



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Análisis de la expresión de PHF20L1 en células de cáncer de ovario y su posible participación en el desarrollo de cáncer de ovario”

T E S I S

Que presenta

M. en C. Dulce Rosario Alberto Aguilar

Para obtener el grado de

DOCTORA EN CIENCIAS

Directora de la Tesis:
Dra. Patricia Talamás Rohana

El presente trabajo se realizó bajo la tutoría de la doctora Patricia Talamás Rohana, en el laboratorio de inmunología del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular ubicado en CINVESTAV-ZACATENCO.

Este proyecto fue financiado por el proyecto CONACYT- Fondo Sectorial de Salud (233739) y una beca estudiantil del CONACYT (338858)

Dedicatorias

A Dios, por permitirme vivir plenamente estos 29 años, haciendo lo que más me gusta, aprender.

A mis Padres, **Zótico y Florencia**, porque me dieron la vida y su apoyo en cada paso que he dado, confiando en que lo que hago los hará sentir orgullosos.

A mis hermanos y hermanas y toda la gran familia que somos. Porque el saber que existen me da la fortaleza para procurar ser mejor cada día.

A mi esposo, **Jesús Antonio Hernández Vergara**, porque su amor y paciencia nos han permitido crear una maravillosa historia a lo largo de todos estos años.

A mi nueva y amorosa familia, los Hernández Régules y los Vergara Cabrera. En quienes descubrí que puedes sentirte como en casa aunque no sea tu casa.

Agradecimientos

A mi tutora de tesis, la doctora **Patricia Talamás Rohana**, quién desde el primer día que la conocí me brindó su apoyo incondicional, su guía y sus consejos a lo largo de todo este camino de 6 fructíferos años, donde no sólo me enseñó cómo hacer investigación, también me enseñó como ser una mejor persona.

A mis asesores de tesis, la doctora **Rosa María del Angel**, el doctor **José Luis Rosales Encina**, el doctor **Mario Alberto Rodríguez Rodríguez**, el doctor **José Eduardo Pérez Salazar**, porque gracias a su experiencia y consejos pude mejorar sustancialmente mi trabajo experimental, y junto a los miembros de sus respectivos laboratorios siempre me apoyaron con recomendaciones, reactivos o equipos de laboratorio.

A la doctora **Dolores Gallardo Rincón**, quien además de ser mi asesora de tesis, junto a la doctora Paty, es el vínculo entre el CINVESTAV y el Instituto Nacional de Cancerología. Porque el trabajar con muestras biológicas de pacientes con cáncer, hace que el compromiso con el que trabajamos sea mayor; y la esperanza de aportar un granito de arena en esta lucha contra el cáncer de ovario es el motor de todos los que trabajamos en esta área.

Al departamento de **Infectómica y Patogénesis Molecular**, por permitirme desarrollar mis proyectos de maestría y doctorado en sus instalaciones.

A la coordinadora Académica, la doctora **Ana Lorena Gutierrez Escolano**, quién siempre estuvo disponible ante cualquier asunto académico que se nos presentó con la amabilidad que la caracteriza.

Al personal académico del departamento, en especial al doctor **Juan Ludert**, el doctor **Victor Tsutsumi**, y a los integrantes de sus laboratorios, quienes en gran medida me apoyaron en mis experimentos y con recomendaciones y consejos que fueron muy importantes para mí.

Al personal administrativo del departamento, en especial a la señora **Maria Marcela Guzmán Rodríguez**, a **Martha Dueñas**, a **Irma Miranda Orea** y **Martha Gisela Aguilar Romero**, quienes a lo largo de estos 6 años me apoyaron.

A los auxiliares, en especial a los del laboratorio 9 y del laboratorio 7, **Verónica Ivonne Hernández Ramírez**, **Juan Carlos Osorio Trujillo**, **Daniel Morales**, **Lidia Bailon** y **Patricia Espíritu**, porque sin su apoyo no habría sido capaz de aprender tantas cosas.

A mis compañeros de laboratorio, los que estuvieron antes que yo y compartieron conmigo su experiencia y conocimiento, a los que llegaron después de mí, de quienes también aprendí muchas cosas valiosas.

A mis compañeros de generación, aunque no estamos todos los que iniciamos la maestría, aún conservo los bonitos momentos que pasamos, los momentos divertidos y aquellas profundas conversaciones de ciencia que teníamos cuando nos reuníamos.

A mi entrañable amiga, **Nayely Paulina Alvear Hernández**, en quien encontré más que a una amiga, una hermana, quién me apoyo y me aguantó en mis mejores y peores momentos, académicos y no académicos.

Al **CINVESTAV**, por permitirme hacer uso de sus instalaciones y formar parte de este gran grupo de investigadores orgullosos de pertenecer a este maravilloso centro de investigación.

Al **CONACyT** por haber financiado mi posgrado, otorgandome la beca estudiantil 338858 y confiando en que seguirá apoyando el desarrollo de la ciencia en México, pues como decía Bill Nye “la ciencia es la clave de nuestro futuro”.

En el fondo, los científicos somos gente con suerte: podemos jugar a lo que queramos durante toda la vida.

Lee Smolin

ÍNDICE

I.	Introducción.....	1
1.	Cáncer de ovario.....	1
1.1.	Generalidades.....	1
1.1.1.	Clasificación del cáncer de ovario.....	1
1.1.2.	Etapas clínicas.....	2
1.2.	Estadísticas de cáncer de ovario en México y en el mundo	2
1.3.	Anomalías y síndromes genéticos	3
1.4.	Herramientas de diagnóstico actuales	3
1.5.	Terapéutica actual.....	5
1.6.	El microambiente en cáncer de ovario.....	6
1.6.1.	Producción de líquido ascítico y transición epitelio mesenquimal.....	6
2.	Biomarcadores en cáncer: reguladores transcripcionales.....	10
3.	PHF20L1.....	11
3.1.	Características generales de la proteína.....	11
3.1.1.	Estructura y dominios.....	11
3.1.2.	Funciones principales conocidas.....	13
3.2.	Participación de la proteína en cáncer.....	13
4.	Antecedentes directos.....	14
II.	Justificación.....	18
III.	Hipótesis.....	19
IV.	Objetivos.....	19
V.	Estrategia Metodológica.....	20
VI.	Materiales y Métodos.....	20
VII.	Resultados.....	35
VIII.	Discusión.....	69
IX.	Conclusión.....	78
X.	Perspectivas.....	79
XI.	Referencias.....	80
XII.	Anexo 1.....	90
XIII.	Anexo 2.....	96

