



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

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**Identificación de nuevas proteínas implicadas en el
fenotipo agresivo del cáncer de ovario epitelial
durante la inducción de la transición epitelio-
mesénquima por la ascitis**

TESIS

Que presenta

M. en C. Alfredo Toledo Leyva

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

Directora de la Tesis: Dra. Patricia Talamás Rohana

Ciudad de México

Septiembre, 2017

Este trabajo se realizó en el laboratorio 9 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV-IPN bajo la dirección de la Dra. Patricia Talamás Rohana.

Agradezco el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, becario No. 262797).

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Patricia Talamás Rohana** por permitirme iniciar mi formación como investigador bajo su tutoría y sus valiosos consejos para ayudarme a comprender el mundo de la investigación de una manera extraordinaria.

A la **Dra. Rossana Arroyo Verástegui** por su asesoría y colaboración en el desarrollo de éste trabajo.

A la **Dra. Rosa María del Ángel Núñez de Cáceres**, por su asesoría y colaboración en el desarrollo de éste trabajo.

A la **Dra. Dolores Gallardo Rincón**, porque gracias a su colaboración, asesoría y apoyo he logrado comprender la importancia de la investigación traslacional

Al **Dr. José Eduardo Pérez Salazar**, por su asesoría y colaboración en el desarrollo de éste trabajo.

Al **Dr. Sergio Encarnación Guevara**, por su apoyo, colaboración y asesoría en el desarrollo de éste trabajo.

A la **Dra. Elizabeth Hernandez Nava** por las discusiones científicas interminables y enriquecedoras que me ayudaron en la adquisición de un sentido mas crítico y objetivo.

Al **Dr. Julio César Villegas Pineda** por la colaboración y apoyo que hicieron mas dinámico mi desarrollo y aprendizaje.

Al grupo de trabajo de la **Dra. Patricia Talamás: M. en C. Juan Carlos Osorio Trujillo, Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez, M. en C. Luis Alejandro Constantino Jonapa, M. en C. Dulce Rosario Alberto Aguilar, M. en C. Nayely Paulina Alvear Hernández, M. en C. Luis Varela Rodríguez** y al **Tec. en Investigación Daniel Morales Mora** por la discusión y el apoyo que se reflejaron en el enriquecimiento de este trabajo.

A **Jessica Márquez Dueñas** por el apoyo secretarial brindado.

DEDICATORIAS

A mi madre **Clemencia Leyva Jiménez**, por ser mi inspiración, mi ejemplo de constancia, esfuerzo y superación. Por ser padre y madre a la vez enseñándome las mejores cosas de la vida.

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

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

A mi esposa **Elizabeth**, porque juntos empezamos este viaje y gracias a tu compañía y amor, mi vida y formación han sido inigualables. Porque has generado en mí el sentimiento mas hermoso en diversas formas y por haberme brindado la dicha de ser padre.

A mi hijo **Alfredo**, porque a tí debo la inmensa felicidad y alegría que me invade desde que te supe y te conocí. Porque tus actos, tu sonrisa y tu cariño me impulsan a ser siempre un buen ejemplo y a seguir adelante.

.

ABREVIATURAS

b-FGF	Factor Básico de Crecimiento de Fibroblastos
COE	Cáncer de Ovario Epitelial
CMP	Células Malignas de Paciente
Dil	Dilución
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetra-acético
F.I.G.O.	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
h	Hora
HCl	Ácido clorhídrico
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
kDa	kilodaltones
mg	Miligramos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de Sodio
NaCl	Cloruro de Sodio

NaF	Fluoruro de Sodio
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
SFB	Suero Fetal Bovino
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
TEM	Transición Epitelio-Mesénquima
T-SKOV-3	Tumor inducido por la linea celular crecida en medio de cultivo convencional
T-mSKOV-3	Tumor inducido por la linea celular SKOV-3 con fenotipo mesenquimal
SKOV-3	Línea celular de carcinoma ovárico (ATCC- HTB-77)
TBS-T	Amortiguador Tris-Salino- con Tween 20
TGF α , β	Factor de Crecimiento Transformante alfa y beta
V	Voltios
VEGF	Factor de crecimiento de endotelio vascular
vol	Volumen
μ g	Microgramos
μ l	Microlitros

ÍNDICE DE CONTENIDO

I. RESUMEN.....	10
II. ABSTRACT	11
III. INTRODUCCIÓN.....	12
1. Cáncer de Ovario Epitelial (COE).....	12
1.1 Generalidades	
1.2 Patogénesis	
1.3 Estadificación del COE	
1.4 Procesos oncológicos en el COE	
2. Microambiente tumoral del COE	
3. Transición epitelio-mesénquima	
IV. JUSTIFICACIÓN.....	24
V. HIPÓTESIS.....	25
VI. OBJETIVO GENERAL.....	26
VII. OBJETIVOS PARTICULARES.....	27
VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	28
IX. MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
X. RESULTADOS.....	39
XI. DISCUSIÓN.....	100
XII. CONCLUSIÓN.....	109
XIII. PERSPECTIVAS.....	110
XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	111

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Incidencia y mortalidad del COE	13
Figura 2. Microambiente tumoral del COE	19
Figura 3. Transición Epitelio-Mesénquima (TEM)	22
Figura 4. Análisis morfológico y estructural de células malignas de pacientes (CMP)	40
Figura 5. Análisis por microscopía confocal de las	

células malignas de pacientes	43
Figura 6. Efecto de la ascitis de COE sobre la línea celular SKOV-3..	46
Figura 7. Análisis por microscopía confocal de SKOV-3 bajo el tratamiento con ascitis de COE	49
Figura 8. Detección de integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ en la línea celular SKOV-3	53
Figura 9. Detección de integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ en células malignas de pacientes (CMP)	56
Figura 10. Expresión de los marcadores de TEM en la línea celular SKOV-3 bajo la condición de ascitis y en células malignas de pacientes	59
Figura 11. Inmunolocalización de los marcadores de la TEM en SKOV-3 bajo la condición de ascitis de COE	62
Figura 12. Inmunolocalización de los marcadores de la TEM en CMP1	65
Figura 13. Inmunolocalización de los marcadores de la TEM en CMP2	67
Figura 14. Agrupamiento funcional de genes regulados positivamente relacionados al microambiente tumoral	70
Figura 15. Agrupamiento funcional de genes regulados negativamente relacionados al microambiente tumoral	73
Figura 16. Mapas proteómicos de células mesenquimales generadas por diferentes ascitis de COE	76
Figura 17. Proteínas desreguladas considerablemente en células mesenquimales inducidas por ascitis (mSKOV-3)	79
Figura 18. Validación de proteínas, a nivel de mRNA, desreguladas en células mesenquimales	

inducidas por ascitis	83
Figura 19. Análisis de interacción proteína-proteína y agrupamiento por términos ontológicos de las proteínas incrementadas ..	87, 88
Figura 20. Análisis de interacción proteína-proteína y agrupamiento por términos ontológicos de las proteínas disminuidas	91, 92
Figura 21. Detección del MHC-I en células mesenquimales inducidas con ascitis de COE	95
Figura 22. Detección del MHC-I en T-SKOV-3 y T-mSKOV-3	98

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadificación de cáncer de ovario epitelial según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO)	15
Tabla 2. Células malignas de pacientes (CMP) y ascitis utilizadas en los ensayos de tratamiento de la línea celular SKOV-3.....	30
Tabla 3. Proteínas desreguladas en células mesenquimales inducidas por ascitis de COE	81

I. RESUMEN

El cáncer de ovario epitelial es el segundo cáncer ginecológico más letal en todo el mundo. La ascitis se puede encontrar en todas las etapas clínicas; sin embargo, en las etapas avanzadas de la enfermedad III C y IV es más frecuente y podría ser masiva y se asocia con un peor pronóstico. En este trabajo, se confirma la presencia de células malignas derivadas del paciente con fenotipo mesenquimal en la ascitis de pacientes con cáncer de ovario epitelial. Además, la ascitis de estas pacientes induce el proceso de transición epitelial-mesenquimal en la línea celular SKOV-3. Lo que garantiza utilizar esta línea celular como modelo de estudio para la identificación de proteínas asociadas al fenotipo agresivo. Con este fin, se realizó un análisis proteómico y entre las proteínas identificadas que aumentaron su expresión se encontraron a la GTPasa Ran, la ZNF268 y la sinaptotagmina tipo 3, entre otras. Por otra parte, entre las proteínas reguladas negativamente por ascitis se encontraron al MHC-I, la HSPB1, la ARF1, la sinaptotagmina 1, y la hnRNPH1 entre otras. El nivel de expresión de estas proteínas seleccionadas se validó por RT-PCR. Además, se realizó un interactoma para cada una de estas proteínas con el fin de identificar procesos biológicos, acciones moleculares y componentes celulares en los que pueden participar. Los resultados mostraron que las proteínas moduladas diferencialmente participan en procesos altamente relevantes en el fenotipo agresivo como el transporte nuclear, la regulación de la expresión génica, el tráfico vesicular, la evasión de la respuesta inmune, la invasión, la metástasis y la resistencia a la quimioterapia.

II. ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer is the second most lethal gynecological cancer worldwide. Ascites can be found in all clinical stages; however, in advanced disease stages IIIC and IV it is more frequent and could be massive, associated with worse prognosis. In this work, we confirm the presence of patient-derived malignant cells with mesenchymal phenotype in the ascites of ovarian cancer patients. Also, the ascites of these patients induces the process of epithelial-mesenchymal transition in the SKOV-3 cell line, which guaranteed to use this cell line as a study model for the identification of proteins associated with their aggressive phenotype. To this end, a proteomic analysis was performed and among the proteins identified that increased their expression were Ran GTPase, ZNF268, and Synaptotagmin like-3, among others. On the other hand, proteins such as MHC-I, HSPB1, ARF1, Synaptotagmin 1, and hnRNPH1 among others, were identified as being negatively regulated by ascites. The level of expression of all these proteins was validated by RT-PCR. Furthermore, an interactome for every one of these proteins was performed in order to identify biological processes, molecular actions, and cellular components in which they may participate and interact. Results showed that differentially modulated proteins participate in cellular processes highly relevant to the aggressive phenotype such as nuclear transport, regulation of gene expression, vesicular trafficking, immune response evasion, invasion, metastasis, and chemotherapy resistance.

III. INTRODUCCIÓN

1. Cáncer de ovario epitelial

1.1. Generalidades

El cáncer de ovario epitelial (COE) ocupa el octavo lugar en incidencia y el séptimo en mortalidad entre el género femenino a nivel mundial y para México se reportó una incidencia de 3,277 casos y una mortalidad de 1,851 casos según el GLOBOCAN en 2012. El INEGI en 2009 registró 2,105 defunciones por esta patología lo que correspondió a un 5.3 % del total de defunciones por cáncer. Entre los factores de riesgo se encuentra la edad, siendo éste el más importante con una incidencia de 80% en mujeres postmenopáusicas. Factores ambientales como el tabaquismo y el uso de talco aumentan el riesgo. Además, se sabe que los factores hormonales y reproductivos pueden aumentar de 6-20% el riesgo, entre los cuales encontramos la nuliparidad, la menarca temprana, la menopausia tardía y la terapia de remplazo hormonal. Finalmente los factores hereditarios aumentan del 10 al 15 % y se presentan derivados de una mutación germinal en el que se encuentra el síndrome mama-ovario, que representa un 90% del cáncer de ovario hereditario, con un riesgo acumulado de 40% para BRCA1 y de 20% para BRCA2 [1-3].

1.2. Patogénesis

La complejidad de la enfermedad ha dificultado el descubrimiento de su origen; hasta el momento se han planteado diversas teorías. Entre las principales se encuentra la teoría de la ovulación incesante, que apoya el hecho de que una ruptura constante del epitelio de la superficie del ovario al momento de la liberación del óvulo, y la generación de quistes de inclusión por la regeneración frecuente provocan con el paso de los años y el deterioro de los sistemas de control del ciclo celular, una o varias mutaciones en las células de la superficie del ovario. Otra teoría igualmente aceptada hace referencia a la producción excesiva de andrógenos por parte del epitelio superficial del ovario, siendo estos andrógenos un factor de riesgo para padecer el COE. En las células del

borde del ovario y en células de tumores de carcinoma ovárico se ha detectado el receptor para andrógenos [4-6].

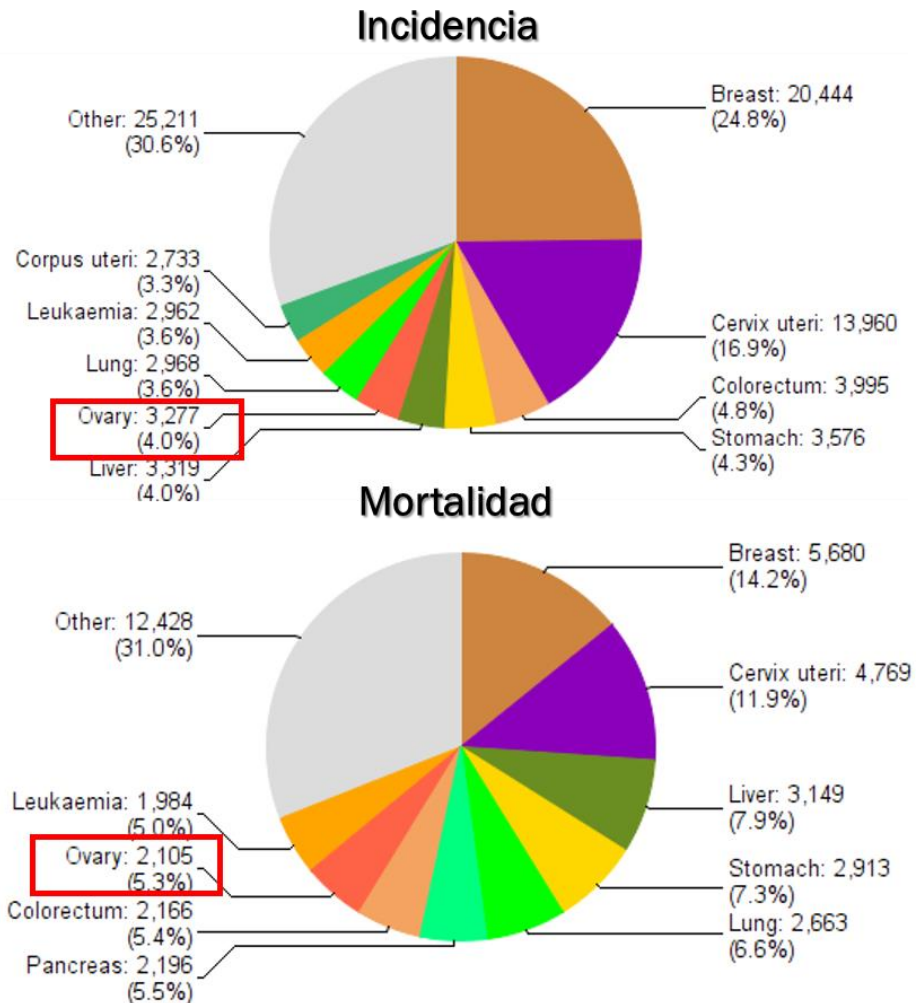


Figura 1. Incidencia y mortalidad del COE [2]

Una vez que las células epiteliales del ovario, ya sea aquéllas residentes de los quistes de inclusión o por una carcinogénesis *de novo*, han perdido su estabilidad genómica, el siguiente proceso es la proliferación descontrolada que obedece a un proceso de progresión y crecimiento para dar lugar a masas celulares amorfas y con diferentes tipos de control y regulación de sus sistemas genéticos y bioquímicos. Si bien, el origen de los tumores de COE es

precisamente epitelial, se presenta como una gran variedad de subtipos histológicos, entre los cuales se encuentran, citados por frecuencia de detección en el diagnóstico clínico: el seroso papilar de alto grado, el endometriode, el tumor de células claras, el seroso papilar de bajo grado y el mucinoso, entre otros. Con respecto al tumor seroso de alto grado existe una activación de vías oncogénicas para desregular la expresión de proteínas como beta-catenina, Ras y Src; posteriormente, también se observa la desregulación de p53 y BRCA. Los tumores endometrioides y de células claras tienen frecuentemente como común denominador la endometriosis, proponiendo que las lesiones provocadas por esta patología originen un tumor ya sea del tipo endometriode o de células claras. Finalmente, los tumores serosos de bajo grado y mucinosos poseen un bajo potencial maligno que se interpreta como un bajo potencial proliferativo y una división mitótica aparentemente normal [7, 8].

1.1. Estadificación del cáncer de ovario epitelial

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

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

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

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

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

Se debe tener en consideración que en cada estadio existen sub-estadios que especifican y/o particularizan aún más el estado patológico [8].

Tabla 1. Estadificación de cáncer de ovario epitelial según la Federación Intenacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).

Etapa	Descripción	Incidencia %	Supervivencia %
I	Confinado a los ovarios	20	90
II	Confinado a la pelvis	5	65
III	Diseminación intraperitoneal o a nódulos linfáticos	58	45
IV	Metástasis distante	17	< 5

1.2. Procesos oncológicos en el cáncer de ovario epitelial

Durante el desarrollo de la enfermedad se presentan diferentes procesos que empeoran o provocan un pronóstico pobre en las pacientes que padecen COE. Un proceso característico del cáncer es la alta tasa de proliferación que presentan las células malignas, lo que les confiere un crecimiento exponencial en comparación con las células no transformadas. El factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) es una potente citocina y un regulador clave de la angiogénesis fisiológica y fisiopatológica. En cáncer, además de favorecer el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y su permeabilización en el tejido tumoral, este factor tiene la capacidad de elevar las tasas de proliferación en las células transformadas, por lo que en el COE se le relaciona directamente con el crecimiento y la progresión tumoral y con un pronóstico clínico pobre [9].

Al igual que el aumento en la proliferación, la migración de las células transformadas parece ser regulada por diversas citocinas, lo que convierte a

estos procesos como blancos principales de terapias anti-cáncer. Wang *et al.*, (2014) utilizando la línea celular de cáncer de ovario OVCAR-3, determinaron el efecto de la epigallocatequina-3-galato sobre la proliferación y la migración de estas células observando que existía una modulación de la cinasa p38 y de la metaloproteinasa 2 y que esta modulación afectaba directamente las tasas de proliferación y migración [10]. La invasión es un proceso característico de las células malignas; estas células han perdido el control o la regulación por contacto, lo que provoca un crecimiento desalineado dando como resultado grandes masas de tejido tumoral. Marie *et al.*, (2007), utilizando una línea celular de COE demostraron que la ascitis que se genera en etapas avanzadas del COE es capaz de regular la capacidad invasiva de dichas células. Además, este efecto parece ser dependiente de las características de cada ascitis. Los mecanismos de invasión involucran la participación de diversos factores y proteínas que en un estado fisiológico ayudan al desempeño de procesos como la inflamación, en la cual se observa la extravasación de diversos tipos celulares del sistema inmunológico principalmente, hacia el sitio de la lesión [11]. Lo Buono *et al.*, (2014), reportaron que CD157, un miembro de la familia ADP-ribosil ciclasa que normalmente participa en las vías de señalización de los leucocitos, y desencadena procesos de adhesión, migración y diapédesis, en el COE se cree que juega un papel fundamental al participar activamente en el proceso de invasión utilizado por las células transformadas. Para el proceso de invasión, las células malignas también requieren de la secreción activa de metaloproteinasas de matriz extracelular, entre las que se encuentran las MMP2 y MMP9, además de la expresión de una amplia gama de receptores para matriz extracelular como los receptores de tipo integrina [12].

En el COE, se sabe que una de las vías de progresión y avance de la enfermedad es la metástasis transcelómica, la cual es un tipo de metástasis por continuidad, en la que las células malignas tienen como mecanismo predilecto la migración [13]. Cabe señalar que también es frecuente encontrar altas cantidades de células malignas circulantes en el torrente sanguíneo. Sin

embargo, se sabe que esta enfermedad no se disemina mediante vías hematógenas ni linfáticas [14].

Por lo tanto, en el COE la invasión es un proceso frecuente y en el cual se pueden distinguir dos tipos: grupal e individual. Del tipo de migración seleccionado se derivará la morfología que adopten estas células para poder lograr internalizarse en los tejidos adyacentes al tumor primario. La invasión colectiva usualmente se lleva a cabo cuando el órgano en el que reside el tumor invasivo no presenta resistencia alguna a este crecimiento anómalo, por lo que las células podrán desplazar e inducir la muerte de las células adyacentes tan solo por la presión del crecimiento. Sin embargo, si el escenario es diferente, es decir, si el órgano en el que se intenta realizar la invasión presenta algún mecanismo de defensa contra el crecimiento, estas células son capaces de migrar individualmente. Por un lado, si la matriz es relativamente suave estas células pueden invadir individualmente en forma ameboidea, lo que significa que células de gran tamaño pueden iniciar el proceso de invasión. Por el contrario, si la respuesta del órgano es lo suficientemente robusta y se traduce en la síntesis de una matriz extracelular rígida que prácticamente aprisione al tumor, la célula puede adquirir una forma fusiforme conocida como mesenquimal. Esta forma está ligada directamente con la adquisición de un fenotipo inmaduro que se explicará con mayor detalle en una sección específica para este fenotipo y que, uno de los puntos del presente trabajo de investigación sugiere como el responsable de una serie de eventos moleculares que desembocan en un aumento en la agresividad de la enfermedad [15].

Con el progreso de la enfermedad se presenta el proceso de metástasis (FIGO II, III y IV), como se mencionó anteriormente, presentándose la extensión pélvica, la cual implica metástasis al útero o trompas de Falopio. La extensión abdominal implica pequeños implantes fuera de la pelvis o metástasis a la cavidad peritoneal y finalmente se presenta la metástasis a distancia donde se afecta principalmente el parénquima hepático. Recientemente, este proceso

se ha asociado con la actividad de una proteína denominada calicreína relacionada a peptidasas, la cual se ha caracterizado como una proteína con actividad de hidrólisis extracelular, así como activante o degradante de sus sustratos, como algunos factores de crecimiento, proteínas de la matriz extracelular, otras proteasas asociadas a cáncer, receptores de unión a membrana y proteínas de adhesión. Cabe señalar que diversos grupos de investigación han reportado la expresión en grandes cantidades de esta proteína en tejido tumoral del COE [6, 16].

