processes when compared with cells that were not treated with morpholines. The response to carboplatin was also altered in the morphant cells, finding an increase in drug sensitivity in  $\alpha 5$  and  $\alpha 6$  morphants, whereas  $\beta 3$  morphant showed a higher resistance to the drug. The results of this study suggest that knowledge about the expression profile of integrins could aid in the design of personalized therapies through the use of monoclonal antibodies directed against different integrins; in addition, Hp and fucosylation have the potential to become diagnostic tools that could impact favorably the therapy schemes for EOC patients.

### III. INTRODUCCIÓN

#### 1. *El cáncer epitelial de ovario.*

##### 1.1. *Histotipos de una enfermedad heterogénea.*

El cáncer epitelial de ovario (CEO) es la neoplasia de ovario más común y también es el cáncer ginecológico más letal. Basados en la histopatología y en las alteraciones genéticas, el CEO se puede dividir en cinco tipos principales: seroso de alto grado (70%), endometrioides (10%), células claras (10%), mucinoso (3%) y seroso de bajo grado (< 5%), que entre ellos suman el 95% total de los casos (Rosen *et al.*, 2010; Benedet *et al.*, 2000) (Fig.1). Estos histotipos corresponden a enfermedades esencialmente distintas, y las diferencias se ven reflejadas en factores epidemiológicos y de riesgo, lesiones precursoras, patrones de metástasis, eventos moleculares durante la oncogénesis, respuesta a la quimioterapia y finalmente en el pronóstico (Prat, 2012).



**Figura 1.** Ejemplos representativos de los cinco principales histotipos de CEO, que juntos representan el 98% de los casos: (A) carcinoma seroso de alto grado, (B) carcinoma seroso de bajo grado, (C) carcinoma mucinoso, (D) carcinoma endometrioide y (E) células claras (Prat, 2012).

### 1.1.1. Seroso.

A pesar de pertenecer al mismo histotipo, en la actualidad el carcinoma seroso de alto grado (HGSC) y el carcinoma seroso de bajo grado (LGSC) son considerados diferentes tipos de tumores y, en consecuencia, enfermedades distintas (Sato *et al.*, 2000). Los LGSCs se asocian en la mayoría de los casos con tumores serosos limítrofes, presentan mutaciones en *KRAS* y *BRAF*, y no están relacionados con mutaciones de *TP53* ni con anomalías en *BRCA* (Singer *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2005). Por el contrario los HGSCs no están asociados con tumores serosos limítrofes y típicamente exhiben mutaciones en *TP53* y anomalías en *BRCA* (Prat, 2012).

#### 1.1.1.1. De bajo grado.

Los carcinomas serosos de bajo grado se caracterizan por mutaciones en los oncogenes *KRAS*, *BRAF* y *ERBB2* (Singer *et al.*, 2005; Singer *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2002). El resultado de estas mutaciones oncogénicas genera la activación constitutiva de la vía de traducción de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK, por sus siglas en inglés) las cuales juegan un papel importante en la transmisión de las señales de crecimiento dentro del núcleo y contribuyen a la transformación neoplásica. Diversos estudios han demostrado que las mutaciones en *KRAS* ocurren en una tercera parte de los carcinomas serosos de bajo grado (Singer *et al.*, 2003; Singer *et al.*, 2002). De manera similar, las mutaciones en *BRAF* ocurren en el 30% de estos carcinomas. Las mutaciones en *KRAS*, *BRAF* y *ERBB2* son mutuamente excluyentes (Kurman and Shih, 2008). Por lo tanto las mutaciones en cualquiera de estos genes son detectadas en dos terceras partes de los carcinomas serosos de bajo grado. Por el contrario, estos genes no están mutados en los carcinomas serosos de alto grado (Nakayama *et al.*, 2006).

#### 1.1.1.2. De alto grado.

El carcinoma seroso de alto grado corresponde al típico carcinoma de ovario seroso y representa aproximadamente el 90% de los carcinomas de este histotipo. Estos tumores están compuestos de grandes masas celulares que frecuentemente muestran una arquitectura papilar, en ellos la necrosis es una característica común. Las células tumorales tienen núcleos grandes y pleomórficos, y muchas de éstas son multinucleadas. Existe un alto nivel de actividad mitótica y son frecuentes los eventos mitóticos anormales. Estos tumores son

considerados pobremente diferenciados y la atipia nuclear es considerada de grado 3 (Kurman and Shih, 2008). Los carcinomas serosos de alto grado tienen mutaciones en *TP53* y la frecuencia de la mutación es mayor al 80% (Chan *et al.*, 2000; Salani *et al.*, 2008).

### *1.1.2. Endometrioides.*

Estos tumores son más comunes en mujeres entre los 50 y los 59 años. Los tumores endometrioides tienen una superficie exterior lisa. Un examen de la sección de corte por lo general revela áreas sólidas y quísticas; los quistes contienen masas blandas y friables así como líquido sanguinolento. Menos frecuente se pueden encontrar tumores sólidos, con extensa hemorragia y necrosis. El carcinoma endometrioides tiene una tasa de supervivencia a 5 años del 40-63%, el pronóstico relativamente bueno es debido principalmente al alto porcentaje de pacientes que se presentan con enfermedad en estadio temprano (Rosen *et al.*, 2010).

Se sabe relativamente poco acerca de los eventos moleculares que conducen al desarrollo del CEO endometrioides, y no hay marcadores moleculares que hayan sido identificados como indicadores de pronóstico. La mutación del gen  $\beta$ -catenina es una de las alteraciones moleculares más comunes en el carcinoma endometrioides (Moreno-Bueno *et al.*, 2001) y por lo tanto puede ser un marcador molecular útil.  $\beta$ -catenina está implicada en dos procesos biológicos importantes: adhesión célula-célula y en la transducción de señales. En las uniones de las células epiteliales, la asociación de  $\beta$ -catenina con el dominio citoplasmático de las cadherinas juega un papel importante en la adhesión celular dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el núcleo,  $\beta$ -catenina participa en la transducción de señales, uniéndose al ADN para activar la transcripción. La desregulación del complejo cadherina/catenina se ha implicado en el desarrollo, la progresión, la diferenciación, la invasión y metástasis de varios tumores malignos (Fuchs *et al.*, 2005; Harris and Peifer, 2005). Las mutaciones de *PTEN* se encuentran con más frecuencia en los carcinomas endometrioides (aproximadamente 43%) que en otro histotipo de CEO, lo que indica que pueden jugar un papel en el desarrollo de este subtipo (Obata *et al.*, 1998; Rosen *et al.*, 2010).

### 1.1.3. Células claras.

Estudios recientes sugieren que el CEO de células claras ocurre casi con la misma frecuencia que los de histotipo endometriode. Los carcinomas de células claras están típicamente compuestos de células con abundante citoplasma claro, frecuentemente con prominentes membranas celulares (DeLair *et al.*, 2011). Los carcinomas de células claras tienen una apariencia morfológica muy característica que consiste en una mezcla de arreglos arquitectónicos incluyendo tubuloquísticas, glandulares, sólidas y papilares. Así mismo, puede estar presente un infiltrado neutrofílico. Algunos tienen una arquitectura que semeja a un tumor seroso limítrofe (Sangoi *et al.*, 2008). Los carcinomas de células claras generalmente son negativos para *ER*, *WT1* y *p53* (triple negativo) y por lo general son negativos o focalmente positivos para p16 (McCluggage, 2011).

### 1.1.4. Mucinoso.

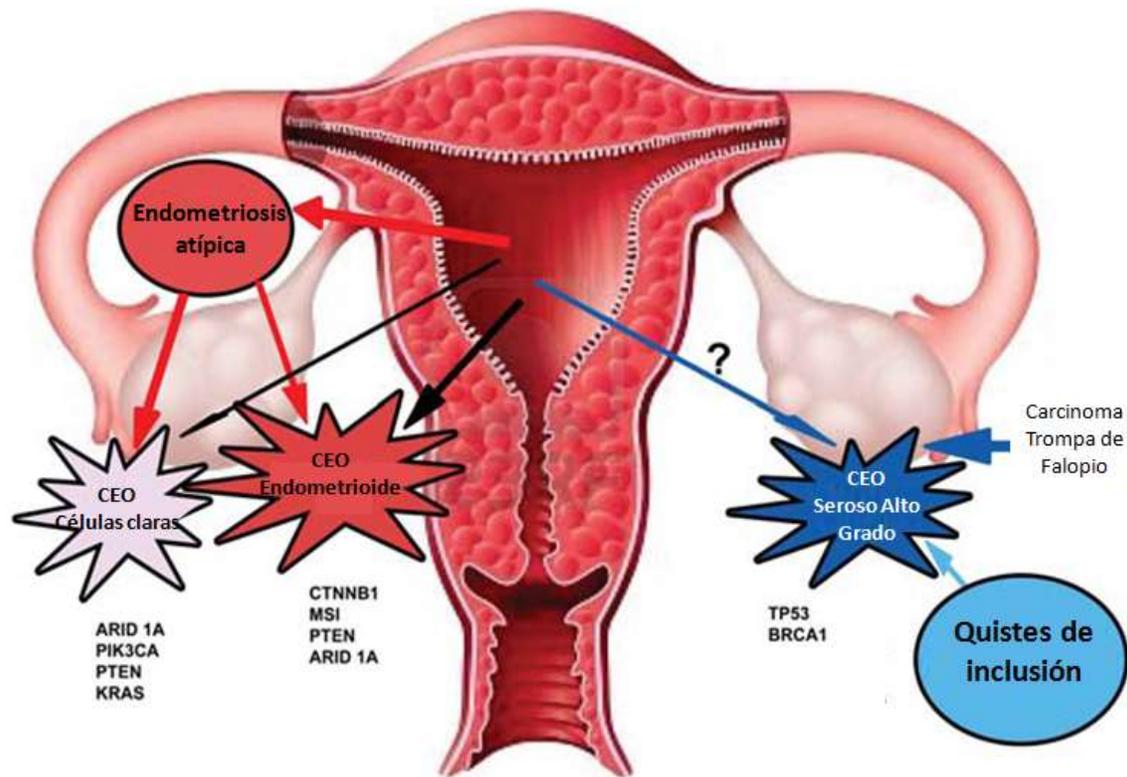
Los tumores mucinosos primarios son clasificados como benignos, limítrofes o malignos, dependiendo de sus características histopatológicas. Los tumores mucinosos pueden asemejarse a los del endocervix o a los intestinales. El epitelio similar al intestinal es más fácilmente reconocible cuando contiene células caliciformes; estos pueden ser vistos en los tumores benignos, pero son más prominentes en tumores limítrofes y malignos. Otro tipo de diferenciación de células intestinales se puede encontrar en los tumores mucinosos de ovario, sin embargo, incluyen las características típicas de la superficie gástrica, células pilóricas, células enterocromafines y células de Paneth (Tenti *et al.*, 1992). A diferencia de los tumores serosos, que son generalmente homogéneos en su composición celular y grado de diferenciación, los tumores mucinosos frecuentemente son heterogéneos, en particular el de tipo intestinal. Las mezclas de benignos, limítrofes y elementos malignos (incluyendo carcinomas invasivos y no invasivos) se encuentran a menudo dentro de una única neoplasia.

Las mutaciones en *KRAS* son comunes en estos tumores. De manera interesante, algunos tumores mucinosos microdisectados mostraron la misma mutación de *KRAS* en áreas histológicamente benignas, limítrofes y malignas del mismo tumor (Mandai *et al.*, 1998; Cuatrecasas *et al.*, 1997). Es por ello que la mutación de *KRAS* puede ser un evento temprano en la carcinogénesis del CEO mucinoso. El carcinoma mucinoso totalmente

invasivo es poco común, siendo menos del 10% de todos los CEO primarios (Lee and Scully, 2000; Seidman *et al.*, 2003). El pronóstico de los carcinomas mucinosos invasivos de tipo intestinal depende de la etapa FIGO y el patrón histológico de la invasión estromal (Lee and Scully, 2000; Rodríguez and Prat, 2002), es favorable en comparación con el de los carcinomas serosos; esto se debe a que el 80% de los carcinomas mucinosos invasivos se encuentran en estadio I al momento del diagnóstico (Rosen *et al.*, 2010).

### *1.2. Etiología.*

Los principales factores de riesgo para padecer CEO son la edad avanzada, el número de ciclos ovulatorios y los antecedentes familiares de cáncer de ovario, de mama, de útero o de colon vinculados con mutaciones de los genes *BRCA1/2*. Aproximadamente el 15% de los cánceres de ovario son familiares y el 85% son esporádicos. De manera tradicional, se ha pensado que el CEO se genera en la superficie del ovario (Romero and Bast, 2012). Aunque el origen mesotelial no puede ser excluido, existe evidencia de que un número de cánceres que se habían creído inicialmente como CEO primarios se generaron a partir de otros órganos pélvicos e involucraron a los ovarios secundariamente (Fig. 2). De hecho, se ha propuesto que el HGSC surge de lesiones precursoras en el extremo distal de las fimbrias de las trompas de Falopio (Piek *et al.*, 2001; Medeiros *et al.* 2006; Kindelberg *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007; Jarboe *et al.*, 2008), mientras que para los histotipos endometriode y de células claras se propone que se originan a partir de endometriosis ovárica (Sato *et al.*, 2000).



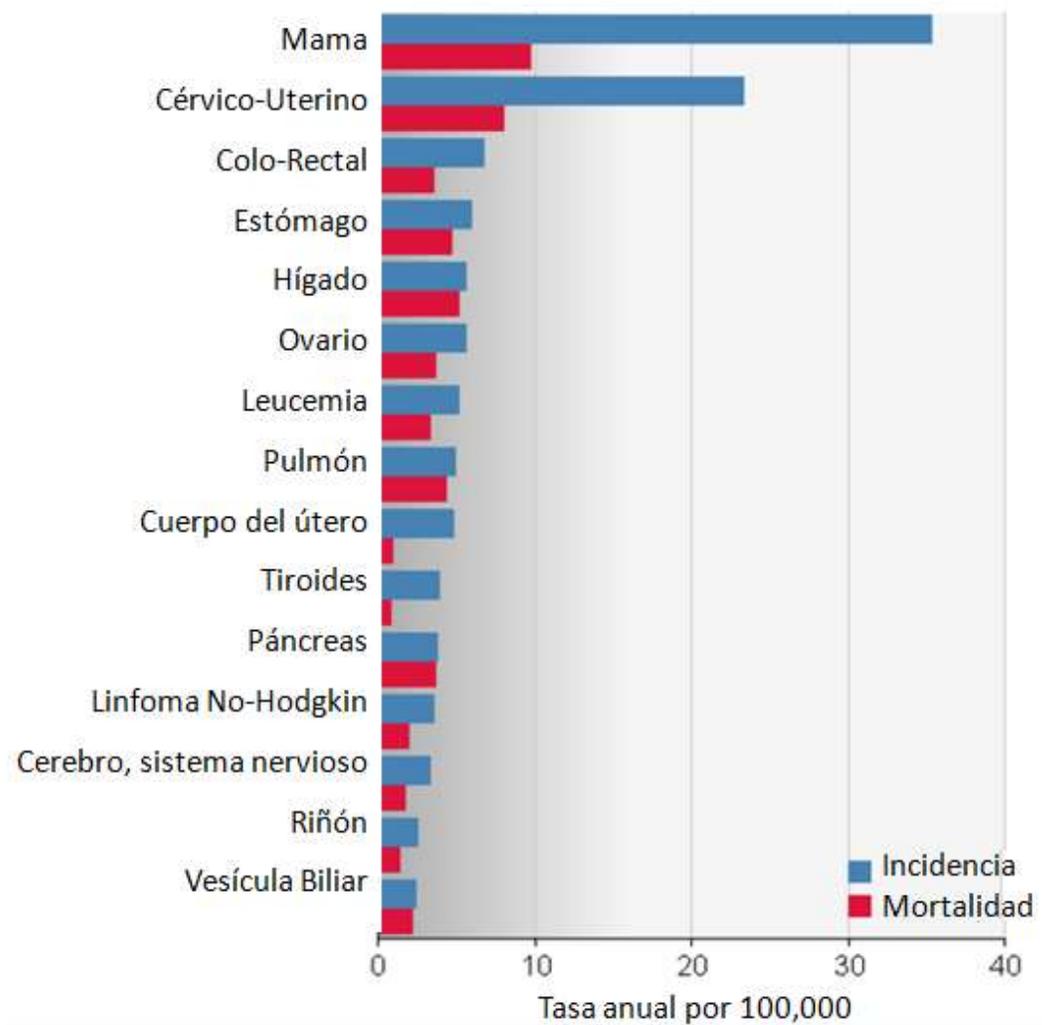
**Figura 2.** Clasificación de los CEO basados en su origen y mutaciones (Prat, 2012).

### 1.3. Epidemiología.

A nivel mundial, entre los diversos tipos de cáncer que afectan a las mujeres, el cáncer de ovario tiene la séptima posición en incidencia, originando anualmente 238,719 nuevos casos y provocando 151,917 defunciones en este mismo periodo. En el continente americano este tipo de cáncer tiene una incidencia de 41,450 casos y una mortalidad de 28,466 mujeres anualmente ([www.globocan.iarc.fr/](http://www.globocan.iarc.fr/)).

En el continente americano, el país que posee las mayores tasas de cáncer de ovario es Estados Unidos, donde cada año la Sociedad Americana de Cáncer estima el número de nuevos casos y muertes esperadas, compilando los datos más recientes de la incidencia del cáncer, mortalidad y sobrevivencia basados en datos del Instituto Nacional de Cáncer, los Centros de Control y Prevención de Enfermedades y la Asociación Norteamericana de los Registros Centrales de Cáncer, presentándose 21,980 nuevos casos y 14,270 muertes, ambos anualmente (Siegel *et al.*, 2014).