Lista de figuras

- Figura 1. Gráficas de las tasas de incidencia (superior) y mortalidad (inferior) de los principales tipos de cáncer, según los registros del GLOBOCAN 2018
- Figura 2. Un modelo esquemático ilustrativo de la metástasis de cáncer de ovario en el microambiente tumoral
- Figura 3. Vías metabólicas de la TEM
- Figura 4. Estructura y dominios de las isoformas de PHF20L1.
- Figura 5. Histología de ovario libre de cáncer
- Figura 6. Imagen representativa de la asignación de células positivas y negativas
- Figura 7. Imágenes representativas de la expresión de PHF20L1 en cortes de tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario epitelial
- Figura 8. Imágenes representativas de la expresión de PHF20L1 a nivel de citoplasma o núcleo en dos cortes de tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario epitelial
- Figura 9. Imágenes del tejido número 2
- Figura 10. Análisis de la expresión de PHF20L1 en tejido de pacientes con cáncer de ovario
- Figura 11. Curva de supervivencia libre de progresión y supervivencia global
- Figura 12. Patrón de expresión de las isoformas de PHF20L1 en células SKOV-3 estimuladas con ascitis de pacientes con cáncer de ovario.
- Figura 13. Análisis estadísticos de la expresión de PHF20L1 mediante Western blot.
- Figura 14. PHF20L1 se expresa de manera basal en diferentes líneas celulares de cáncer
- Figura 15. Análisis de la expresión de las isoformas de PHF20L1 en células OVCAR-3 estimuladas con ascitis de pacientes con cáncer de ovario
- Figura 16. Expresión de PHF20L1 mediante inmunofluorescencia en células SKOV-3 bajo el estímulo de 9 ascitis diferentes
- Figura 17. Expresión de PHF20L1 mediante inmunofluorescencia en células OVCAR-3 bajo el estímulo de 5 ascitis diferentes
- Figura 18. Análisis de correlación entre PHF20L1 y la fucosilación
- Figura 19. Imagen representativa del inmunoprecipitado
- Figura 20. Red de interacción y clasificación de las proteínas identificadas en el complejo proteico formado durante la inmunoprecipitación de extractos de células control, con el anticuerpo anti-PHF20L1
- Figura 21. Red de interacción y clasificación de las proteínas identificadas en el complejo proteico formado durante la inmunoprecipitación de extractos de células estimuladas con ascitis, con el anticuerpo anti-PHF20L1
- Figura 22. Co-IP de la Histona 2A con PHF20L1
- Figura 23. Participación de PHF20L1 en el ciclo celular
- Figura 24. Distribución comparativa de las células en el ciclo celular en presencia y ausencia de ascitis
- Figura 25. Micrografías de los cultivos que se sometieron al silenciamiento de PHF20L1 en células SKOV-3.

- Figura 26. El uso de siRNAs abate la expresión de PHF20L1.
 Figura 27. Micrografías de las heridas visualizadas en una cinética de tiempo
 Figura 28. Ensayo de herida y cierre.
 Figura 29. Análisis de proliferación celular.
 Figura 30. Ensayo de invasión en presencia y ausencia de la expresión de PHF20L1

Lista de tablas

- Tabla 1. Lista de prediccción de proteínas que pueden tener interacción con PHF20L1.....16
 Tabla 2. Características clínicas de las pacientes con cáncer de ovario cuyos cortes de tejido tumoral fueron empleados en este proyecto.
 Tabla 3. Características clínicas de las pacientes con cáncer de ovario cuyos líquidos ascíticos fueron empleados en este proyecto.....21
 Tabla 4. Porcentaje de células positivas a la expresión de la proteína PHF20L1.
 Tabla 5. Análisis de correlación de *Spearman* entre la expresión de PHF20L1 y datos clínicos de las pacientes
 Tabla 6. Proteínas identificadas a partir de la inmunoprecipitación con PHF20L1.

Glosario de abreviaturas

APP	Proteína precursora amiloidea, «Amyloid Precursor Protein»
ATF1	Activating Transcription Factor 1, «Factor activador de Transcripción»
BRCA1	breast cancer 1, «cáncer de mama 1»
BRCA2	breast cancer 2, «cáncer de mama 2»
BRPF1	Peregrin
CA125	Cancer antigen 125, «Antígeno del cáncer 125»
CaOv	Cáncer de Ovario
CASP10	Caspasa 10, «Caspase 10»
CD14	Grupo de diferenciación, «cluster of differentiation»
CDH1	Cadherina 1, «Cadherin 1»
CDK12	Cyclin Dependent Kinase 12, «Cinasa dependiente de Ciclina 12»
CDKN1A	Inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina 1A, «Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A»
CO ₂	Dióxido de Carbono
COE	Cáncer de ovario epitelial
Cul3	Culina 3, «Cullin-3»
DNMT1	Metiltransferasa de ADN 1, «DNA Methyltransferase 1»
DNMT3B	Metiltransferasa de ADN 3B, «DNA Methyltransferase 3B»
DTNA	Distrobrevin alfa
DUF	Dominio de función desconocida, «domain of unknown function»
DVL	Dishevelled
EGFR	Receptor del Factor de crecimiento epidermal
ERG	Gen asociado a Eritoblasto Específico de Transformación (ETS), «ETS-related gene»
ESR1	Receptor de estrógeno 1, Estrogen Receptor 1
EZH2	Potenciador de homólogo zeste 2, «Enhancer of zeste homolog 2»
FOKK2	Proteína de caja de horquilla K2, «Forkhead box protein K2»
FOXM1	Forkhead Box M1
GRO-1	«C-X-C Motif Chemokine Ligand 1»
HDAC1	Desacetilasa de histona, «Histone deacetylase 1»
HE4	Proteína epididimal humana 4, «Human Epididymus Protein 4»
HGSP	Seroso Papilar de alto grado, «High Grade Serous Papillary»
HIF1 α	Factor inducible por hipoxia 1 α
HRP	Peroxidasa de rábano, «horse radish peroxidase»
IFFO1	Isoforma X11 de la familia de filamentos intermedios Orphan 1
IGHV1-2	Región variable de la cadena pesada de la gamma inmunoglobulina 1
IL	Interleucina
IP	Inmunoprecipitación
JAK	Quinasas Janus, «Janus kinase»
KAT8	Acetiltransferasa 8 de lisina, «Lysine Acetyltransferase 8»
KDM1A	Desmetilasa de Lisina 1A, «Lysine Demethylase 1A»

KO	Knock down
KRT10	Keratina 10
KRT8	Keratina 8
LA	Líquido ascítico
LPA	Ácido lisofosfatídico
MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time-Of-Flight
Mbd2	Proteína 2 de dominio de unión a metil CpG, «Methyl-CpG-binding domain protein 2»
MBT	Tumor cerebral maligno, «Malignant Brain Tumor»
MCP-1	Proteína quimioatrayente de monocitos, «Monocyte chemoattractant protein-1»
MNC	Membrana de nitrocelulosa
MTA1	Proteína 1 asociada a metástasis, «metastasis-associated protein 1»
MyD88	Respuesta primaria de diferenciación mieloides 88, «Myeloid differentiation primary response 88»
Na ₂ VO ₄	Ortovanadato de sodio
NaF	Fluoruro de sodio
NF-κB	Factor nuclear kappa B, «Nuclear factor kappa B»
NF1	Neurofibromina, «Neurofibromin»
NFAT	Factor nuclear de células T activadas, «Nuclear factor of activated T-cells»
NuRD	Remodelamiento del nucleosoma y desacetilación, «Nucleosome Remodeling and Deacetylation»
PARP	Poli ADP ribosa polimerasa, «Poly (ADP-ribose) Polymerase»
PBS	Amortiguador salino de fosfatos
PHD	Homeodominio de la planta, «plant homeodomain»
PHF20L1	Proteína 20 similar a la proteína 1 con dominio PHD, «PHD Finger Protein 20 Like 1»
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PTCH	Homólogo parcheado «Patched Homolog»
RB1	Proteína del retinoblastoma, «Retinoblastoma protein 1»
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa, «Reverse transcription polymerase chain reaction»
SBA	Albumina sérica bovina
SDS-PAGE	Electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SMAD2	Madres contra el homólogo decantapléjico 2, «Mothers Against Decantaplegic homolog»
SNAI1	Represor Transcripcional de la familia Snail 1 «Snail Family Transcriptional Repressor 1»
Sox2	Región determinante del sexo Caja Y 2, «Sex determining Region Y-box 2»
STAT	Señal de transductor y activador de la transcripción, «Signal Transducer and Activator of Transcription»
STAT1	Transductor de señal activador de transcripción 1, «Signal Transducer And Activator of Transcription 1»
STK11	Cinasa de Serina/Treonina 11, «Serine/threonine kinase 11»
TBS-T	Amortiguador Tris-Salino con Tween 20
TCR	Receptor de célula T, «T-cell receptor»