Además de la metástasis como un factor oncológico de gran impacto en la enfermedad, se encuentran los esferoides multicelulares presentes en la ascitis de COE. Se ha descrito que estas estructuras están conformadas por grandes cúmulos de células, los cuales inician su desarrollo con pequeños grupos de células que forman el núcleo del esferoide y posteriormente comienza a crecer hasta lograr grandes estructuras que pueden mantenerse suspendidas en la ascitis. Sin embargo, se trata de células que se han reconfigurado genética y bioquímicamente para poder sobrevivir en esas condiciones y con una alta capacidad invasiva y proliferativa. Se sabe que estas estructuras son las responsables de la diseminación e implantación de micro-metástasis en distintas regiones de la cavidad peritoneal. Junto con el proceso de metástasis, los esferoides multicelulares de COE parecen ser muy importantes en la progresión de la enfermedad; al grado de que se han estudiado con un enfoque terapéutico y se ha descubierto su gran complejidad y resistencia a los tratamientos quimioterapéuticos convencionales [6, 8].

2. Microambiente tumoral del cáncer de ovario epitelial.

En el microambiente del cáncer de ovario se encuentran diferentes elementos entre los que podemos destacar los elementos celulares como leucocitos inmunosupresores mieloides, linfocitos, fibroblastos, células estromales y células endoteliales, así como sus productos de secreción, moléculas de superficie y factores de supervivencia paracrinos, entre los que se encuentran algunas citocinas. Estos elementos han sido considerados como blancos

potenciales en el microambiente tumoral. Actualmente se sabe que las propias células tumorales son las encargadas de orquestar la generación de su nicho y microambiente tumoral, pues todos los elementos inmersos en el microambiente tumoral durante la inflamación crónica propician la progresión de la enfermedad. El cáncer se define como una enfermedad heterogénea que implica mutaciones aberrantes en las células tumorales. Ahora se sabe que los distintos tipos de cánceres son diversos por la naturaleza y composición de su microambiente, lo cual depende en gran medida de la proporción de células estromales y de sus respectivos estados de activación. Al principio las células malignas han logrado evadir los mecanismos intrínsecos de muerte celular, posteriormente, deberán evadir la respuesta inmunológica.

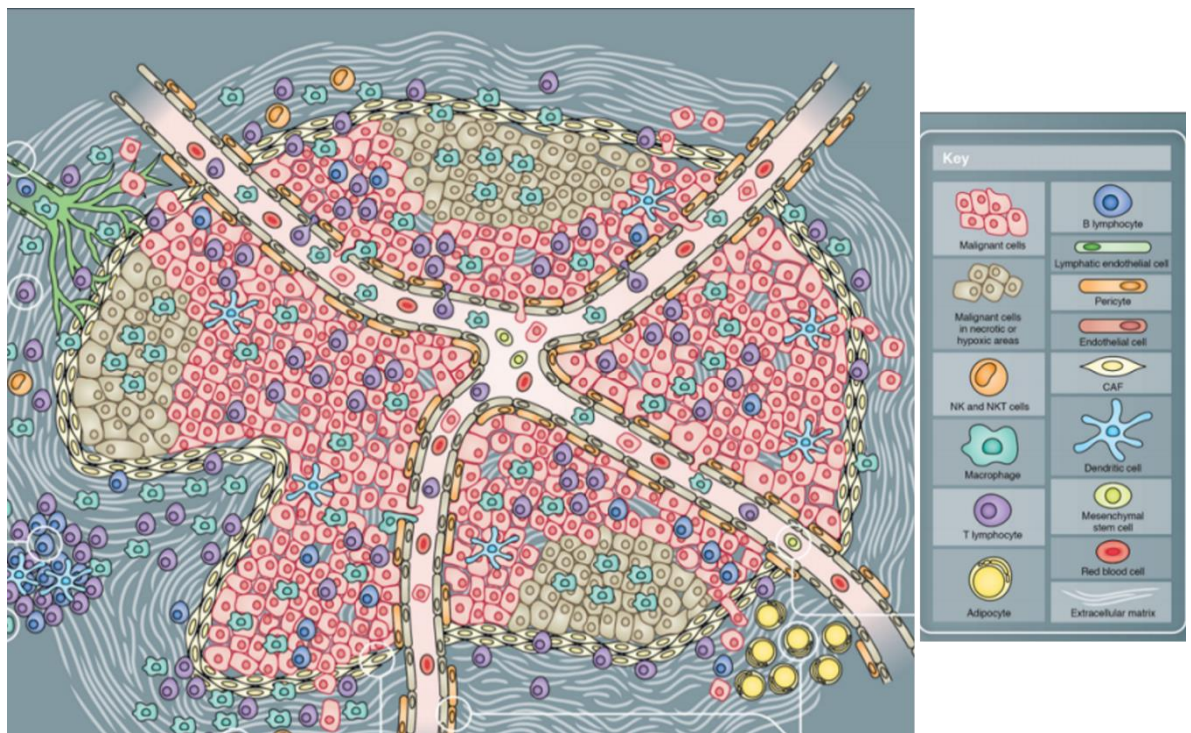


Figura 2. Microambiente tumoral. Interacción de diferentes tipos celulares durante el desarrollo del tumor primario. Tomado y modificado de "The tumor microenvironment at a glance" [17].

El organismo al no lograr una eliminación óptima de las células malignas, genera un estado de inflamación crónica, el cual marca el inicio de la generación del nicho y el microambiente tumoral. La proporción de estos

elementos y las continuas señales oncogénicas de los tumores crecientes, cambia el curso de la progresión del cáncer. Por lo anterior, es importante resaltar la necesidad de considerar al microambiente y su influencia sobre la metástasis como un proceso altamente dinámico. Las células estromales y los macrófagos circundantes son comúnmente educados por el tumor para responder a sus estímulos, los cuales son correspondidos con soporte y secreción de proteasas y diversas citocinas como EGF, VEGF, TGF- β , entre otras que promueven la migración, la proliferación y la metástasis. Por lo tanto el nicho tumorogénico se crea durante el origen de la enfermedad en el desarrollo de los tumores primarios [18-20].

Además de los nichos tumorogénicos, que son un foco de proliferación de células transformadas durante el inicio y posteriormente durante los eventos metastásicos, existe también la acumulación de ascitis durante las etapas avanzadas del COE [8]. La ascitis es un fluido biológico que contiene una gran variedad de factores solubles, células y componentes de la matriz extracelular. Durante las etapas avanzadas del COE y en la gran mayoría de los casos detectados de esta enfermedad, se presenta la formación y/o acumulación de este líquido en la cavidad peritoneal por obstrucción de vasos linfáticos que se encargan del drenado del fluido lubricante de esta zona. La obstrucción provocada por células metastásicas genera este tipo de ascitis, denominada ascitis maligna, la cual para fines prácticos será mencionada de aquí en adelante como ascitis. Además de las células malignas, células de la respuesta inmune y esferoides multicelulares se pueden encontrar los exosomas (un tipo de micelas o vesículas rodeadas de membrana plasmática que son liberados del tumor primario y/o secundario). Como se puede apreciar según las características descritas de la enfermedad, la ascitis representa un ambiente rico en moléculas de señalización que provocan un fenotipo específico en cada célula o tipo celular presente en él. Sin embargo, es importante resaltar que el efecto de la ascitis sobre las células que en él residen ha sido poco estudiado [21, 22]. Ahmed *et al.* (2005) describió que la ascitis derivada de pacientes con COE es capaz de modular la expresión de

la integrina $\alpha 6\beta 1$ y del receptor a urocinasa activadora de plasminógeno, demostrando que este fluido puede influenciar y/o inducir cambios en el fenotipo celular [23].

3. Transición Epitelio-Mesénquima (TEM)

Como se ha comentado anteriormente, el COE es una enfermedad altamente heterogénea debido a la diversidad de subtipos histológicos y grados de la enfermedad. Se sabe que distintos tipos de adenocarcinomas tienen la capacidad de desarrollar un proceso llamado transición epitelio-mesénquima [24]. Este proceso produce la caída de la “estabilidad genómica” que aún pudieran conservar estas células para poder lograr una desdiferenciación hacia un fenotipo celular altamente inmaduro como lo son las células mesenquimales malignas [25]. Entre las principales características de estas células inmaduras se encuentran las tasas elevadas de migración e invasión. Además, este fenotipo se ha ligado fuertemente al desarrollo de metástasis [26] y también al de la resistencia a diferentes esquemas quimioterapéuticos [27]. Recientemente, dos grupos de investigación han reportado que diferentes fluidos asociados a la malignidad, entre los que se encuentran la ascitis y el líquido pleural de COE, tienen la capacidad de inducir la TEM debido a la presencia de factores importantes en el desarrollo de este proceso, entre los cuales se encuentran el TGF- β , Wnt, lípidos bioactivos y una gran gama de factores [18, 28, 29].

Derivado de la revisión bibliográfica de la TEM en células malignas presentes en ascitis de COE, se detectó que no existen estudios que analicen a profundidad la importancia de la TEM en la fisiopatología del COE

considerando la frecuencia con la que se lleva a cabo este proceso y su posible relación con la recurrencia temprana.



Figura 3. Transición Epatelio-Mesénquima (TEM).

4. Antecedentes generales

Datos generados por nuestro grupo de investigación con cultivos primarios de COE indican la presencia de moléculas presumiblemente implicadas en eventos como adhesión y migración celular. Tal es el caso de moléculas de tipo integrina y de haptoglobina [30]. Se sabe que las integrinas pueden funcionar como receptores para las proteínas de matriz extracelular facilitando los procesos de adhesión y migración. En biopsias de pacientes con COE, se detectó la presencia de estos receptores en zonas específicas del tejido, pero también en estructuras multicelulares de tipo esferoides, lo cual correlaciona con la capacidad que tienen estas estructuras para adherirse al peritoneo y formar nuevos tumores durante un proceso de metástasis transcelómica [30].

Con respecto al estudio de la enfermedad avanzada (EC III, IV); se diseñó un modelo *in vitro* que consiste en el tratamiento de la línea celular SKOV-3 con ascitis de pacientes con COE, con la finalidad de replicar las condiciones de las células malignas que frecuentemente se encuentran suspendidas en este fluido y que podrían ser las responsables de la recurrencia de la enfermedad agresiva. El tratamiento de esta línea celular con al menos 30 ascitis diferentes de COE indicó que este fluido tiene un efecto diferencial, lo cual se reflejó en la generación de cambios morfológicos diversos como disminución de la talla celular, protrusiones de membrana, filopodios, lamelipodios, nanotubos de membrana y citonemas. Además, se observaron agregados celulares tipo sincitios y un menor porcentaje de ascitis generó estructuras tipo esferoides

multicelulares. Finalmente, tres ascitis mostraron un efecto negativo sobre el crecimiento y proliferación de estas células. La diversidad de los efectos de las ascitis de COE observados sobre la línea celular SKOV-3 nos muestra un poco de la heterogeneidad de la enfermedad [11].

IV. JUSTIFICACIÓN

El cáncer de ovario epitelial es una enfermedad oncológica que afecta principalmente a mujeres mayores de 50 años. La complejidad de esta patología dificulta un diagnóstico oportuno, lo cual se refleja en las altas tasas de mortalidad. La mayoría de los casos diagnosticados de cáncer de ovario epitelial corresponden a pacientes en etapas avanzadas de la enfermedad, al menos un tercio de estas pacientes desarrollan la acumulación de líquido de ascitis o ascitis, lo cual les confiere un peor pronóstico sin conocerse a detalle el porqué de este hecho.

Dado lo anterior, resulta necesario estudiar el contexto tumoral para conocer y caracterizar el efecto de la ascitis sobre las células malignas, en las que se involucra el uso de herramientas moleculares de las cuales se valen estas células para sobrevivir y evadir el sistema inmunológico, generando la característica letalidad en esta enfermedad.

V. HIPÓTESIS

La ascitis del cáncer de ovario epitelial conforma un microambiente tumoral que promueve un fenotipo celular agresivo, debido a la inducción de la expresión diferencial de proteínas.

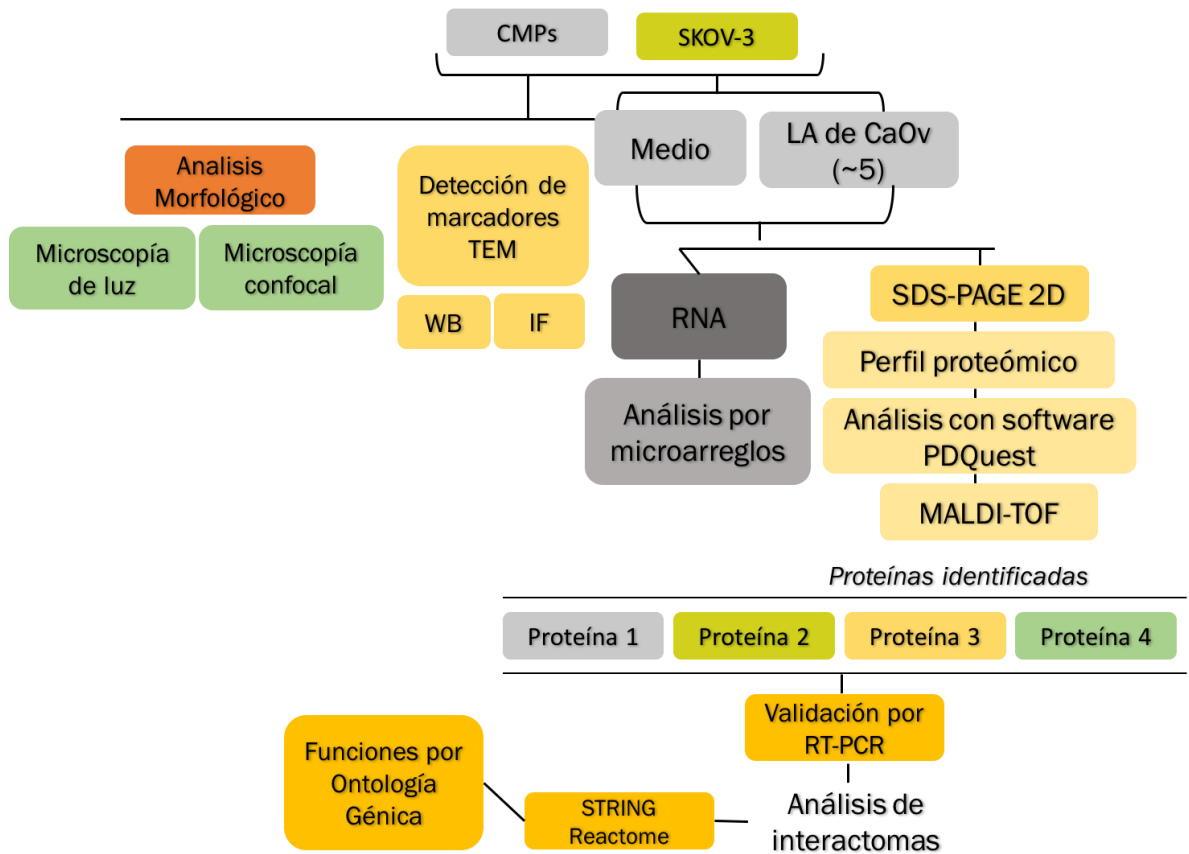
VI. OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la ascitis sobre células malignas recuperadas de pacientes con COE y en células SKOV-3, determinando la adquisición de un fenotipo celular agresivo el cual se verá reflejado por cambios a nivel proteómico.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Analizar las características morfológicas de las células recuperadas de pacientes con COE y de la línea celular SKOV-3 por el tratamiento con ascitis.
2. Detectar los marcadores de la transición epitelio-mesenquimal en células de pacientes y en SKOV-3 tratadas con ascitis.
3. Determinar los cambios a nivel transcriptómico y proteómico de las células por el tratamiento con ascitis.
4. Analizar las proteínas desreguladas mediante análisis bioinformático y redes de interacción proteica.

VIII. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



IX. MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de células malignas y procesamiento de ascitis de COE

Las ascitis de COE se obtuvieron en el Instituto Nacional de Cancerología de México (INCan), bajo convenios de colaboración general y específico entre dicha institución y el CINVESTAV, con la aprobación de los comités científicos y de bioética del INCan (No. de protocolos INCA/CC/134/09 y CB/549/09), así como de la carta de consentimiento informado firmado por las pacientes previo a la toma de la muestra. Las muestras de ascitis de pacientes con COE se obtuvieron bajo condiciones estériles por el personal médico calificado. Una vez colectadas, se transportaron al laboratorio en frío en un recipiente con hielo. Las muestras (células de paciente 1 y 2= CMP1 y CMP2) se colocaron en cajas de cultivo T-75 o en cajas de Petri P-25 (conteniendo cubreobjetos) bajo condiciones estériles y se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ por al menos 3-5 semanas para las células en las cajas T-75 y uno o dos días para las células sembradas en cubreobjetos para análisis por inmunofluorescencia indirecta. Las células malignas permanecieron adherentes y proliferantes después de 5 semanas aproximadamente. La ascitis se procesó como se describió previamente [31], durante este proceso, la ascitis se centrifuga inicialmente a 1,000 rpm a 4 °C para obtener la pastilla celular y posteriormente a 14,000 rpm a 4 °C para eliminar cualquier resto celular. Finalmente, la ascitis libre de células se utilizó para el tratamiento de la línea celular SKOV-3, posteriormente la ascitis fue reemplazada al menos dos veces para eliminar los restos celulares usando la misma ascitis en todos los casos.

No. de Ascitis	Subtipo histológico	Etapa Clínica	CA125
CMP1	Seroso papilar AG	IIIC	1300
CMP2	Seroso papilar AG	IIIC	3000
A1	Seroso papilar AG	IIIC	25772
A2	Metástasico de cáncer de mama	IIB	1628
A3	Seroso papilar AG	IVA	12300
A4	Mucinoso	IIIC	467
A5	Seroso papilar AG	IVA	132

Tabla 2: Células malignas de pacientes (CMP) y ascitis utilizadas en los ensayos de tratamiento de la línea celular SKOV-3 (Alto grado, AG; Células malignas de paciente, CMP).

Línea celular SKOV-3

La línea celular utilizada para los ensayos de tratamiento con diferentes ascitis de COE fue la línea SKOV-3 de cáncer de ovario adquirida en ATCC (SK-OV-3 [SKOV-3; SOV3] ATCC). Como se recomendó por el proveedor, la línea celular se creció en medio de cultivo McCoy 5A modificado (Thermo Fisher Scientific No. Cat.: 16600-082) suplementado con 10% de suero fetal bovino (PAA. No. Cat.: A15-701) y 1% de penicilina/estreptomicina (PAA No. Cat.: P11-010), a 37 °C y 5% de CO₂.

Tratamiento de la línea celular SKOV-3 con ascitis de COE

Las ascitis seleccionadas previamente procesadas se descongelaron y se centrifugaron a 14,000 rpm x 10 min a 4 °C; posteriormente, la ascitis se atemperó a 37 °C. Este proceso se realizó previo al tratamiento de las células. Las células SKOV-3 se trataron individualmente con cinco ascitis diferentes de COE etiquetados como: A1, A2, A3, A4 y A5. Células cultivadas bajo condiciones normales en medio de cultivo McCoy con 10 % de SFB se usaron como condición de referencia para las comparaciones. Las células se

sembraron a una densidad de 3.5×10^5 células y se incubaron por 24 h. Al finalizar este periodo, se removió el medio de cultivo y las células se lavaron dos veces con PBS 1x estéril; después se agregaron 15 ml por condición de las diferentes ascitis de COE a los cultivos celulares y se mantuvieron a 37 °C por 72 h de incubación. Después de esta incubación, las células se recuperaron retirando el medio de cultivo o ascitis y lavando 2 veces con PBS 1x, posteriormente se adicionaron 500 μ l (pozo) o 1 ml (caja T-25) de tripsina-EDTA (0.01%/0.1), se retiró ese volumen y se adicionaron nuevamente 500 μ l o 1 ml de tripsina-EDTA y se incubó por 5 min a 37 °C. La reacción se detuvo adicionando 1 ml de medio con SFB.

Esquema de lisis celular

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

Electroforesis unidimensional.

Se realizó electroforesis en un gel de poliacrilamida al 12.5 % de los extractos totales de proteína de las diferentes condiciones experimentales. El corrimiento inició aplicando 80 V durante 20 min aumentando posteriormente a 120 V durante 1 h aproximadamente. El corrimiento electroforético se realizó por duplicado y uno de los geles se transfirió a una membrana de nitrocelulosa para posteriormente realizar ensayos de western blot, mientras que el otro gel se tiñó con plata utilizando el kit Silver Stain Plus (BIORAD, No. Cat. 161-0462 a 64).

Western blot

Extractos celulares provenientes de SKOV-3, en condiciones control, ascitis y células malignas de pacientes (CMP) se procesaron para obtener extractos totales usando tres ciclos de lisis con amortiguador RIPA (1 % NP-40, 1 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 7.4) más inhibidores de proteasas (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de aprotinina y leupeptina, 1 mM PMSF) por agitación rigurosa en vórtex por 1 min e incubación en hielo durante 3 min. Posteriormente, los extractos celulares se sonicaron 5 s con intervalos de 5 s de descanso durante 1 min. La concentración de proteína se determinó usando “RC DC™ Protein Assay” (No. Cat. 5000119, BioRad Laboratories). Las proteínas (35 μg) se separaron en SDS-PAGE 1D al 12.5 % y posteriormente se transfirieron en membranas de nitrocelulosa (No. Cat. 1620115, BioRad Laboratories) toda la noche a 25 V, 4 °C. La membrana de nitrocelulosa se bloqueó con TBS-T 5 % de leche y se lavó cinco veces con TBS-T 1x. Para detectar las proteínas de interés se incubaron con los siguientes anticuerpos primarios en TBS-T 2.5 % de leche toda la noche a 4 °C: ratón monoclonal anti-vimentina (No. Cat. V6630, Sigma Aldrich), rata monoclonal anti-E-cadherina (No. Cat. sc-59778), cabra policlonal anti-integrina β 1 (No. Cat. sc-9936), ratón monoclonal anti-integrina β 3 (No. de Cat. sc-52685), conejo policlonal anti-integrina β 4 (No. de Cat. sc-9090), todos ellos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Posteriormente, se lavaron cinco veces con TBS-T 1x, enseguida se incubó con el respectivo anticuerpo secundario; cabra anti-IgG de ratón conjugada a HRP (No. Cat. 31430); conejo anti-IgG de rata (No. Cat. 433009, PIERCE, Rockford); en TBS 2.5 % leche durante 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, la membrana se lavó con TBS-T 1x en dos ocasiones. La señal se reveló por quimioluminiscencia con el kit SuperSignal West Femto Chemiluminescent Substrate (Cat. No. 34095Thermo Scientific).