En México, de acuerdo a los últimos datos registrados en el GLOBOCAN, existe una incidencia anual de 3,277 casos y una mortalidad de 2,105 mujeres mexicanas (Fig. 3) ([www.globocan.iarc.fr/](http://www.globocan.iarc.fr/)).



**Figura 3.** Tasas de incidencia y de mortalidad de cánceres en mujeres en México ([www.globocan.iarc.fr/](http://www.globocan.iarc.fr/)).

#### 1.4. Diagnóstico.

El éxito del tratamiento depende del diagnóstico temprano. Sin embargo la capacidad de lograr el diagnóstico temprano permanece como un problema sin resolver. El médico debe ser consciente de las diferentes neoplasias que se presentan en los diferentes grupos de edad a fin de tener un alto índice de sospecha. Los tumores limítrofes se producen con mayor

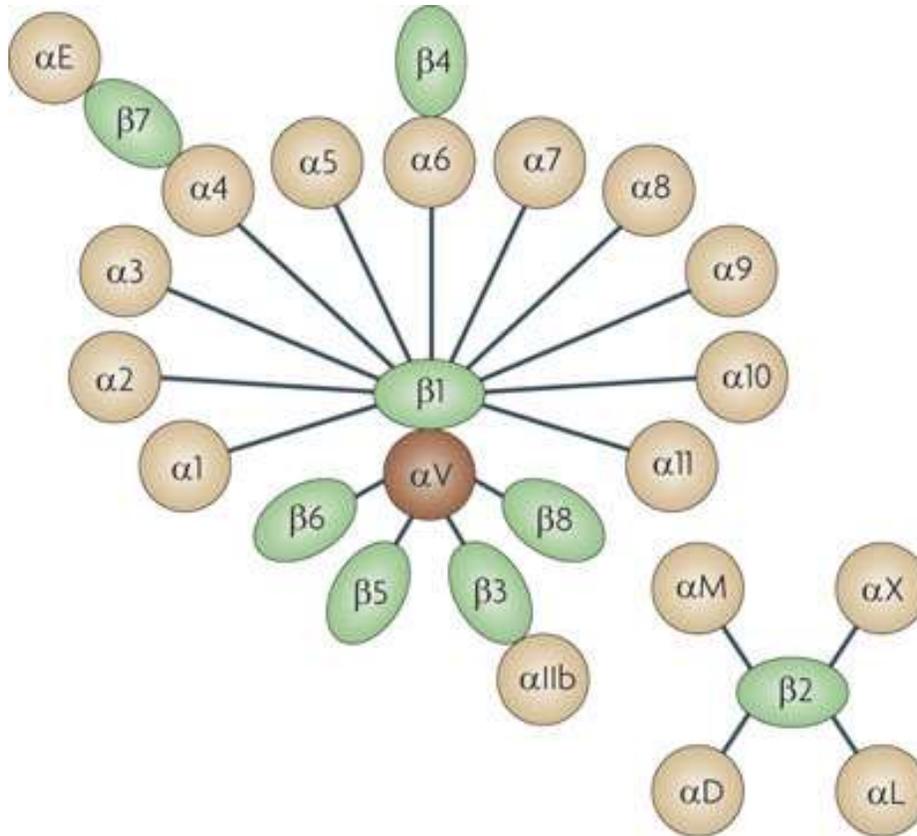
frecuencia en la edad perimenopáusica. Para las pacientes más jóvenes, los marcadores tumorales como la gonadotropina humana (hCG) y la alfa-fetoproteína (AFP) son obligatorios para excluir los tumores de células germinales. El CEO en su etapa temprana usualmente no produce síntomas o signos que alerten al médico para su diagnóstico (Bankhead *et al.*, 2005; Lataifeh *et al.*, 2005).

Aproximadamente dos tercios de todos los CEO se encuentran en estadio III o IV al momento del diagnóstico. Los síntomas que incluyen dolor o malestar abdominal vago, irregularidades menstruales, dispepsia y otros trastornos digestivos leves, que sólo pudieron haber estado presentes durante unas semanas, por lo general son la presentación de la enfermedad. Por lo tanto, se requiere un alto índice de sospecha para todas las mujeres entre las edades de 40 a 69 años. A medida que la enfermedad progresa, la ascitis, la distensión abdominal y el malestar general empeoran y pueden estar asociados a síntomas respiratorios, aumento de la presión intrabdominal o a la trasudación de líquido en las cavidades pleurales. El sangrado vaginal anormal es poco común como un síntoma o signo de la enfermedad. Se debe tomar un historial clínico detallado para determinar los posibles factores de riesgo, la historia de otros tipos de cáncer y la historia del CEO en la familia. También debe realizarse un examen físico completo, que incluya la examinación mamaria, pélvica y rectal. Una prueba de Papanicolau generalmente se realiza al mismo tiempo (DiSaia *et al.*, 2002). Previo a la cirugía se debe tomar una radiografía de tórax para detectar metástasis pulmonar o pleural, mientras que se requiere una tomografía computarizada del abdomen y de la pelvis para delinear la extensión de la enfermedad intrabdominal o la presencia de otra enfermedad primaria (Benedet *et al.*, 2000).

## 2. *Integrinas: moléculas de adhesión.*

Las integrinas son una familia de receptores heterodiméricos transmembranales de superficie celular que están conformados por dos subunidades, una  $\alpha$  y una  $\beta$ . A la fecha se ha descrito la existencia de 18 subunidades  $\alpha$  y 8 subunidades  $\beta$ , que se enlazan para formar al menos 24 diferentes receptores heterodiméricos funcionales que se unen a uno o más ligandos de la matriz extracelular (MEC) (Cox *et al.*, 2010) (Fig. 4). Estos receptores son capaces de desencadenar una variedad de respuestas celulares mediante la formación de una conexión física entre los lados extra e intracelular que permiten la integración bidireccional

de las señales para el control de la adhesión celular, la proliferación, la supervivencia y la diferenciación (Desgrosellier y Cheresch, 2010).



**Figura 4.** Las 24 diferentes integrinas que se pueden formar por la heterodimerización de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Cox *et al.*, 2010).

### 2.1. Estructura de las integrinas.

Mediante microscopía electrónica se demostró que las integrinas tienen una cabeza globular y dos regiones insertadas en la membrana citoplasmática, indicando que cada subunidad de integrina tiene un dominio extracelular, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática (Srichai and Zent, 2010). El tipo de ligando lo determina la subunidad  $\alpha$  principalmente y ambas subunidades participan en la traducción de señales. Debido a su estructura única, las integrinas pueden unirse con proteínas de la MEC tales como colágeno, laminina, fibronectina, vitronectina y algunas otras proteínas (Plow *et al.*, 2000). Los dominios citoplásmicos intracelulares cortos de las integrinas pueden asociarse directamente con numerosas proteínas del citoesqueleto y moléculas de señalización

intracelulares (Rohrschneider, 1980). Estas proteínas asociadas proporcionan una base para la modulación de procesos celulares fundamentales y los diversos resultados biológicos incluyendo la proliferación, la migración, la diferenciación celular y la apoptosis (Schwartz *et al.*, 1995) mediante la regulación de las vías de transducción de señales.

#### 2.1.1. Subunidades $\alpha$ .

Las estructuras de las diferentes subunidades  $\alpha$  son muy similares. Los dominios extracelulares contienen 7 dominios homólogos repetidos de 30 a 40 aminoácidos y el intervalo entre estas secuencias es de 20 a 30 aminoácidos. Los dominios extracelulares también contienen un sitio adhesivo dependiente de ión metálico (MIDAS, por sus siglas en inglés) que puede unir cationes metálicos divalentes ( $Mg^{2+}$  o  $Ca^{2+}$ ) importante para la unión al ligando. Los dominios transmembranales de las subunidades  $\alpha$  comparten estructuras de 5 aminoácidos en común “GFFKR”, su función específica es regular la afinidad de la integrina. Los dominios citoplásmicos de las subunidades  $\alpha$  son cortos generalmente (Pan *et al.*, 2016).

#### 2.1.2. Subunidades $\beta$ .

Las subunidades  $\beta$  tienen un dominio I-like, similar a las subunidades  $\alpha$ , el cual es importante para la unión al ligando. Otros componentes incluyen un dominio Plexina/Semaforina/Integrina, un dominio híbrido, 4 repetidos de factor de crecimiento epidermal y un dominio en la cola proximal a la membrana. Las subunidades  $\beta$  también contienen un gran dominio extracelular, un dominio transmembranal y una cola citoplasmática (excepto la subunidad  $\beta_4$ ). El dominio citoplasmático carece de actividad catalítica por sí mismo y está conformado por 60 aminoácidos (excepto la subunidad  $\beta_4$ , la cual contiene 1000 aminoácidos) (Hogervost *et al.*, 1990). Sus dominios citoplasmáticos típicamente tienen 2 secuencias NPXY que proveen sitios de unión a múltiples proteínas con dominios de unión a fosfotirosina (Bouaouina *et al.*, 2008) y participan en la traducción de señales mediante la unión con moléculas de señalización citoplasmáticas (Gilcrease, 2007).

## 2.2. Funciones biológicas y vías de señalización relacionadas.

Las integrinas son responsables de sensor muchos aspectos del microambiente celular, incluyendo la composición y la estructura de la MEC y algunas señales bioquímicas generadas por factores de crecimiento o por citocinas. Las integrinas transmiten señales bidireccionalmente a través de la membrana plasmática mediante cambios conformacionales y por la separación de los dominios citoplasmáticos y transmembranales de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  (Luo and Springer, 2006). Las señales de adentro hacia afuera regulan la afinidad de las integrinas por los ligandos, las señales de afuera hacia adentro dependen de los ligandos que regulan las respuestas celulares de adhesión (Ginsberg *et al.*, 2005). Las integrinas no tienen actividad catalítica intrínseca y transmiten señales intracelularmente vía proteínas adaptadoras. La integración de estas señales complejas contribuye a mediar los procesos biológicos celulares (Desgrosellier and Cheresch, 2010).

### 2.2.1. Integrinas en la adhesión celular.

La adhesión celular a los componentes de la MEC mediada por integrinas es esencial para la organización, mantenimiento y reparación de varios tejidos (De Arcangelis and Georges-Labousse, 2000). El proceso de adhesión celular es complejo y tiene una serie de etapas (Friedl and Wolf, 2003), incluyendo la unión a la MEC, agrupamiento de receptores y reclutamiento de elementos del citoesqueleto. La adhesión celular mediada por integrinas ocurre mediante adhesiones focales involucrando la vía de señalización ILK (sirviendo como una proteína multifuncional adaptadora que enlaza las adhesiones focales al citoesqueleto de actina) (Hannigan *et al.*, 2005), FAK, fosfolipasa C y la activación de la familia de proteínas Pho.

En este sentido, FAK modula la actividad de las integrinas (Lawson *et al.*, 2012) e incrementa la fosforilación de tirosina en respuesta a la activación de las integrinas (Burrige *et al.*, 1992). Aunque las relaciones exactas entre las GTPasas y la vía de señalización mediada por integrina aún no están claras, la regulación del pH intracelular dependiente de integrina puede ocurrir por la GTPasa Pho, que tiene efectos necesarios en la propagación de células y la adhesión celular (Tominaga and Barber, 1998). Las moléculas de señalización involucradas en la adhesión mediada por integrinas están río arriba participando en otras funciones celulares, lo que pone en evidencia la relación entre

la adhesión celular y otras funciones biológicas mediadas por integrinas tales como la proliferación, la supervivencia y la migración celular. Esto puede explicar por qué la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , después de la unión con fibronectina y con componentes del citoesqueleto intracelulares localizados en sitios de adhesión particulares, puede inducir la transducción de señales que afecta a la movilidad celular (Su *et al.*, 2005).

### 2.2.2. Integrinas en la proliferación celular.

La proliferación de células de mamíferos es regulada por varios factores microambientales, principalmente la adhesión a la MEC. La adhesión mediada por integrinas y los factores solubles son cruciales para la proliferación celular, y la pérdida de adhesión celular a su vez conduce a la invasión celular y a la apoptosis (Blandin *et al.*, 2016). Las subunidades  $\alpha 2$  y  $\alpha 3$  muestran un gradiente espacial de expresión en las criptas intestinales y se han visto implicadas como patrones de crecimiento celular y moduladores del fenotipo requeridos para el proceso de diferenciación de células epiteliales intestinales (Zhang *et al.*, 2003). Las integrinas también interactúan con receptores de factores de crecimiento y con otros factores para regular la proliferación celular. Las integrinas y los receptores de factores de crecimiento pueden regular ciclinas de la fase G1 y cinasas relacionadas que determinan el ciclo celular a través de diversas vías de señalización citoplasmáticas (Moreno-Layseca and Streuli, 2013; Eberwein *et al.*, 2015).

Existen muchos indicios de que no todas las señalizaciones del ciclo celular mediadas por integrinas son iguales. La mayoría de las integrinas activan a FAK, a ERK, a MAPKs y a la familia de GTPasas Rho (Luo *et al.*, 2013; Naci and Aoudjit, 2014). Sin embargo, la integrina  $\alpha V\beta 3$  está selectivamente asociada con la señalización por receptores RTK. Esto también puede activar otras vías de señalización incluyendo la entrada de calcio a las células (Schwartz and Denninghoff, 1994), NF- $\kappa$ B (Scatena *et al.*, 1998) y posiblemente algunas otras. Las integrinas  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 1\beta 1$  interactúan con caveolina para estimular la fosforilación de Shc y posiblemente de otros factores para promover la síntesis de ADN (Wary *et al.*, 1996). Las integrinas  $\alpha v\beta 3$  y  $\alpha 5\beta 1$  también activan a PI3K, la cual modifica enzimas implicadas como mediadores de los cambios del citoesqueleto inducidos por integrinas y juegan un papel importante en la migración celular (Cary *et al.*, 1999).

### 2.2.3. *Integrinas en la supervivencia y migración celular.*

La migración celular también es vital para diversos fenómenos biológicos. No sólo está implicada en eventos normales, sino también en patológicos. Por ejemplo, la migración celular es esencial en los procesos homeostáticos como la reparación de tejidos dañados y en las respuestas inmunes (Steffensen *et al.*, 2001). Los receptores de adhesión son esenciales para la migración celular y muchos pertenecen a la familia de las integrinas (Liddington and Bankston, 2000). Se ha reportado que la expresión de integrinas es sobrerregulada en células con fenotipo migratorio y su actividad se ha relacionado con la diferenciación celular fisiológica (Meighan and Schwarzbauer, 2008). Durante la migración celular, las integrinas deben haber sido recicladas o sintetizadas. La migración celular involucra la activación localizada de Rac. El pH intracelular y el flujo de calcio mediado por integrinas afectan la migración celular (Schwartz *et al.*, 1989; Marks *et al.*, 1991). Las integrinas también desempeñan un papel crucial en la supervivencia celular y en la protección de las células adheridas contra la apoptosis inducida por la privación de suero. Cuando la unión de las células epiteliales y endoteliales con la matriz se rompe, se induce apoptosis celular. La supervivencia celular mediada por integrinas es promovida por la señalización a través de las vías PI3K-AKT, AKT y ERK (Naci and Aoudjit, 2014). La señalización a través de AKT media la supervivencia en células epiteliales adherentes mediante la fosforilación y secuestrando a BAD, que es una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 (Cory and Adams, 2002). La señalización a través de la vía PI3K-AKT resulta en la fosforilación de Bax, el cual también es una proteína pro-apoptótica de la familia Bcl-2 (Gilmore *et al.*, 2000). La señalización mediada por integrinas a través de la vía ERK regula de manera negativa a la proteína pro-apoptótica Bim (Reginato *et al.*, 2003).

### 3. *Integrinas, proteínas esenciales en el desarrollo del CEO.*

Cuando la MEC es proteolíticamente degradada o deformada por fuerzas mecánicas, las células sufren cambios sensibles que influyen en el remodelamiento de la MEC durante eventos fisiológicos y patológicos. Estos receptores además de regular procesos importantes para diversos eventos fisiológicos, también desempeñan un papel crucial

promoviendo el fenotipo celular maligno en diversos cánceres (Mouw *et al.*, 2014; Bridges *et al.*, 1995).

La capacidad de las integrinas de dictar respuestas celulares a una variedad de vías se deriva de su capacidad de reconocer diferencialmente distintos ambientes. Esta especificidad permite que los eventos de unión integrina-ligando cumplan funciones bien definidas, por lo que las células que expresan solamente ciertas integrinas pueden atravesar una MEC que contiene componentes específicos, tales como laminina, colágena, vitronectina o fibronectina. En el contexto del cáncer, la adhesión celular dependiente de las integrinas juega un papel crítico en la determinación de la capacidad de una célula para aislarse de un tumor definido e invadir localmente y posteriormente hacer metástasis. La unión del ligando también controla si una determinada célula tumoral puede migrar a un nicho particular metastásico, tal como el peritoneo, el hígado u otros órganos de la cavidad peritoneal. Al encontrarse con un ligando específico, las integrinas experimentan un cambio conformacional que las cambia de un estado de baja avidéz a uno de alta (Shattil *et al.*, 2010). La señalización intracelular también puede activar la señalización hacia adentro y/o afuera lo que afecta la afinidad/avidéz por los ligandos extracelulares (Barczyk *et al.*, 2010). Las integrinas juegan un papel importante en potenciar la actividad de los receptores tirosina cinasa, incluyendo factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) o el factor de crecimiento epidermal (EGF) (Desgrosellier and Cheresch, 2010; Huang *et al.*, 2012; Goel and Mercurio, 2012; Hood *et al.*, 2003; Guo and Giancotti, 2004). Por la amplia diversidad de eventos importantes en los que participan las integrinas en condiciones fisiológicas y patológicas, son un atractivo blanco terapéutico (Bhaskar *et al.*, 2008; Millard *et al.*, 2011; Niu and Cheng, 2011).