TEM	Transición epitelio mesénquima
TERT	Telomerasa transcriptasa reversa, «Telomerase reverse transcriptase»
TFF1	Factor Trefoil 1, «Trefoil Factor 1»
TGIF	Factor inducido por TGFB, «TGFB induced factor »
TIRAP	Proteína adaptadora que contiene dominio TIR, «TIR Domain Containing Adaptor Protein»
TMPRSS2	Proteasa transmembrana, la serina 2, «transmembrane serine protease 2»
TP53	Proteína tumoral 53, « Tumor Protein 53»
TRAF6	Receptor TNF asociado al factor 6, «TNF Receptor Associated Factor 6»
WWP1	Dominio WW que contiene la proteína ligasa 1 de ubiquitina E3, «WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1»
ZNF224	Proteína de dedos de zinc 224

Resumen

El cáncer de ovario es el más agresivo de los cánceres ginecológicos. Los reguladores transcripcionales influyen en el fenotipo tumoral y, en consecuencia, en la progresión clínica y la respuesta a la terapia. PHF20L1, es un regulador transcripcional que no se ha estudiado ampliamente en el cáncer de ovario, pero se expresa en células SKOV-3 estimuladas con líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario. Por ello, el objetivo de este proyecto fue analizar la expresión de PHF20L1 en tejido de cáncer de ovario y analizar si el líquido ascítico puede modular a las diferentes isoformas de esta proteína, y con estos datos, determinar si existía una conexión entre el nivel de expresión de PHF20L1 y los datos clínicos de los pacientes. Adicionalmente, decidimos evaluar cuales son las proteínas con las cuales PHF20L1 interacciona y su participación en algunos procesos celulares importantes en las células de cáncer de ovario. Se analizaron biopsias de cáncer de ovario de 29 pacientes diferentes mediante inmunohistoquímica y se determinó la expresión de las isoformas mediante ensayos de western blot en células de cáncer de ovario expuestas o no expuestas al microambiente tumoral. Las interacciones de PHF20L1 se evaluaron mediante inmunoprecipitación y espectrometría de masas. La participación de PHF20L1 en procesos celulares se evaluó mediante el uso de knockdown de la proteína en células SKOV-3. PHF20L1 exhibe una mayor expresión en secciones de tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario epitelial, la cual se correlaciona con un período libre de progresión más corto y una supervivencia global más corta. También se encontró que las isoformas de proteínas se regulan diferencialmente en las células SKOV-3 bajo la estimulación de la ascitis de pacientes con cáncer de ovario epitelial. Se demostró que PHF20L1 tiene un mayor número de interacciones cuando las células se encuentran bajo el estímulo del líquido ascítico y que estas interacciones pueden ser con proteínas tipo histonas o no histonas. El análisis funcional de PHF20L1, demostró que su ausencia afecta significativamente la invasión celular; aunado a eso, los resultados también sugieren una disminución en la proliferación celular. Los resultados obtenidos indican que PHF20L1 es una proteína cuya expresión se incrementa en células de cáncer de ovario y este incremento se asocia de manera negativa a la supervivencia de las pacientes. Además, la disminución de su expresión afecta funciones celulares importantes en células de cáncer de ovario. Estos datos, sugieren que PHF20L1 podría tener un papel importante en el crecimiento tumoral y un estudio más profundo

de la proteína podría definir si la proteína puede ser considerada como un potencial biomarcador o blanco terapéutico.

Abstract

Ovarian cancer is the most aggressive of the gynecological cancers. Transcriptional regulators influence tumor phenotype and, consequently, clinical progression and response to therapy. PHF20L1 is a transcriptional regulator that has not been widely studied in ovarian cancer but is expressed in ascitic fluid stimulated SKOV-3 cells from ovarian cancer patients. Therefore, the objective of this project was to analyze the expression of PHF20L1 in ovarian cancer tissue and analyze whether ascites fluid can modulate the different isoforms of this protein, and with these data, to determine if there is a connection between the level of PHF20L1 expression and patient clinical data. Additionally, we decided to evaluate the proteins with which PHF20L1 interacts and their participation in some essential cellular processes in ovarian cancer cells. Ovarian cancer biopsies from 29 different patients were analyzed by immunohistochemistry, and the expression of the isoforms was determined by western blot assays in ovarian cancer cells exposed or not exposed to the tumor microenvironment. PHF20L1 interactions were evaluated by immunoprecipitation and mass spectrometry. The participation of PHF20L1 in cellular processes was evaluated using knockdowns of the protein in SKOV-3 cells. PHF20L1 exhibits increased expression in tumor tissue sections from epithelial ovarian cancer patients, which correlates with shorter progression-free survival and shorter overall survival. Protein isoforms were also differentially regulated in SKOV-3 cells under the stimulation of ascites from epithelial ovarian cancer patients. It was shown that PHF20L1 has a higher number of interactions when cells are under the stimulus of ascites fluid and that these interactions can be with histone-like or non-histone-like proteins. The functional analysis of PHF20L1 demonstrated that its absence significantly affects cell invasion. In addition to this, the results also suggest a decrease in cell proliferation. The results obtained indicate that PHF20L1 is a protein whose expression is increased in ovarian cancer cells, and this increase is negatively associated with the survival of the patients. Furthermore, the decrease in its expression affects important cellular functions in ovarian cancer cells. These data suggest that PHF20L1 could play an important role in tumor growth, and a more in-depth study of the protein could define whether the protein can be considered a potential biomarker or therapeutic target.

I. Introducción

1. Cáncer de ovario

1.1 Generalidades

El cáncer de ovario (CaOv) ocupa el octavo lugar en incidencia mundial de cáncer, sin embargo, se considera el tipo de cáncer ginecológico más letal, debido a que la mayoría de las pacientes se diagnostica en etapas clínicas avanzadas (III y IV) [1]. En México, la incidencia reportada por el GLOBOCAN en 2018 fue de 4,759 casos y la mortalidad alcanzó los 2,765 casos [2].

Los síntomas no específicos y la falta de estrategias de diagnóstico temprano confiables no permiten la detección del diagnóstico de CaOv en una etapa temprana más curable. Además, se sugiere que en promedio el CaOv alcanza a progresar a una etapa tardía en menos de un año a partir de la fecha en que se diagnostica [3].

Comparado con el tumor primario por sí mismo, la enfermedad metastásica es más letal y aunque más del 80% de las pacientes con CaOv en etapas avanzadas puede responder a los enfoques terapéuticos estándar, la recurrencia ocurre en casi todos los casos. Sin embargo, aún está pendiente elucidar los mecanismos que subyacen la progresión del CaOv [4].

1.1.1 Clasificación del cáncer de ovario

Dentro de esta patología se incluyen una variedad de tumores: epitelial, germinal y estromal [5]. La gran mayoría de los casos se incluyen dentro de los tumores epiteliales y a su vez éstos se subclasifican en 5 tipos de carcinomas: seroso de alto grado, seroso de bajo grado, endometriode, células claras y mucinoso [6].

Los tumores de ovario que incluyen a los carcinomas serosos de bajo grado, endometriode, de células claras y mucinoso son menos comunes y representan el 30% de todos los tumores. Las lesiones precursoras de éstos incluyen a los tumores serosos *borderline* (que dan lugar al tumor seroso de bajo grado) y endometriosis (Endometriode, células claras) [7].