Análisis por Microscopía Confocal

Terminado el periodo de incubación para las condiciones de ascitis y control (medio McCoy 5A) las células se fijaron usando 4 % de p-formaldehído (No. de Cat. P4168, Sigma Aldrich) durante 1 h a 37 °C. Los cultivos se lavaron tres veces con PBS 1x y se bloquearon con 10 % de suero de bovino adulto (No. de Cat.: Su-146, Microlab) por 1 h a 37 °C; finalmente, las muestras se permeabilizaron con 0.2 % de Tritón X-100. Cada condición se incubó individualmente toda la noche a 4 °C y a una dilución 1:100 con los siguientes anticuerpos primarios: ratón monoclonal anti-vimentina (No. Cat. V6630, Sigma Aldrich), rata monoclonal anti-E-cadherina (No. Cat. sc-59778), cabra policlonal anti-integrina β 1 (No. Cat. sc-9936), ratón monoclonal anti-integrina β 3 (No. de Cat. sc-52685), conejo policlonal anti-integrina β 4 (No. de Cat. sc-9090) todos ellos obtenidos de Santa Cruz Biotechnology. Después de varios lavados con PBS 1x, las células se incubaron por 1 h a 37 °C con los anticuerpos secundarios que se indican a continuación: cabra anti-IgG de ratón conjugado a TRITC (dilución 1:50, No. Cat. 115-025-072, Jackson Immunoresearch Laboratories Inc.), cabra anti-IgG de conejo conjugado a FITC (dilución 1:100, No. Cat. 65611) y conejo anti-IgG de cabra conjugado a Alexa 647 (dilución 1:100, No, Cat. a21446, Life Technologies Thermo Fisher Scientific, y cabra anti-IgG de ratón conjugado a FITC (dilución 1:100, No. Cat. 31569, Thermo Scientific Pierce Antibodies). Los controles negativos se incubaron solo con su respectivo anticuerpo secundario para cada condición. El citoesqueleto de actina se tiñó con faloidina rodaminada (dilución 1:50, No. Cat. R415, Molecular Probes, Grand Island, NY, USA) y el núcleo con DAPI (dilución 1:50, No. Cat. D1306, Molecular Probes, Eugene, OR USA) por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente, las muestras se montaron con medio de montaje VectaShield (No. Cat. H-1000, Vector Laboratories). El análisis de inmunofluorescencia y la cuantificación de la fluorescencia (unidades arbitrarias de fluorescencia) se realizaron usando un microscopio Carl Zeiss (Carl Zeiss LMS 700) y el software del microscopio (ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy). La presencia o ausencia de la marca correspondiente a las

proteínas estudiadas se determinó por un análisis de cuatro campos (tile scan 2 x 2 en los planos X, Y) combinado con un análisis en el plano Z en tres cortes ópticos de 0.9 μm . Se obtuvo el porcentaje de píxeles y se analizó usando el software GraphPad Prism. Como prueba estadística se aplicó un análisis de ANOVA de dos colas.

Análisis de microarreglos de cáncer humano

A partir de 3×10^6 células mesenquimales SKOV-3 inducidas por ascitis y en medio de cultivo utilizado como control, se realizó la extracción de RNA utilizando el reactivo de TRIzol (Invitrogen) como indica el fabricante para una extracción de RNA con un alto grado de pureza. El RNA obtenido fue enviado al Instituto de Fisiología Celular e la Universidad Nacional Autónoma de México en donde se realizaron la síntesis de cDNA, la hibridación al chip de dos canales (control y problema), la lectura y el análisis estadístico de los cambios en la condición de ascitis con respecto a la condición control, a continuación se realiza una breve explicación del proceso realizado por el personal del Instituto: la condición control se marcó con el fluorocromo Cy5 y la condición de células mesenquimales se marcó con el fluorocromo Cy3. Posteriormente, las muestras se hibridaron en un arreglo de dos canales que contenía 1,920 genes relacionados con cáncer humano (Fabricante, Instituto de Fisiología Celular, UNAM). Luego, el mapa de hibridación fue analizado con un software Genarise y se obtuvieron las listas con los genes desregulados para dos cortes Z-score (1.5 y 2), los resultados se expresaron con respecto a la condición control. Mediante el uso de la base de datos DAVID, se realizaron agrupamientos funcionales de los genes desregulados en las células mesenquimales inducidas por ascitis de COE.

Electroforesis bidimensional (2-DE)

Al final de la incubación de 72 h, las células cultivadas se separaron usando tripsina al 0.01% / EDTA 0.1 M y la reacción se detuvo añadiendo medio de cultivo suplementado con SFB al 10%. Las células se centrifugaron entonces

a 1,000 rpm x 10 min a 4 °C y se lavaron rápidamente con PBS estéril dos veces; Finalmente, las células se centrifugaron a 14,000 rpm x 10 min a 4 °C. El sedimento celular se sometió a lisis como se ha descrito anteriormente. Los extractos proteicos totales (500 µg) se limpiaron de sales y detergentes usando el protocolo de extracción fenólico como sigue: en primer lugar, las proteínas se precipitaron con acetona fría durante 16 h a -20 °C. El sedimento se volvió a suspender en amortiguador de extracción constituido por 0.5 M de Tris-HCl, 0.7 M de sacarosa, 30 mM de HCl, 50 mM de EDTA, 0.1 M de KCl, 12 mg/ml de PVPP y 2% de mercaptoetanol. Se añadió un volumen equivalente de fenol saturado a cada muestra y luego se centrifugaron a 12,000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se precipitó entonces con 5 volúmenes de acetato de amonio 0.1 M en metanol a -20°C durante una noche. El precipitado se lavó con acetato de amonio 0.1 M y 80% de acetona. Los precipitados se secaron al vacío. Finalmente, las proteínas limpias se resuspendieron en amortiguador de lisis constituido por urea 8 M, tiourea 2 M, CHAPS al 4%, 2% anfólinas (pH 4-6.5, 5-8 y 3-10) y DTT 60 mM. La cuantificación final de proteínas se realizó mediante el método de Bradford [32]. Se realizaron perfiles proteómicos (500 µg) de la condición control y de las condiciones experimentales. El método aplicado para 2-DE se ha descrito previamente [33]. Los geles se fijaron y se tiñeron con azul de Coomassie coloidal G-250, y se escanearon con el sistema de análisis de imágenes PDI (Bio-Rad Hercules, GS-800, CA, EE.UU.). El análisis bioinformático de los mapas proteómicos se realizó utilizando el software PDQuest versión 8.0.1 [34, 35]. Las manchas de proteínas se detectaron en forma automática por el software en cada una de las réplicas; posteriormente se llevó a cabo un ajuste y edición manual de los mapas con el software, para eliminar los artefactos detectados erróneamente como manchas de proteínas o para agregar las manchas correspondientes a proteínas no detectadas. A continuación, se combinaron los mapas proteómicos con sus elementos correspondientes en cada una de las repeticiones biológicas. Aquellas manchas de proteínas que mostraron un

cambio hacia arriba o hacia abajo en su nivel de expresión de 2 veces o más se eligieron para su posterior análisis por espectrometría de masas.

Espectrometría de masas (MALDI TOF)

Los geles uni y bidimensionales se tiñeron con plata y se escanearon en un densitómetro GS-800 (Bio-Rad, Hércules, CA). Las imágenes digitales se analizaron y compararon utilizando el software PDQuest 8.0.1 (Bio-Rad).

Posteriormente, las secciones seleccionadas del gel se destiñeron y se procesaron con acetonitrilo para deshidratar, las proteínas se redujeron y se alquilaron adicionando DTT y iodoacetamida, respectivamente. Se realizó una digestión enzimática utilizando tripsina y posteriormente se hizo una extracción proteica de los geles y se sometieron a un proceso de desalinización. Finalmente, los espectros de masa se adquirieron utilizando Ultraflex TOF/TOF (Bunker Daltonics, Alemania) en modo reflectrón. Para la identificación de las proteínas se utilizaron las masas monoisotópicas del espectro utilizando el motor de búsqueda MASCOT v2.2 (www.matrixscience.com).

Análisis bioinformático de proteínas identificadas

Los análisis bioinformáticos se realizaron usando la base de datos Gene Ontology (<http://geneontology.org>), utilizando los términos de ontología génica (TERMOG/GOTERM por sus siglas en inglés); DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>) y String (<http://string-db.org>) para agrupamiento funcional y para la generación de redes de interacción proteína-proteína (IPP) con la finalidad de determinar las interacciones en las cuales estas proteínas pueden estar implicadas bajo nuestras condiciones experimentales, así como la base de datos PaxDB para señalar la abundancia relativa de cada proteína identificada.

Análisis estadístico

Para determinar los niveles de expresión de proteínas en el análisis de SDS-PAGE 2D, se realizó una normalización de los mapas proteómicos usando un

modelo de regresión local utilizando el software PDQuest versión 8.0.1 (BioRad Laboratories). Esto permitió la comparación de cada una de las réplicas de las condiciones experimentales. Usando una herramienta bioinformática para comparación cuantitativa provista por el software, se seleccionaron todos los spots representados en las muestras con 95 % de confianza estadística ($p < 0.01$) determinado por una prueba de T de Student. Finalmente, para analizar la expresión a nivel del transcrito de los genes desregulados por efecto de la ascitis de COE, se desarrolló un análisis densitométrico de los ensayos de RT-PCR y se le aplicó un análisis de ANOVA de una cola para determinar los cambios entre cada una de las condiciones comparado contra la condición control, además se aplicó una prueba Bonferroni posthoc a este grupo de datos.

Retro transcripción (RT).

Para evaluar los niveles de expresión de las proteínas identificadas que aumentaron o disminuyeron su expresión por efecto de la ascitis de COE en células mesenquimales, se realizaron ensayos de RT-PCR. Primero, se realizó la extracción de mRNA a partir de extractos totales de células SKOV-3 pre-tratadas o no con ascitis de COE usando reactivo de TRIZoL (No. de Cat. 10296028, Thermo Fisher Scientific) la extracción fue realizada como indica el fabricante. La síntesis de cDNA se llevó a cabo a partir de mRNA usando el Single Chain Synthesis Kit (No. de Cat. k1612, Thermo Fisher Scientific). El diseño de los iniciadores fue realizado usando el software PRIMER3 (<http://primer3.ut.ee/>) y Primer BLAST-NCBI.

Después de descongelar los componentes del kit First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, #K1612), se mezclaron, se centrifugaron brevemente y se mantuvieron en hielo. Se agregaron los siguientes reactivos en un tubo estéril libre de nucleasas manteniéndolo en hielo en el siguiente orden:

RNA Molde	RNA total	0.1-5 µg			
Iniciadores	Iniciadores específicos para el gen de la proteína seleccionada	15-20 pmol	⇒	Búffer de reacción 5x	4 µl
				Inhibidor de RNasas RiboLock (20u/µl)	1 µl
	Agua libre de nucleasas	Aforar a 11 µl		Mezcla de dNTP 10 mM	2 µl
	Volumen total	11 µl		Transcriptasa reversa M-MuLV (20u/µl)	2 µl
				Volumen total	20 µl

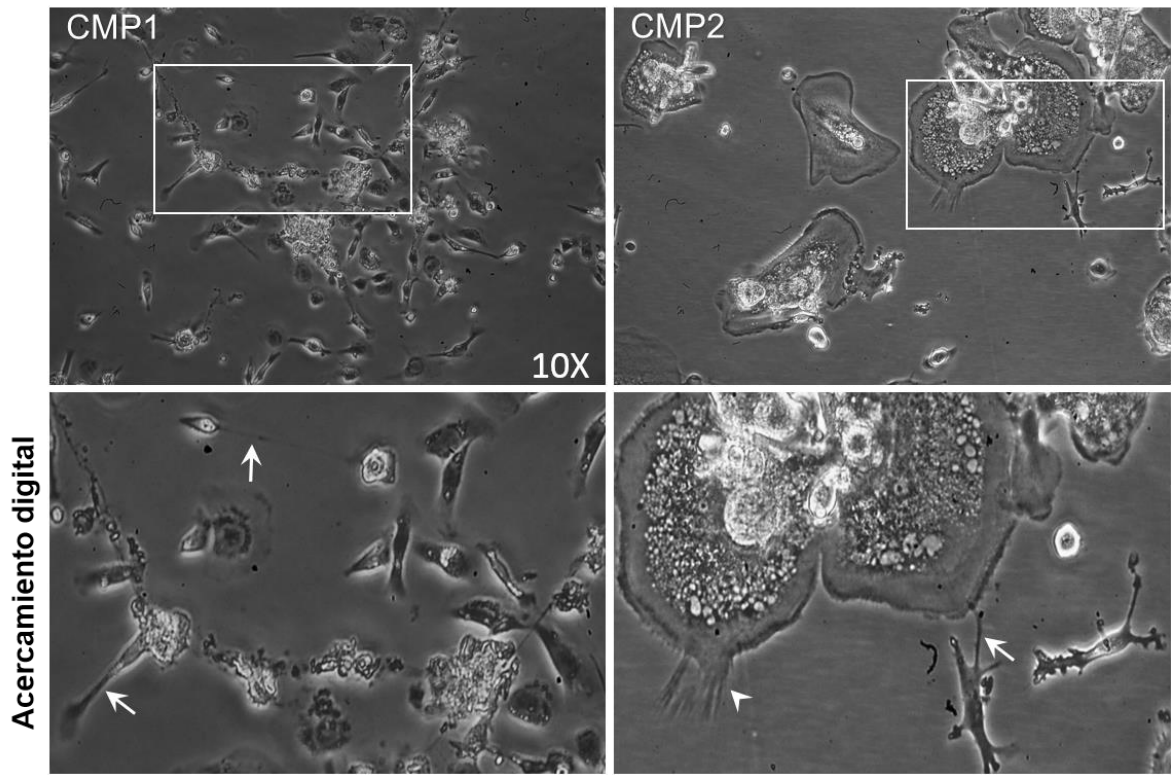
Se mezclaron suavemente y se centrifugaron y se incubaron durante 60 min a 37 °C. La reacción se terminó por calentamiento a 70 °C durante 5 min. El cDNA fue utilizado directamente para reacciones de PCR.

Inducción de tumores con la línea celular SKOV-3 bajo diferentes condiciones
 Ratones Nu/Nu de 3 semanas de edad se inocularon intraperitonealmente con 5×10^6 células mSKOV-3 y 10×10^6 células SKOV-3 crecidas en medio de cultivo como condición control. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical después de cinco semanas post-inoculación para los tumores generados por mSKOV-3 y nueve semanas para la condición control, lo cual se determinó en función del crecimiento del tumor.

X. RESULTADOS

Análisis morfológico y estructural de células malignas derivadas de paciente (CMP) y células SKOV-3 bajo tratamiento con ascitis de COE

La ascitis generada en etapas avanzadas del cáncer de ovario forma un importante microambiente tumoral altamente dinámico. Las células malignas provenientes de la ascitis de pacientes con COE poseen características morfológicas y estructurales distintivas, usualmente relacionadas con células invasivas. Es bastante común encontrar en forma abundante células pequeñas con una morfología celular característica con la presencia de protrusiones de membrana, observada en células malignas derivadas de paciente (CMP1 y CMP2) (Figura 4). Algunas veces fue posible observar células grandes exhibiendo estructuras de membrana muy complejas llamadas invadopodios, cuya formación implica un proceso de reorganización del citoesqueleto y cuya función está fuertemente asociada con procesos como migración e invasión. El análisis de las células malignas derivadas de pacientes muestra algunas protrusiones de membrana conservadas principalmente en células malignas pequeñas, señalado con flechas blancas; las cabezas de flecha blancas indican la presencia de invadopodios en células grandes (Figura 4, acercamiento digital). En las células malignas derivadas de pacientes los invadopodios, estructuras especializadas ricas en actina, se detectaron con faloidina-rodaminada y el núcleo con DAPI.



CMP= Células Malignas de Paciente

Figura 4. Análisis morfológico y estructural de células malignas de pacientes. Micrografía obtenida por microscopía de contraste de fases, que muestra las características morfológicas de dos diferentes cultivos de células malignas de pacientes (CMP1, CMP2) (10X). Los rectángulos blancos señalan el área seleccionada para el acercamiento digital que se muestra en la parte inferior de cada micrografía con la finalidad de apreciar detalles morfológicos. Las células se mantuvieron en ascitis al menos cinco semanas; las cabezas de flecha blancas indican estructuras tipo invadopodio y las flechas blancas indican prolongaciones de membrana.

Las CMP se analizaron por microscopía confocal para apreciar las características de los núcleos celulares y el citoesqueleto de actina para detectar zonas ricas en actina filamentosa o polimerizada (Figura 5). Los invadopodios se observaron como una zona rica en actina polimerizada, típicamente polarizada; un acercamiento digital de la micrografía en campo claro mostró esas estructuras con más detalle (Figura 5, cabeza de flecha blanca).

Núcleos / Actina

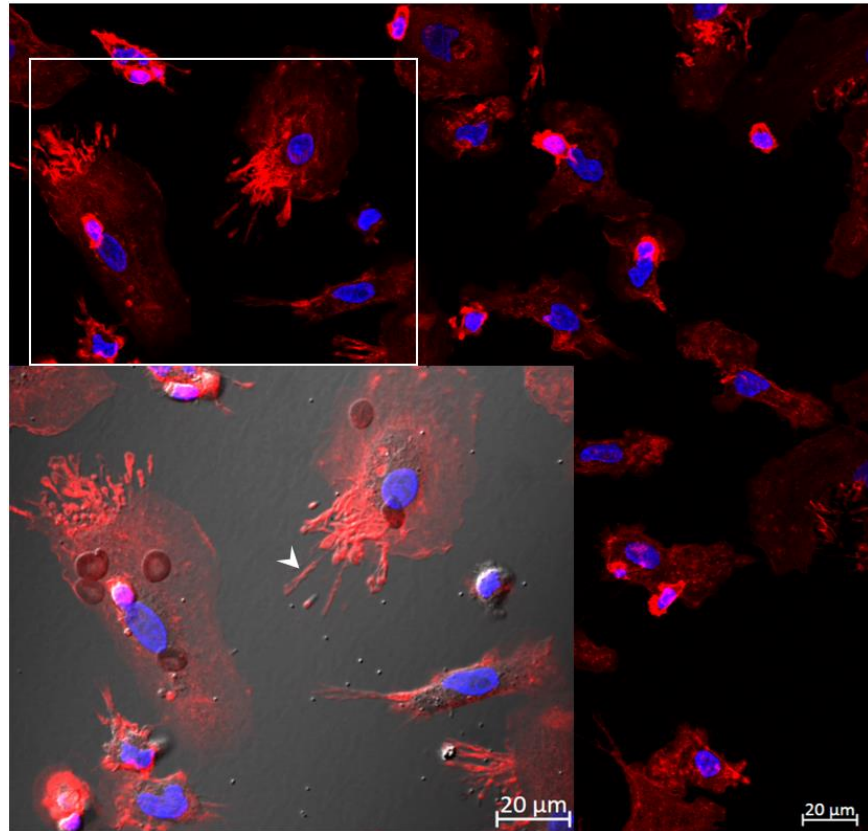


Figura 5. Análisis del citoesqueleto por microscopía confocal de las células malignas de pacientes (CMP2). Los cultivos de las CMP se tiñeron para observar el citoesqueleto de actina (faloidina-rodaminada, 1:50) y los núcleos celulares (DAPI, 1:50). La zona del acercamiento digital en la combinación con el campo claro mostró estructuras tipo invadopodios (señalados con cabezas de flecha blanca) fuertemente teñidos con faloidina-rodaminada.

Para analizar la influencia de la ascitis de COE en las células transformadas, se utilizaron células SKOV-3 como modelo *in vitro*. Esta línea celular proviene de ascitis de una paciente con cáncer de ovario epitelial, subtipo histológico seroso papilar. Las células SKOV-3, se trataron individualmente con ascitis de cinco pacientes diferentes para observar si estos líquidos podían inducir los cambios morfológicos y estructurales antes observados en las células malignas derivadas de pacientes, las cuales fueron recuperadas directamente de la ascitis de paciente con COE. Se observó una morfología muy similar, con presencia de protrusiones de membrana y de prolongaciones celulares (flechas blancas) en todos los casos (Figura 6), así como la presencia de células grandes con citoplasmas abundantes y algunas células pequeñas alrededor del cultivo. En todos los casos se observaron protrusiones de membrana y prolongaciones en las células SKOV-3 tratadas con ascitis de COE (Figura 6; b, c, d, e y f).

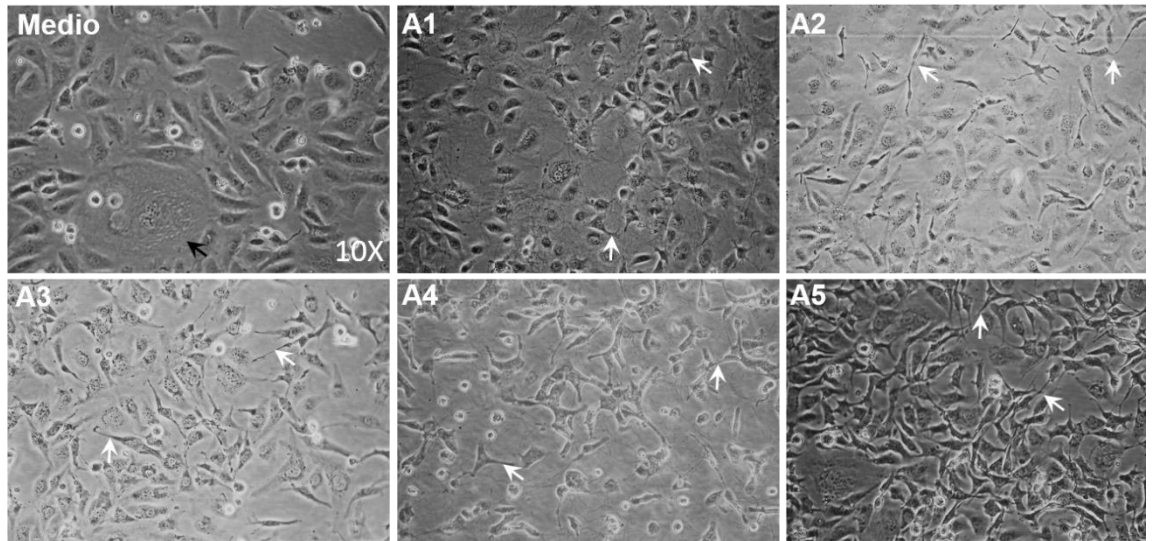


Figura 6. Efecto de la ascitis de COE sobre la línea celular SKOV-3.