### *3.1. Participación de la integrina $\alpha 5\beta 1$ en el CEO.*

La integrina  $\alpha 5\beta 1$  es una de las más estudiadas; existen reportes en donde se define una vía de señalización en el CEO que inicia con la activación de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  mediada por fibronectina y conduce al contacto directo con c-Met, seguido por la activación de Src y FAK, enlazando la señalización RTK mitogénica con procesos de adhesión. Sugiriendo que éste podría ser uno de los mecanismos utilizados por las células en las etapas iniciales de la

metástasis en un microambiente rico en fibronectina (Mitra *et al.*, 2011). También participa activamente en la adhesión y migración celular (Yan *et al.*, 2010) y su bloqueo inhibe los procesos angiogénicos e impide el crecimiento tumoral *in vivo* (Bhaskar *et al.*, 2007).

Por otra parte, se ha estudiado su relación con la respuesta a fármacos (Barkan and Chambers, 2011). El incremento en los niveles de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  en células de CEO promueve su diseminación y le confiere quimiorresistencia (Hu *et al.*, 2012) debido a la regulación que ejerce sobre la peptidasa relacionada a kalikreina 7 (KLK7) (Dong *et al.*, 2010).

### 3.2. *Papel de la integrina $\alpha 6\beta 4$ en el cáncer.*

Aunque las funciones de adhesión de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  están bien caracterizadas en células epiteliales normales, las funciones de esta integrina asociadas a tumores están siendo cada vez más reconocidas (Lipscomb *et al.*, 2005; Hong *et al.*, 2008). A diferencia de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  que ha sido ampliamente estudiada en el CEO, existen pocos estudios de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  en esta neoplasia. Los principales estudios se han realizado en cáncer de mama, de páncreas y de piel. En células neoplásicas, la sobreexpresión de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  coopera con diversos factores de crecimiento para potenciar las señales que promueven los eventos celulares relacionados a la progresión tumoral (Beaulieu, 2010). En una línea celular de cáncer pancreático se observó que el reclutamiento de integrinas  $\alpha 6\beta 4$  inducido por hipoxia generó un cambio en la adhesión celular hacia movilidad celular, el cual está favorecido por la degradación de la laminina (Ngora *et al.*, 2012). La expresión de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  en queratinocitos epidermales post mitóticos estimula un ambiente pro-tumorigénico en la piel aumentando el influjo de células granulares inmunosupresoras durante la promoción tumoral (Maalouf *et al.*, 2012). Relacionado al CEO, se ha analizado la expresión de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  en tumores de pacientes, encontrándose sobreexpresada en los tejidos tumorales en comparación con sus niveles en el tejido ovárico sano (Villegas-Pineda *et al.*, 2015), existiendo la posibilidad que en este tipo de neoplasia esté llevando a cabo procesos similares a los que genera o favorece en otros tipos de cánceres.

### 3.3. *La integrina de la angiogénesis: $\alpha V\beta 3$ .*

La integrina  $\alpha V\beta 3$  fue la primer integrina  $\alpha V$  caracterizada y ha sido asociada con la regulación de la angiogénesis (Cheresh, 1987; Brooks *et al.*, 1994). Esta integrina es capaz

de unirse a múltiples componentes de la MEC incluyendo fibronectina, vitronectina, fibrinógeno y osteopontina. La expresión de esta integrina junto con el antígeno de Lewis “y” fueron evaluados en un estudio realizado en mujeres chinas, en el cual se observó una correlación positiva entre la expresión de estos dos marcadores y la progresión de la enfermedad (Wang *et al.*, 2011). Diversos estudios con poblaciones de diferentes nacionalidades han concluido que la integrina  $\alpha V\beta 3$  está sobreexpresada en los tejidos tumorales en comparación con sus niveles de expresión en tumores benignos o limítrofes, mientras que su expresión en tejidos ováricos sanos fue basal y menor a las condiciones tumorales (Wang *et al.*, 2011; Villegas-Pineda *et al.*, 2015). La integrina  $\alpha V$  se ha relacionado con la resistencia a drogas, particularmente a paclitaxel y carboplatino, ya que su expresión se ha visto aún más incrementada en pacientes resistentes a estas drogas comparadas con el grupo sensible (Gao *et al.*, 2013). También se asocia a movilidad celular y está siendo blanco de medicamentos que mejoren la respuesta de las pacientes hacia la quimioterapia (Gillan *et al.*, 2002; Millard *et al.*, 2011; Niu and Cheng, 2011).

#### *4. Haptoglobina y fucosilación, prometedores biomarcadores de neoplasias.*

La haptoglobina es una proteína sintetizada en el hígado en condiciones fisiológicas y su principal función es actuar como antioxidante uniéndose a la hemoglobina (Wicher and Fries, 2006), además actúa como proteína de fase aguda (Raynes *et al.*, 1991). Su asociación a procesos angiogénicos (Cid *et al.*, 1993) sugiere que podría estar participando en el desarrollo de diferentes cánceres, tal y como lo asocian diversos estudios (Nie *et al.*, 2014; Pang *et al.*, 2013). La fucosilación es una modificación postraduccional muy importante. En cáncer, cada vez hay más pruebas relacionadas con el papel de la glicosilación en la formación de tumores y en la metástasis. Las alteraciones en la fucosilación pueden promover un comportamiento invasivo de las células tumorales y favorecer la progresión del cáncer (Christiansen *et al.*, 2014).

##### *4.1. Sobreexpresión de la haptoglobina y niveles de fucosilación en el CEO.*

Existe evidencia que la expresión de la haptoglobina en los tumores de CEO se encuentra incrementada en comparación con el tejido ovárico sano (Garibay-Cerdenares *et al.*, 2014; Villegas-Pineda *et al.*, 2015). Se ha observado un mayor número y un nivel de expresión

incrementada de las isoformas alfa fucosiladas de haptoglobina en líquidos ascíticos de pacientes con CEO, este incremento se ha asociado con las etapas avanzadas de la enfermedad, reforzando el potencial que tiene como posible biomarcador de progresión del CEO (Garibay-Cerdenares *et al.*, 2014). Estos resultados en conjunto sugieren la importante participación de la haptoglobina en el CEO. En el cáncer de próstata, se ha sugerido como biomarcador pronóstico en sangre periférica (Pang *et al.*, 2013).

La fucosilación aberrante se ha reportado en diferentes tipos de cánceres (Nie *et al.*, 2014; Nakagawa *et al.*, 2008). En tejidos tumorales de CEO los niveles de fucosilación se encuentran altamente sobreexpresados (Villegas-Pineda *et al.*, 2015), y también existe una expresión incrementada de las cadenas beta de haptoglobina con niveles elevados de subgrupos de glicofomas en pacientes con CEO (Saldova *et al.*, 2007; Saldova *et al.*, 2008). También observaron altos niveles de sLex en la mayoría de las isoformas de las cadenas beta de haptoglobina. Además, se ha reportado el incremento de la haptoglobina fucosilada en suero de pacientes con CEO (Wu *et al.*, 2014). Todos estos resultados sugieren fuertemente la participación de manera activa de la fucosilación en los procesos neoplásicos, entre ellos el CEO.

#### **IV. JUSTIFICACIÓN**

Las integrinas son receptores heterodiméricos que desencadenan diversos procesos celulares en condiciones fisiológicas y se sobre-expresan en la patología del cáncer. Dado que las integrinas están relacionadas con el desarrollo de los procesos neoplásicos, es importante analizar cómo se afecta el fenotipo maligno de las células de CEO silenciando a estos receptores heterodiméricos. Estudios recientes sugieren como posibles biomarcadores a la haptoglobina y a la fucosilación en cáncer de mama, páncreas y colon. Por lo que es necesario evaluar la expresión de haptoglobina, de fucosilación y de integrinas para establecer si existe una asociación estadística.

## V. HIPÓTESIS

Las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$ ,  $\alpha V\beta 3$ , la haptoglobina y el grado de fucosilación, se encuentran sobreexpresadas y son relevantes para el fenotipo transformado (incremento en proliferación, migración, invasión y resistencia a fármacos) en el CEO.

## **VI. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la relevancia de las integrinas  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha6\beta4$  y  $\alphaV\beta3$ , así como evaluar la expresión de la haptoglobina y del proceso de fucosilación en el CEO.

## VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. En tumores de pacientes con CEO:
  - a. Analizar la expresión de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$ .
  - b. Determinar la presencia de haptoglobina fucosilada y correlacionarla con los niveles de expresión de las integrinas.
2. En células SKOV-3:
  - a. Silenciar las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$ , a través del uso de morfolinos.
  - b. Evaluar el efecto del silenciamiento en la proliferación celular.
  - c. Determinar el efecto del silenciamiento sobre la migración celular.
  - d. Analizar la respuesta de los morfantes hacia el carboplatino.

## VIII. METODOLOGÍA

### Tejidos tumorales

Los tejidos quirúrgicos fueron colectados de Junio a Diciembre del 2011 en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), Ciudad de México, México. Las 20 biopsias fueron provistas por el área de patología del INCan bajo un protocolo aprobado por los comités de bioética y científico (INCAN/CB/23812 e INCAN/CC/179/12, respectivamente), a través de un acuerdo de colaboración entre el CINVESTAV y el INCan. Todos los tejidos tumorales de los pacientes fueron analizados y diagnosticados por patólogos expertos. Tejido de ovario de pacientes sin cáncer, confirmado por los patólogos como no transformado, fueron usados como referencia de tejido ovárico sano.

### Inmunohistofluorescencia

Para realizar estudios de colocalización, se utilizó la técnica de inmunohistofluorescencia indirecta. Los tejidos tumorales de pacientes con CEO embebidos en parafina, se colocaron durante toda la noche en una incubadora a 60 °C, y posteriormente los cortes histológicos se colocaron en xilol 3x durante 5 min y en soluciones seriadas descendentes de etanol (etanol absoluto, y al 95%, 90%, 80%, 70% en agua destilada) durante 5 min c/u. Se lavaron con TBS-T 3x por 5 min cada uno. Para recuperar la antigenicidad de la muestra, los cortes histológicos se trataron con tripsina 0.1%, con CaCl<sub>2</sub> 0.1%, pH 7.8, en agua destilada a 37 °C durante 20 min en cámara húmeda. Se lavaron con TBS-T 2x por 5 min. Para bloquear los sitios de unión inespecíficos las muestras se incubaron con albúmina sérica bovina al 5% recién preparada en TBS-T durante 30 min a temperatura ambiente en cámara húmeda. Se agregaron los anticuerpos primarios anti- $\alpha$ 5 (Santa Cruz Biotechnology, sc-376199), anti- $\alpha$ 6 (Santa Cruz Biotechnology, sc-71423), anti- $\alpha$ V $\beta$ 3 (Santa Cruz Biotechnology, sc-7312), anti- $\beta$ 1 (Santa Cruz Biotechnology, sc-9936), anti- $\beta$ 4 (Santa Cruz Biotechnology, sc-9090), anti-haptoglobina (PIERCE, HYB 170-06-02) y la lectina *Aleuria aurantia* biotinilada (Vector Laboratories, B-1395) diluidos 1:50 en Tris-HCl pH 7.4 con albúmina sérica bovina al 1% y Tween 0.1%. Las muestras se incubaron en una cámara húmeda durante toda la noche a 4 °C. Después, las muestras se lavaron con TBS-T 3x por 5 min y se aplicaron los anticuerpos secundarios: anti-ratón acoplado a FITC

(Thermo Scientific, 31569), anti-conejo acoplado a FITC (Invitrogen, 65-6111), anti-ratón acoplado a TRITC (Jackson ImmunoResearch, 115-025-003), anti-cabra acoplado a Alexa 647 (Invitrogen, A-21446) y estreptavidina acoplada a FITC (Life Technologies, 19538016), todos diluidos 1:100 en Tris-HCl 0.05 M, pH 7.4. Los cortes tumorales se incubaron en cámara húmeda durante 1 h y posteriormente se lavaron con TBS-T 3x durante 5 min cada uno. Las muestras se montaron con VectaShield (Vector Laboratories Inc, H-1100) y se analizaron con un microscopio confocal Carl Zeiss LMS 700.

### **Línea celular**

La línea celular SKOV-3 (ATCC, HTB-77) se estableció a partir de ascitis maligna de una paciente con carcinoma ovárico avanzado en el Sloan-Kettering Cancer Center. Las células SKOV-3 son capaces de generar tumores en la cavidad peritoneal de ratones desnudos pero incapaces de formar agregados celulares.

### **Morfolinos**

Los morfolinos utilizados para inhibir la expresión de las integrinas  $\alpha 5$  (GGTCCCTGGA ACTCTGAGCCCG),  $\alpha 6$  (CGCGACCGCTGAATGAGCCCGTT) y  $\beta 3$  (CTCGCATCTCGTCCGCCTCC), así como el morfolino random se diseñaron y se adquirieron en la página web de la compañía Gene Tools, LLC (Philomath, OR, USA).

### **Inhibición de las integrinas**

Para los diferentes ensayos, células SKOV-3 se sembraron en medio de cultivo McCoy's 5A con L-glutamina (Corning, 10-050-CV) suplementado con suero fetal bovino (PAA, A15-701) al 10%, y se trataron de manera independiente durante 48, 72 y 96 h con los morfolinos dirigidos contra  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  (morfantos) a una concentración de 10  $\mu$ M solubilizados en agua desionizada; como control de especificidad se utilizó un morfolino random que carece de RNAm blanco en las células SKOV-3.

### **Inmunofluorescencia**

Para evaluar el bloqueo de las integrinas se utilizó la técnica de inmunofluorescencia indirecta. Se sembraron células SKOV-3 sobre cubreobjetos previamente tratados con

alcohol y esterilizados en autoclave. Posterior al tratamiento con los morfolinós por 96 h, se retiró el medio de cultivo y se fijaron con p-formaldehído al 4% en PBS durante 1 h a 37 °C, se lavaron 3 veces con PBS filtrado y estéril, se bloquearon con suero fetal bovino al 10% en PBS durante 1 h a 37 °C, se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con los anticuerpos primarios anti- $\alpha 5$  (Santa Cruz Biotechnology, sc-376199), anti- $\alpha 6$  (Santa Cruz Biotechnology, sc-71423) y anti- $\beta 3$  (Santa Cruz Biotechnology, sc-52685) diluidos 1:50 en PBS toda la noche a 4 °C. Posteriormente se lavaron 3 veces con PBS, se incubaron con el anticuerpo secundario anti-ratón-FITC en PBS y se lavaron 3 veces con PBS. Las muestras se montaron con VectaShield con DAPI (Vector Laboratories Inc, H-1200) y se analizaron con un microscopio confocal Carl Zeiss LMS 700.

### **Proliferación celular evaluada con WST-1**

Posterior a la inhibición de las integrinas durante 96 h por el bloqueo traduccional en las células SKOV-3 ejercido por los morfolinós respectivos, se midió la proliferación celular a las 0, 24 y 48 h utilizando el reactivo WST-1 (Roche, 05015944001). Para esto se retiró el medio de cultivo, se lavó 3 veces con PBS 1x estéril, se agregó PBS con WST-1 al 10%, se incubó durante 30 min a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> y finalmente se leyó en un lector de placas de ELISA (Bio Rad, Microplate Reader, Model 680) con un filtro de 450 nm.

### **Ensayo de herida y cierre**

Se sembraron células SKOV-3 en medio de cultivo McCoy con suero fetal bovino al 10% en una placa de 24 pozos, se dejaron adherir al pozo toda la noche y se trataron con los morfolinós dirigidos contra las integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  ó  $\beta 3$ , así como con el morfolino random durante 96 horas, además de contar como control adicional con las células SKOV-3 “wild type”, que no recibieron tratamiento con morfolino alguno. Posteriormente, se inició el ayuno con medio de cultivo McCoy sin suero por 24 h, transcurrido este tiempo se agregó mitomicina C (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Mitolem) 0.02 mg/ml durante 2 h, se retiró el medio de cultivo con la mitomicina C y se realizaron dos heridas perpendiculares sobre la monocapa celular con una punta blanca. Para retirar los restos celulares se lavó dos veces con medio de cultivo McCoy, finalmente se agregó medio de cultivo McCoy con suero fetal bovino al 10%. El registro fotográfico se realizó a las 0, 12, 24 y 30 h con una

cámara fotográfica (Nikon Corp., NKR-D40B) adaptada a un microscopio invertido (Nikon Corp., Diaphot). El porcentaje de herida remanente abierta fue calculado como: Distancia 1/Distancia 0, donde a mayor valor menor tasa de migración celular.

### **Ensayo de invasión**

La migración celular fue medida usando cámaras Transwell (tamaño del poro 8  $\mu\text{m}$ , Corning, 3428). Células SKOV-3 se colocaron en la cámara superior (previamente cubierta con Matrigel) con uno de los morfolidos ( $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$ ,  $\beta 3$  y R) durante 96 h, posteriormente el medio de cultivo que contenía a los morfolidos se reemplazó con medio de cultivo McCoy con suero fetal bovino al 10% y en la cámara inferior se agregó fibronectina a una concentración de 50  $\mu\text{g}$  por ml. Se evaluó la invasión celular a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% a las 48 h, las células que no invadieron fueron removidas del compartimento superior con un hisopo de algodón. Las células que invadieron y que estaban adheridas a la parte inferior del transwell fueron teñidas con azul de metileno durante 15 min, lavadas 2 veces con PBS y contadas en un microscopio invertido (Nikon Corp., Diaphot).

### **Respuesta celular a carboplatino**

Después de la inhibición de las integrinas en las células SKOV-3 durante 96 h, se agregó carboplatino (Teva Pharmaceutical Industries Ltd., Blastocarb RU) a diferentes concentraciones (0.2 y 0.5 mM), se incubó durante 48 h, posteriormente se retiró el medio de cultivo, se lavó 3 veces con PBS 1x estéril, se agregó PBS con WST-1 al 10%, se incubó durante 30 min a 37 °C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> y finalmente se leyó en un lector de placas de ELISA (Bio Rad, Microplate Reader, Model 680) con un filtro de 450 nm.

### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5. Para analizar los datos obtenidos de los ensayos de inmunofluorescencia en tejidos tumorales de pacientes y determinar la existencia de asociaciones estadísticas entre las diferentes variables, se aplicó la prueba de correlación de Spearman. Los ensayos *in vitro* fueron realizados al menos 3 veces de manera independiente por duplicado, los datos son expresados como promedios  $\pm$  SD. Para los ensayos de proliferación celular y de herida y cierre se utilizó la prueba

estadística ANOVA de 2 vías para medidas repetidas; para los ensayos de invasión en cámaras transwell y de respuesta a carboplatino se aplicó la prueba estadística ANOVA de 1 vía; como prueba *post-hoc* para comparar los valores múltiples se aplicó el test de Bonferroni.

## **IX. RESULTADOS**

### **A). Análisis *in situ* de la expresión de las integrinas, la haptoglobina y la fucosilación en el CEO.**

En este proyecto fue de suma importancia evaluar los niveles de expresión de las integrinas, la haptoglobina y la fucosilación en tejidos tumorales de pacientes con CEO, en primer lugar para determinar si existe una sobreexpresión de las proteínas y de la modificación post traduccional en comparación con los tejidos normales y en segundo lugar para determinar si existe una asociación de estos niveles con la presencia de la enfermedad y con las características clínicas y patológicas.

#### **Características clínicas y patológicas de las pacientes con CEO.**

De los 20 tejidos tumorales estudiados en este trabajo, once correspondieron al histotipo endometriode (55%), cuatro al histotipo seroso (20%), cuatro a células claras (20%) y uno presentó la combinación del histotipo seroso con el histotipo endometriode, denominado histotipo mixto (5%). El rango de edad de las pacientes fue entre 29 y 67 años con un promedio de 50.8 años; otras características clínicas y patológicas tales como grado histológico, etapa clínica, concentración de CA-125 inicial, tratamiento inicial, cirugía de intervalo, citorreducción, periodo libre de enfermedad y supervivencia general se muestran en la Tabla 1.

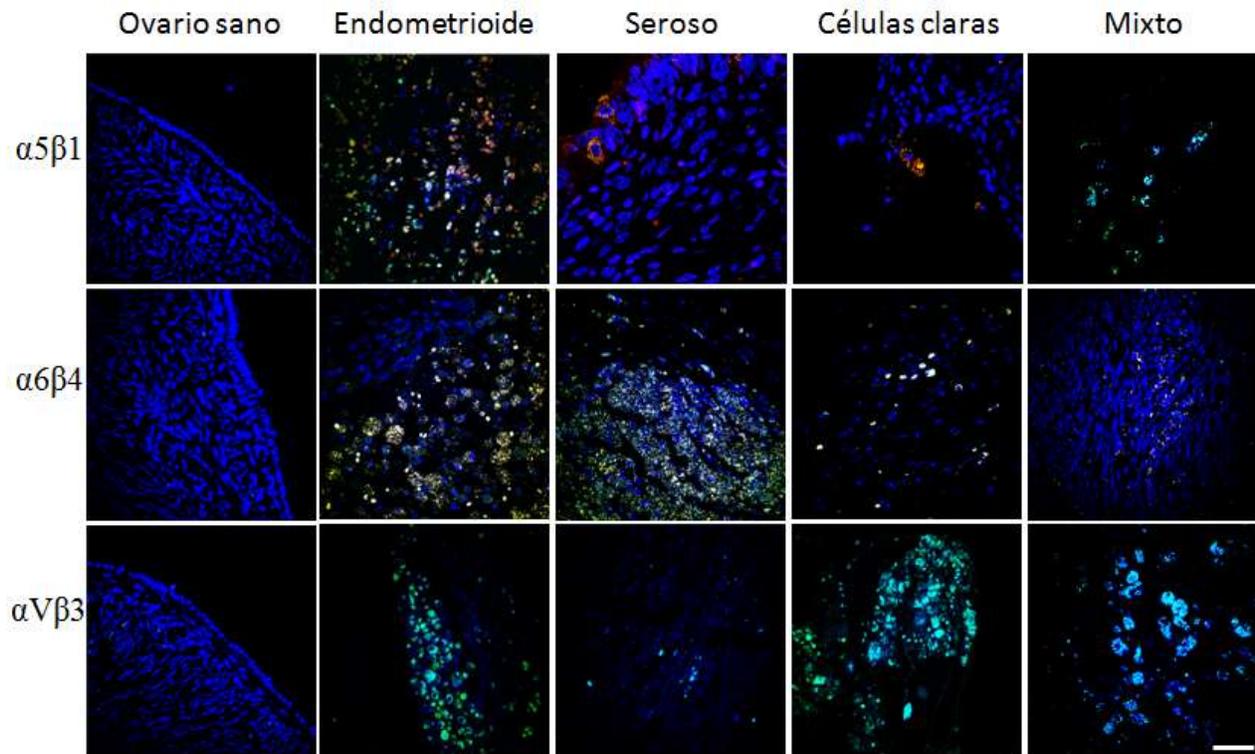
**Tabla 1.** Características clínicas y patológicas de las pacientes con CEO.

Edad al Diagnóstico	Histología	Grado Histológico	Etapa Clínica	CA-125 Inicial ( U/ml )	Seguimiento Meses
65	Papilar seroso y Endometriode	Alto	IV B	3161	53 <sup>=</sup>
43	Células Claras	Alto	IV B	395	SS
55	Células Claras	Alto	IA	38.8	48 <sup>=</sup>
64	Células Claras	Alto	IA	225	48 <sup>=</sup>
29	Células Claras	Alto	IIIC	54.5	16 <sup>x</sup>
39	Papilar Seroso	Alto	IV B	2365	15 <sup>x</sup>
48	Papilar Seroso	Alto	IIIC	265	SS
64	Papilar Seroso	Alto	IV	924	51 <sup>x</sup>
65	Papilar Seroso	Alto	IA	7406	SS
51	Endometriode	G3	IIIC	1872	53 <sup>=</sup>
49	Endometriode	G2	IIIC	335	SS
51	Endometriode	G1	IC	12.1	47 <sup>=</sup>
38	Endometriode	G2	IB	208	54 <sup>=</sup>
60	Endometriode	G3	IB	336	49 <sup>=</sup>
43	Endometriode	G2	IV	11781	58 <sup>=</sup>
40	Endometriode	G1	IA	90.4	51 <sup>=</sup>
59	Endometriode	G3	IIIB	1184	SS
46	Endometriode	G3	IIIC	2158	54 <sup>=</sup>
40	Endometriode	G2	IA	56.1	53 <sup>=</sup>
67	Endometriode	G3	IIIC	935	54 <sup>=</sup>

Viva, <sup>=</sup>; Fallecida, <sup>x</sup>; SS, Sin Seguimiento

### Expresión de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ , $\alpha 6\beta 4$ y $\alpha V\beta 3$ .

Ensayos de Western-Blot realizados en la maestría sugirieron la presencia de los heterodímeros  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$  en la línea celular SKOV-3. Con este antecedente analizamos la expresión de estas integrinas en tejidos tumorales de pacientes con CEO realizando ensayos de inmunohistofluorescencia mediante microscopía confocal. En la figura 5, se muestran imágenes representativas de los resultados obtenidos, con altas tasas de colocalización de las subunidades  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  con las subunidades  $\beta 1$  y  $\beta 4$  respectivamente; también se encontró una fuerte señal para la expresión de  $\alpha V\beta 3$  en los diferentes histotipos de CEO. Estos resultados permitieron confirmar la sobreexpresión de estos heterodímeros en tejidos tumorales de pacientes con CEO (Fig. 5).



**Figura 5. Sobreexpresión de integrinas en los tejidos tumorales de pacientes con CEO.** La sobreexpresión de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$  se analizó por inmunohistoquímica, en tejido ovárico sano y en tejidos tumorales de diferentes histotipos de CEO: endometrioides, seroso, células claras y mixto. Para las integrinas  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 4$ , la señal verde indica la presencia de las subunidades  $\alpha 5$  y  $\beta 4$ , mientras que la señal roja indica la presencia de las subunidades  $\beta 1$  y  $\alpha 6$ , respectivamente, el color amarillo indica la colocalización de las subunidades. Para la detección de la integrina  $\alpha V\beta 3$ , se utilizó un anticuerpo dirigido contra el heterodímero y la señal verde indica la presencia del receptor. En todas las imágenes los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala =  $40\mu\text{m}$ . Imágenes representativas de 20 biopsias analizadas.

El perfil de expresión de  $\alpha 5\beta 1$  en el histotipo endometriode mostró un patrón homogéneo y disperso en todas las áreas del tejido analizadas; en el histotipo seroso, se observaron algunos grupos de células positivas y en el histotipo de células claras se observaron algunas células aisladas con señal positiva. Finalmente, el histotipo mixto mostró expresión restringida de esta integrina. La expresión de la integrina  $\alpha 6\beta 4$  fue muy similar en los histotipos endometriode y seroso, mostrando un patrón disperso en grandes áreas del tejido tumoral, mientras que el histotipo de células claras tuvo señal positiva solamente en células aisladas similar a lo observado para la integrina  $\alpha 5\beta 1$ . En el histotipo mixto, la señal positiva fue confinada a una pequeña zona y el nivel de expresión fue bajo. Con respecto a la presencia de la integrina  $\alpha V\beta 3$ , este heterodímero se expresa fuertemente en áreas muy bien delimitadas para los histotipos endometriode, células claras y mixto, mientras el histotipo seroso mostró una señal muy escasa y restringida en pequeñas áreas del tejido tumoral.

#### **Dimerización e intensidad de las integrinas en los diferentes histotipos de CEO.**

El nivel de colocalización entre las respectivas subunidades, se determinó con base en la intensidad de pixeles detectada por el software del microscopio confocal. Ésta fue mayor al 70%, confirmando que la mayoría de las moléculas están en el estado dimerizado y por lo tanto estos heterodímeros deben ser funcionales (Tabla 2). El histotipo endometriode tuvo la mayor intensidad para las integrinas  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 4$ , mientras que el histotipo de células claras mostró la señal más fuerte para la integrina  $\alpha V\beta 3$ .

**Tabla 2.** Expresión cuantitativa (intensidad de pixeles) y coeficiente de colocalización de las integrinas en los diferentes tipos histológicos de CEO.

Histotipo	Intensidad (pixeles)	Coeficiente de colocalización	Intensidad (pixeles)	Coeficiente de colocalización	Intensidad (pixeles)
	$\alpha 5\beta 1$		$\alpha 6\beta 4$		$\alpha V\beta 3$
Endometriode	5.27	0.74	3.88	0.79	0.93
Seroso	3.35	0.77	2.49	0.76	0.28
Células claras	3.51	0.79	1.76	0.80	3.78
Mixto	2.54	0.75	2.92	0.71	1.72
Ovario sano	0.02	0	0.03	0	0.08

### **Sobreexpresión de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ , $\alpha 6\beta 4$ y $\alpha V\beta 3$ en la mayoría de biopsias analizadas.**

De los 20 tejidos tumorales analizados, 16 mostraron señal para las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$ ; solamente 2 tumores no mostraron señal positiva para  $\alpha 5\beta 1$  ni para  $\alpha 6\beta 4$ , y 4 biopsias no mostraron positividad para la integrina  $\alpha V\beta 3$  (Tabla 3).

**Tabla 3.** Porcentaje de biopsias positivas y correlación de Spearman entre la expresión de las integrinas ( $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$ ) con diferentes tipos histológicos.

Integrinas	Endometrioides	Seroso	Células claras	Mixto	Spearman r
$\alpha 5\beta 1$	81.8%	100%	100%	100%	0.06
$\alpha 6\beta 4$	81.8%	100%	100%	100%	0.03
$\alpha V\beta 3$	72.8%	75%	100%	100%	0.20

### **Niveles sobreexpresados de las integrinas $\alpha 5\beta 1$ , $\alpha 6\beta 4$ y $\alpha V\beta 3$ por histotipo.**

Para analizar los niveles de expresión de las integrinas, se calculó el porcentaje de muestras positivas para estos receptores. Los tejidos tumorales, a pesar de que algunos correspondieron al mismo histotipo, no tuvieron un comportamiento similar; en lugar de esto, mostraron diferentes niveles de expresión de las 3 integrinas estudiadas. En el histotipo endometrioides se encontraron niveles altos de sobreexpresión para las integrinas  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha 6\beta 4$ , en el histotipo seroso también se observaron niveles altos para la integrina  $\alpha 6\beta 4$ , mientras que el nivel más alto de la integrina  $\alpha V\beta 3$  se observó en el histotipo de células claras. El histotipo mixto mostró sobreexpresión de las 3 integrinas pero no a niveles altos (Tabla 4).

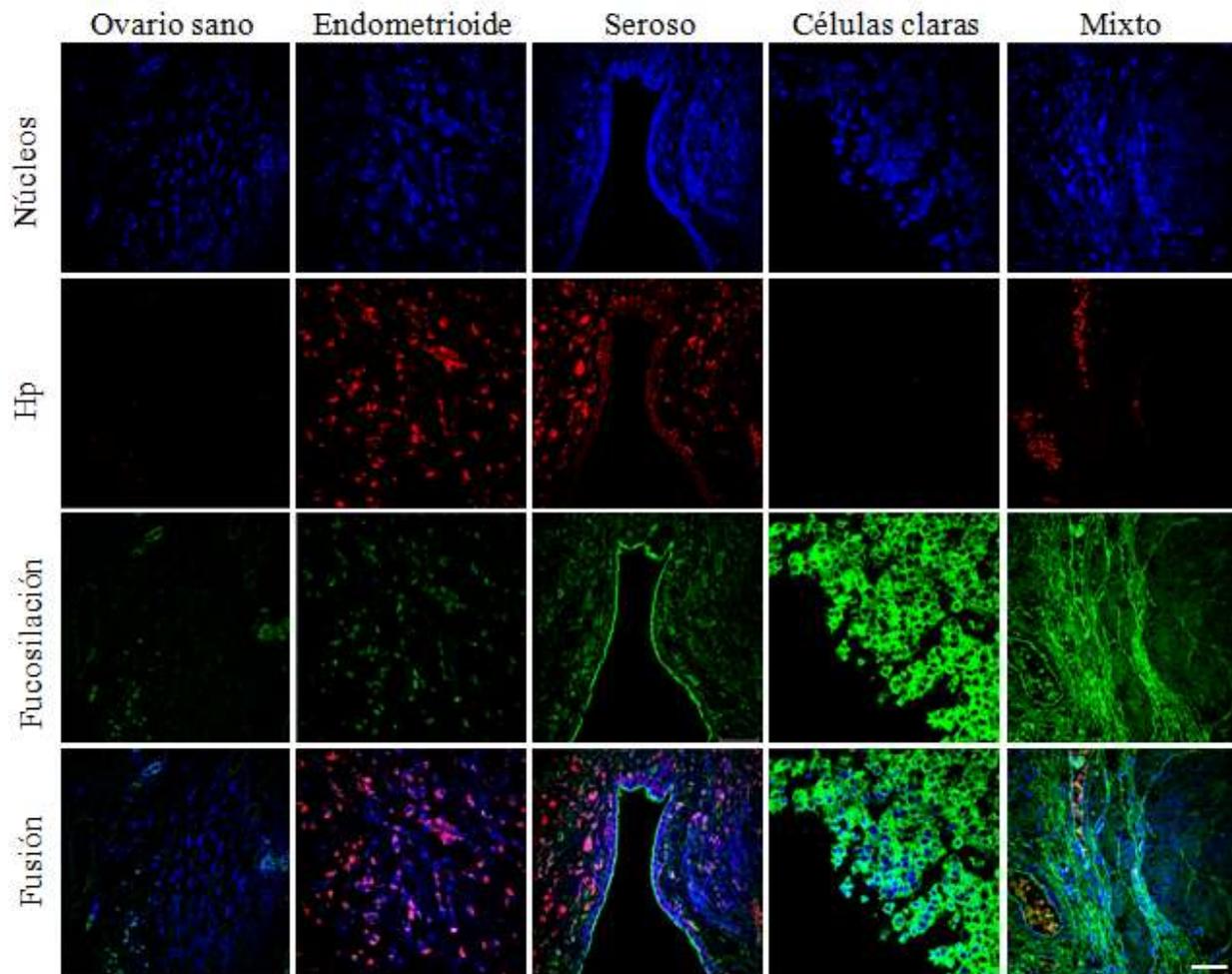
**Tabla 4.** Niveles de sobreexpresión (bajo, medio o alto) de los heterodímeros  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$  en los diferentes histotipos de CEO.

Histotipo	Muestras Positivas (%)			Nivel de sobreexpresión
	Integrinas			
	$\alpha 5\beta 1$	$\alpha 6\beta 4$	$\alpha V\beta 3$	
Endometrioides	55.5	55.5	87.5	Bajo
	33.3	11.1	12.5	Medio
	11.1	33.3	0	Alto
Seroso	100	75	100	Bajo
	0	0	0	Medio
	0	25	0	Alto
Células claras	100	100	75	Bajo
	0	0	0	Medio
	0	0	25	Alto
Mixto	100	100	100	Bajo
	0	0	0	Medio
	0	0	0	Alto

**Expresión de haptoglobina, de haptoglobina fucosilada y de fucosilación en biopsias de CEO.**

Para evaluar la expresión de haptoglobina, haptoglobina fucosilada y fucosilación se realizaron ensayos de inmunohistoquímica en los 20 tejidos tumorales. En la mayoría de los tumores analizados (80%), los niveles de fucosilación fueron muy elevados (Fig. 6). Estos niveles elevados no siempre se acompañaron por incremento de la expresión de la haptoglobina, la cual sí incrementa con respecto al nivel de expresión encontrado en el tejido ovárico sano pero nunca a la misma magnitud como la fucosilación. Cuando se observó haptoglobina fucosilada, ésta se encontraba dispersa en todo el campo analizado (histotipos endometrioides y seroso); cuando no se detectó haptoglobina, la señal para la fucosilación fue más evidente (histotipos células claras y mixto). La autofluorescencia de los eritrocitos dentro de los vasos sanguíneos es notable en el tejido tumoral mixto. El

ovario sano expresó haptoglobina fucosilada solamente en los folículos ováricos como se reportó previamente (Garibay-Cerdenares *et al.*, 2014).