Los tumores más comunes incluyen a los tumores serosos de alto grado, los cuales son los principales responsables de la alta tasa de mortalidad. Este tipo de tumores tienen un

terreno genómico complejo, marcado por alteraciones en el número de copias de genes y la presencia, en prácticamente todos los casos, de mutaciones en el gen del supresor tumoral TP53 [8]. Algunos estudios sugieren que el tumor seroso de alto grado empieza a desarrollarse durante 4 años y puede existir como un tumor de etapa III clínicamente no detectado durante un año hasta su diagnóstico [9].

1.1.2 Etapas clínicas

De acuerdo a la Federación Internacional de ginecología y obstetricia (FIGO: Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique) [10], el CaOv se clasifica en las siguientes etapas clínicas:

Etapa I y II: Confinadas a la pelvis.

Etapa III: Se subclasifica en a) IIIA nódulos linfoides retroperitoneales y/o enfermedad peritoneal extra pélvica; y b) IIIB confinada a enfermedad peritoneal extra pélvica con metástasis menor a dos centímetros; también es posible encontrar diseminación de la enfermedad en nódulos linfáticos retroperitoneales y en hígado o bazo, c) IIIC: Enfermedad macroscópica extra-pélvica, metástasis mayor a dos centímetros.

Etapa IVA: Efusión pleural y citología positiva.

Etapa IVB: Metástasis en hígado, parénquima del bazo, en órganos extra abdominales, afección de nódulos inguinales o afectación de nódulos en otros sitios.

1.2 Estadísticas de cáncer de ovario en México y en el mundo

Como se mencionó previamente, a pesar de que el CaOv no muestra una incidencia tan elevada a nivel mundial, se le considera el más letal de los cánceres ginecológicos; en México se reportó una incidencia de 4,759 casos y una mortalidad de 2,765 (Figura 1) [2].

El cáncer de ovario epitelial (COE) es el tipo más común representando el 85% de los casos, especialmente en mujeres entre 45 a 59 años. El de células germinales representa el 10% y es más frecuente en mujeres menores de 30 años, mientras que los tumores estromales son muy escasos (2-3%) [2011].

1.3 Anomalías y síndromes genéticos

En general, el patrón de transmisión para el COE familiar es autosómico dominante [12]. Cerca del 10 % del cáncer de ovario tiene un factor genético principalmente por

los genes BRCA1/2, y hasta el 90% de los casos de ovario pueden ser esporádicos y no relacionados a algún factor genético [13]. En un estudio recientemente realizado en pacientes mexicanas, se detectaron mutaciones de *BRCA* en el 33% (59/179) de las pacientes analizadas; donde el 66.1% (39/59) fueron en *BRCA1*, y 33.9% (20/59) fueron en *BRCA2*. Cerca de 22 diferentes mutaciones se encontraron en el gen *BRCA1*, de las cuales el 81.8% (18/22) fueron patogénicas y afectaron a 32 de 39 pacientes. En el caso de *BRCA2*, se identificaron 12 diferentes mutaciones de las cuales el 66.7 % fueron mutaciones patogénicas afectando a 15 de 20 pacientes [14]. *BRCA1/2* tiene una relación estrecha con importantes factores de transcripción, incluyendo p53, STAT1, c-Myc, JunB, ATF-1, entre otros [15]. Un funcionamiento aberrante en *BRCA1/2* ocasiona que la célula tenga incremento en el número de centrosomas, reparación inadecuada de daño al ADN, y eventualmente, sucumbiría a aneuploidía, lo cual le daría predisposición a mutaciones [15]. Los factores que afectan la función de *BRCA1/2* incluyen “splicing” alternativo y factores genéticos [16-18].

El 10% de los cánceres ováricos restantes consta de síndrome de Lynch o cáncer colorectal no polipósico hereditario. Este síndrome se asocia con alteraciones en genes reparadores de errores en el ADN, afectando al 5% de la población, y pacientes con este síndrome tienen un riesgo de desarrollar cáncer de ovario de cerca del 12% [19]. Otros síndromes familiares asociados con tumores ováricos estromales incluyen el síndrome de Peutz-Jeghers, el cual consta de poliposis hamartomatosa (mutaciones en el gen *STK 11*) y síndrome de Gorlin (mutación en *PTCH*) [20]. Individuos que vienen de familias con cánceres múltiples, cánceres que ocurren a edad temprana, y dos o más cánceres primarios en un solo individuo tienen un mayor riesgo de síndromes de CaOv; en la mayoría de los tumores, muchas mutaciones se dan en el gen *TP53* [21]. Aproximadamente, el 13% tuvo mutaciones de línea germinal en *BRCA1* o *BRCA2*, y un pequeño porcentaje tuvo mutaciones somáticas en *NF1*, *RB1* y *CDK12* [21]. Además, el análisis de vías de señalización muestra que defectos en la recombinación homóloga y en la señalización vía Notch y *FOXM1* están involucrados en la fisiopatología de cáncer de ovario de tipo seroso [21].