Tratamiento de la línea celular SKOV-3 con ascitis de COE. Imágenes de microscopía de luz de cultivos de la línea celular SKOV-3 tratada individualmente con cinco diferentes ascitis por 72 h; a, medio de cultivo convencional con 10 % de suero fetal bovino (control del tratamiento); b, ascitis 1 (A1); c, ascitis 2 (A2); d, ascitis 3 (A3); e, ascitis 4 (A4) y f, ascitis 5 (A5); las flechas blancas señalan algunas protrusiones de membrana. Las condiciones generales de incubación para la condición control y los tratamientos fueron 72 h a 37 °C y 5 % de CO₂ (10X).

Finalmente, se evaluó el efecto de la ascitis sobre estructuras celulares como el citoesqueleto de actina y la forma del núcleo. Se observó una importante disminución del tamaño celular bajo esta condición, además de que la forma se tornó más alargada. Con respecto al citoesqueleto de actina, las células tratadas con ascitis, mostraron la pérdida de fibras de estrés, y solo fue posible observar algunas placas corticales de actina polimerizada (Figura 7). Por otra parte el núcleo celular exhibió una disminución importante en su tamaño y un cambio en su forma, la cual se tornó elongada, estos cambios en tamaño y forma se repitieron en al menos el 80% del cultivo, debido a que también se detectó la presencia de células grandes bajo esta condición experimental.

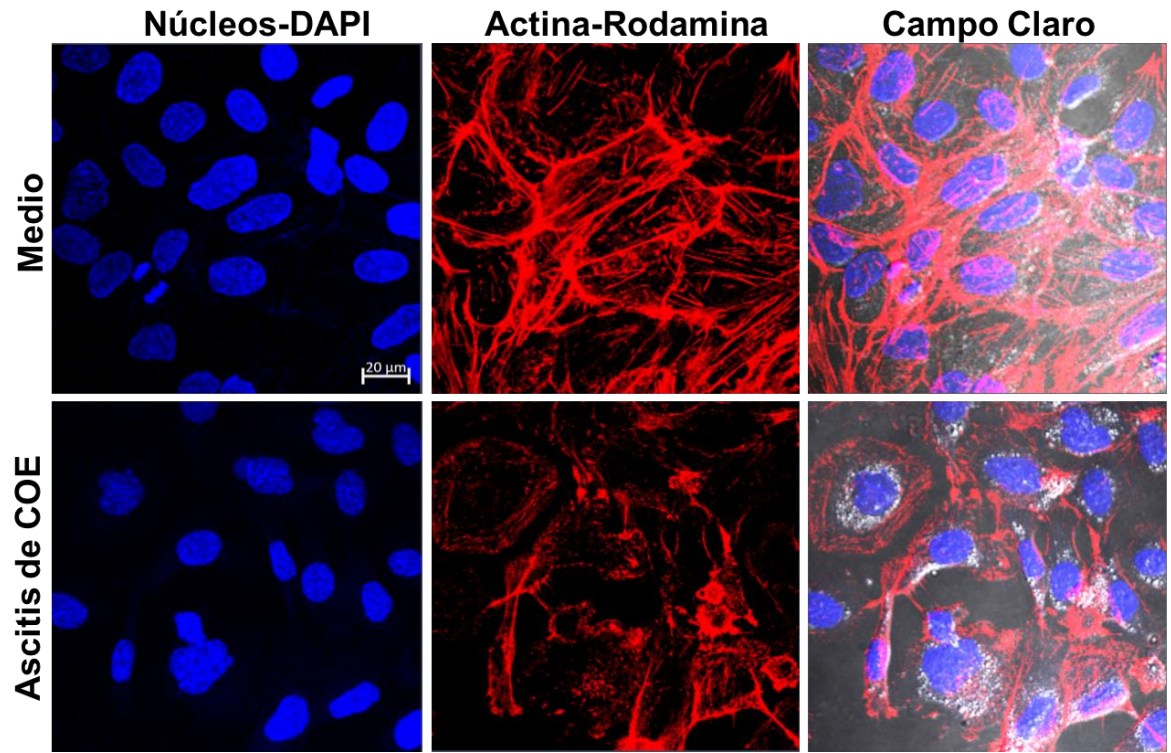


Figura 7. Análisis por microscopía confocal de SKOV-3 bajo el tratamiento con ascitis de COE. Análisis morfológico de la línea celular SKOV-3 por microscopía confocal en la condición control (medio de cultivo convencional) y la condición de ascitis; los núcleos se tiñeron con DAPI (1:50) y el citoesqueleto de actina con faloidina-rodamina (1:50).

De acuerdo a los cambios morfológicos observados en las células bajo la condición de ascitis, se aprecia la polarización o redistribución de los componentes celulares y formación de elongaciones de membrana; usualmente estas estructuras son utilizadas por las células para establecer contacto con la matriz extracelular. Entre las moléculas que utiliza la célula maligna para realizar este contacto se encuentran las integrinas, que son proteínas transmembranales que funcionan como receptores hacia diferentes proteínas de la matriz extracelular; particularmente, los receptores a fibronectina usualmente están localizados en estructuras focalizadas en la membrana celular donde participan en el proceso de migración [30].

En cáncer, la migración e invasión dependerán en gran medida de las características de la matriz extracelular; por lo que si ésta es suave y laxa las células malignas de gran tamaño pueden invadir fácilmente utilizando un tipo de migración ameboide. Por el contrario, si la matriz es rígida, estas células requieren de cambios en su fenotipo que les permitan hacerle frente, comúnmente utilizan un tipo de migración denominado mesenquimal [36]. Un evento frecuente en el que se implica la migración mesenquimal es precisamente la adquisición de un fenotipo mesenquimal, a través del proceso conocido como transición epitelio-mesénquima el cual es un proceso de desdiferenciación hacia un fenotipo celular inmaduro que tiene como característica una alta tasa de migración [37].

Se determinó la expresión de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ relacionadas con la migración mesenquimal y $\beta 4$ relacionada principalmente con invasión. Todos estos receptores fueron evaluados en SKOV-3 y en las células malignas de pacientes (Figura 8).

En las células SKOV-3 la expresión de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$ se detectó elevada en la condición de ascitis comparada contra la condición control, particularmente la integrina $\beta 3$ no se detectó en la condición control (medio de cultivo). En la condición control, la expresión de la integrina $\beta 4$ fue elevada y

su distribución subcelular fue homogénea en todo el citoplasma (Figura 8. SKOV-3, β 4, Medio). La integrina β 4 en la condición de ascitis se observó en algunas regiones de la célula, particularmente en las zonas donde las células mantenían un contacto celular muy estrecho, además, se observó que en esas zonas la integrina β 4 colocalizó con el citoesqueleto de actina (Figura 8. SKOV-3, β 4, Ascitis). La migración mesenquimal fue detectada por los cambios observados y variaciones observadas que las células SKOV-3 exhibieron en presencia de la ascitis de COE en cuanto a tamaño y forma celular y nuclear, fibras de estrés en el citoesqueleto de actina y expresión incrementada de integrinas como receptores para matriz extracelular .

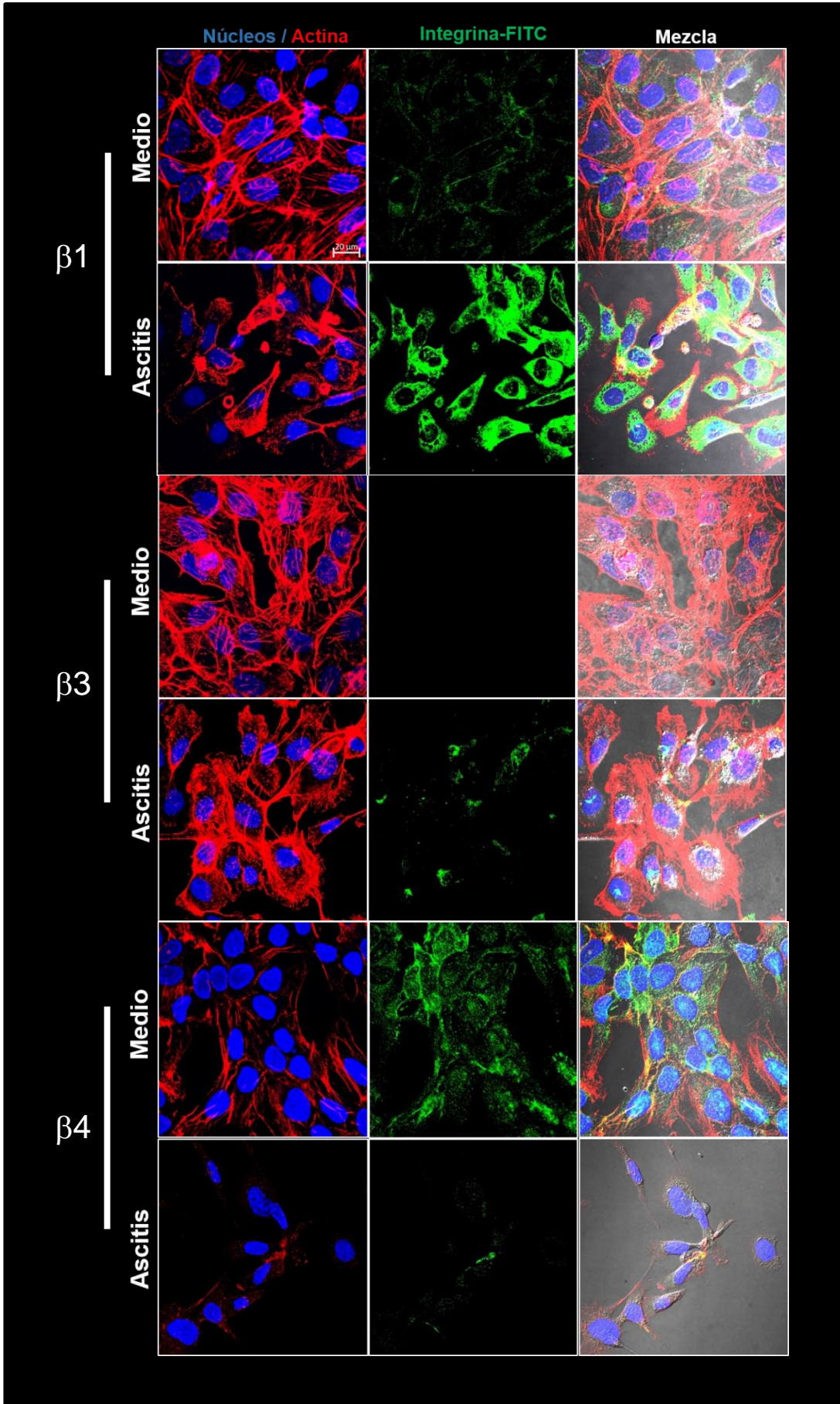


Figura 8. Detección de integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ en la línea celular SKOV-3. Micrografías por microscopía confocal muestran la localización de las integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ en la línea celular SKOV-3 incubada en la condición control (medio de cultivo) y en ascitis de COE (las células fueron tratadas durante 24 h con ascitis). La integrina $\beta 1$ se detectó usando un anticuerpo policlonal (1:100), la integrina $\beta 3$ se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal (1:100) y la integrina $\beta 4$ se detectó utilizando un anticuerpo policlonal contra ese receptor (1:100); el citoesqueleto de actina se tiñó usando faloidina-rodamina (1:50). Escala de la barra = 20 μm .

Con respecto a las células malignas derivadas de pacientes, las CMP1 mostraron un patrón de expresión de las integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ muy similar al observado en la línea células SKOV-3 bajo la condición de ascitis. Por el contrario, las CMP2 mostraron una expresión basal para $\beta 1$, una señal muy débil para $\beta 3$ y ausencia de señal para $\beta 4$ (Figura 9).

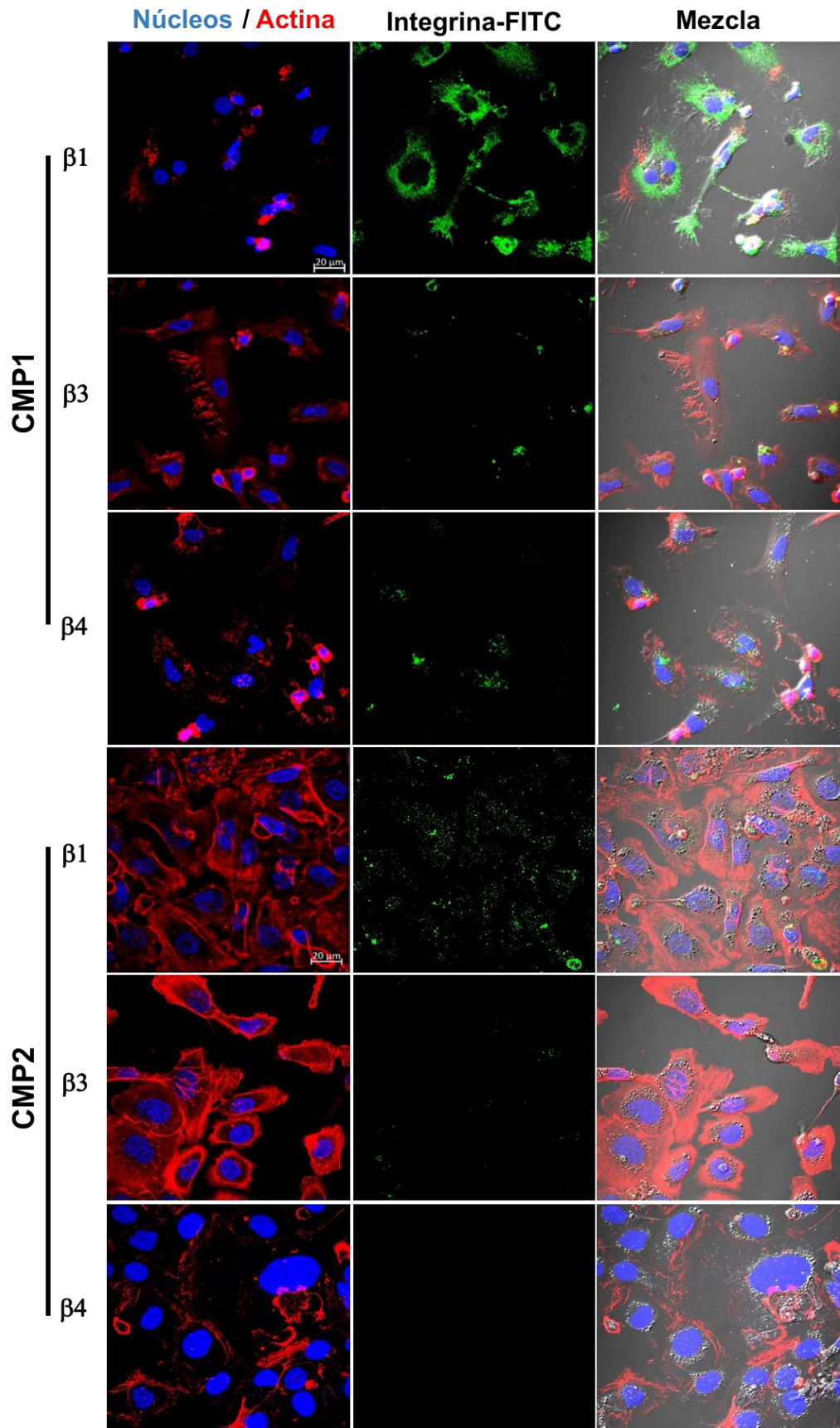


Figura 9. Detección de integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ en células malignas de pacientes (CMP). Micrografías por microscopía confocal muestran la localización de las integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$ en las CMP1 y CMP2 recuperadas directamente de la ascitis de pacientes con COE. La integrina $\beta 1$ se detectó usando un anticuerpo policlonal (1:100), la integrina $\beta 3$ se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal (1:100) y la integrina $\beta 4$ se detectó utilizando un anticuerpo policlonal contra ese receptor (1:100); el citoesqueleto de actina se tiñó usando faloidina-rodamina (1:50). Escala de la barra = 20 μm .

Estado de transición epitelio-mesénquima (TEM) en células malignas derivadas de pacientes y en células SKOV-3, inducido por ascitis de COE

Una vez que la morfología celular exhibió un efecto inducido por ascitis de COE y los marcadores de migración mesenquimal ($\beta 1$ y $\beta 3$) se incrementaron en las células SKOV-3 y en al menos un cultivo celular de las CMP y el marcador de invasión la integrina $\beta 4$, se relocalizó en células SKOV-3 bajo la condición de ascitis, se analizó la presencia de las proteínas E-cadherina y vimentina como marcadores de la TEM para confirmar la inducción del fenotipo celular epitelial y/o mesenquimal en las células malignas de paciente y en las células SKOV-3 bajo la condición de ascitis. Los resultados de western blot mostraron que la proteína E-cadherina, particularmente en las células SKOV-3 se expresó en bajos niveles en ambas condiciones experimentales (control y ascitis de COE). En la condición control y bajo los tratamientos con ascitis, se logró detectar una proteína de 80 kDa, el cual es el peso molecular que ha sido reportado para esta proteína [38]. Interesantemente, el anticuerpo anti-E-cadherina (DECMA) detectó una proteína de 29 kDa, la cual puede corresponder a un pequeño fragmento resultante de la digestión de dicha proteína, como se ha reportado en células malignas y cuya función se desconoce [39]. La cadherina de 80 kDa se detectó en las células SKOV-3 en la condición control y en ascitis pero no en las CMP con COE. Mientras el fragmento de 29 kDa se detectó exclusivamente en las condiciones de SKOV-3 tratadas con ascitis de COE. Concerniente a la proteína vimentina con un peso molecular de 58 kDa, ésta se expresó únicamente en las células SKOV-3 bajo la condición de ascitis; además, se detectó una fuerte señal para esta proteína en las CMP (Figura 10). Las diferencias en los niveles de expresión entre estas dos proteínas se confirmaron por análisis densitométricos de los resultados obtenidos por western blot; el nivel de expresión de la E-cadherina de 80 kDa permaneció en niveles muy similares en todas las condiciones exceptuando las CMP, en donde, como ya se mencionó, no se detectó esta proteína.

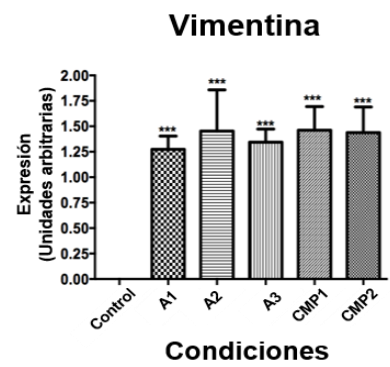
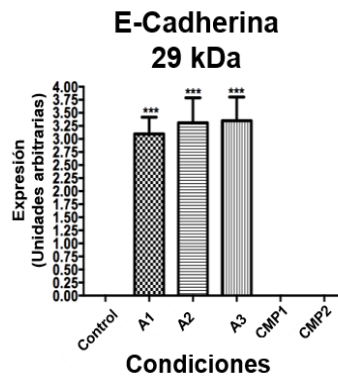
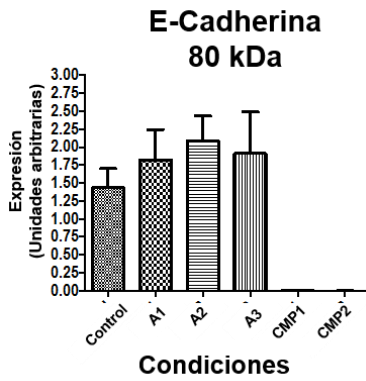
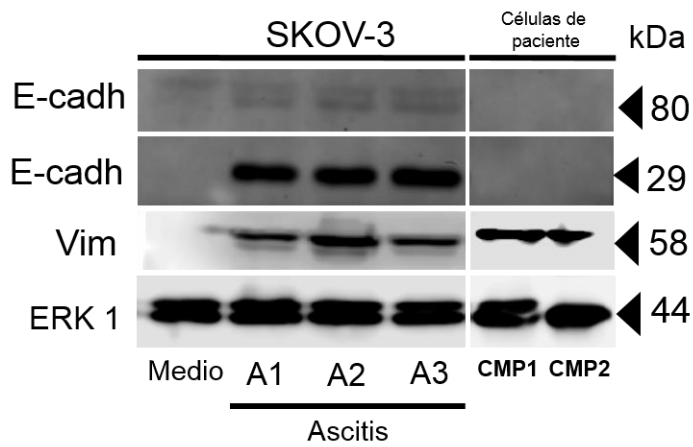


Figura 10. Expresión de los marcadores de TEM en la línea celular SKOV-3 bajo la condición de ascitis y en células malignas de pacientes. Análisis por western blot para detectar los marcadores de la TEM usando los anticuerpos específicos anti-E-cadherina (1:5000) y anti-vimentina (1:1000). Células SKOV-3 bajo la condición de diferentes ascitis (A1, A2, A3) y células malignas de pacientes (CMP1, CMP2); como condición control se utilizó a la línea celular crecida en medio de cultivo convencional. El análisis densitométrico se realizó utilizando a la cinasa ERK1 como control de carga. Todos los experimentos se realizaron al menos tres veces. Se realizó una prueba de ANOVA de una cola y Bonferroni post hoc para analizar este grupo de datos, $p < 0.0001$.

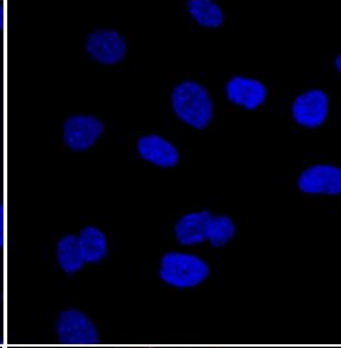
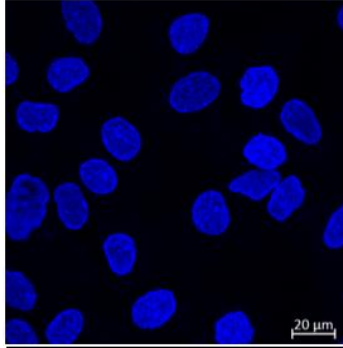
Por el contrario, en el caso del fragmento de 29 kDa detectado con el anticuerpo anti-E-cadherina, su expresión incrementó en forma significativa en las células SKOV-3 bajo la condición de ascitis y en las CMP, mientras que en la condición control estuvo ausente (Figura 11). Los resultados obtenidos por microscopía confocal confirmaron los hallazgos previamente observados por el análisis de western blot. Las células SKOV-3 en la condición control exhibieron una señal muy débil para la proteína E-cadherina y su localización fue citoplasmática. En el caso de las células SKOV-3 tratadas con ascitis, la proteína E-cadherina mostró una señal fuerte y abundante y su localización fue citoplasmática y alrededor del núcleo formando estructuras donde esta proteína se observó concentrada. Por otra parte, la vimentina fue prácticamente indetectable en las células SKOV-3 en la condición control, en comparación con la condición de ascitis en la que esta proteína se observó fuertemente expresada y se observó formando la característica estructura de filamentos intermedios (Figura 11).