**Figura 6. Expresión de haptoglobina y fucosilación en tejidos tumorales de pacientes con CEO.** La expresión de haptoglobina y de fucosilación se analizó por inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con diferentes histotipos de CEO: endometrioides, seroso, células claras y mixto. La señal roja indica la presencia de la haptoglobina, mientras que la señal verde indica la presencia de fucosilación. En todas las imágenes los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

**Correlación estadística de la expresión de integrinas, haptoglobina y fucosilación con la presencia de la enfermedad y las características clínicas y patológicas de los pacientes.**

Para determinar si existía asociación estadística de las variables analizadas (integrinas, haptoglobina y fucosilación) con la presencia de la enfermedad y con las características clínicas y patológicas, se hizo el análisis de correlación, por separado, de los niveles de expresión de las integrinas, la haptoglobina y la fucosilación con la presencia de la enfermedad, y con las características clínicas y patológicas de los pacientes, haciendo uso del coeficiente estadístico de Spearman. Al analizar los coeficientes obtenidos, se puede observar que existe una correlación positiva entre la expresión de las proteínas y de la fucosilación con la presencia de la enfermedad, con una alta asociación para  $\alpha5\beta1$  y  $\alpha6\beta4$ , y una asociación moderada para  $\alpha V\beta3$ , haptoglobina y fucosilación (Tabla 5). El mismo análisis estadístico se realizó para evaluar alguna asociación entre la expresión de las proteínas y de la fucosilación con los histotipos, el grado histológico, etapa clínica, CA-125, periodo libre de enfermedad (PLE) y supervivencia general (SG), pero no se encontró dicha asociación.

**Tabla 5.** Correlación estadística entre la expresión de integrinas, Hp y fucosilación con la presencia de la enfermedad.

Presencia de la enfermedad (CEO)					
Expresión de proteínas/fucosilación					
	$\alpha5\beta1$	$\alpha6\beta4$	$\alpha V\beta3$	Hp	Fucosilación
Spearman $\rho$	0.890	0.802	0.667	0.577	0.633
Valor de p	< 0.0001	< 0.0001	0.0003	0.0031	0.0009

## B. Análisis *in vitro* de la participación de las integrinas en los mecanismos de establecimiento/progresión del CEO.

Los niveles sobreexpresados de las integrinas en los tejidos tumorales de CEO sugieren que estos receptores heterodiméricos pueden estar desempeñando un papel importante en estos tejidos. Por lo que nos dimos a la tarea de bloquear, mediante el uso de morfolinós, la traducción de las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  en células SKOV-3 y evaluamos su respuesta en diferentes procesos esenciales para el desarrollo del CEO (proliferación, migración, invasión y la respuesta al carboplatino).

### Diseño de los morfolinós dirigidos hacia las subunidades de integrinas $\alpha 5$ , $\alpha 6$ y $\beta 3$ .

Para evaluar la participación de las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$  en eventos esenciales para la generación y el desarrollo del CEO tales como la proliferación, la migración, la invasión y la respuesta hacia el carboplatino, se inhibió la expresión de las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$ . Para la inhibición de estas subunidades de integrinas se diseñaron morfolinós entre 20 y 25 bases nucleotídicas en la página de la compañía comercial GeneTools, LTD. Para el caso de las subunidades  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  los morfolinós se unen río arriba del sitio de inicio de la traducción y para la subunidad  $\beta 3$  el morfolino tiene su secuencia blanco sobre el sitio de inicio de la traducción (Fig. 7).

CLUSTAL multiple sequence alignment by MUSCLE (3.8)

```
Integrinaalfa5      AGTCCAGACAACCGGCTTCCAGCTGGGGCTGGGGAAAGGGGGTTGGAGGGGTGCGCCCCC
Morfolinoalfa5     -----

Integrinaalfa5      CCCCCACGCCCTTAGGGGTGGGGGACGCGGGCTCAGAGTTCCAGGGACCCAGGATGCCC
Morfolinoalfa5     -----*****-----

Integrinaalfa5      CCCCCGCCAGCCCCCTCGGCAGGCGGGGGGAGGGCTCAGCCGGGAGTTTGGCAAACCTCCT
Morfolinoalfa5     -----

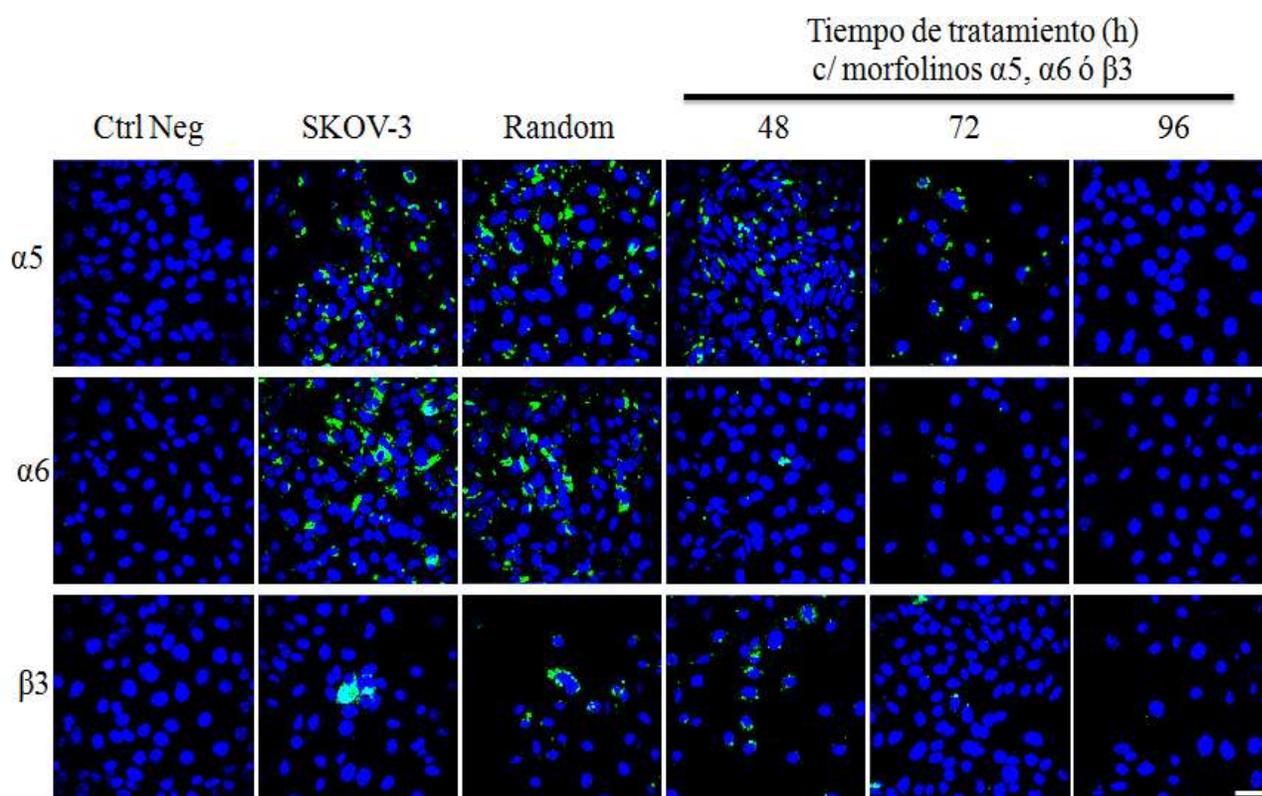
Integrinaalfa5      CCCC CGTTGAGTCATTCGCCTCTGGGAGG
Morfolinoalfa5     -----
```

Integrinaalfa6 Morfolinoalfa6	TTGATAAAACGCCTGCGAGTCTCCAGAGAACAACGGGCTCATTTCAGCGGTCGCGAGCTGC ----- *****-----
Integrinaalfa6 Morfolinoalfa6	CCGCGAGGGGGAGCGGCCGGACGGAGAGCGCGACCCGTCCCAGGGGTGGGGCCGGGCGCA -----
Integrinaalfa6 Morfolinoalfa6	GCGGCGAGAGGAGGCGAAGGTGGCTGCGGTAGCAGCAGCGCGGCAGCCTCGGACCCAGCC -----
Integrinaalfa6 Morfolinoalfa6	CGGAGCGCAGGGCGGCCGCTGCAGGTCCCCGCTCCCCTCCCCGTGCGTCCGCC <b>ATG</b> BCC -----
Integrinaalfa6 Morfolinoalfa6	GCCGCCGGGCAGCTGTGCTTGCTCTACCTGTCGGCGGGGC -----
Integrinabeta3 Morfolinobeta3	CGCCCGGGGAGGCGGACGAC <b>ATG</b> CGAGCGCGGCCGCGGCCCGGCCGCTCTGGGCGACTG ----- *****-----
Integrinabeta3 Morfolinobeta3	TGCTGGCGCTGGGGCGCTGGCGGGCGTTGGCGTAGGAGGGCCCAACATCTGTACCACGC -----
Integrinabeta3 Morfolinobeta3	GAGGTGTGAGCTCCTGCCAGCAGTGCCTGGCTGTGAGCCCCATGTGTGCCTGGTGTCTG -----
Integrinabeta3 Morfolinobeta3	ATGAGGCCCTGCCTCTGGGCTCACCTCGCT -----

**Figura 7. Secuencias de los morfornos.** El diseño de los morfornos se obtuvo a través de la página web GeneTools. Se muestra el sitio de unión de los morfornos en su secuencia blanco, el rectángulo negro indica el codón de inicio de la traducción de cada integrina.

### Inhibición de la expresión de las integrinas $\alpha 5$ , $\alpha 6$ y $\beta 3$ mediante morfolinós.

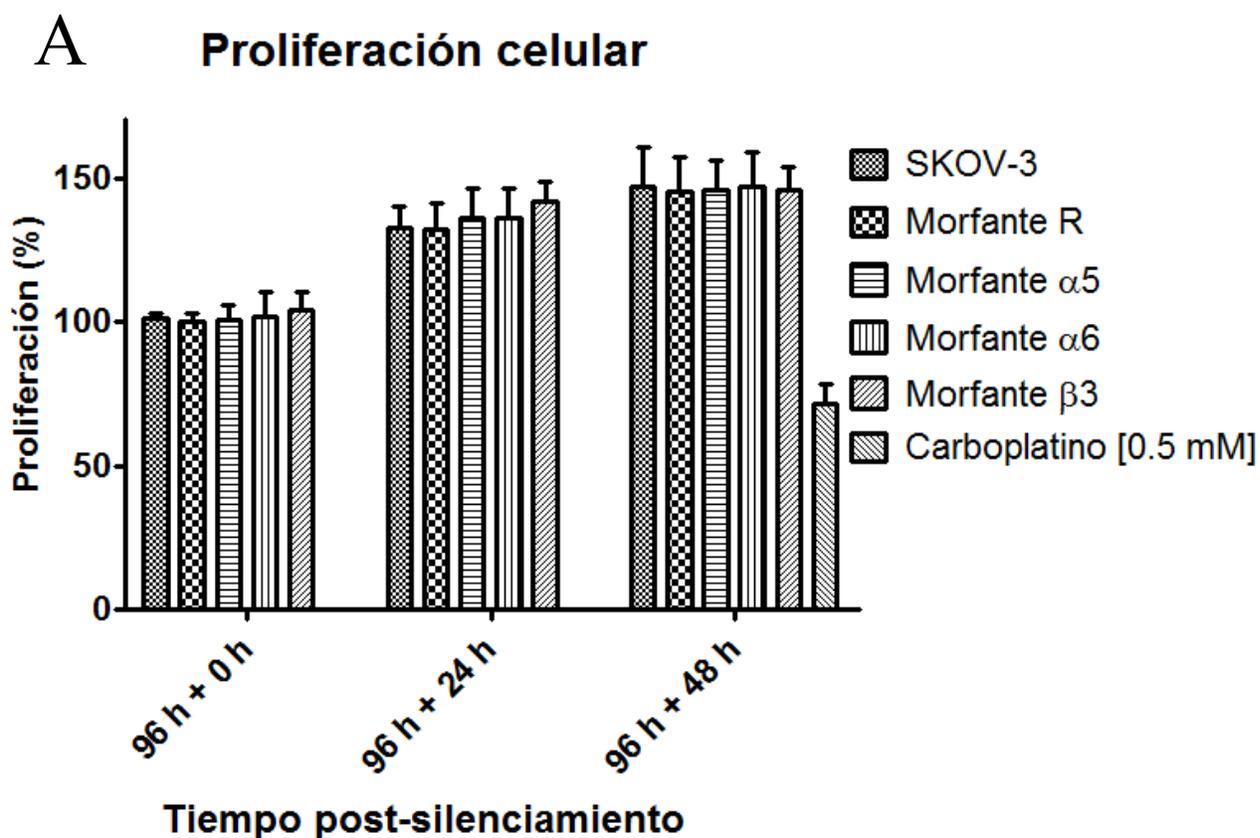
La inhibición de la expresión de las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  mediante el tratamiento de las células SKOV-3 con morfolinós específicos para cada subunidad, se corroboró mediante ensayos de inmunofluorescencia. La expresión basal de las integrinas  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  fue mayor que la expresión de  $\beta 3$ . El tratamiento con los morfolinós por 48 h disminuyó notablemente la expresión de las 3 subunidades, pero aún se encontró señal positiva en el cultivo celular. A las 72 h la expresión de  $\alpha 6$  se evitó completamente, mientras que en las células tratadas con los morfolinós para  $\alpha 5$  y  $\beta 3$ , la señal positiva permaneció. Después de 96 h de tratamiento se bloqueó completamente la traducción de las 3 subunidades y no se observó señal positiva para ninguna de ellas (Fig. 8).



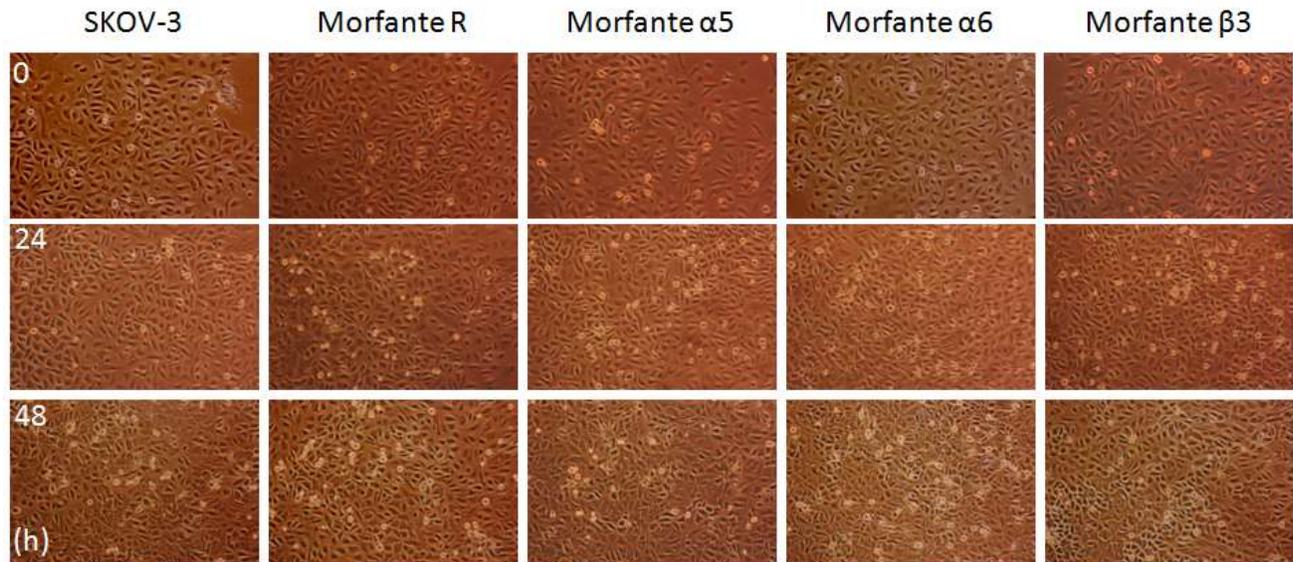
**Figura 8. Inhibición de la traducción de las subunidades de integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$ .** El bloqueo traduccional de las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  empleando morfolinós se confirmó por inmunofluorescencia. Se emplearon células sin tratamiento (SKOV-3), células tratadas con un morfolino random el cual carece de algún RNAm blanco (R) y células tratadas con los morfolinós dirigidos contra la subunidad  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  ó  $\beta 3$ , se evaluaron 4 temporalidades: basal, 48 h, 72 h y 96 h de post-tratamiento con los morfolinós. Las subunidades de integrinas se detectaron con un anticuerpo secundario acoplado a FITC (verde) y los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). Barra de escala = 50  $\mu$ m.

### El silenciamiento de las integrinas $\alpha 5$ , $\alpha 6$ y $\beta 3$ no afecta la proliferación celular.

En la literatura se ha reportado que la sobreexpresión de las integrinas ayuda a la proliferación celular (Desgrosellier and Cheresch, 2010; Mouw *et al.*, 2014). Para determinar si el bloqueo de la traducción de las integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  afectaba la proliferación de la línea celular SKOV-3 se evaluó su capacidad proliferativa empleando el reactivo WST-1 (Fig. 9). Las células tratadas con los diferentes morfolinós R,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  (morfantes) por 96 h, no tuvieron una tasa de proliferación alterada comparadas con las células control sin tratamiento (Fig. 9a) y tampoco se observó algún cambio en la morfología celular (Fig. 9b) a las 0, 24 y 48 h después de la incubación con los diferentes morfolinós.