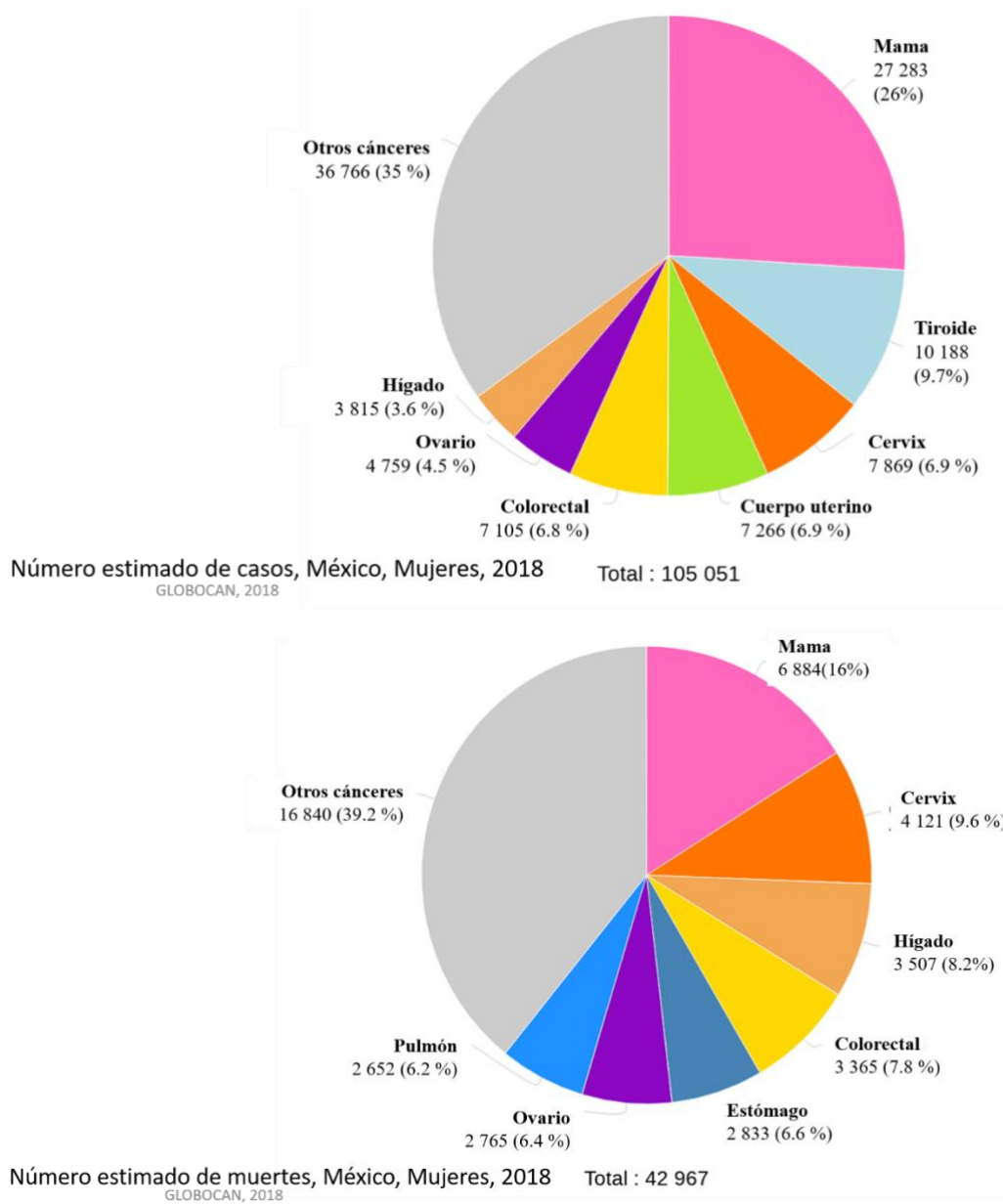


Figura 1. Gráficas de las tasas de incidencia (superior) y mortalidad (inferior) de los principales tipos de cáncer, según los registros del GLOBOCAN 2018.

1.4 Actuales herramientas de diagnóstico

Las manifestaciones del COE típicamente son vagas y se confunden con enfermedades digestivas [22], de tal modo que difícilmente se diagnostica en etapas tempranas.

El diagnóstico oportuno del COE tiene un mejor pronóstico de la enfermedad: de acuerdo a la sociedad americana del cáncer (2019), el 92% de las pacientes tiene la probabilidad de tener una tasa de supervivencia de 5 años. Sin embargo, sólo el 15 % de las pacientes se diagnostica en etapa temprana. Las pacientes con etapas avanzadas tienen un peor pronóstico, aproximadamente el 32% tiene una tasa de supervivencia de 5 años [23]. Además, aproximadamente el 70% de las pacientes diagnosticadas con CaOv experimenta recurrencia [24].

Las dos pruebas actualmente empleadas para el diagnóstico del CaOv son el ultrasonido transvaginal y la medición en sangre del antígeno CA125 [25]. La tomografía computarizada (TC) se utiliza para la estadificación, la evaluación de la respuesta al tratamiento y la reestadificación, mientras que la tomografía por emisión de positrones (PET) se puede utilizar para caracterizar las características de afecciones ováricas fisiológicas y no malignas [26]. Entre éstas, sólo CA125 se recomienda para monitorear la respuesta a terapia de pacientes con CaOv, así como para el monitoreo post-tratamiento a la recurrencia de la enfermedad [27]. Sin embargo, esas pruebas tienen utilidad clínica limitada, y frecuentemente se asocian con resultados falsos positivos o falsos negativos [28]. Por lo tanto, para diseñar nuevas alternativas para el diagnóstico, por lo que es necesario conocer el entorno en el cual se desarrolla el tumor. Actualmente, se están utilizando enfoques proteómicos para identificar marcadores moleculares para cáncer de ovario y también se están desarrollando modelos matemáticos para identificar patrones específicos que son indicativos de la enfermedad. Otros marcadores prometedores incluyen al receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), el ácido lisofosfatídico y la haptoglobina fucosilada [25- 30].

1.5 Terapéutica actual

La cirugía seguida de quimioterapia es el régimen estándar de tratamiento de primera línea para pacientes con cáncer de ovario. Inicialmente, las pacientes son intervenidas mediante citoreducción para remover todos los tumores visibles; al mismo tiempo esto permite a los médicos establecer el diagnóstico y diseminación de la enfermedad [31]. En el pasado, comúnmente se utilizaban drogas como ciclofosfamida, mefalan y clorambucil para la quimioterapia [32]. Cuando se introdujo el cisplatino a la práctica

clínica, se demostró que la terapia basada en platino generaba una respuesta favorable. A finales de 1990, se empezó a utilizar la combinación de cisplatino con paclitaxel como tratamiento adyuvante durante las etapas avanzadas [33].

Aunque casi el 80% de las pacientes con COE en etapas avanzadas responden a enfoques terapéuticos estándar (los cuales incluyen debilitamiento tumoral seguido de quimioterapia con carboplatino y paclitaxel), la recurrencia ocurre en casi todos los casos (mediana 15 meses después del diagnóstico) [4, 34].

Actualmente, 60-80% de las pacientes con etapas avanzadas responden a la combinación de quimioterapia basada en taxanos y platino mostrando remisión clínica completa mientras que el 20-30% presenta resistencia intrínseca a platino y la enfermedad continúa a pesar del tratamiento [35].

Pacientes con mutaciones en los genes BRCA1/2 se consideran más sensibles a la quimioterapia; por tal motivo, el uso de inhibidores de PARP como olaparib pueden ser usados en la clínica [36].

Se sabe además que, la resistencia a platino adquirida por células de cáncer de ovario A2780 se acompaña por la sobrerregulación significativa de los genes de la metiltransferasa de ADN 1 (DNMT1) y de la Metiltransferasa de ADN 3B (DNMT3B), sugiriendo que los inhibidores de DNMT pueden ayudar a revertir la resistencia a platino [37]

1.6 El microambiente en el cáncer de ovario

En la mayoría de los casos de COE, existe metastasis en la cavidad abdominal, independientemente del subtipo histológico [38]. La interacción dinámica de las células transformadas con el microambiente único del tumor peritoneal no sólo influye sobre la progresión tumoral, sino que también resulta en la evolución de otros eventos genéticos y epigenéticos que impactan profundamente en el resultado de la enfermedad y en la respuesta a la terapia [39].

Los tumores son tejidos complejos compuestos por células tumorales, así como un estroma que consiste en vasos sanguíneos y linfoides, nervios, fibroblastos, y proteínas de la matriz extracelular, células endoteliales, pericitos y células del sistema inmune (Figura 2). Todo este conjunto conforma el microambiente tumoral [40].

De este modo, el microambiente tumoral puede tener un efecto diferencial en la población clonal diversificada de las células cancerosas, y en el caso del cáncer de ovario la producción de líquido ascítico (LA) [41] es una complicación común [42]. Este microambiente tumoral tiene una compleja interacción con la carcinogénesis y la progresión en COE [3].