SKOV-3

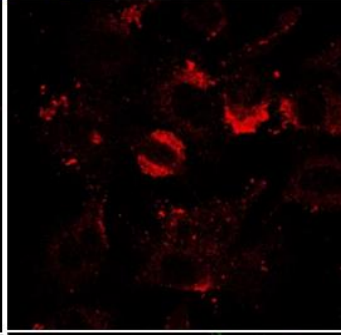
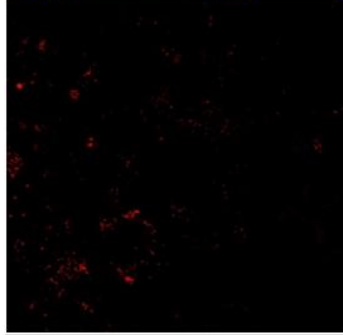
Medio

Ascitis

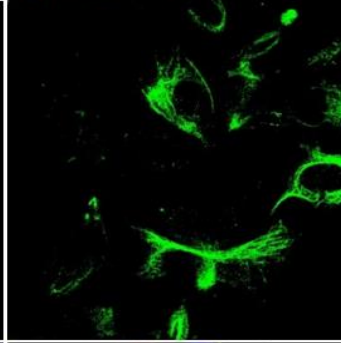
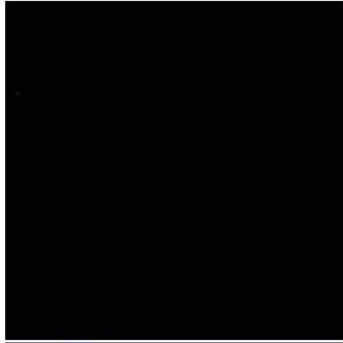
Núcleos



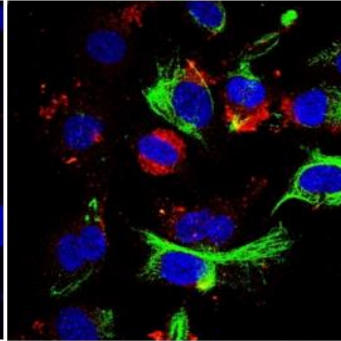
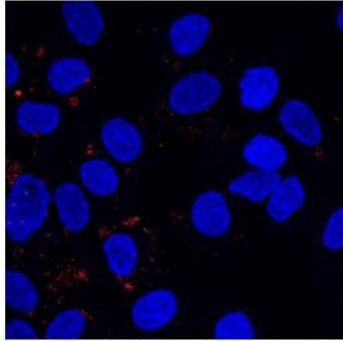
E-Cadherina



Vimentina



Mezcla



**Mezcla /
Campo Claro**

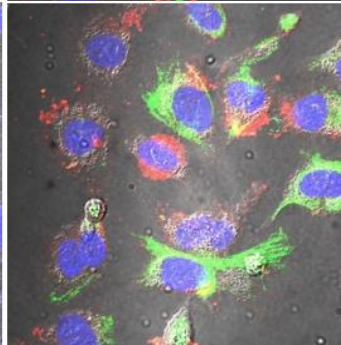
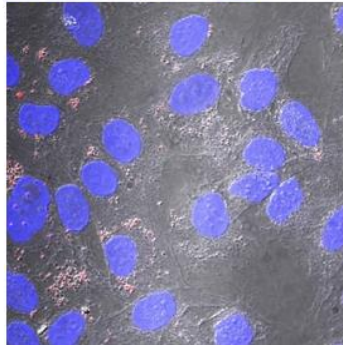
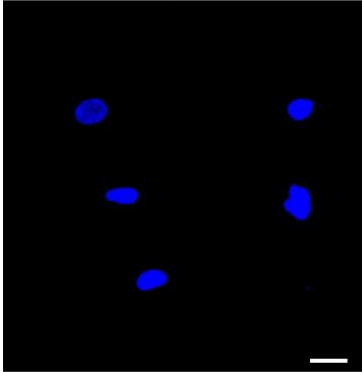


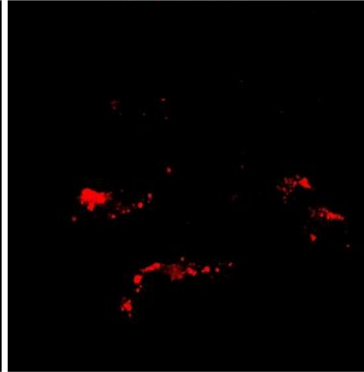
Figura 11. Inmunolocalización de los marcadores de la TEM en SKOV-3 bajo la condición de ascitis de COE. Los marcadores de la TEM fueron inmunodetectados utilizando anticuerpos específicos anti-E-cadherina (1:500) y anti-vimentina (1:100) y anticuerpos secundarios como anti-IgG de rata acoplado a Alexa 647 (1:100, color rojo) y anti-IgG de conejo acoplado a FITC (1:100, color verde); los núcleos se tiñeron con DAPI (1:50). La escala de la barra corresponde a 20 μm .

Finalmente, se evaluaron los marcadores para la TEM en CMP; tanto CMP1 como CMP2 mostraron una fuerte expresión de la proteína vimentina; sin embargo, solo CMP1 mostró la presencia de E-cadherina contenida en vesículas positivas para ambos marcadores (Figura 12, CMP1, combinado), mientras que estuvo totalmente ausente en el caso de las CMP2 (Figura 13). El citoesqueleto de filamentos intermedios basado en vimentina puede apreciarse formando las estructuras características en el citoplasma de CMP.

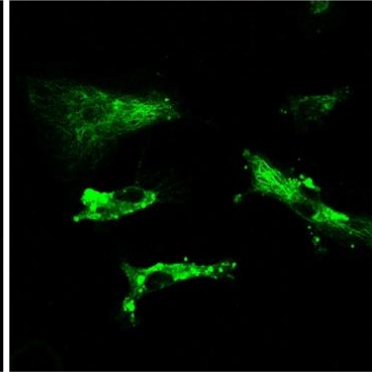
Núcleos



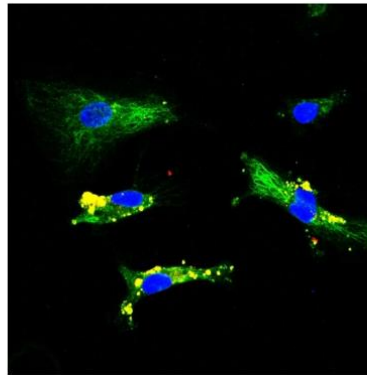
E-Cadherina



Vimentina



Mezcla



Mezcla / Campo Claro

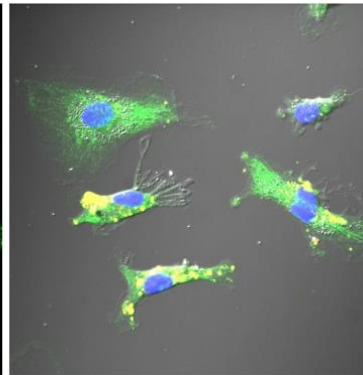
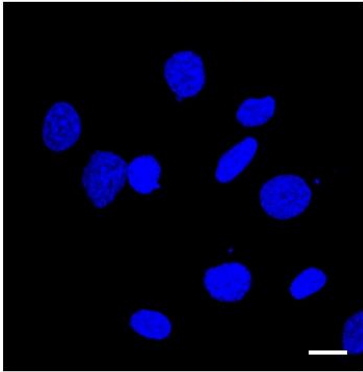
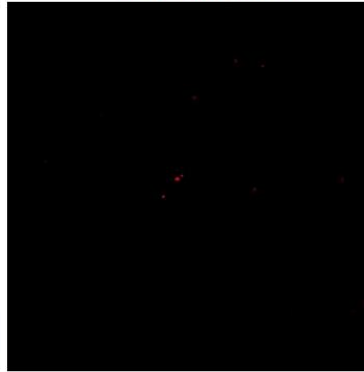


Figura 12. Inmunolocalización de los marcadores de la TEM en CMP1. Los marcadores de la TEM se detectaron utilizando anticuerpos específicos anti-E-cadherina (1:500) y anti-vimentina (1:100) y anticuerpos secundarios como anti-IgG de rata acoplado a Alexa 647 (1:100, color rojo) y anti-IgG de conejo acoplado a FITC (1:100, color verde); los núcleos se tiñeron con DAPI (1:50). La escala de la barra corresponde a 20 μm .

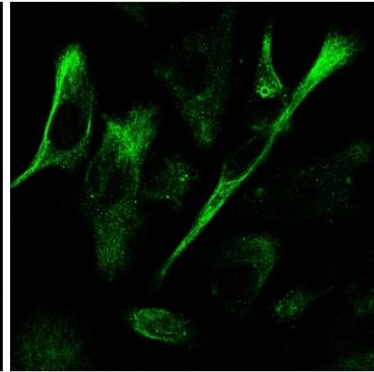
Núcleos



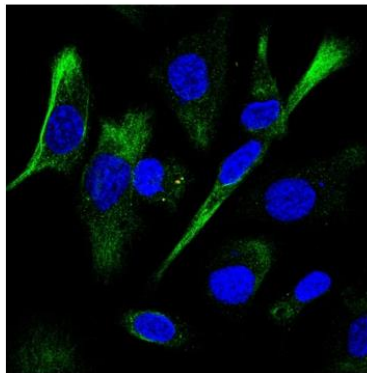
E-Cadherina



Vimentina



Mezcla



Mezcla / Campo Claro

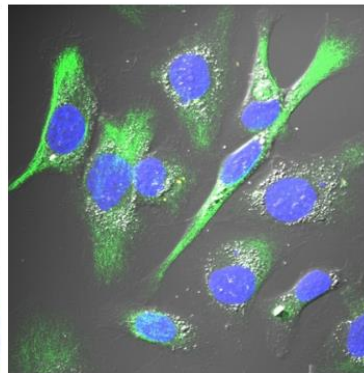


Figura 13. Inmunolocalización de los marcadores de la TEM en CMP2. Los marcadores de la TEM se detectaron utilizando anticuerpos específicos anti-E-cadherina (1:500) y anti-vimentina (1:100) y anticuerpos secundarios como anti-IgG de rata acoplado a Alexa 647 (1:100, color rojo) y anti-IgG de conejo acoplado a FITC (1:100, color verde); los núcleos se tiñeron con DAPI (1:50). La escala de la barra corresponde a 20 μm .

Para analizar el comportamiento de estas células inmaduras, se realizaron análisis de microarreglos de cáncer humano y análisis proteómicos utilizando células mesenquimales SKOV-3 generadas con cinco ascitis diferentes y se utilizó como condición control la misma línea celular SKOV-3 crecida en medio de cultivo convencional. Para el caso de los microarreglos de cáncer humano solo se utilizó la ascitis de mayor volumen (A1) para inducir a las células mesenquimales. El número de CMP recuperadas de las ascitis de cada paciente fue insuficiente para llevar a cabo este tipo de ensayos, por lo tanto, se utilizaron células SKOV-3 estimuladas con ascitis, las cuales muestran un patrón de expresión muy similar de los marcadores de la TEM, lo cual representó un modelo adecuado para analizar las estrategias usadas por estas células malignas bajo este microambiente y con dicho fenotipo.

Genes relacionados a cáncer desregulados en células mesenquimales de SKOV-3 (mSKOV-3)

Para evaluar el nivel de expresión de diferentes genes relacionados a cáncer humano, se llevaron a cabo microarreglos de DNA en los que se utilizó el mRNA que refleja a aquellos genes que se expresaron en las células mesenquimales bajo el efecto de la ascitis de COE. Los genes regulados se analizaron en la base de datos DAVID, la cual permitió crear los agrupamientos funcionales relacionados con el microambiente tumoral. Para el caso de los genes regulados positivamente se encontraron 69 genes regulados más de 1.5 veces y se trató de genes que participan en vías de señalización como MAPK, PI3K, TNF, TGF β , Toll y Fas, entre otros; los cuales a su vez regulan procesos como, proliferación celular, ciclo celular, respuesta inmune, apoptosis y diferenciación, entre otros (Figura 14).

Genes regulados positivamente

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)



Figura 14. Agrupamiento funcional de genes regulados positivamente relacionados al microambiente tumoral. El análisis de 1,920 genes relacionados a cáncer humano se realizó utilizando mRNA de mSKOV-3, lo cual permitió determinar un grupo de genes sobreexpresados bajo esta condición, en total se contabilizaron 69 genes regulados más de 1.5 con respecto a la condición control. Alrededor de la forma central, en formas ovaladas, se señalan los principales procesos regulados por efecto de los genes regulados positivamente.

Con respecto a los genes regulados negativamente, se determinó que al menos 105 genes disminuyeron su expresión 1.5 veces con respecto al control, el cual consistió de células SKOV-3 con fenotipo epitelial. Se encontró que estos genes afectan directamente vías como VEGF, EGF, MAPK, TRAIL, TNFR, Notch e $IFN\gamma$. Estas vías de señalización repercuten directamente en la regulación de las uniones intercelulares, angiogénesis, apoptosis, expresión génica y reparación del DNA (Figura 15).

Genes regulados negativamente

The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)



Figura 15. Agrupamiento funcional de genes regulados negativamente relacionados al microambiente tumoral. El análisis de 1,920 genes relacionados a cáncer humano se realizó utilizando mRNA de mSKOV-3, lo cual permitió determinar un grupo de genes sobreexpresados bajo esta condición, en total se contabilizaron 105 genes regulados más de 1.5 con respecto a la condición control. Alrededor de la forma central, en formas ovaladas, se señalan los principales procesos regulados por efecto de los genes regulados negativamente.

Perfiles proteómicos de células SKOV-3 en transición epitelio-mesénquima (mSKOV-3)

Se indujo la transición epitelio-mesenchimal en células SKOV-3 utilizando cinco ascitis diferentes y como condición control se utilizó la misma línea celular crecida en medio de cultivo McCoy. Posteriormente, todas las condiciones fueron analizadas mediante electroforesis en doble dimensión (mapas proteómicos); en cada uno de los geles analizados se detectaron alrededor de 300 puntos; así mismo, se identificaron áreas de expresión diferencial entre para la condición control y cada uno de los tratamientos (Figura 16).

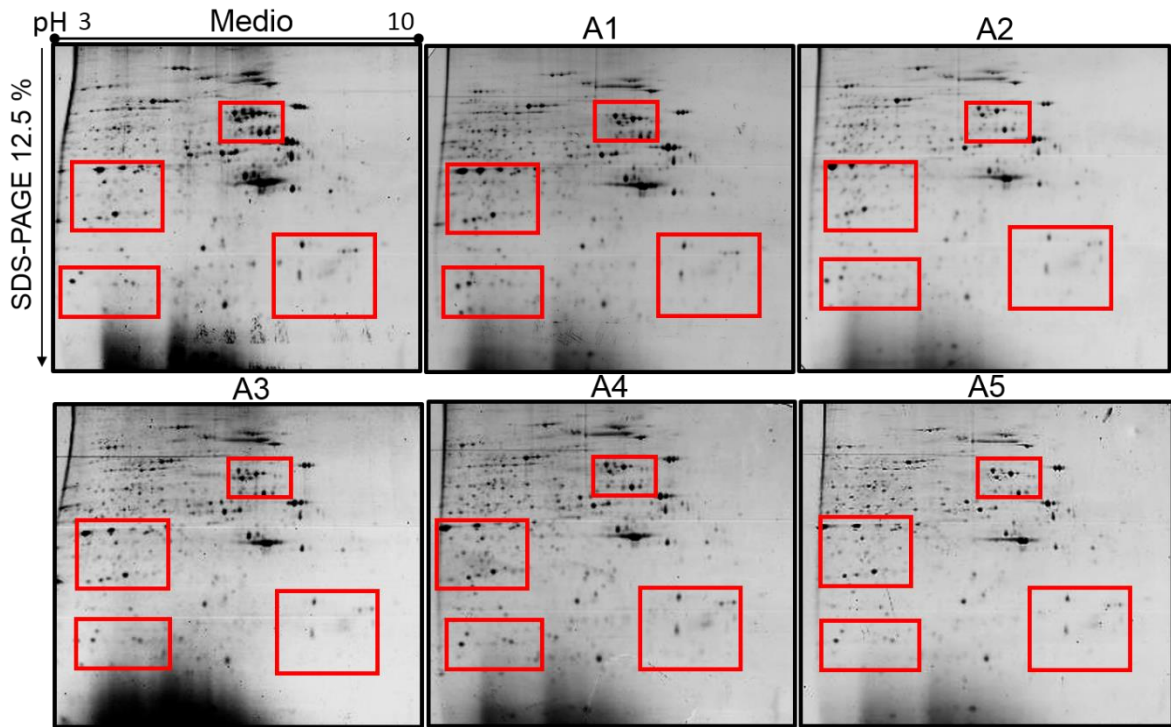


Figura 16. Mapas proteómicos de células mensesquimales generadas por diferentes ascitis de COE. Geles bidimensionales que representan mapas proteómicos de las células mesenquimales inducidas por efecto de la ascitis. Se observa la definición de al menos 300 puntos en cada condición. Las regiones con patrones de expresión diferencial de proteínas se señalan en rectángulos rojos.

Las diferencias entre las condiciones control y problema no fueron muy pronunciadas; sin embargo, el análisis densitométrico permitió detectar al menos 20 puntos con alteraciones en su expresión. Entre ellos, 9 proteínas aumentaron su nivel de expresión mientras 11 disminuyeron, en ambos casos, las diferencias fueron de al menos dos veces o más (Figura 17; Tabla 3). En recuadros rojos se muestra la localización de las proteínas que disminuyeron su expresión en la condición control (SKOV-3/Medio de cultivo) para una mejor visualización. Las proteínas que incrementaron su expresión se muestran en triángulos verdes en un gel representativo de células SKOV-3 tratadas con ascitis (Figura 17). Después de la escisión de los puntos seleccionados y su procesamiento por espectrometría de masas se obtuvieron las secuencias de los péptidos ionizados. Entre las proteínas identificadas se encuentran algunas implicadas en procesos biológicos relevantes para el desarrollo de un fenotipo típico de células de cáncer, tales como el crecimiento, la proliferación, la migración y la metastasis. Algunos de estos procesos (con proteínas que incrementaron o disminuyeron su expresión) están implicados en la evasión de la respuesta inmunológica o en la resistencia a la quimioterapia (ver adelante, Figura 17, Tabla 1).

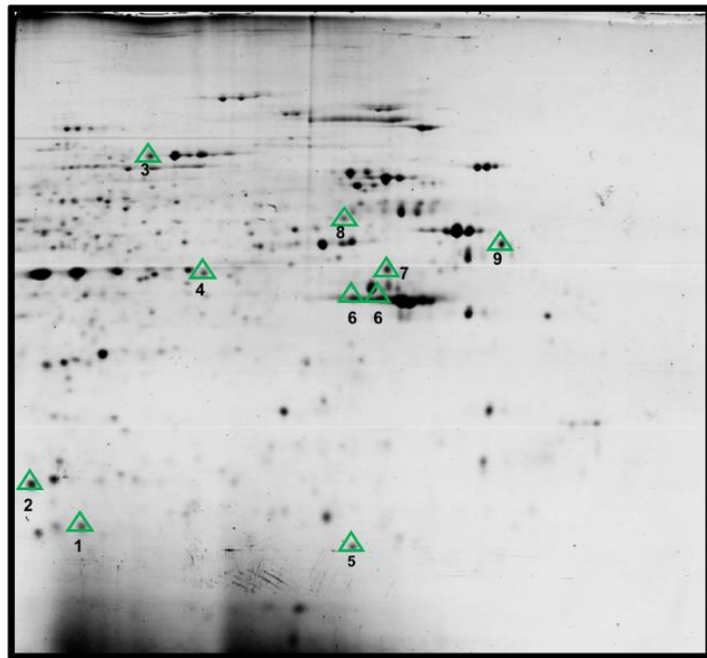
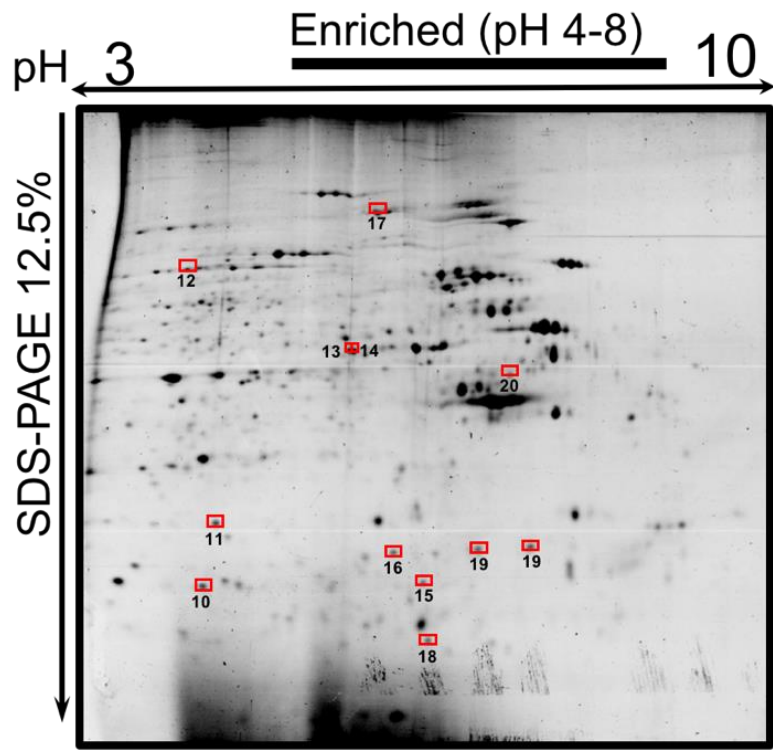


Figura 17. Proteínas desreguladas considerablemente en células mesenquimales inducidas por ascitis (mSKOV-3). El análisis de los mapas proteómicos con el software PDQuest versión 8.0.1, permitió determinar aquellas proteínas con variación de al menos dos veces en el nivel de expresión incrementado (9, señaladas en triángulos verdes, panel derecho) o dos veces disminuido (11, señaladas con recuadros rojos, panel izquierdo). Los geles fueron preparados en formato largo al 12.5 %; y con un gradiente de pH de 3 a 10 que se aplicó a cada gel además de enriquecer en un rango de pH de 4 a 8.