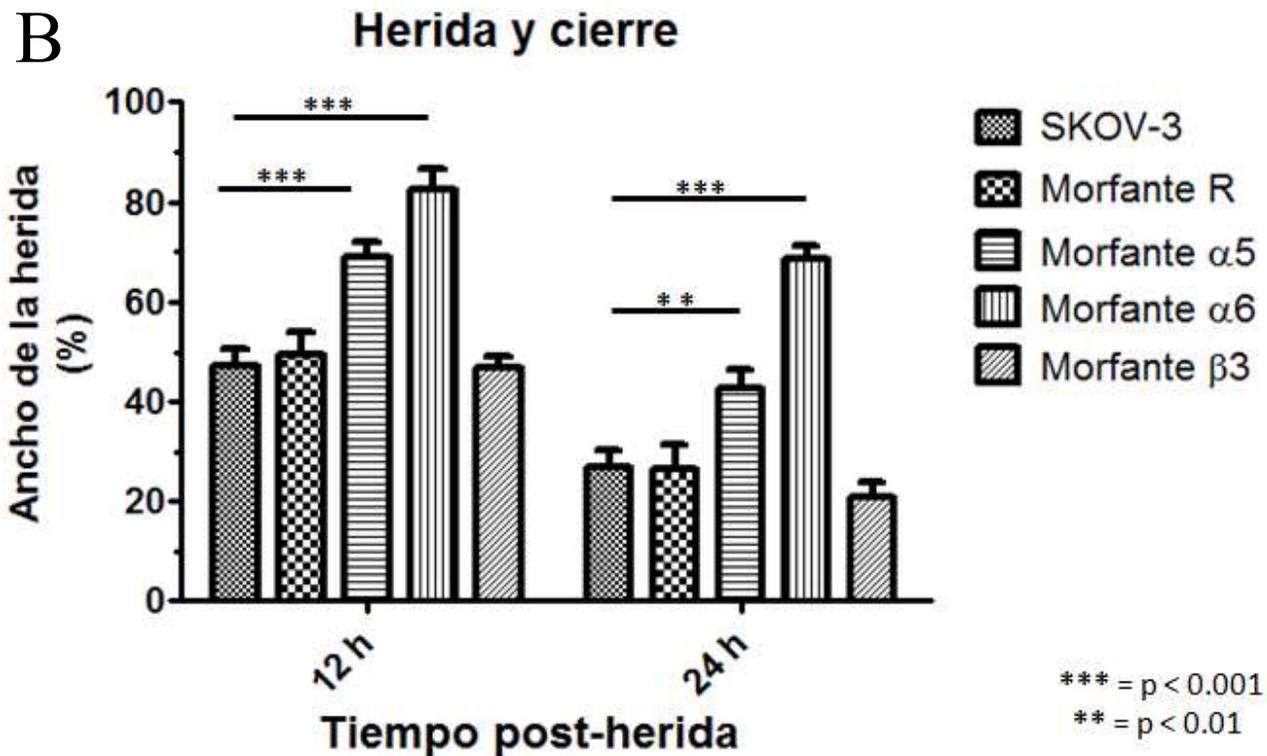
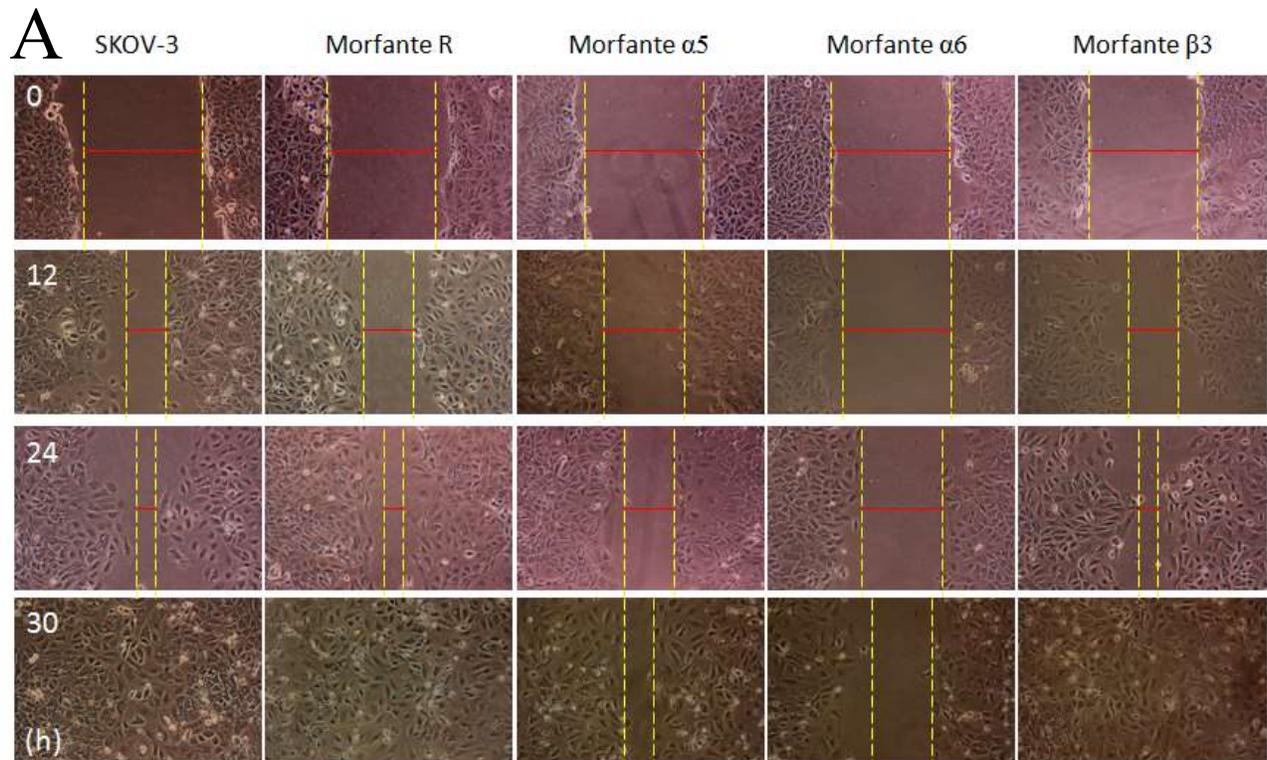
# B



**Figura 9. Proliferación de células SKOV-3 y morfantes de las integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$ .** (A) Se evaluó la proliferación celular a las 0, 24 y 48 h después del tratamiento con los morfolinós durante 96 h. Se emplearon células sin tratamiento (SKOV-3), tratadas con un morfolino random el cual carece de algún RNAm blanco (R) y con los morfolinós dirigidos contra la subunidad  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  ó  $\beta 3$ . Como control de daño en la proliferación celular se utilizó carboplatino al 0.5 mM. (B) Imágenes fotográficas de los cultivos celulares de las células control y de las morfantes, objetivo 10X.

### **El bloqueo de la traducción de las integrinas $\alpha 5$ y $\alpha 6$ disminuye la capacidad migratoria de las células SKOV-3.**

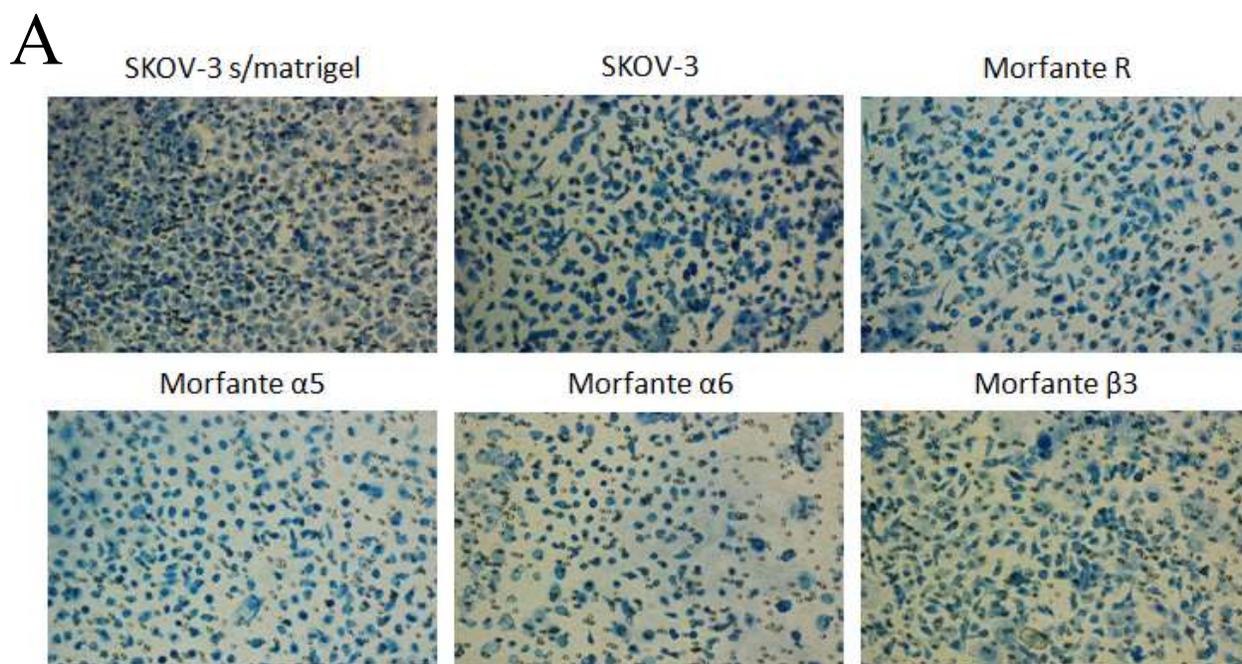
Está documentado que la integrina  $\alpha 6\beta 4$  participa en procesos de migración celular (Ngora *et al.*, 2012), sin embargo no se conoce mucho acerca del papel que desempeñan otras integrinas como  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha V\beta 3$  en este evento tan importante en los procesos neoplásicos. Por lo que se analizó como se afecta este fenómeno en las morfantes carentes de las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  ó  $\beta 3$  mediante ensayos de herida y cierre. Las células control, random y morfantes  $\beta 3$  se comportaron de manera similar, cerrando cerca del 50% de la herida a las 12 h y cerca del 75% a las 24 h. Para el caso de los morfantes  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  a las 12 h, cerraron 30% y menos del 20% respectivamente y a las 24 h cerraron cerca del 60% y del 30%, respectivamente (Fig. 10).



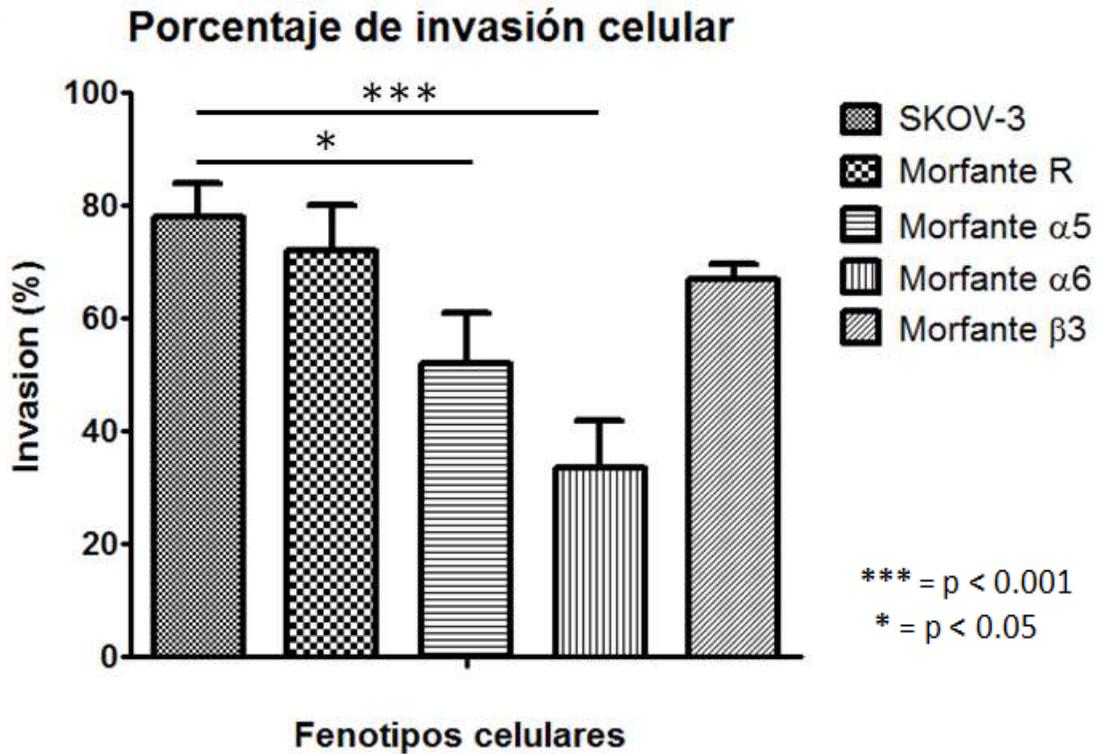
**Figura 10. Efecto del bloqueo traduccional de las subunidades de integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  en la migración celular.** (A) Imágenes de microscopía óptica representativas del ensayo de herida y cierre con las células morfantes (R,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$ ) y las células control (SKOV-3). El porcentaje de cierre de la herida se calculó como la relación entre el ancho de la herida a T0 entre el ancho de la herida a los tiempos de 12 y 24 h. (B) Los porcentajes de herida a los diferentes tiempos se graficaron para cada caso y se hizo el análisis estadístico correspondiente. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$  en comparación con las células control a los tiempos de 12 y 24 h. Los resultados son representativos de 3 experimentos independientes realizados por triplicado.

### La inhibición de las integrinas $\alpha 5$ and $\alpha 6$ afecta el proceso de invasión

Para evaluar el efecto del silenciamiento de las integrinas en la línea celular SKOV-3 en el proceso de invasión, se realizaron ensayos en cámaras transwell (Fig. 11A). Como podemos observar en la figura 11, en los morfantes  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ , se observan menores porcentajes de células que invadieron, con una diferencia estadísticamente significativa comparada con células control SKOV-3 sin tratamiento (52.1%,  $p < 0.05$  y 33.6%  $p < 0.001$  vs 77.9%, respectivamente), mientras que el morfante  $\beta 3$  tuvo un comportamiento similar a células sin tratar (66.8%,  $p > 0.05$  vs 77.9%) (Fig. 11B).



B

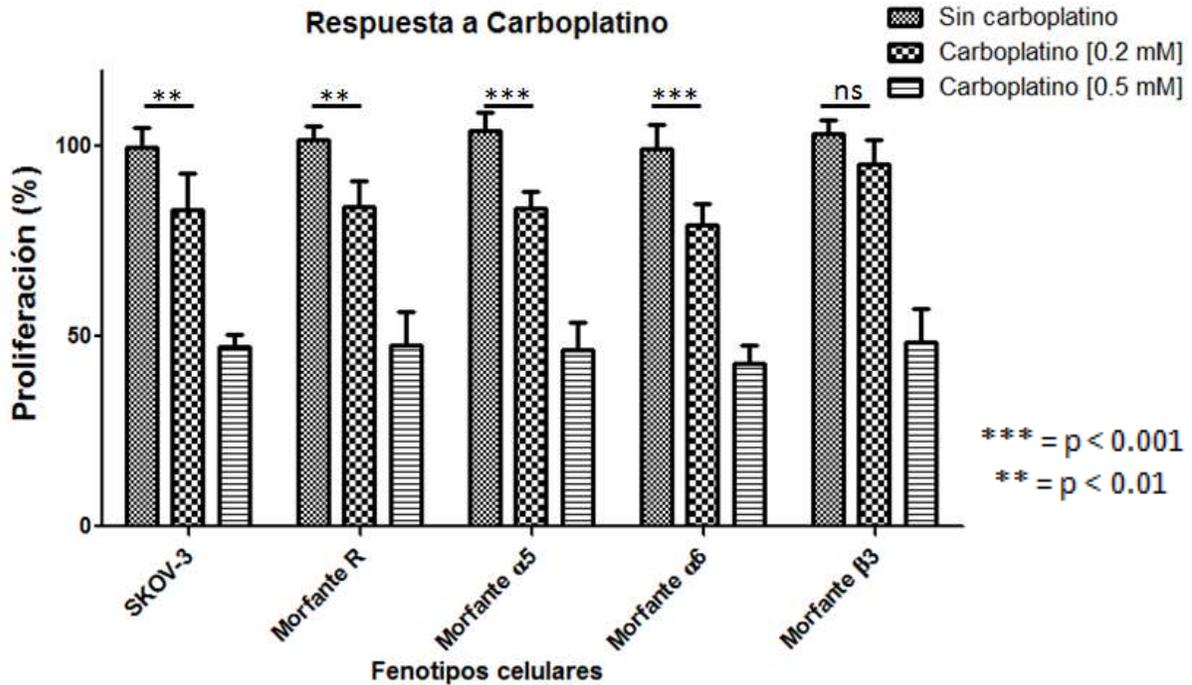


**Figura 11. Ensayos de invasión de células SKOV-3 y morfantes carentes de las integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  en cámaras transwell.** La tasa de invasión de células SKOV-3 y de los morfantes R,  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  se evaluó usando cámaras transwell cubiertas con matrigel. (A) La invasión de las células que atravesaron el matrigel después de 48 h, se tiñeron con azul de metileno. (B) Los porcentajes de invasión se graficaron para cada condición y se realizó el análisis estadístico correspondiente. \* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

**La carencia de las integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  altera la resistencia hacia el carboplatino.**

Existen muy pocos trabajos acerca de la sensibilidad que genera el bloqueo de las integrinas sobreexpresadas en las células de cáncer hacia compuestos generados a partir del platino (Hu *et al.*, 2012; Gao *et al.*, 2013). En estos trabajos se menciona que el bloqueo de las integrinas confiere sensibilidad celular hacia fármacos que contienen platino. En el presente estudio realizamos un ensayo que evaluara la proliferación de las células control y de las células morfantes para las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  para determinar si la ausencia de las subunidades de integrinas favorecía o no la sensibilidad de las células hacia el tratamiento con carboplatino (Fig. 12). Como era de esperarse, el grupo tratado con el morfolino random se comportó como las células control, mostrando una diferencia significativa entre

las condiciones de carboplatino de 0 mM y 0.2 mM. Los morfantes  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  resultaron más sensibles en esta misma comparación, teniendo tres grados de diferencia estadística, mientras que inesperadamente el morfante  $\beta 3$  no fue sensible a la concentración de 0.2 mM de carboplatino.