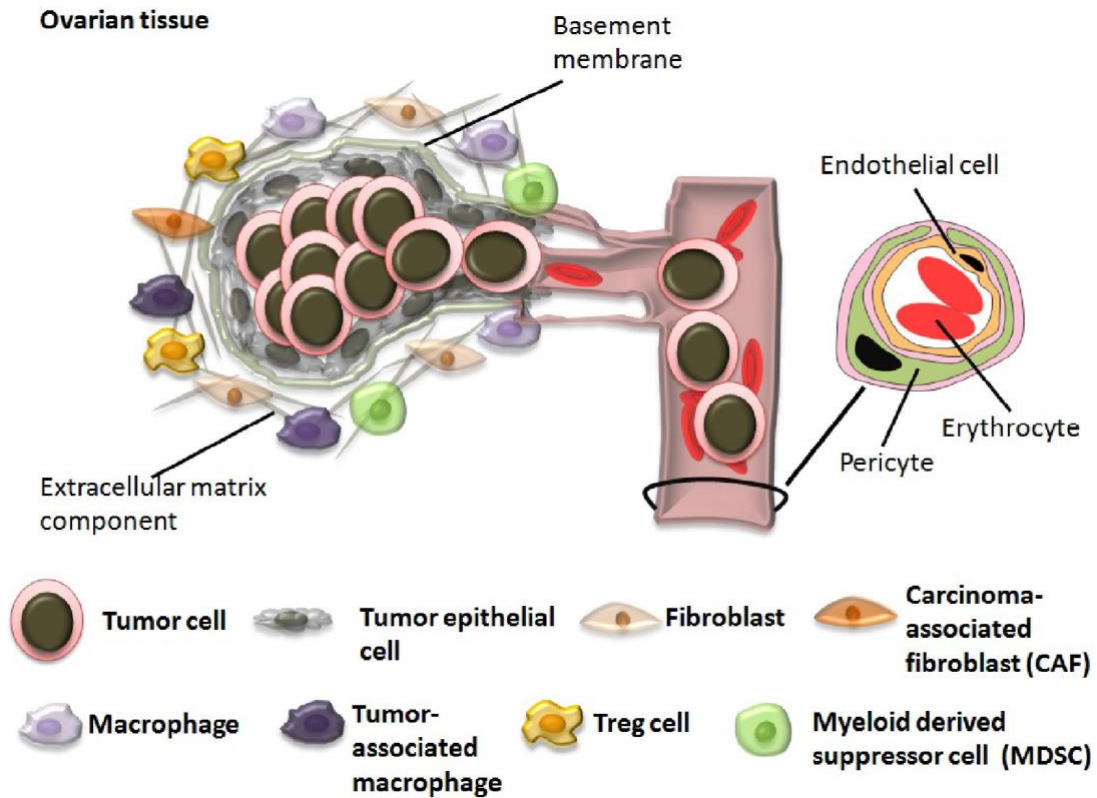


Figura 2. Un modelo esquemático ilustrativo de la metástasis de cáncer de ovario en el microambiente tumoral [41].

1.6.1 Producción de líquido ascítico (LA) y transición epitelio mesénquima (TEM)

Una característica única del CaOv es su redirección hacia la cavidad abdominopélvica como sitio de metástasis, facilitado por el flujo del fluido natural que ahí se encuentra; las células se unen preferentemente al mesotelio que cubre todos los órganos presentes en la cavidad abdominopélvica, incluyendo el omento, el peritoneo abdominal y el ovario contralateral [43-45]. Las células mesoteliales son pre-condicionadas por el secretoma de las células de cáncer para inducir la expresión de múltiples proteínas, permitiendo así la formación de un nicho idóneo para el crecimiento de las células malignas [46]. La presencia de células tumorales en la cavidad abdominopélvica se asocia frecuentemente

con la acumulación de líquido ascítico (en un 35% de las pacientes) [47]. Durante las etapas avanzadas de este tipo de cáncer, frecuentemente se presenta exceso de líquido ascítico producido, sin embargo, en algunos casos se ha presentado en etapas tempranas [48]. Se cree que el LA crea un microambiente permisivo específico donde las células de cáncer pueden sobrevivir y diseminarse [49].

El LA o ascitis se define como la acumulación de líquido en la cavidad peritoneal [50]. La ascitis contiene factores de crecimiento y otros componentes de la matriz extracelular producida por leucocitos infiltrados en el tumor y células mesoteliales activadas no cancerosas [51]. Así mismo, el LA es rico en agentes solubles que participan en la angiogénesis y en la proliferación de células de cáncer de ovario, incluyendo angiogenina, factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), interleucina 6 (IL-6) y quimiocinas MCP-1, GRO-1 e IL-8 ([52]. Además, el LA es capaz de suprimir reacciones inflamatorias peritoneales, incluyendo la inhibición de NF- κ B y la señalización del factor nuclear de células T activadas (NFAT) en células T asociadas a tumor [53]. El LA puede también interactuar con células mesoteliales peritoneales normales promoviendo así su proliferación y migración, inhibiendo la apoptosis de las células de cáncer [54].

El LA se desarrolla debido al incremento en la permeabilidad vascular y mesotelial y al incremento de fluido con alto contenido proteico en la cavidad peritoneal de las pacientes con COE. La señalización celular que se generan en los tumores en crecimiento se concentran en el LA, y cambian dinámicamente de acuerdo al subtipo de la enfermedad, etapa y grado, así como entre las pacientes. En el tumor seroso de alto grado, el LA promueve la invasividad tumoral y sobrevive e inhibe la apoptosis llevando a la quimioresistencia [55][56]. La alta concentración de proteínas y el incremento en la producción de citocinas proinflamatorias contribuyen a la acumulación del LA, lo cual, finalmente induce un estado de inmunosupresión [57-59]. También, el LA es rico en lípidos bioactivos, tal como el ácido lisofosfatídico, que se sabe es producido por las células tumorales y que en altos niveles lleva a una señalización aberrante y a la activación de vías proinflamatorias y de proliferación, así como a la transactivación de receptores tirosina cinasa que a su vez contribuyen al incremento en la producción del ácido lisofosfatídico (LPA) y otros factores de crecimiento y citosinas [59,60]. Además,

el LA puede contener células malignas flotantes individuales o agrupadas (esferoides), macrófagos y otras células inmunes que en conjunto contribuyen al fenotipo maligno del CaOv [55].

La transición epitelio mesenquimal (TEM) es un programa de plasticidad epitelial que se lleva a cabo durante el desarrollo, la curación de heridas, y en el mantenimiento de las células troncales [61]. Las características principales incluyen pérdida de la adhesión celular, reorganización del citoesqueleto, pérdida de la polaridad celular y un cambio de expresión génica de epitelio a mesénquima (Figura 3) [61]. La proliferación excesiva de las células epiteliales y la angiogénesis son marcadores del inicio y crecimiento temprano de los cánceres epiteliales primarios [40]. Los controles genéticos y mecanismos bioquímicos que subrayan la adquisición del fenotipo invasivo y la subsecuente diseminación sistémica de células cancerosas han sido objeto de investigación intensa. En muchos de esos estudios se ha propuesto a la activación de la TEM como el mecanismo crítico de adquisición de fenotipos malignos por las células epiteliales de cáncer [62].

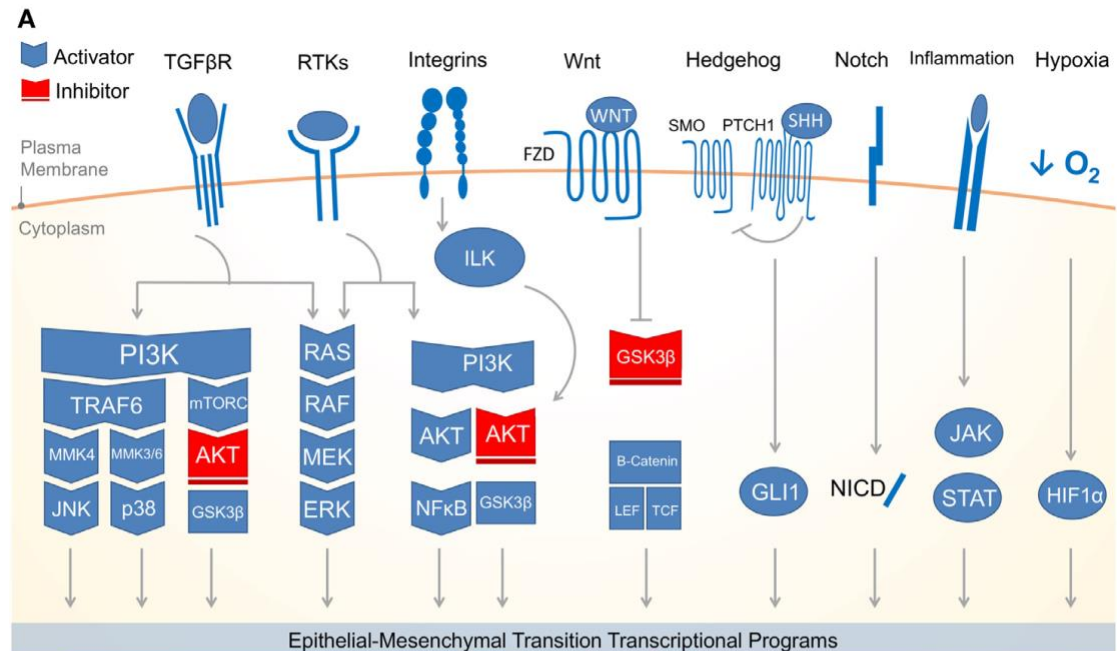


Figura 3. Vías de señalización de la TEM [63].