Tabla 3. Proteínas desreguladas en células mesenquimales inducidas por ascitis de COE.

	No. de Punto	Proteína	Gen	ID de Uniprot	PM (kDa)	Mascot Score	Regulación (veces)
<i>Proteínas Incrementadas</i>	1	PDZ domain containing protein 11	PDZD11	Q5EBL8	16.1	64	+ 2.5
	2	GTP-binding nuclear protein Ran	RAN	P62826	24.6	90	+ 2.8
	3	Zinc finger protein 268	ZNF268	Q14587	92.6	68	+ 2.5
	4	Succinyl-CoA:3-ketoacid-coenzyme A transferase 1, OXCT1	N/A	B7Z609	36.8	72	+ 3.2
	5	Collagen alpha 6(VI) chain	COL6A6	A6NMZ7	183.4	68	+ 2.8
	6	Actin B	ACTB	P60709	40.5	103	+ 2.4
	7	Keratin, type II cytoskeletal 8	KRT8	P05787	53.4	75	+ 2.3
	8	Synaptotagmin-like protein 3	SYTL3	Q4VX76	70	64	+ 2.5
	9	Vimentin	VIM	P08670	53.6	79	+ 2.7
<i>Proteínas Disminuidas</i>	10	Human Leucocytic Antigen I	HLA-I	P01892	21.7	79	- 2.3
	11	Purine nucleoside phosphorylase	PNP	P00491	32.2	69	- 2.1
	12	Prelamin-A/C	LMNA	P02545	61.6	69	- 2.4
	13	Actin, cytoplasmic 2	ACTG1	P63261	42.1	97	- 2.2
	14	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1	HNRNPH1	P31943	50.5	75	- 2.5
	15	Heat shock protein beta-1	HSPB1	P04792	22.4	91	- 2.9
	16	ADP ribosylation factor	ARF1	P84077	44.6	69	- 2.4
	17	Lon protease mitochondrial	LONP1	P36776	95.5	87	- 3.0
	18	Peroxiredoxin-2	PRDX2	P32119	18.4	85	- 2.6
	19	Cathepsin D	CTSD	P07339	26.7	77	- 2.5
	20	Synaptotagmin-1	SYT1	P21579	32.5	68	- 2.5

Validación de las proteínas desreguladas a nivel de mRNA

Ocho proteínas (tres que incrementaron y cinco que disminuyeron) reguladas bajo el efecto de la ascitis fueron seleccionadas para confirmar sus cambios a nivel transcripcional usando ensayos de RT-PCR. Debido a la gran cantidad de ascitis requerida para cada experimento, para los ensayos de expresión solo se utilizaron 4 ascitis, cuyos volúmenes permitieron llevar a cabo los tratamientos. En estas condiciones se evaluaron los niveles de expresión de RAN, ZNF268, SYTL3, MHC-I, hnRNPH1, HSP β 1, ARF1 y SYT1. Después de 24 h de tratamiento con ascitis las proteínas RAN, ZNF268 y SYTL3 incrementaron más de dos veces sus niveles de expresión en algunos casos. Por otra parte, las proteínas MHC-I, hnRNPH, HSP β 1, ARF1 y SYT1, disminuyeron dos o tres veces sus niveles de expresión. Estos resultados apoyan fuertemente los resultados observados previamente por análisis proteómicos. El análisis estadístico de este grupo de datos confirmó las diferencias observadas en las condiciones de ascitis, las cuales resultaron significativas comparadas contra la condición control (Figura 18) (*= $p < 0.05$, **= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$).

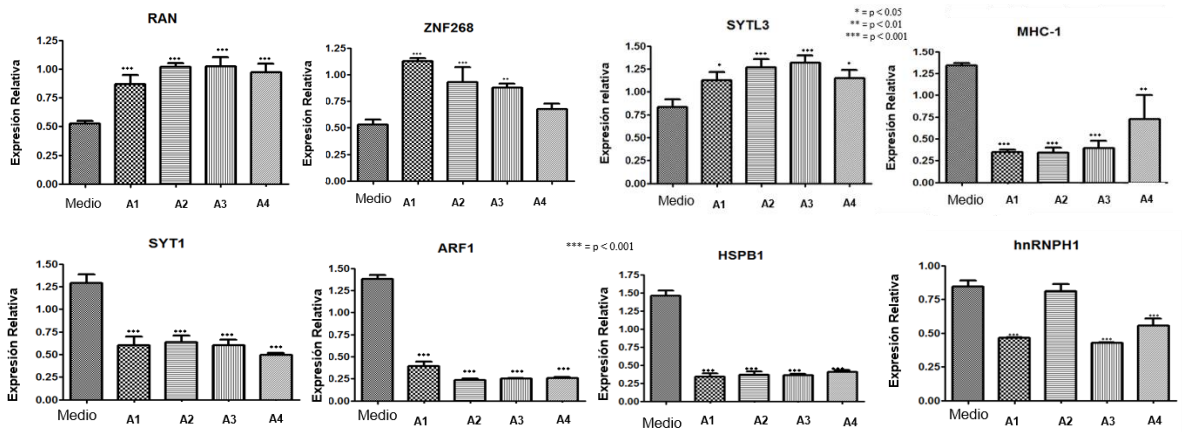
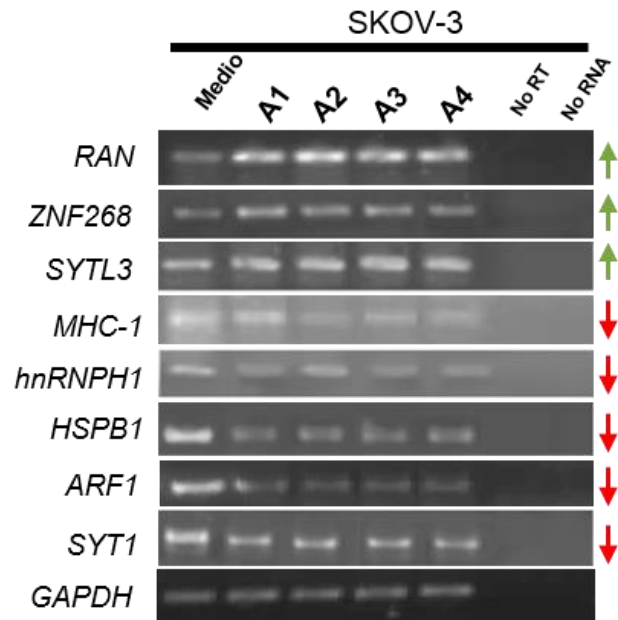


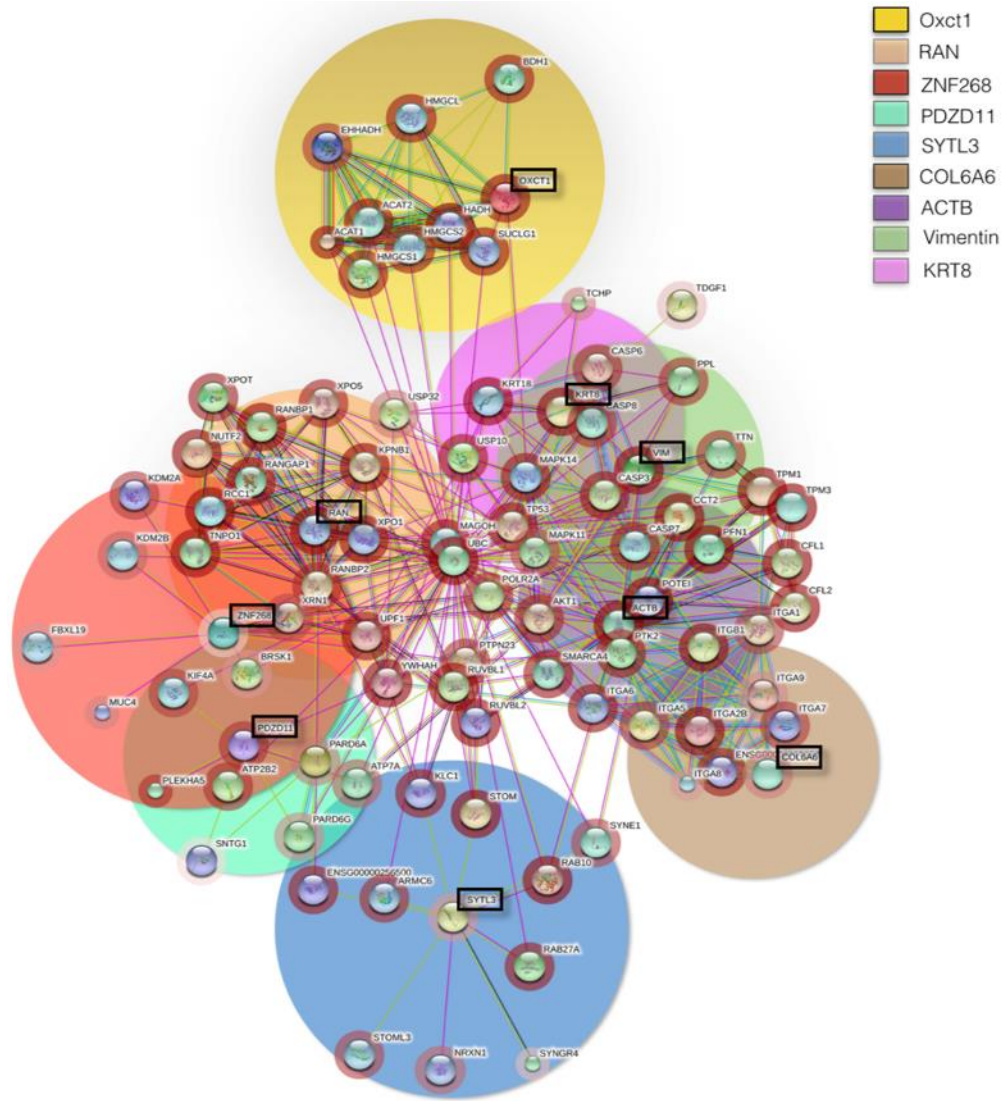
Figura 18. Validación de proteínas desreguladas en células mesenquimales inducidas por ascitis a nivel de mRNA. Los perfiles de expresión de proteínas mencionadas a nivel de mensajero para 3 que incrementaron su expresión y 5 que la disminuyeron en células mesenquimales inducidas por ascitis. El análisis densitométrico se realizó utilizando como control interno GAPDH. *= $p < 0.05$; **= $p < 0.001$; ***= $p < 0.0001$.

Las proteínas desreguladas por efecto de la ascitis participan en diferentes procesos biológicos

Proteínas reguladas positivamente

Una vez que se identificaron las proteínas reguladas por efecto de la ascitis (incrementadas o disminuidas), se realizaron diferentes análisis bioinformáticos utilizando las siguientes bases de datos: STRING 10.0, Gene Ontology, AmigO 2, Panther DB, and Pax DB. Estas bases de datos integran varias fuentes de datos bioinformáticos, lo que permite analizar las propiedades físicas y funcionales de las proteínas, así como hacer predicciones de las interacciones entre los genes y sus productos. Estos análisis proporcionan una visión de las proteínas que podrían estar interactuando con las proteínas identificadas (Figura 19, recuadros negros), para detectar los procesos biológicos que podrían verse afectados por la regulación de las proteínas identificadas como consecuencia de la TEM. La red de interacción proteína-proteína (IPP) muestra el grupo principal de proteínas (indicado en los círculos de color) con el que estas proteínas interactúan. Además, la abundancia relativa de estas proteínas en el nivel fisiológico se muestra en el halo rojo que rodea a cada proteína (Figura 19). El análisis por ontología génica (OG) permite clasificar las proteínas identificadas en los procesos biológicos, funciones moleculares, y los componentes celulares de acuerdo a su función típica utilizando principalmente la base de datos DAVID [40]. Las proteínas incrementadas en mSKOV-3 muestran una interrelación compleja con otras proteínas, además de su participación en procesos estrechamente relacionados con un fenotipo celular altamente competente para hacer frente a un microambiente adverso. Los procesos biológicos encontrados fueron: respuesta al estrés (TERMOG: 0006950), organización de la matriz extracelular (TERMOG: 0030198), cicatrización de heridas (TERMOG: 0042060), transducción de señales (GOTERM: 0007165), respuesta celular al estímulo (TERMOG : 0051716), el ciclo celular (TERMOG: 0007049), la comunicación celular (TERMOG: 0007154), la diferenciación

celular (TERMOG: 0030154), la regulación negativa de la muerte celular programada (TERMOG: 0043069), el sistema inmunológico (TERMOG: 0002376) (TERMOG: 0007228), la vía de señalización de la respuesta de la respuesta inmune (TERMOG: 0007166), la vía de señalización mediada por integrina (TERMOG: 0007229), el desarrollo de tejidos (TERMOG: 0009888) , entre otros. También se analizó el enriquecimiento de estas proteínas con respecto a su función molecular, y los términos más abundantes fueron unión a proteínas (TERMOG: 0005515), unión a enzimas (TERMOG: 0019899), unión a nucleótidos de purina (TERMOG: 00117976), unión a trifosfato de ribonucleósido de purina (TERMOG: 0035639), unión a iones (TERMOG: 0043167), unión a compuestos cíclicos orgánicos (TERMOG: 0097159). Además, como constituyentes de componentes celulares, estas proteínas participan en el citoesqueleto (TERMOG: 0005856), exosoma extracelular (TERMOG: 0070062), citoesqueleto de actina (TERMOG: 0015629), lamellipodios de membrana (TERMOG: 0031258), complejo de integrina (TERMOG: 004335), núcleo (TERMOG: 0005634), unión de substrato celular (TERMOG: 0030055), proyección celular (TERMOG: 0042995) y complejo de proteínas (TERMOG: 0043234), entre otros.



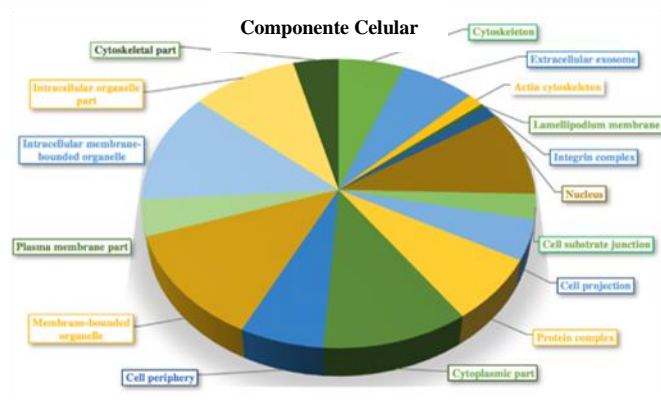
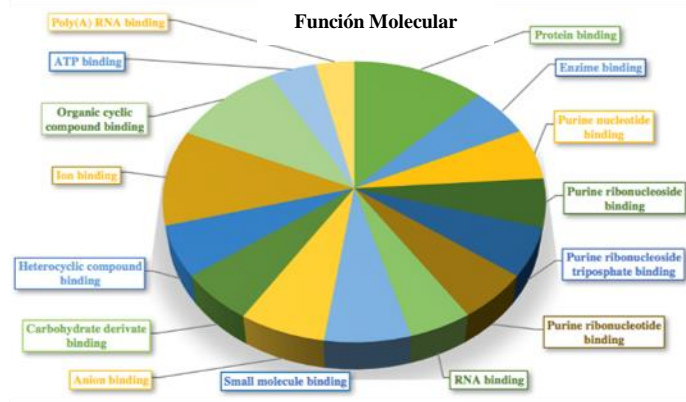
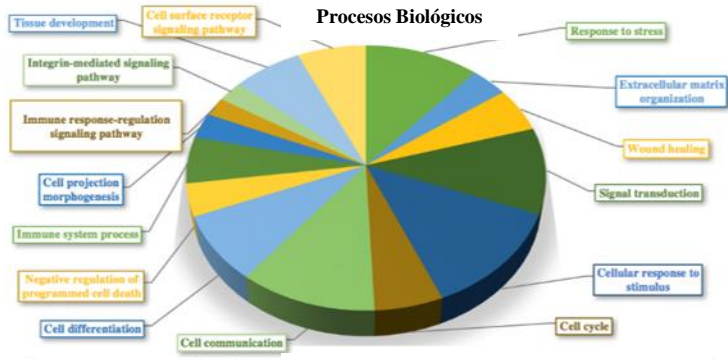
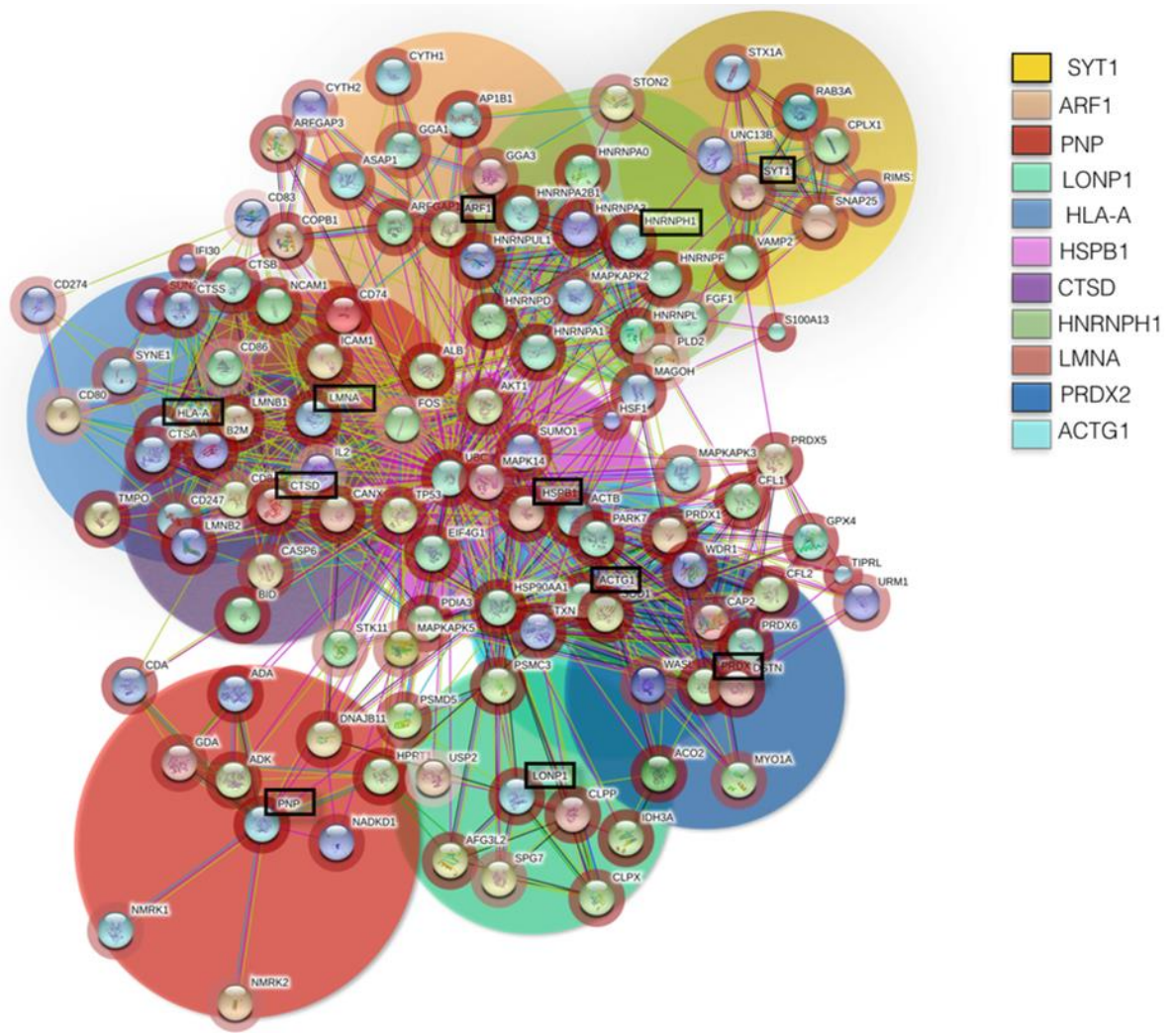


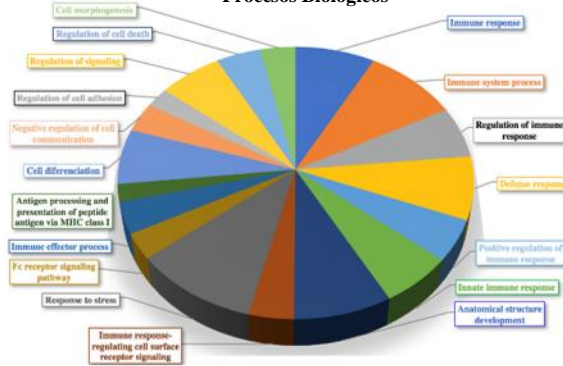
Figura 19. Análisis de interacción proteína-proteína y agrupamiento por términos ontológicos de las proteínas incrementadas. Las proteínas incrementadas en células mesenquimales inducidas por las ascitis, y analizadas utilizando diferentes bases de datos, se muestran con su principal grupo de proteínas interactuantes; la proteína identificada por análisis proteómico se señala en un recuadro negro en las redes de interacción proteína-proteína. Los agrupamientos por términos ontológicos se subdividieron en 3 categorías; procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares, señalando los principales procesos, funciones y componentes relacionados al grupo de proteínas incrementadas.

Proteínas reguladas negativamente

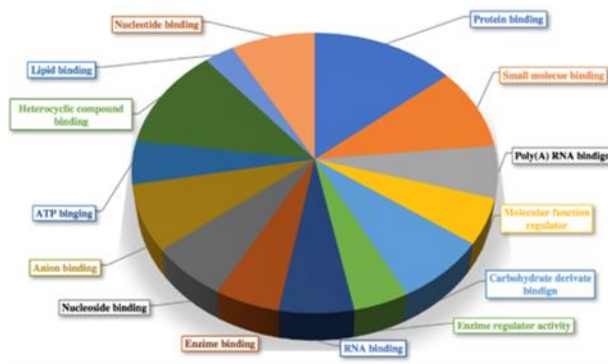
En cuanto a las proteínas reguladas negativamente, se realizaron los mismos análisis bioinformáticos. La red de IPP para proteínas que disminuyeron su expresión (Figura 20, recuadros negros) muestra el grupo principal de proteínas (indicado en los círculos de color) con el que estas proteínas interactúan. La abundancia relativa para cada proteína en la red IPP se indica por un halo que rodea cada proteína (Figura 20). Los términos de OG determinados para este grupo de proteínas asociadas con procesos biológicos fueron respuesta inmune (TERMOG: 0006955), procesos del sistema inmunológico (TERMOG: 0002376), regulación de la respuesta inmune (TERMOG: 0050776), la defensa de respuesta (TERMOG: 006952), regulación positiva de la respuesta inmune (TERMOG: 0050778), respuesta inmune innata (TERMOG: 00450), diferenciación celular (TERMOG: 003030154), regulación de la señalización (TERMOG: 0023051), morfogénesis celular (TERMOG: 0000902), regulación negativa de la respuesta inmune (TERMOG: 0010648), respuesta al estrés (TERMOG: 0006950). En las funciones moleculares, un enriquecimiento para la unión a proteínas (TERMOG: 0005515), unión a moléculas pequeñas (TERMOG: 0036094), unión a poli RNA (A) (TERMOG: 0044822), regulador molecular (TERMOG: 0030234) (TERMOG: 00119899). Finalmente, para componentes celulares estas proteínas participan en el exosoma extracelular (TERMOG: 0070062), vesícula de membrana (TERMOG: 0031988), lumen de organelo intracelular (TERMOG: 0070013), nucleoplasma (TERMOG: 0005654), aparato de Golgi (TERMOG: 0044431) y la parte mitocondrial (TERMOG: 004429), entre otros. La información completa sobre TERMOGs determinada para el grupo completo de proteínas identificadas.