**Figura 12. Respuesta hacia el carboplatino de células SKOV-3 wild type y de morfantes  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$ .** Se analizó la respuesta de las células hacia diferentes concentraciones de carboplatino, se emplearon células sin tratamiento (SKOV-3), tratadas con un morfolino random (R) y con los morfolinos dirigidos contra la subunidad  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  ó  $\beta 3$ . ns = no significativo.

## X. DISCUSIÓN

Las integrinas son moléculas de adhesión que regulan procesos neoplásicos. Estos receptores juegan un papel fundamental para la adhesión celular a proteínas de la MEC y son capaces de activar cascadas de señalización que conducen a importantes eventos celulares tales como proliferación, diferenciación y migración, entre otros (Xiong *et al.*, 2013). En este trabajo analizamos la expresión de las integrinas  $\alpha5\beta1$ ,  $\alpha6\beta4$  y  $\alpha V\beta3$ , de la haptoglobina y de la fucosilación en biopsias de pacientes con CEO, también bloqueamos la traducción de las subunidades  $\alpha5$ ,  $\alpha6$  y  $\beta3$  para evaluar su repercusión en el fenotipo de la línea celular SKOV-3 en diferentes eventos celulares esenciales para el desarrollo del CEO (proliferación, migración, invasión y respuesta a carboplatino).

Al examinar la expresión de los tres heterodímeros en biopsias de pacientes con CEO, se encontró que el 90% de las muestras analizadas expresaron la integrina  $\alpha5\beta1$ , y, considerando los resultados descritos en la bibliografía, en la que se menciona que esta integrina participa activamente en procesos de adhesión y migración celular así como en procesos angiogénicos y como consecuencia en el crecimiento tumoral (Yan *et al.*, 2010; Bhaskar *et al.*, 2007), era de esperarse que sus niveles estuvieran sobreexpresados en los tejidos tumorales.

Se sabe que la integrina  $\alpha6\beta4$  promueve la migración y la adhesión de células tumorales hacia nuevos sitios tumorales, generando metástasis (Ngora *et al.*, 2012). Sin embargo pocos son los estudios de este receptor en CEO. Al analizar los tejidos tumorales observamos una señal positiva en el 90% de las biopsias examinadas, porcentaje similar al observado para  $\alpha5\beta1$ . Este resultado concuerda con la literatura donde diversos grupos han establecido que esta integrina es muy importante en los procesos neoplásicos (Beaulieu, 2010; Ngora *et al.*, 2012; Maalouf *et al.*, 2012).

La integrina  $\alpha V\beta3$  ha sido relacionada con la formación de vasos sanguíneos, su expresión en los tumores es necesaria para nutrir a las células malignas y promover la formación de las masas tumorales (Millard *et al.*, 2011). Wang *et al.*, (2011) establecieron una correlación entre la expresión de las subunidades  $\alpha V$  y  $\beta3$  con una glicoproteína de superficie (antígeno de Lewis Y), encontrando que tanto la integrina como el antígeno se encuentran sobreexpresados durante el CEO. Estos autores también mostraron que la

integrina  $\alpha V\beta 3$  no se expresa en tejido ovárico sano, lo cual concuerda con nuestros datos obtenidos. Por lo tanto, nuestros resultados confirman que la integrina  $\alpha V\beta 3$  está sobreexpresada durante el desarrollo del CEO.

Recientemente nuestro grupo de trabajo evaluó la expresión de isoformas de haptoglobina y haptoglobina fucosilada en líquidos ascíticos de pacientes con CEO y se asoció a la progresión de esta enfermedad (Garibay-Cerdenares *et al.*, 2014). En el presente estudio, determinamos la expresión de haptoglobina y la presencia de fucosilación en los 20 tejidos tumorales de CEO con diferentes histotipos. Encontramos que la haptoglobina y la fucosilación están sobreexpresados en el CEO, resultados similares a los obtenidos en trabajos previos (Garibay-Cerdenares *et al.*, 2014). Con los datos obtenidos, se refuerza la idea de que existe un incremento notable de la expresión de integrinas, haptoglobina y fucosilación en los tejidos tumorales, dado que existe una correlación estadística de la expresión de estas proteínas y de la fucosilación con la presencia de la enfermedad. Sin embargo, no se encontró alguna asociación entre el aumento de los niveles de integrinas, haptoglobina y fucosilación con los histotipos, grados histológicos, etapa clínica, CA-125, PLE y SG.

A pesar de esto, la mayoría de las biopsias fueron positivas para los tres heterodímeros de integrinas analizados, para la haptoglobina y para la fucosilación, indicando que la expresión de estas moléculas está relacionada con el proceso maligno *per se*. Estudios adicionales serán necesarios para comprender mejor la heterogeneidad en la expresión de estos receptores con respecto a los diferentes histotipos de CEO. Enfermedades en las cuales existe una respuesta heterogénea a las drogas, como es el caso del CEO, una terapia personalizada es la mejor opción para un tratamiento exitoso. Nuestros resultados demuestran el potencial beneficio que es conocer el patrón de integrinas expresado en cada paciente para el diseño del tratamiento, dado que ya se encuentran comercialmente disponibles algunos anticuerpos bloqueadores contra  $\alpha 5\beta 1$  y  $\alpha V\beta 3$ . Así, el tumor de una paciente podría ser analizado para determinar el patrón de integrinas presentes, y asignarle una terapia personalizada con estos anticuerpos bloqueadores como un complemento al tratamiento convencional. Esto podría incrementar las probabilidades del paciente de responder más efectivamente a la quimioterapia y así prolongar la supervivencia libre de enfermedad.

Referente a los ensayos *in vitro*, se evaluó la respuesta de los morfantes de integrinas a diferentes procesos tales como proliferación, migración, invasión y respuesta a carboplatino mediante el silenciamiento de las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  empleando morfolinós como moléculas bloqueadoras de la traducción (Heasman *et al.*, 2000).

Cuando analizamos el efecto del silenciamiento de las subunidades sobre la proliferación celular no se observó afectación alguna en ninguno de los morfantes (Fig. 5), lo que estaría indicando que la falta de una subunidad de integrina no estaría mermando la proliferación. Si bien es cierto que en la literatura se ha asociado a la sobreexpresión de integrinas con procesos de proliferación exacerbados (Desgrosellier and Cheresch, 2010; Beaulieu, 2010) nuestros resultados no contradicen esto, debido a que posiblemente las altas tasas de proliferación sean el resultado de la sinergia entre varias integrinas sobreexpresadas.

La migración y la invasión son eventos esenciales para que se lleve a cabo la metástasis (Yan *et al.*, 2010; Ngora *et al.*, 2012; Gillan *et al.*, 2002), por lo que evaluamos, mediante ensayos de herida y cierre, si estas capacidades característicamente aumentadas en el fenotipo de células transformadas se afectaban en los morfantes (Fig. 6). A las 12 h y a las 24 h las células morfantes  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  mostraron, con diferentes porcentajes, remanentes de la herida mayores (69% y 82%), respectivamente para las 12 h y (43% y 69%), respectivamente para las 24 h comparadas con células control sin tratamiento (47% a las 12 h y 27% a las 24 h), con células control de especificidad (49% a las 12 h y 26% a las 24 h) y con el morfante  $\beta 3$  (47% a las 12 h y 21% a las 24 h). Lo que significa que estas subunidades,  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ , son importantes para el proceso migratorio de las células transformadas y su bloqueo traduccional afecta la migración celular. En la literatura se ha mencionado que la integrina  $\alpha 6\beta 4$  participa en la migración de células transformadas (Ngora *et al.*, 2012) tal y como lo observamos en el presente trabajo, para el caso de la integrina  $\alpha 5\beta 1$  se ha relacionado principalmente con procesos de adhesión, además de procesos de migración (Mitra *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2010), por lo que nuestros resultados concuerdan con lo descrito en la literatura.

El bloqueo traduccional de las integrinas  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  también afectó la invasividad de las células de cáncer epitelial de ovario (Fig. 7), esto fue observado en las tasas de invasión de los morfantes  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ , las cuales tuvieron una diferencia estadísticamente significativa comparadas con células sin tratar (52.1%,  $p < 0.05$  y 33.6%  $p < 0.001$  vs 77.9%,

respectivamente), este resultado concordó con lo observado en los ensayos de herida y cierre donde estos morfantes fueron más lentos para disminuir el ancho de la herida. Mientras que el morfante  $\beta 3$  tuvo un comportamiento similar a las células sin tratamiento (66.8% vs 77.9%,  $p > 0.05$ ), corroborando de esta forma la importancia y la participación de las subunidades de integrinas  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  en los eventos de migración e invasión, procesos importantes para el establecimiento/desarrollo del CEO.

Un aspecto relevante en la terapia de las pacientes con CEO es como responden a los medicamentos, en ocasiones presentan buena respuesta y en otras muestran resistencia (Millard *et al.*, 2011; Niu and Cheng, 2011). Considerando este aspecto decidimos evaluar la respuesta de los morfantes hacia el carboplatino (Fig. 8), droga de primera línea en el tratamiento del CEO, encontrando que los morfantes  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  presentaron mayor sensibilidad hacia el carboplatino a una concentración de 0.2 mM que los controles (Wild type y morfante random), lo que sugiere que la falta de estas proteínas favorece el efecto citotóxico que ejerce esta droga sobre las células de cáncer. Estos resultados concuerdan con lo descrito anteriormente para la integrina  $\alpha 5\beta 1$ , dado que se han reportado eventos de quimiorresistencia en pacientes con tumores de CEO con niveles incrementados de esta integrina (Hu *et al.*, 2012). De manera sorprendente, se observó que el morfante  $\beta 3$  presentó mayor resistencia que las células control al carboplatino a 0.2 mM; a la fecha no hay estudios que reporten que el bloqueo de alguna integrina genere resistencia a algún fármaco y mucho menos mediante que vía se genera esto, por lo que es necesario realizar más estudios para dilucidar el mecanismo mediante el cual las células que carecen de cierta integrina experimentan mayor sensibilidad o mayor resistencia hacia los fármacos.

Las subunidades  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  mostraron ser, en mayor o menor medida, importantes para el fenotipo transformado de la línea celular SKOV-3.

## **XI. RESUMEN DE RESULTADOS**

- Las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$  así como la haptoglobina y el proceso de fucosilación se encuentran sobreexpresados en tejidos tumorales de CEO.
- Existe correlación estadística entre la expresión de las proteínas y de la fucosilación con la aparición de la enfermedad, pero no con la etapa clínica, el histotipo, el grado histológico, la concentración de CA-125 inicial, el PLE ni con la SG.
- La haptoglobina y la fucosilación tienen el potencial para ser herramientas de diagnóstico.
- El bloqueo de la traducción de las subunidades de integrinas  $\alpha 5$ ,  $\alpha 6$  y  $\beta 3$  no afectó la proliferación de los morfantos.
- Las integrinas  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$ , esta última en mayor grado, participan en los procesos de migración e invasión.
- El silenciamiento de las integrinas  $\alpha 5$  y  $\alpha 6$  generó mayor sensibilidad celular hacia el carboplatino [0.2 mM], mientras que por el contrario el bloqueo traduccional de  $\beta 3$  generó mayor resistencia.

## **XII. CONCLUSIÓN**

Las integrinas  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha 6\beta 4$  y  $\alpha V\beta 3$  se encuentran sobreexpresadas en los tejidos tumorales del CEO y participan de manera activa, en menor o mayor grado, en eventos importantes para el desarrollo de esta neoplasia (proliferación, migración, invasión y respuesta a fármaco). La sobreexpresión de la haptoglobina y de la fucosilación en los tumores de CEO sugiere que cumplen un papel importante en esta neoplasia.

### **XIII. PERSPECTIVAS**

- Generar tumores en el modelo murino mediante la inoculación de células morfantas para cada una de las integrinas y evaluar su desarrollo.
- Analizar el efecto del bloqueo traduccional de dos o más integrinas simultáneamente en ensayos que evalúen la migración, la invasión, la respuesta a carboplatino y el desarrollo de tumores en el modelo murino.
- Determinar cuál(es) es(son) la(s) vía(s) que se afecta(n) como resultado del bloqueo de la traducción de las integrinas y cómo repercuten en su tasa de migración disminuida.
- Analizar por qué se afecta la respuesta hacia el carboplatino al bloquear la traducción de las subunidades  $\alpha 6$  y  $\beta 3$ .
- Determinar cuáles son las proteínas que se encuentran fucosiladas además de la haptoglobina en los tejidos tumorales de CEO.
- Estudiar que papel cumplen los altos niveles de expresión de haptoglobina y de fucosilación.
- Validar a la haptoglobina y a la fucosilación como biomarcadores para el CEO.

## XIV. BIBLIOGRAFÍA

- Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. (2005) Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer. A systematic review. *BJOG*. 112 (7): 857-865.
- Barczyk M, Carracedo S, Gullberg D. (2010) Integrins. *Cell Tissue Res*. 339 (1): 269-280.
- Barkan D, Chambers AF. (2011)  $\beta$ 1-integrin: a potential therapeutic target in the battle against cancer recurrence. *Clin Cancer Res*. 17 (23): 7219-7223.
- Beaulieu JF. Integrin  $\alpha$ 6 $\beta$ 4 in colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol*. 1 (1): 3-11.
- Benedet JL, Pecorelli S, Ngan HYS *et al.* (2000) Staging classifications and clinical practice guidelines for gynaecologic cancers. *Int J Gynaecol Obstet*. 70: 207-312.
- Bhaskar V, Fox M, Breinberg D. (2008) Volociximab, a chimeric integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 antibody, inhibits the growth of VX2 tumors in rabbits. *Invest New Drugs*. 26 (1): 7-12.
- Bhaskar V, Zhang D, Fox M *et al.* (2007) A function blocking anti-mouse integrin  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 antibody inhibits angiogenesis and impedes tumor growth *in vivo*. *J Transl Med*. 5: 61.
- Blandin AF, Noulet F, Renner G *et al.* (2016) Glioma cell dispersion is driven by  $\alpha$ 5 integrin-mediated cell–matrix and cell–cell interactions. *Cancer Lett*. 376 (2): 328-338.
- Bouaouina M, Lad Y, Calderwood DA. (2008) The N-terminal domains of talin cooperate with the phosphotyrosine binding-like domain to activate beta1 and beta3 integrins. *J Biol Chem*. 283 (10): 6118-6125.
- Bridges JE, Englefiel P, Boyd IE, Roche WR, Thomas EJ. (1995) Expression of integrin adhesion molecules in normal ovary and epithelial ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer*. 5 (3): 187-192.
- Brooks PC, Clark RA, Cheresch DA. (1994) Requirement of vascular integrin  $\alpha$  $\beta$ 3 for angiogenesis. *Science*. 264 (5158): 569-571.

- Burridge K, Turner CE, Romer LH. (1992) Tyrosine phosphorylation of paxillin and pp 125FAK accompanies cell adhesion to extracellular matrix: a role in cytoskeletal assembly. *J Cell Biol.* 119 (4): 893-903.
- Cary LA, Han DC, Guan JL. (1999) Integrin-mediated signal transduction pathways. *Histol Histopathol.* 14 (3): 1001-1009.
- Chan WY, Cheung KK, Schorge JO *et al.* (2000) Bcl-2 and p53 protein expression, apoptosis, and p53 mutation in human epithelial ovarian cancers. *Am J Pathol.* 156 (2): 409-417.
- Cheresh DA. (1987) Human endothelial cells synthesize and express an Arg-Gly-Asp-directed adhesion receptor involved in attachment to fibrinogen and von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 84 (18): 6471-6475.
- Christiansen MN, Chik J, Lee L *et al.* (2014) Cell surface protein glycosylation in cancer. *Proteomics.* 14 (4-5): 525-546.
- Cid MC, Grant DS, Hoffman GS *et al.* (1993) Identification of haptoglobin as an angiogenic factor in sera from patients with systemic vasculitis. *J Clin Invest.* 91 (3): 977-985.
- Cory S, Adams JM. (2002) The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2 (9): 647-656.
- Cox D, Brennan M, Moran N. (2010) Integrins as therapeutic targets: lessons and opportunities. *Nat Rev Drug Discov.* 9 (10): 804-820.
- Cuatrecasas M, Villanueva A, Matias-Guiu X, Prat J. (1997) K-ras mutations in mucinous ovarian tumors: a clinicopathologic and molecular study of 95 cases. *Cancer.* 79 (8): 1581-1586.
- De Arcangelis A, Georges-Labouesse E. (2000) Integrin and ECM functions: roles in vertebrate development. *Trends Genet.* 16 (9): 389-395.
- DeLair D, Oliva E, Koble M *et al.* (2011) Morphologic spectrum of immunohistochemically characterized clear cell carcinoma of the ovary: a study of 155 cases. *Am J Surg Pathol.* 35 (1): 36-44.
- Desgrosellier JS, Cheresh DA. (2010) Integrins in cancer: biological implications and therapeutic opportunities. *Nat Rev Cancer.* 10 (1): 9-22.