Recientemente, Toledo-Leyva observó que en la línea celular SKOV-3, derivada de un adenocarcinoma de ovario, se presentan cambios morfológicos cuando las células se estimulan con el LA de COE [64]. Ensayos de western blot utilizando anticuerpos dirigidos contra los marcadores de TEM revelaron que las células estimuladas con LA presentan ausencia de E-cadherina y elevada vimentina, a diferencia de las células en medio de cultivo normal, que muestran la expresión de E-cadherina y bajos niveles de vimentina, lo cual indica que el estado TEM está ocurriendo de manera basal en las células sin estimular y que el LA de COE es capaz de potenciar la diferenciación hacia el fenotipo mesénquima en esta línea celular [64].

Muchas de las vías para que ocurra la TEM se activan por señalización extracelular (Figura 3), resaltando así la importancia del microambiente tumoral para la inducción de la TEM. Algunas de las vías críticas para la activación son TGF- β , receptores tirosina cinasas (RTKs), integrinas, WNT, NOTCH, Hedgehog (HH), factor inducible por hipoxia 1 α (HIF1 α), y JAK/STAT (Figura 3). En algunas de estas vías, la fucosilación es muy importante; de hecho, en un estudio realizado por Shaul y colaboradores [65] se identificaron enzimas metabólicas claves para la transición epitelio mesénquima, entre las que se encuentran enzimas de la vía biosintética de hexosaminas, lo cual no es de sorprender, dado que las proteínas N-cadherina y fibronectina, que se alteran durante la TEM, se encuentran glicosiladas. Así, el estudio de proteínas glicosiladas con funciones primordiales en cáncer podría abrir la posibilidad de desarrollar nuevos blancos terapéuticos o biomarcadores en cáncer.

2. Biomarcadores en cáncer: Reguladores transcripcionales

Los biomarcadores son moléculas que indican la presencia de una enfermedad, sustentan un pronóstico o dan seguimiento a la misma por cambios en su concentración o funcionamiento. Aún se carece de un biomarcador idóneo para el diagnóstico temprano de cáncer de ovario; sin embargo, la evaluación de genes como *BRCA1* y *BRCA2*, o de proteínas como CA125 y HE4, ha generado resultados clínicos favorables [66].

El cáncer surge de alteraciones genéticas que invariablemente llevan a programas transcripcionales desregulados [67]. Esos programas pueden causar que esas células de cáncer se vuelvan altamente dependientes de ciertos reguladores de expresión génica [67]. La desregulación génica es un “hallmark” del cáncer; por ello, el peso del fenotipo

del tumor, incluyendo aquéllos que afectan la progresión clínica y la respuesta a terapia, está regulado por la versión desregulada de programas transcripcionales que operan en las células tumorales [67]. Por tanto, las proteínas que están involucradas en el control transcripcional, se consideran como blancos atractivos para una nueva generación de fármacos que afecten sus funciones y, de este modo, a los programas que ellas gobiernan [67].

Existe una gran variedad de reguladores transcripcionales alterados en cáncer, muchos de los cuales controlan procesos que favorecen la progresión y metástasis del cáncer, como ejemplo la proteína Snail, importante durante la transición epitelio mesénquima [68].

Los complementos de las alteraciones genéticas que colaboran para transformar una célula normal en una neoplásica exhiben un alto grado de especificidad de tejido, lo cual conlleva a la obtención de moléculas específicas de un tumor específico (p. ej., TMPRSS2-ERG en cáncer de próstata, alteraciones del locus TCR en tumores malignos de células T) [69]. Además, muchas vías de señalización oncogénicas requieren contextos de la cromatina específicos de cada célula (por ejemplo, la activación de NOTCH1 en células T pero no en células B en leucemia o la activación de EZH2 en células B pero no en T en linfoma [67]). Debido a que muchos programas de diferenciación específicos de tejido persisten en células tumorales, es claro que el cáncer surge de un juego intercolaborativo de eventos oncogénicos que son adquiridos durante la formación del tumor. Conocer más acerca de reguladores transcripcionales en cáncer de ovario, podría generar herramientas útiles para el diagnóstico, tratamiento o para el conocimiento de la biología del tumor. Por ello, la información sobre la proteína PHF20L1, la cual es un regulador transcripcional, será presentada a continuación.

3. PHF20L1

3.1.1 Características generales de la proteína

La Proteína 20 similar a la proteína 1 con dominio PHD, PHF20L1 por sus siglas en inglés (*PHD finger protein 20-like 1*) es una proteína que contiene dos dominios tudor y que tiene 21 isoformas [70]. El gen que codifica a la proteína PHF20L1 se ubica en el cromosoma 8 humano [71]. Es un regulador transcripcional que se encuentra presente

en bajos niveles en casi todos los tipos celulares, del cual se conocen alrededor de 21 isoformas distintas, generadas por *splicing* alternativo y de las cuales 3 de ellas son las que se expresan. No se conoce acerca de las modificaciones postraduccionales de la proteína. En cuanto a su glicosilación, no hay antecedentes, con excepción de los nuestros, que indican que es una proteína fucosilada (Alberto Aguilar, Tesis de Maestría, 2016) [72]

3.1.2 Estructura y dominios

Como se muestra en la fig. 4, la proteína cuenta con algunos dominios característicos como son MBT (*Malignant Brain Tumor*), 2 dominios Tudor, un dominio DUF3776, y un dominio de dedos de Zinc tipo PHD.

El dominio DUF se refiere a un dominio de función desconocida, debido a que no ha sido caracterizada. Existen más de 3000 dominios DUF que se diferencian por una numeración después de las siglas DUF. Su importancia radica en que están altamente conservados y se cree que son requeridos únicamente bajo ciertas condiciones [73].

La función del repetido MBT es desconocida también, sin embargo, se encuentra en un cierto número de proteínas nucleares [74]. Se sabe que proteínas que contienen este dominio son producto de grupo de genes policomb (Complejo de proteínas que pueden regular la cromatina) y están implicadas en represión transcripcional de genes del desarrollo [74]. Además, la desregulación de proteínas con dominio MBT se ha asociado con varios fenotipos de enfermedades como los tumores neurológicos [74].

El dominio Tudor también es conservado; originalmente se identificó como una región de 50 aminoácidos encontrado en una proteína de *Drosophila* llamada precisamente Tudor. En humanos, su estructura es una hoja B anti paralela que consiste de 5 cadenas beta que reconoce arginina dimetilada [75].

Por último, el dominio *PHD-type zinc finger* participa principalmente en la unión a la histona H3 metilada [76].