Procesos Biológicos



Función Molecular



Componente Celular

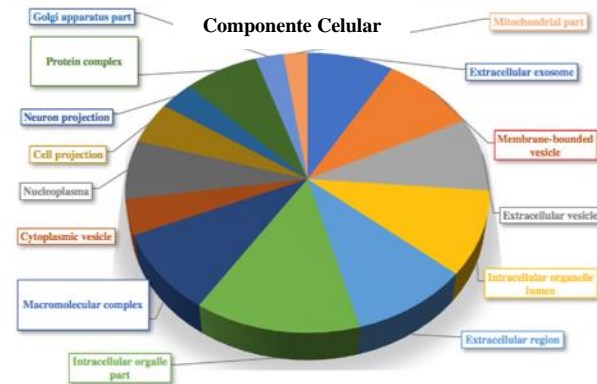


Figura 20. Análisis de interacción proteína-proteína y agrupamiento por términos ontológicos de las proteínas disminuidas. Las proteínas disminuidas en células mesenquimales inducidas por ascitis analizadas utilizando diferentes bases de datos, se muestra con su principal grupo de proteínas interactuantes; la proteína identificada por análisis proteómico se señala en un recuadro negro en las redes de interacción proteína-proteína (IPP). Los agrupamientos por términos ontológicos se subdividieron en 3 categorías; procesos biológicos, funciones moleculares y componentes celulares, señalando los principales procesos, funciones y componentes relacionados al grupo de proteínas disminuidas.

Detección del MHC-I

Derivado del análisis proteómico de células mesenquimales inducidas por ascitis, se determinó la desregulación de diferentes proteínas entre ellas el complejo principal de histocompatibilidad (HLA en seres humanos) lo cual resulta importante porque se ha asociado la disminución del MHC-I con la evasión del sistema inmunológico; la regulación negativa de este complejo se validó a nivel de mRNA. Posteriormente se realizó la detección proteica del MHC-I en CMPs, mSKOV-3 y en el tumor generado por inoculación de mSKOV-3 (T-mSKOV-3) en el modelo murino (ratón NuNu), considerando como condición control a las células SKOV-3 en medio de cultivo.

Se realizó la detección y localización del MHC-1 en CMP. En la condición control (SKOV-3/Medio) la expresión del MHC-I fue muy similar a lo observado por western blot, mostrando una expresión basal, superior a lo detectado en mSKOV-3, en la cual se detectaron trazas de este complejo. En SKOV-3, el complejo se localizó principalmente en la membrana celular y para mSKOV-3 la localización fue citoplasmática (Figura 21).

SKOV-3

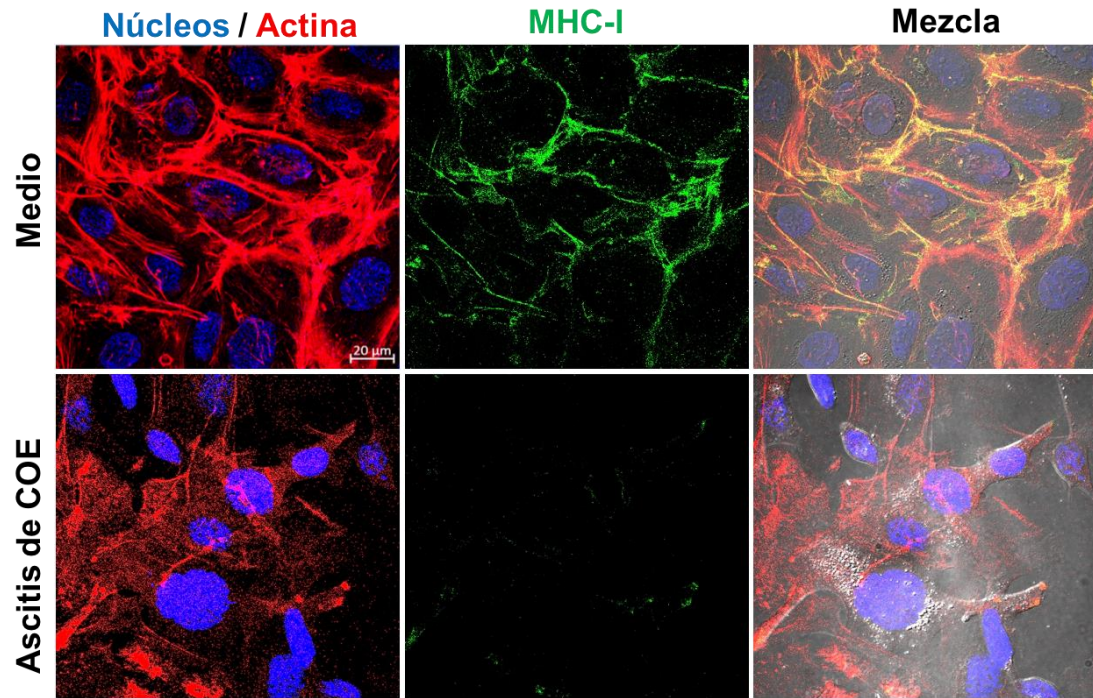


Figura 21. Detección del MHC-I en células mesenquimales inducidas para ascitis de COE. Detección del MHC-I en la línea celular SKOV-3 y mSKOV-3 por microscopía confocal; los núcleos se tiñeron con DAPI (dilución 1:50) y el citoesqueleto de actina con faloidina-rodamina (dilución 1:50), el anticuerpo anti-MHC-I (1:100) se detectó con anticuerpo secundario anti-ratón-FITC (1:100).

Finalmente, en el modelo murino se analizó la capacidad tumorigénica de las células mSKOV-3 (mesenquimales). Del mismo modo, se indujo la TEM en células SKOV-3 y éstas se inocularon en el modelo murino. Durante el desarrollo del tumor se logró apreciar que existió un crecimiento acelerado, ya que se observó que mediante la inoculación de 5×10^6 células pretratadas con ascitis de COE (mSKOV-3) y en sólo 5 semanas, se desarrolló un tumor de grandes dimensiones en comparación con la condición control, en la que el desarrollo del tumor tomó alrededor de 9 semanas utilizando 10×10^6 células control (SKOV-3) (Figuras 22 y 23).

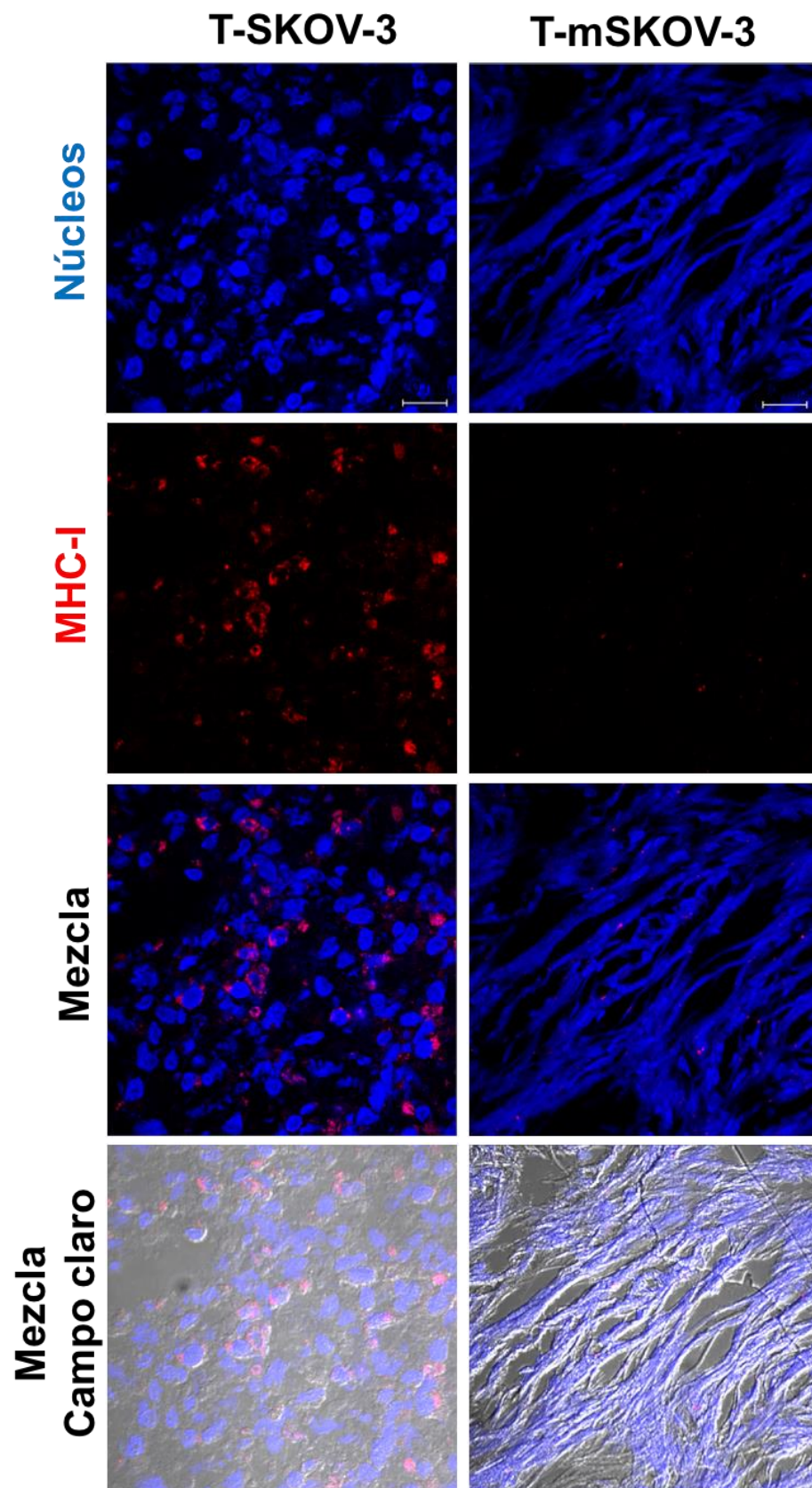


Figura 22. Detección del MHC-I en T-SKOV-3 y T-mSKOV-3.

Detección del MHC-I tumor generado por la línea celular SKOV-3 crecida en medio de cultivo convencional y mSKOV-3 (SKOV-3 mesenquimales inducidas por ascitis de COE) por microscopía confocal. Los tumores fueron criopreservados en medio de congelación y corte óptimo (Tissue Tek), se generaron cortes de 4 μm de grosor y se procesaron para inmunohistofluorescencia. Los núcleos se tiñeron con DAPI (dilución 1:50), el anticuerpo anti-MHC-I (1:100) se detectó con anticuerpo secundario anti-mouse-TRITC (1:100), tamaño de la barra: 20 μm .

XI. DISCUSIÓN

La disponibilidad de CMP recuperadas de ascitis permitió realizar análisis morfológicos, así como buscar la expresión de diferentes marcadores de los fenotipos epitelial y mesenquimal. Respecto a sus características morfológicas, se encontró que su tamaño era variable, encontrando células grandes y pequeñas; algunas de ellas mostraron una forma fusiforme con algunas protrusiones de membrana y otras mostraron estructuras conocidas como invadopodios, que son estructuras especializadas ricas en actina que ayudan a las células a realizar la invasión. Esta misma morfología se pudo apreciar como resultado del tratamiento de las células SKOV-3 con cinco ascitis diferentes provenientes de pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario epitelial. Además, el tamaño celular, el tamaño del núcleo y el citoesqueleto de actina en estas células cambiaron dramáticamente en presencia de ascitis, donde las fibras de estrés de la actina desaparecieron y el tamaño del núcleo disminuyó. Todas estas características y cambios observados en CMP así como en células SKOV-3 en condiciones de ascitis son típicos de células altamente invasivas. Como se ha indicado, las ascitis de pacientes con cáncer de ovario pueden alterar morfológicamente, fenotípicamente y funcionalmente las células que residen en ella [41].

Una característica importante de las células malignas es su capacidad de invadir y el tipo de migración celular se elige dependiendo de las características de la matriz extracelular y el microambiente [36]. Las células malignas invaden usando la migración colectiva durante el desarrollo del tumor, donde varias células malignas invaden juntas el tejido normal en el órgano. Mientras que la migración individual se deriva de la migración colectiva y las células malignas utilizan por lo menos dos maneras de realizar la migración individual. Si el microambiente y la matriz extracelular son blandos, las células grandes con un abundante citoplasma migran usando una migración de tipo ameboide, en la cual las células no necesitan realizar cambios celulares complejos y no expresan proteasas ni integrinas. Por el

contrario, si el microambiente y la matriz extracelular son rígidos, estas células eligen migrar usando una forma mesenquimal. En esta forma de migración las células malignas expresan las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$, reducen el tamaño de su núcleo y su citoplasma [20]. Así mismo, en varios tipos de cáncer se ha reportado que las células expresan también la integrina $\beta 4$ la cual está relacionada con la invasión. La integrina $\beta 1$ es utilizada por las células malignas como un receptor para la fibronectina, la integrina $\beta 3$ se utiliza para reconocer la vitronectina y la integrina $\beta 4$ es un receptor para las lamininas, todas ellas enfocadas a evaluar el microambiente de la matriz extracelular [30, 42]. Utilizando ensayos de inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal se evaluó la expresión de las integrinas $\beta 1$, $\beta 3$ y $\beta 4$. Estos receptores se evaluaron primero en células SKOV-3 en condiciones de ascitis. La integrina $\beta 1$ mostró una expresión fuerte y aumentada en la condición de ascitis. La integrina $\beta 3$ no se detectó en la condición de control, pero en la condición de ascitis la expresión aumentó significativamente. Finalmente, la integrina $\beta 4$ mostró una expresión disminuida cuando las células fueron tratadas con ascitis; sin embargo, este receptor estaba en algunos puntos de contacto entre células malignas. Posteriormente, la detección de estos receptores en CMP1 fue similar a la observada en SKOV-3 bajo la condición de ascitis, en comparación con las CMP2 que mostraron una disminución en la expresión de $\beta 1$, pobre expresión de $\beta 3$, mientras que la integrina $\beta 4$ resultó prácticamente indetectable. Estos resultados reflejan la heterogeneidad entre los tumores, y a la vez, permiten sugerir que la expresión de la integrina $\beta 4$ dependerá en gran medida de la composición de la matriz extracelular. El comportamiento de las CMP puede responder a varios factores que favorecen la heterogeneidad tumoral. La expresión o ausencia de este tipo de receptores refleja el comportamiento de estas células malignas con su entorno.

Con base en las características morfológicas observadas en las CMPs y en las células SKOV-3 en presencia de ascitis, así como la expresión diferencial de receptores relacionados con la invasividad permitió plantear la hipótesis de

que las células malignas residentes del peritoneo con ascitis adquieren un fenotipo más agresivo y en consecuencia son capaces de inducir una enfermedad más agresiva. Los procesos de reorganización del citoesqueleto y los cambios en la forma celular bajo la estimulación de ascitis sugieren fuertemente el desarrollo de un fenotipo celular específico que proporciona a las células la capacidad de emigrar, invadir y llevar a cabo el proceso de metástasis.

Con el objetivo de dar sustento a esta hipótesis, se decidió confirmar el fenotipo de estas células, comunicado habitualmente a partir de tejidos epiteliales (adenocarcinomas). Estas células pueden sufrir el proceso de transición epitelio-mesenquimal (TEM) que es un proceso de desdiferenciación para adquirir un fenotipo celular muy inmaduro con mayores tasas de proliferación, migración e invasión [43]. Para confirmar la inducción de la TEM, se analizó el patrón de expresión de la E-cadherina y de la vimentina con el fin de definir los fenotipos epiteliales y mesenquimales, respectivamente en las células SKOV-3 en las condiciones control y de ascitis. E-cadherina es un componente importante de las uniones adherentes, un tipo de unión intercelular característica del epitelio [41]. Vimentina es el principal componente del citoesqueleto de filamentos intermedios durante el desarrollo de los tejidos embrionarios y en el cáncer se utiliza como un marcador de células no maduras [44]. Esta proteína confiere una mayor flexibilidad celular que es un requisito importante para las células migrantes como ocurre durante el desarrollo del tejido. La E-cadherina se expresó en todas las condiciones (excepto en las células de los pacientes) con el peso molecular indicado de 80 kDa; sin embargo, también se encontró, en forma abundante, un fragmento de E-cadherina de 29 kDa, notoriamente aumentado en SKOV-3 pretratadas con ascitis. Se ha informado que este fragmento de E-cadherina se genera cuando las uniones adherentes se interrumpen [45]. Este fragmento aparece debido a la transformación de la proteína madura en respuesta a algunos factores que estimulan el estado TEM en un proceso descrito como el desprendimiento de algunos dominios [45]. Este fragmento de 29 kDa de E-cadherina se localizó

en el citoplasma celular como se demostró mediante resultados de microscopía confocal en condición de ascitis. Como se esperaba de acuerdo con el estado TEM, la vimentina se detectó solamente en la condición de ascitis, mientras que la etiqueta para la vimentina estaba completamente ausente en la condición control. Las estructuras de vimentina observadas en la condición de ascitis son características de los filamentos intermedios. Estos resultados muestran que las ascitis inducen el estado TEM en la línea celular SKOV-3; esto podría deberse a la presencia de TGF- β , ya que se ha reportado su presencia en la ascitis maligna en concentraciones variables [38, 39] y ha sido descrito como un inductor de TEM [46]. En el caso de las células malignas de los pacientes (CMP1, CMP2), se detectó señal para E-cadherina únicamente en vesículas celulares en el caso de la CMP1; se requieren experimentos adicionales para definir si éstas corresponden a vesículas de degradación o secreción. Por lo que respecta a vimentina, su detección en el mismo paciente fue muy fuerte; cabe resaltar que prácticamente todas las vesículas positivas para E-cadherina resultaron positivas también para vimentina. Además, el citoesqueleto de filamentos intermedios basado en vimentina se demostró con una alta definición en estas células malignas. Este hallazgo es muy relevante porque la presencia de ascitis suele estar relacionada con un mal pronóstico [47] y, como estos hallazgos indican, el principal actor para lograr la enfermedad agresiva parece ser la célula mesenquimal maligna presente en la ascitis; esta población muy probablemente es inducida y quizá reforzada por la ascitis.

Una vez detectado y confirmado el cambio de fenotipo celular hacia un fenotipo inmaduro, se decidió evaluar los cambios a nivel de expresión génica en las células mesenquimales bajo el microambiente tumoral reflejado por la ascitis. La evaluación solo constó de genes relacionados a cáncer humano. Respecto a los genes regulados positivamente (que incrementaron su expresión más de 1.5 veces) se encontraron algunos relacionados con la diferenciación celular, ciclo celular, reestructuración del citoesqueleto y respuesta inmune (TGF β , TGF α , p53, HDAC1, entre otros), lo cual apoya directamente los datos previos

observados en la adquisición de un fenotipo mesenquimal, que consiste en la diferenciación hacia un fenotipo inmaduro, cambios en el ciclo celular, en el citoesqueleto y en la capacidad de evitar su eliminación mediante la evasión del sistema inmunológico [48, 49]. Además de otras vías que pueden estar siendo activadas frecuentemente por las células mesenquimales que no han sido descritas y que requieren de un análisis y validación más profunda, tal es el caso de la vía que podría regular el factor de transcripción ZNF268, en transporte vesicular la SYTL3 y modificación de la matriz extracelular el COL6A6. Por otra parte, los genes que disminuyeron su expresión estuvieron más relacionados con expresión génica, reparación del DNA, angiogénesis, apoptosis y uniones celulares (EGF, VEGF, FANCA, TNF, BLC2, ACTB, etc.). Estos procesos reflejan el apagado de procesos como la muerte celular, la degeneración de las uniones celulares, la desregulación de proteínas de citoesqueleto basado en actina, entre otros. Estos eventos arrojan información acerca de la fina regulación que llevan a cabo las células mesenquimales en respuesta a un microambiente tumoral específico que puede representar en distintos grados un ambiente hostil [50, 51].

Para comprender mejor este proceso de transición epitelial-mesenquimal, se analizó el papel de la ascitis en el proteoma celular desencadenado por este fluido. Puiffe et al., (2007) analizaron 54 muestras independientes de ascitis y determinaron el efecto de este fluido en el fenotipo invasivo de las líneas celulares de COE; encontraron que un buen porcentaje de estas ascitis indujo invasividad de estas células, mientras que una buena proporción de los fluidos produjo el efecto opuesto. Finalmente, encontraron también un pequeño número aparentemente resultó irrelevante en este efecto estimulante; esto demuestra que cada ascitis es diferente y complejo, incluso cuando se trata de la misma enfermedad [11].

El modelo de estudio, basado en el tratamiento de la línea celular SKOV-3 con diferentes ascitis de COE, permitió analizar cambios morfológicos y proteómicos.