- DiSaia P, Creasman W. (2002) Epithelial Ovarian Cancer. *Clinical Gynecologic Oncology*. Nueva York: Mosby. Sexta edición. 289-350.
- Dong Y, Tan OL, Loessner D *et al.* (2010) Kallikrein-related peptidase 7 promotes multicellular aggregation via the alpha(5)beta(1) integrin and paclitaxel chemoresistance in serous epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Res.* 70 (7): 2624-2633.
- Eberwein P, Laird D, Schulz S *et al.* (2015) Modulation of focal adhesion constituents and their down-stream events by EGF: on the cross-talk of integrins and growth factor receptors. *Biochim Biophys Acta*. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.06.004.
- Friedl P, Wolf K. (2003) Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 3 (5): 362-374.
- Fuchs SY, Ougolkov AV, Spiegelman VS, Minamoto T. (2005) Oncogenic beta-catenin signaling networks in colorectal cancer. *Cell Cycle.* 4 (11): 1522-1539.
- Gao J, Hu Z, Liu D *et al.* (2013) Expression of Lewis y antigen and integrin  $\alpha_v$ ,  $\beta_3$  in ovarian cancer and their relationship with chemotherapeutic drug resistance. *J Exp Clin Cancer Res.* 32: 36.
- Garibay-Cerdenares OL, Hernández-Ramírez VI, Osorio-Trujillo JC *et al.* (2014) Proteomic identification of fucosylated haptoglobin alpha isoforms in ascitic fluids and its localization in ovarian carcinoma tissues from Mexican patients. *J Ovarian Res.* 7: 27.
- Gilcrease MZ. (2007) Integrin signaling in epithelial cells. *Cancer Lett.* 247 (1): 1-25.
- Gillan L, Matei D, Fishman DA *et al.* (2002) Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for  $\alpha_v\beta_3$  and  $\alpha_v\beta_5$  integrins and promotes cell motility. *Cancer Res.* 62 (18): 5358-5364.
- Gilmore AP, Metcalfe AD, Romer LH, Streuli CH. (2000) Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J Cell Biol.* 149 (2): 431-446.
- Ginsberg MH, Partridge A, Shattil SJ. (2005) Integrin regulation. *Curr Opin Cell Biol.* 17 (5): 509-516.

- Goel HL, Mercurio AM. (2012) Enhancing integrin function by VEGF/neuropilin signaling: implications for tumor biology. *Cell Adh Migrat.* 6 (6): 554-560.
- Guo W, Giancotti FG. (2004) Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5 (10): 816-826.
- Hannigan G, Troussard AA, Dedhar S. (2005) Integrin-linked kinase: a cancer therapeutic target unique among its ILK. *Nat Rev Cancer.* 5 (1): 51-63.
- Harris TJ, Peifer M. (2005) Decisions, decisions: beta-catenin chooses between adhesion and transcription. *Trends Cell Biol.* 15 (5): 234-237.
- Heasman J, Kofron M, Wylie C. (2000). Beta-catenin signaling activity dissected in the early *Xenopus* embryo: a novel antisense approach. *Dev Biol.* 222 (1): 124-134.
- Hogervorst F, Kuikman I, von dem Borne AE, Sonnenberg A. (1990) Cloning and sequence analysis of beta-4 cDNA: an integrin subunit that contains a unique 118 kd cytoplasmic domain. *EMBO J.* 9 (3): 765-770.
- Hong IK, Huang H, Cheepala S, Huang S, Chung J. (2008) Curcumin inhibition of integrin (alpha6beta4)-dependent breast cancer cell motility and invasion. *Cancer Prev Res.* 1 (5): 385-391.
- Hood JD, Frausto R, Kiosses WB, Schwartz MA, Cheresch DA. (2003) Differential alphav integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *J Cell Biol.* 162 (5): 933-943.
- Hu Z, Gao S, Gao J *et al.* (2012) Elevated level of Lewis y and integrin  $\alpha 5\beta 1$  correlate with chemotherapeutic drug resistance in epithelial ovarian carcinoma. *Int J Mol Sci.* 13 (12): 15588-15600.
- Huang M, Anand S, Murphy EA. (2012) EGFR-dependent pancreatic carcinoma cell metastasis through Rap1 activation. *Oncogene.* 31 (22): 2783-2793.
- Jarboe E, Folkins A, Nucci MR *et al.* (2008) Serous carcinogenesis in the fallopian tube: a descriptive classification. *Int J Gynecol Pathol.* 27 (1): 1-9.
- Kindelberger DW, Lee Y, Miron A *et al.* (2007) Intraepithelial carcinoma of the fimbria and pelvic serous carcinoma: evidence for a causal relationship. *Am J Surg Pathol.* 31 (2): 161-169.

- Kurman RJ, Shih IM. (2008) Pathogenesis of ovarian cancer. Lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol.* 27 (2): 151-160.
- Lataifeh I, Marsden DE, Robertson G, Gebiski V, Hacker NF. (2005) Presenting symptoms of epithelial ovarian cancer. *Aust NZJ Obstet Gynecol.* 45 (3): 211-214.
- Lawson C, Lim ST, Uryu S *et al.* (2012) FAK promotes recruitment of talin to nascent adhesions to control cell motility. *J Cell Biol.* 196 (2): 223-232.
- Lee KR, Scully RE. (2000) Mucinous tumors of the ovary: a clinicopathologic study of 196 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas, including an evaluation of 11 cases with ‘pseudomyxoma peritonei’. *Am J Surg Pathol.* 24 (11): 1447-1464.
- Lee Y, Miron A, Drapkin R *et al.* (2007) A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol.* 211 (1): 26-35.
- Liddington RC, Bankston LA. (2000) The structural basis of dynamic cell adhesion: heads, tails, and allostery. *Exp Cell Res.* 261 (1): 37-43.
- Lipscomb EA, Simpson KJ, Lyle SR *et al.* (2005) The  $\alpha 6\beta 4$  integrin maintains the survival of human breast carcinoma cells *in vivo*. *Cancer Res.* 65 (23): 10970-10976.
- Luo BH, Springer TA. (2006) Integrin structures and conformational signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 18 (5): 579-586.
- Luo DY, Wazir R, Tian Y *et al.* (2013) Integrin  $\alpha v$  mediates contractility whereas integrin  $\alpha 4$  regulates proliferation of human bladder smooth muscle cells via FAK pathway under physiological stretch. *J Urol.* 190 (4): 1421-1429.
- Maalouf SW, Theivakumar S, Owens DM. (2012) Epidermal  $\alpha 6\beta 4$  integrin stimulates the influx of immunosuppressive cells during skin tumor promotion. *J Dermatol Sci.* 66 (2): 108-118.
- Mandai M, Konishi I, Kuroda H *et al.* (1998) Heterogeneous distribution of K-ras-mutated epithelia in mucinous ovarian tumors with special reference to histopathology. *Hum Pathol.* 29 (1): 34-40.

- Marks PW, Hendey B, Maxfield FR. (1991) Attachment to fibronectin or vitronectin makes human neutrophil migration sensitive to alterations in cytosolic free calcium concentration. *J Cell Biol.* 112 (1): 149-158.
- McCluggage WG. (2011) Morphological subtypes of ovarian carcinoma: a review with emphasis on new developments and pathogenesis. *Pathology.* 43 (5): 420-432.
- Medeiros F, Muto MG, Lee Y *et al.* (2006) The tubal fimbria is a preferred site for early adenocarcinoma in women with familial ovarian cancer syndrome. *Am J Surg Pathol.* 30 (2): 230-236.
- Meighan CM, Schwarzbauer JE. (2008) Temporal and spatial regulation of integrins during development. *Curr Opin Cell Biol.* 20 (5): 520-524.
- Millard M, Odde S, Neamati N. (2011) Integrin Targeted Therapeutics. *Theranostics.* 1: 154-188.
- Mitra AK, Sawada K, Tiwari P *et al.* (2011) Ligand-independent activation of c-Met by fibronectin and  $\alpha 5\beta 1$  integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. *Oncogene.* 30 (13): 1566-1576.
- Moreno-Bueno G, Gamallo C, Pérez-Gallego L *et al.* (2001) beta-Catenin expression pattern, beta-catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas. *Diagn Mol Pathol.* 10 (2): 116-122.
- Moreno-Layseca P, Streuli CH. (2013) Signalling pathways linking integrins with cell cycle progression. *Matrix Biol.* 34: 144-153.
- Mouw JK, Yui Y, Damiano L *et al.* (2014) Tissue mechanics modulate microRNA-dependent PTEN expression to regulate malignant progression. *Nat Med.* 20 (4): 360-367.
- Naci D, Aoudjit F. (2014) Alpha2beta1 integrin promotes T cell survival and migration through the concomitant activation of ERK/Mcl-1 and p38 MAPK pathways. *Cell Signal.* 26 (9): 2008-2015.
- Nakagawa T, Miyoshi E, Yakushijin T *et al.* (2008) Glycomic analysis of alpha-fetoprotein L3 in hepatoma cell lines and hepatocellular carcinoma patients. *J Proteome Res.* 7 (6): 2222-2233.

- Nakayama K, Nakayama N, Kurman RJ *et al.* (2006) Sequence mutations and amplification of PIK3CA and AKT2 genes in purified ovarian serous neoplasms. *Cancer Biol Ther.* 5 (7): 779-785.
- Ngora H, Galli UM, Miyazaki K, Zöller M. (2012) Membrane-bound and exosomal metastasis-associated c4.4a promotes migration by associating with the  $\alpha 6\beta 4$  integrin and MT1-MMP. *Neoplasia.* 14 (2): 95-107.
- Nie S, Lo A, Wu J *et al.* (2014) Glycoprotein biomarker panel for pancreatic cancer discovered by quantitative proteomic analysis. *J Proteome Res.* 13 (4): 1873-1884.
- Niu G, Cheng X. (2011) Why integrin as a primary target for imaging and therapy. *Theranostics.* 1: 30-47.
- Obata K, Morland SJ, Watson RH *et al.* (1998) Frequent PTEN/MMAC mutations in endometrioid but not serous or mucinous epithelial ovarian tumors. *Cancer Res.* 58: 2095-2097.
- Pan L, Zhao Y, Yuan Z, Qin G. (2016) Research advances on structure and biological functions of integrins. *SpringerPlus.* 5 (1): 1094.
- Pang X, Tashiro K, Eguchi R *et al.* (2013) Haptoglobin proved a pronostic biomarker in peripheral blood of patients with personalized peptide vaccinations for advanced castration-resistant prostate cancer. *Biosci Biotechnol Biochem.* 77 (4): 766-770.
- Piek JM, van Diest PJ, Zweemer RP *et al.* (2001) Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol.* 195 (4): 451-456.
- Plow EF, Haas TA, Zhang L, Loftus J, Smith JW. (2000) Ligand binding to integrins. *J Biol Chem.* 275 (29): 21785-21788.
- Prat J. (2012) New insights into ovarian cancer pathology. *Ann Oncol.* 23 (10): 111-117.
- Raynes JG, Eagling S, McAdam KP. (1991) Acute phase protein synthesis in human hepatoma cells: differential regulation of serum amyloid A (SAA) and haptoglobin by interleukin-1 and interleukin-6. *Clin Exp Immunol.* 83 (3): 488-491.

- Reginato MJ, Mills KR, Paulus JK *et al.* (2003) Integrins and EGFR coordinately regulate the proapoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat Cell Biol.* 5 (8): 733-740.
- Rodríguez I, Prat J. (2002) Mucinous tumors of the ovary: a clinicopathologic analysis of 75 borderline tumors (of intestinal type) and carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 26 (2): 139-152.
- Rohrschneider LR. (1980) Adhesion plaques of Rous sarcoma virus-transformed cells contain the src gene product. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77 (6): 3514-3518.
- Romero I, Bast RC. (2012) Minireview: human ovarian cancer: biology, current management, and paths to personalizing therapy. *Endocrinology.* 153 (4): 1593-1602.
- Rosen DG, Yang G, Liu G *et al.* (2010) Ovarian cancer: pathology, biology, and disease models. *Front Biosci.* 14: 2089-2102.
- Salani R, Kurman RJ, Giuntoli IRL *et al.* (2008) Assessment of TP53 mutation using purified tissue samples of ovarian serous carcinomas reveals a higher mutation rate than previously reported and does not correlate with drug resistance. *Int J Gynecol Cancer.* 18 (3): 487-491.
- Saldova R, Royle L, Radcliffe CM *et al.* (2007). Ovarian cancer is associated with changes in glycosylation in both acute-phase proteins and IgG. *Glycobiology.* 17 (12): 1344–1356.
- Saldova R, Wormald MR, Dwek RA, Rudd PM. (2008). Glycosylation changes on serum glycoproteins in ovarian cancer may contribute to disease pathogenesis. *Dis Markers.* 25 (4-5): 219–232.
- Sangoi AR, Soslow RA, Teng NN *et al.* (2008) Ovarian clear cell carcinoma with papillary features: a potential mimic of serous tumor of low malignant potential. *Am J Surg Pathol.* 32 (2): 269-274.
- Sato N, Tsunoda H, Nishida M *et al.* (2000) Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of the tumor suppressor gene PTEN in benign endometrial cyst of the ovary: possible sequence progression from benign endometrial cyst to endometrioid carcinoma and clear cell carcinoma of the ovary. *Cancer Res.* 60 (24): 7052-7056.

- Scatena M, Almeida M, Chaisson ML *et al.* (1998) NF- $\kappa$ B mediates  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin-induced cell survival. *J Cell Biol.* 141 (4): 1083-1093.
- Schwartz MA, Both G, Lechene C. (1989) Effect of cell spreading on cytoplasmic pH in normal and transformed fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86 (12): 4525-4529.
- Schwartz MA, Denninghoff K. (1994)  $\alpha$ v integrins mediate the rise in intracellular calcium in endothelial cells on fibronectin even though they play a minor role in adhesion. *J Biol Chem.* 269 (15): 11133-11337.
- Schwartz MA, Schaller MD, Ginsberg MH. (1995) Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 11: 549-599.
- Seidman J, Kurman RJ, Ronnett BM. (2003) Primary and metastatic mucinous adenocarcinomas in the ovaries: incidence in routine practice with a new approach to improve intraoperative diagnosis. *Am J Surg Pathol.* 27 (7): 985-993.
- Shattil SJ, Kim C, Ginsberg MH. (2010) The final steps of integrin activation: the end game. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11 (4): 288-300.
- Siegel R, Ma J, Zou Z, Jemal A. (2014) Cancer Statistics, 2014. *CA Cancer J Clin.* 64 (1): 9-29.
- Singer G, Kurman RJ, Chang HW *et al.* (2002) Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol.* 160 (4): 1223-1228.
- Singer G, Oldt R 3rd, Cohen Y *et al.* (2003) Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Nat Cancer Inst.* 95 (6): 484-486.
- Singer G, Stöhr R, Cope L *et al.* (2005) Patterns of p53 mutations separate ovarian serous borderline tumors and low- and high-grade carcinomas and provide support for a new model of ovarian carcinogenesis. *Am J Surg Pathol.* 29 (2): 218-224.
- Srichai MB, Zent R (2010) Cell-extracellular matrix interactions in cancer. Chapter 2: Integrin structure and function. Springer, New York, pp 19-41.
- Steffensen B, Häkkinen L, Larjava H. (2001) Proteolytic events of wound-healing-coordinated interaction among matrix metalloproteinases (MMPs), integrins, and extracellular matrix molecules. *Crit Rev Oral Biol Med.* 12 (5): 373-398.

- Su JM, Wang LY, Ling YL, Zha XL. (2005) Role of cell adhesion signal molecules in hepatocellular carcinoma cell apoptosis. *World J Gastroenterol.* 11 (30): 4667-4673.
- Tenti P, Aquizzi A, Riva C *et al.* (1992) Ovarian mucinous tumors frequently express markers of gastric, intestinal, and pancreatobiliary epithelial cells. *Cancer.* 69 (8): 2131-2142.
- Tominaga D, Barber DL (1998) Na<sup>+</sup>-H exchange acts downstream of Rho A to regulate integrin-induced cell adhesion and spreading. *Mol Biol Cell.* 9 (8): 2287-2303.
- Villegas-Pineda JC, Garibay-Cerdenares OL, Hernández-Ramírez VI *et al.* (2015) Integrin and haptoglobin: molecules overexpressed in ovarian cancer. *Pathol Res Pract.* 211 (12): 973-981.
- Wang Y, Liu J, Lin B *et al.* (2011) Study on the expression and clinical significances of Lewis y antigen and integrin  $\alpha\beta 3$  in epithelial ovarian tumors. *Int J Mol Sci.* 12 (6): 3409-3421.
- Wary KK, Maneiro F, Isakoff SJ, Marcantonio EE, Giancotti FG. (1996) The adapter protein Shc couples a class of integrins to the control of cell cycle progression. *Cell.* 87 (4): 733-743.
- Wicher KB, Fries E. (2006) Haptoglobin, a hemoglobin-binding plasma protein, is present in bony fish and mammals but not in frog and chicken. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103 (11): 4168-4173.
- Wu J, Zhu J, Yin H, Buckanovich RJ, Lubman DM. (2014). Analysis of glycan variation on glycoproteins from serum by the reverse lectin-based ELISA assay. *J Proteome Res.* 13 (4): 2197-2204.
- [www.globocan.iarc.fr/](http://www.globocan.iarc.fr/) (Consultado el 01/julio/2016)
- Xiong J, Balcioglu HE, Danen EH. (2013) Integrin signaling in control of tumor growth and progression. *Int J Biochem Cell Biol.* 45 (5): 1012-1015.
- Yan LM, Lin B, Zhu LC *et al.* (2010) Enhancement of the adhesive and spreading potentials of ovarian carcinoma RMG-1 cells due to increased expression of integrin  $\alpha 5\beta 1$  with the Lewis Y-structure on transfection of the  $\alpha 1,2$ -fucosyltransferase gene. *Biochimie.* 92 (7): 852-857.

- Zhang X, Cromwell JW, Kunjummen BD, Yee D, Garcia-Aguilar J. (2003) The  $\alpha 2$  and  $\alpha 3$  integrins are required for morphologic differentiation of an intestinal epithelial cell line. *Surgery*. 133 (4): 429-437.