Una vez confirmado el proceso de la TEM, se realizó un análisis proteómico para identificar proteínas que se desregularon, reflejando así el estado de estas células. Los resultados obtenidos permitieron identificar algunos procesos y herramientas que estas células utilizan para sobrevivir y producir la enfermedad oncológica con gran éxito. Proteínas con expresiones cuantitativas promedio mayor a dos veces entre la ascitis y el medio de cultivo se consideraron como proteínas reguladas. Entre ellas, nueve fueron seleccionadas para una mayor discusión acerca de su posible papel en el desarrollo del cáncer. Las proteínas incrementadas seleccionadas y confirmadas a nivel de transcrito fueron la proteína Ran, la proteína de dedos de zinc 268, y Sinaptotagmina tipo 3. Ran es una GTPasa pequeña importante implicada en el transporte nuclear de diversas proteínas que participan en varios procesos y se ha informado que esta proteína se sobreexpresa en el cáncer de mama y renal y también se ha relacionado con el desarrollo de tumorigénesis y metástasis [52, 53]. La proteína dedos de zinc 268 funciona como un represor transcripcional. Esta proteína se ha asociado con el cáncer cérvico-uterino donde se ha encontrado sobreexpresado, y se asocia con tumorigénesis aumentada. Se ha demostrado que el *knockdown* de esta proteína se relaciona con el aumento de la señalización de NF- κ B, contribuyendo a la tumorigénesis, la proliferación celular y el crecimiento [54]. Sinaptotagmina tipo 3, es una proteína que puede funcionar como un efector para las proteínas Rab implicadas en el tráfico vesicular; también se une a los fosfolípidos en presencia de calcio en las células neuronales. Algunas funciones de esta proteína como la unión a varias vesículas, se infieren porque su función no se conoce bien [55]. Es importante mencionar que en el análisis proteómico se encontró un incremento en la vimentina, lo que confirma las observaciones previas sobre la determinación de la inducción del estado TEM (Tabla 3) por influencia de al menos cinco ascitis de COE.

Las proteínas disminuidas seleccionadas para validar a nivel de transcripción se asociaron con procesos tales como el transporte, evasión inmune, y la respuesta al estrés, principalmente. MHC clase I es una proteína que se

encuentra en la superficie celular de todas las células nucleadas que funciona principalmente como un complejo para la presentación de antígeno a las células T citotóxicas [56]. En el cáncer de pulmón, se ha sugerido que la reducción de esta proteína se utiliza como un mecanismo de escape de la vigilancia inmune [56-58], mientras que en las células malignas del cáncer de ovario, se ha reportado que la disminución de esta molécula constituye un mecanismo para evitar su eliminación mediada por células T CD8+ [57]. Por otro lado, la sinaptotagmina 1 puede participar en la regulación de las interacciones de la membrana durante el tráfico de vesículas sinápticas en la zona dinámica de la sinapsis. Además, se ha documentado una interacción dependiente del calcio entre la sinaptotagmina 1 y los receptores putativos para la proteína C quinasa activada. Por otra parte, hay informes sobre su participación en la formación de dendritas por los melanocitos [59]. Sin embargo, la forma en que esta proteína funciona dentro de un proceso específico como el cáncer nose conoce bien.

Arf1, una ADP-ribosil transferasa, participa en el tráfico de proteínas en diferentes compartimentos y regula la formación de vesículas [60]. En su forma unida a GTP, desencadena la asociación de proteínas con membranas de Golgi, la hidrólisis de Arp1 GTP, que es mediada por las proteínas ArfGAPs, es necesaria para la disociación de proteínas de membrana del complejo de Golgi y vesículas. Desactivar esta proteína induce la redistribución del aparato de Golgi al retículo endoplasmático, lo que sugiere un papel crucial en el tráfico vesicular de proteínas. En el cáncer de ovario epitelial, se ha informado que una mayor expresión de esta proteína promueve la tasa de migración [61]. Sin embargo, nuestros resultados muestran una disminución de esta proteína en presencia de ascitis.

HSPB1, también denominada HSP27, es un miembro de una familia de proteínas de choque térmico pequeñas de humano. Estas proteínas se caracterizan por la presencia de un dominio alfa altamente conservado. Esta proteína tiene una actividad de chaperona que modula la estructura de las proteínas [62, 63]. La sobreexpresión de esta proteína está relacionada con

un fenotipo de células altamente migrantes e invasivas; el *knockdown* de HSPB1 reveló la pérdida de estas características, así como una disminución en la capacidad de desarrollar metástasis [64, 65]. Numerosos estudios sugieren que el aumento de la expresión de esta proteína está relacionado con la resistencia a la quimioterapia. La ribonucleoproteína 1 nuclear heterogénea, un componente de los complejos de ribonucleoproteínas nucleares, está implicada en la biogénesis del ARNm, mediante el empalme alternativo del mediador apoptótico Bcl-x [66]; los altos niveles de fosforilación correlacionan con cáncer de mama HER2 positivo [67].

Por último, se recurrió a los análisis bioinformáticos utilizando la lista completa de proteínas identificadas mediante análisis proteómico y las principales interacciones para realizar las redes PPI; estos análisis permitieron reconocer el impacto de los cambios inducidos por la ascitis en la línea celular SKOV-3. Este modelo simula los estadios avanzados de esta enfermedad, donde el microambiente tumoral es altamente dinámico y las pacientes que acumulan ascitis poseen una tasa de mortalidad muy alta. Los procesos más notables que llevan a cabo las células malignas bajo este microambiente se relacionan con un aumento de proliferación, migración, invasión, metástasis y supervivencia celular.

En el caso de las proteínas reguladas positivamente se encontró que las células malignas que expresan vimentina y citoqueratina 8 abundantemente, generalmente son células muy inmaduras y poseen altas tasa de migración e invasión; además, otras proteínas como Ran ayudan a transportar varios factores importantes al núcleo y esta acción induce la activación de vías de señalización como la vía Jak-Stat, importante durante la respuesta inmune mediada por citoquinas y durante la regulación de la proliferación, migración y apoptosis . Estudios recientes indican un papel no canónico para algunos elementos de esta vía que indican su participación en un aumento de tumorigénesis [68].

Por otra parte, las proteínas reguladas negativamente identificadas son susceptibles a la modificación por la proteína ubiquitina C (UBC); esta modificación confiere varios efectos sobre la proteína diana. Ejemplos de esto son la activación o inactivación de proteínas, la interacción proteína-proteína, el tráfico vesicular y la degradación a través de proteasoma [69].

La comprobación de la desregulación del MHC-I mediante inmunofluorescencia, confirmó el hallazgo realizado por proteómica y que describe una desregulación de esta molécula en al menos cinco cultivos de mSKOV-3 inducidas por cinco diferentes ascitis de COE. Si bien ya se conoce que la desregulación del MHC-I ha sido vinculada a la evasión de la respuesta inmunológica [70], no se debe perder de vista que estos reportes se han basado en el análisis de tumores primarios o secundarios los cuales exhiben el fenotipo epitelial que los ha generado (en cáncer de ovario epitelial: seroso alto grado, endometriode, mucinoso, seroso papilar bajo grado y células claras), a diferencia de los hallazgos que se reportan en este trabajo y que indican que las células mesenquimales (que en forma rutinaria en la clínica no se buscan y por lo tanto no se detectan) además de su inmadurez característica que le confiere alta movilidad, utilizan otros mecanismos para evitar ser reconocidas por elementos del sistema inmunológico.

Todos los cambios enlistados anteriormente reflejan una respuesta general hacia la ascitis de COE de la línea celular de cáncer ovárico SKOV-3, lo cual se asemeja mucho a lo que ocurre en la paciente oncológica. Algunos de estos cambios se producen como una respuesta de la célula transformada para sobrevivir y evitar el daño inducido por la respuesta inmune. Mientras que otros cambios obedecen a la construcción de un microambiente donde las señales de proliferación o señales que promueven la invasión y las metástasis hacia otros órganos predominan para garantizar su supervivencia y la dominación.

XII. CONCLUSIÓN

La ascitis se genera en estadios avanzados del cáncer de ovario epitelial y representa un importante factor de pronóstico. Las células malignas en la ascitis pueden iniciar una transición epitelio-mesénquima para adquirir un fenotipo inmaduro que confiere un comportamiento celular más agresivo. Esto les permite aumentar su proliferación, su capacidad invasora y especialmente su capacidad para realizar metástasis y evitar la respuesta del sistema inmune. Los resultados aquí reportados indican que el efecto de este fluido en el proteoma de las células transformadas conduce a una activación de varios procesos entre los que se pueden mencionar el control del ciclo celular, el transporte vesicular y la evasión de la respuesta inmune, la degradación y modificación de la matriz extracelular y la resistencia a agentes quimioterapéuticos. Sugerimos que este trabajo representa una fuente interesante de información que tiene el potencial de ser evaluado para el diseño de terapias dirigidas contra estas células malignas indiferenciadas que cambian fácilmente su fenotipo para sobrevivir y que no han sido considerados como objetivos de las terapias convencionales para cáncer de ovario epitelial.

XIII. PERSPECTIVAS

1. Determinar la participación de las células mesenquimales presentes en la ascitis de COE en la recurrencia de la enfermedad.
2. Analizar la participación de algunas de las proteínas identificadas en nuevos procesos de agresividad como evasión de la respuesta inmune o activación de vías de señalización asociadas a quimioresistencia no reportada en células mesenquimales.
3. Determinar el potencial de las proteínas identificadas como biomarcadores de diagnóstico o pronóstico y como blanco terapéutico del COE.

XIV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Roett MA, Evans P (2009). Ovarian cancer: an overview *Am Fam Physician* **80**, 609-616.
- [2] World Health Organization IAfRoC (2012). *GLOBOCAN: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide 2012*. Editor (ed)^(eds): City.
- [3] Geografía iNdEy (2009). *Cáncer de ovario*. Editor (ed)^(eds): City.
- [4] Okamura H, Katabuchi H, Nitta M, Ohtake H (2006). Structural changes and cell properties of human ovarian surface epithelium in ovarian pathophysiology *Microsc Res Tech* **69**, 469-481.
- [5] Fleming JS, Beaugie CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL (2006). Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses *Mol Cell Endocrinol* **247**, 4-21.
- [6] Chien JR, Aletti G, Bell DA, Keeney GL, Shridhar V, Hartmann LC (2007). Molecular pathogenesis and therapeutic targets in epithelial ovarian cancer *J Cell Biochem* **102**, 1117-1129.
- [7] Shih le M, Kurman RJ (2004). Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis *Am J Pathol* **164**, 1511-1518.
- [8] Dolores GR (2016). *Cáncer de Ovario Epitelial*, Vol. 8. PyDESA: Mexico.
- [9] Masoumi Moghaddam S, Amini A, Morris DL, Pourgholami MH (2012). Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer *Cancer Metastasis Rev* **31**, 143-162.
- [10] Wang F, Chang Z, Fan Q, Wang L (2014). Epigallocatechin3gallate inhibits the proliferation and migration of human ovarian carcinoma cells by modulating p38 kinase and matrix metalloproteinase2 *Mol Med Rep* **9**, 1085-1089.
- [11] Puiffe ML, Le Page C, Filali-Mouhim A, Zietarska M, Ouellet V, Tonin PN, Chevrette M, Provencher DM, Mes-Masson AM (2007). Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer *Neoplasia* **9**, 820-829.
- [12] Morone S, Augeri S, Cuccioloni M, Mozzicafreddo M, Angeletti M, Lo Buono N, Giacomino A, Ortolan E, Funaro A (2014). Binding of CD157 protein to fibronectin regulates cell adhesion and spreading *J Biol Chem* **289**, 15588-15601.
- [13] Tan DS, Agarwal R, Kaye SB (2006). Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer *Lancet Oncol* **7**, 925-934.
- [14] Lengyel E (2010). Ovarian cancer development and metastasis *Am J Pathol* **177**, 1053-1064.
- [15] Friedl P, Gilmour D (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 445-457.
- [16] Dong Y, Loessner D, Irving-Rodgers H, Obermair A, Nicklin JL, Clements JA (2014). Metastasis of ovarian cancer is mediated by kallikrein related peptidases *Clin Exp Metastasis* **31**, 135-147.
- [17] Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T (2012). The tumor microenvironment at a glance *J Cell Sci* **125**, 5591-5596.
- [18] Barbieri F, Bajetto A, Florio T (2010). Role of chemokine network in the development and progression of ovarian cancer: a potential novel pharmacological target *J Oncol* **2010**, 426956.

- [19] Scarlett UK, Conejo-Garcia JR (2012). Modulating the tumor immune microenvironment as an ovarian cancer treatment strategy *Expert Rev Obstet Gynecol* **7**, 413-419.
- [20] Quail DF, Joyce JA (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis *Nat Med* **19**, 1423-1437.
- [21] Garrison RN, Galloway RH, Heuser LS (1987). Mechanisms of malignant ascites production *J Surg Res* **42**, 126-132.
- [22] Nagy JA, Herzberg KT, Dvorak JM, Dvorak HF (1993). Pathogenesis of malignant ascites formation: initiating events that lead to fluid accumulation *Cancer Res* **53**, 2631-2643.
- [23] Ahmed N, Riley C, Oliva K, Rice G, Quinn M (2005). Ascites induces modulation of alpha6beta1 integrin and urokinase plasminogen activator receptor expression and associated functions in ovarian carcinoma *Br J Cancer* **92**, 1475-1485.
- [24] Kalluri R, Weinberg RA (2009). The basics of epithelial-mesenchymal transition *J Clin Invest* **119**, 1420-1428.
- [25] Lamouille S, Xu J, Derynck R (2014). Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 178-196.
- [26] Heerboth S, Housman G, Leary M, Longacre M, Byler S, Lapinska K, Willbanks A, Sarkar S (2015). EMT and tumor metastasis *Clin Transl Med* **4**, 6.
- [27] Wang J, Wei Q, Wang X, Tang S, Liu H, Zhang F, Mohammed MK, Huang J, Guo D, Lu M, et al. (2016). Transition to resistance: An unexpected role of the EMT in cancer chemoresistance *Genes Dis* **3**, 3-6.
- [28] Davidson B, Trope CG, Reich R (2012). Epithelial-mesenchymal transition in ovarian carcinoma *Front Oncol* **2**, 33.
- [29] Fang D, Chen H, Zhu JY, Wang W, Teng Y, Ding HF, Jing Q, Su SB, Huang S (2017). Epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells is sustained by Rac1 through simultaneous activation of MEK1/2 and Src signaling pathways *Oncogene* **36**, 1546-1558.
- [30] Villegas-Pineda JC, Garibay-Cerdenares OL, Hernandez-Ramirez VI, Gallardo-Rincon D, Cantu de Leon D, Perez-Montiel-Gomez MD, Talamas-Rohana P (2015). Integrins and haptoglobin: Molecules overexpressed in ovarian cancer *Pathol Res Pract* **211**, 973-981.
- [31] Garibay-Cerdenares OL, Hernandez-Ramirez VI, Osorio-Trujillo JC, Hernandez-Ortiz M, Gallardo-Rincon D, Cantu de Leon D, Encarnacion-Guevara S, Villegas-Pineda JC, Talamas-Rohana P (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.
- [32] Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- [33] Encarnacion S, Guzman Y, Dunn MF, Hernandez M, del Carmen Vargas M, Mora J (2003). Proteome analysis of aerobic and fermentative metabolism in *Rhizobium etli* CE3 *Proteomics* **3**, 1077-1085.
- [34] Giannopoulou EG, Garbis SD, Vlahou A, Kossida S, Lepouras G, Manolagos ES (2009). Proteomic feature maps: a new visualization approach in proteomics analysis *J Biomed Inform* **42**, 644-653.
- [35] Magdeldin S, Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z, Lokamani I, Yaoita E, Yamamoto T (2014). Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis *Clin Proteomics* **11**, 16.

- [36] Krakhmal NV, Zavyalova MV, Denisov EV, Vtorushin SV, Perelmuter VM (2015). Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms *Acta Naturae* **7**, 17-28.
- [37] Lee S, Yang Y, Fishman D, Banaszak Holl MM, Hong S (2013). Epithelial-mesenchymal transition enhances nanoscale actin filament dynamics of ovarian cancer cells *J Phys Chem B* **117**, 9233-9240.
- [38] David JM, Rajasekaran AK (2012). Dishonorable discharge: the oncogenic roles of cleaved E-cadherin fragments *Cancer Res* **72**, 2917-2923.
- [39] Steinhilber U, Weiske J, Badock V, Tauber R, Bommert K, Huber O (2001). Cleavage and shedding of E-cadherin after induction of apoptosis *J Biol Chem* **276**, 4972-4980.
- [40] Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2009). Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources *Nat Protoc* **4**, 44-57.
- [41] Carduner L, Leroy-Dudal J, Picot CR, Gallet O, Carreiras F, Kellouche S (2014). Ascites-induced shift along epithelial-mesenchymal spectrum in ovarian cancer cells: enhancement of their invasive behavior partly dependant on alpha v integrins *Clin Exp Metastasis* **31**, 675-688.
- [42] Hendrix MJ, Seftor EA, Seftor RE, Trevor KT (1997). Experimental co-expression of vimentin and keratin intermediate filaments in human breast cancer cells results in phenotypic interconversion and increased invasive behavior *Am J Pathol* **150**, 483-495.
- [43] Huang RY, Chung VY, Thiery JP (2012). Targeting pathways contributing to epithelial-mesenchymal transition (EMT) in epithelial ovarian cancer *Curr Drug Targets* **13**, 1649-1653.
- [44] Kim YS, Yi BR, Kim NH, Choi KC (2014). Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells *Exp Mol Med* **46**, e108.
- [45] Verkhovsky AB (2015). The mechanisms of spatial and temporal patterning of cell-edge dynamics *Curr Opin Cell Biol* **36**, 113-121.
- [46] Krstic J, Trivanovic D, Mojsilovic S, Santibanez JF (2015). Transforming Growth Factor-Beta and Oxidative Stress Interplay: Implications in Tumorigenesis and Cancer Progression *Oxid Med Cell Longev* **2015**, 654594.
- [47] Bell DA (2005). Origins and molecular pathology of ovarian cancer *Mod Pathol* **18 Suppl 2**, S19-32.
- [48] Minafra L, Bravata V, Forte GI, Cammarata FP, Gilardi MC, Messa C (2014). Gene expression profiling of epithelial-mesenchymal transition in primary breast cancer cell culture *Anticancer Res* **34**, 2173-2183.
- [49] Yi BR, Kim TH, Kim YS, Choi KC (2015). Alteration of epithelial-mesenchymal transition markers in human normal ovaries and neoplastic ovarian cancers *Int J Oncol* **46**, 272-280.
- [50] Kim S, Kim B, Song YS (2016). Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer *Cancer Sci* **107**, 1173-1178.
- [51] Barbolina MV, Moss NM, Westfall SD, Liu Y, Burkhalter RJ, Marga F, Forgacs G, Hudson LG, Stack MS (2009). Microenvironmental regulation of ovarian cancer metastasis *Cancer Treat Res* **149**, 319-334.
- [52] Clarke PR, Zhang C (2008). Spatial and temporal coordination of mitosis by Ran GTPase *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 464-477.
- [53] Matchett KB, McFarlane S, Hamilton SE, Eltuhamy YS, Davidson MA, Murray JT, Faheem AM, El-Tanani M (2014). Ran GTPase in nuclear envelope formation and cancer metastasis *Adv Exp Med Biol* **773**, 323-351.

- [54] Hu L, Wang W, Cai J, Luo J, Huang Y, Xiong S, Li W, Guo M (2013). Aberrant expression of ZNF268 alters the growth and migration of ovarian cancer cells *Oncol Lett* **6**, 49-54.
- [55] Fukuda M (2002). The C2A domain of synaptotagmin-like protein 3 (Slp3) is an atypical calcium-dependent phospholipid-binding machine: comparison with the C2A domain of synaptotagmin I *Biochem J* **366**, 681-687.
- [56] Bubenik J (2004). MHC class I down-regulation: tumour escape from immune surveillance? (review) *Int J Oncol* **25**, 487-491.
- [57] Kono K, Halapi E, Hising C, Petersson M, Gerdin E, Vanky F, Kiessling R (1997). Mechanisms of escape from CD8+ T-cell clones specific for the HER-2/neu proto-oncogene expressed in ovarian carcinomas: related and unrelated to decreased MHC class I expression *Int J Cancer* **70**, 112-119.
- [58] Pantel K, Schlimok G, Kutter D, Schaller G, Genz T, Wiebecke B, Backmann R, Funke I, Riethmuller G (1991). Frequent down-regulation of major histocompatibility class I antigen expression on individual micrometastatic carcinoma cells *Cancer Res* **51**, 4712-4715.
- [59] Fukuda M, Mikoshiba K (2001). Synaptotagmin-like protein 1-3: a novel family of C-terminal-type tandem C2 proteins *Biochem Biophys Res Commun* **281**, 1226-1233.
- [60] D'Souza-Schorey C, Chavrier P (2006). ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 347-358.
- [61] Casalou C, Faustino A, Barral DC (2016). Arf proteins in cancer cell migration *Small GTPases* **7**, 270-282.
- [62] Arrigo AP, Gibert B (2014). HspB1, HspB5 and HspB4 in Human Cancers: Potent Oncogenic Role of Some of Their Client Proteins *Cancers (Basel)* **6**, 333-365.
- [63] Geisler JP, Geisler HE, Tammela J, Wiemann MC, Zhou Z, Miller GA, Crabtree W (1998). Heat shock protein 27: an independent prognostic indicator of survival in patients with epithelial ovarian carcinoma *Gynecol Oncol* **69**, 14-16.
- [64] Arts HJ, Hollema H, Lemstra W, Willemse PH, De Vries EG, Kampinga HH, Van der Zee AG (1999). Heat-shock-protein-27 (hsp27) expression in ovarian carcinoma: relation in response to chemotherapy and prognosis *Int J Cancer* **84**, 234-238.
- [65] Elpek GO, Karaveli S, Simsek T, Keles N, Aksoy NH (2003). Expression of heat-shock proteins hsp27, hsp70 and hsp90 in malignant epithelial tumour of the ovaries *APMIS* **111**, 523-530.
- [66] Sun YL, Liu F, Liu F, Zhao XH (2016). Protein and gene expression characteristics of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 in esophageal squamous cell carcinoma *World J Gastroenterol* **22**, 7322-7331.
- [67] Zhang D, Tai LK, Wong LL, Putti TC, Sethi SK, Teh M, Koay ES (2008). Proteomic characterization of differentially expressed proteins in breast cancer: Expression of hnRNP H1, RKIP and GRP78 is strongly associated with HER-2/neu status *Proteomics Clin Appl* **2**, 99-107.
- [68] Barres V, Ouellet V, Lafontaine J, Tonin PN, Provencher DM, Mes-Masson AM (2010). An essential role for Ran GTPase in epithelial ovarian cancer cell survival *Mol Cancer* **9**, 272.
- [69] Pickart CM, Eddins MJ (2004). Ubiquitin: structures, functions, mechanisms *Biochim Biophys Acta* **1695**, 55-72.
- [70] Bubenik J (2005). MHC class I down regulation, tumour escape from immune surveillance and design of therapeutic strategies *Folia Biol (Praha)* **51**, 1-2.