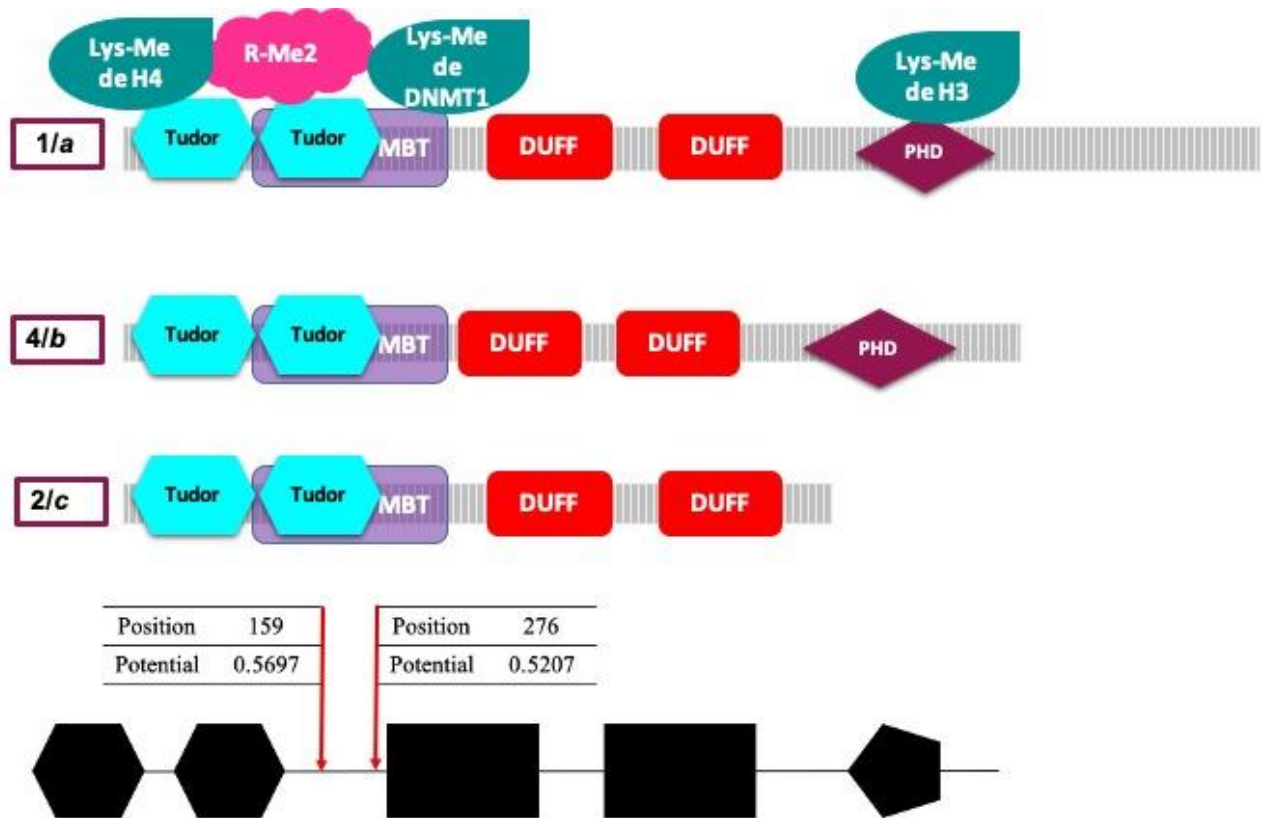


Figura 4. Estructura y dominios de las isoformas de PHF20L1. En orden descendente, en función del peso molecular, se encuentran esquematizadas las 3 isoformas conocidas de PHF20L1; de lado izquierdo en el recuadro se indica la variante de splicing y su correspondiente isoforma. Adicionalmente, se esquematiza algunas modificaciones en proteínas que pueden ser reconocidas por los dominios presentes en PHF20L1 (Lys-Me de H4: Monometilación en lisina de histona 4; R-Me2: Dimetilación en residuos de arginina; Lys-Me de DNMT1: Monometilación en lisina de la ADN metiltransferasa 1; Lys-Me de H3: Monometilación en lisina de Histona3). El cuarto esquema representa los sitios probables de glicosilación que puede sufrir la proteína.

3.1.3 Funciones principales conocidas de PHF20L1

Este factor transcripcional puede tener interacción con diferentes proteínas (Tabla 1). Una de las primeras interacciones reportadas de PHF20L1 es con una metiltransferasa, la DNMT1 (enzima que agrega grupos metilo al ADN hemimetilado durante su replicación). Se sabe que la proteína PHF20L1 por medio del dominio MBT lee y controla los niveles enzimáticos de DNMT1, ya que al unirse a la lisina 142 metilada de la enzima previene su degradación proteosomal [77]. Sabemos que la metilación del ADN es un proceso fundamental durante la división celular en mamíferos y es

responsable del mantenimiento de la integridad del genoma y además regula la expresión génica [78]. Por tanto, la interacción de estas dos proteínas puede ser importante en el silenciamiento epigenético [77].

Como se mencionó anteriormente, en cáncer de ovario se han realizado estudios que demuestran que la resistencia al tratamiento con carboplatino y cisplatino está fuertemente relacionada con el incremento en la metilación del ADN [79].

3.1.4 Participación de PHF20L1 en cáncer

En CaOv, no hay reportes de la participación de esta proteína, sin embargo, en cáncer de mama ha sido ampliamente estudiada, donde se ha encontrado que PHF20L1 se sobreexpresa en cáncer de mama [80] y que se asocia con un mal pronóstico y una menor supervivencia en las pacientes con esta patología. Así mismo, la disminución de la expresión de esta proteína por *knock-down* (KD) resulta en la inhibición de la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de mama [80]. Además, se sabe que existe relación entre estos dos tipos de cáncer, de hecho, una historia familiar de cáncer de mama u ovario en primer grado incrementa el riesgo de CaOv [81]. Por ello, es probable que esta proteína tenga una implicación importante en nuestro modelo de estudio.

Recientemente se ha reportado que, así como PHF20L1 se une a DNMT1, también es capaz de unirse a otra proteína, denominada Sox2 (por sus siglas en inglés: *Sex determining Region Y-box 2*) [82]. Sox2 es una proteína clave presente en células totipotenciales y se asocia frecuentemente a cáncer [83]. La unión de PHF20L1 con Sox2 impide la ubiquitinación y subsecuente proteólisis de Sox2 [82]. Es importante mencionar que la expresión abundante de Sox2 está altamente correlacionado con el teratoma ovárico inmaduro [84]. Sin embargo, a la fecha, no hay información del estado fucosilado de la proteína PHF20L1 ni de la importancia de la función de PHF20L1 en cáncer de ovario.

Tabla 1. Lista de predicción de proteínas que pueden tener interacción con PHF20L1 [87].

Proteína	Descripción
APP	Funciona como un receptor de superficie celular que participa en funciones fisiológicas en las neuronas, importante para el desarrollo neuronal y la adhesión neuronal
DNMT1	Metila residuos CpG
CASP10	Involucrada en la activación de la cascada de caspasas responsables de la ejecución de la apoptosis.
CD14	Actúa vía MyD88, TIRAP y TRAF6, llevando a la activación de NF-kappa-B, secreción de citocinas y respuesta inflamatoria
Cul3	Componente central de complejos de la proteína Ubiquitin ligasa E3 que median la ubiquitinación y degradación proteosomal de proteínas blanco
FOXK2	Regula positivamente la señalización WNT/beta-catenina traslocando proteínas DVL al núcleo
HDAC1	Responsable de la desacetilación de residuos de lisina en la parte amino terminal de histonas (H2A, H2B, H3 and H4). Inhibe la actividad transcripcional de NF-kappa-B
KAT8	Acetiltransferasa de histonas la cual puede estar involucrada en activación transcripcional
KDM1A	Desmetila y estabiliza a DNMT1. Efector de la represión transcripcional mediada por SNAI1 de E-cadherina/CDH1, CDN7 y KRT8. Requerida para el mantenimiento del estado silenciado de los genes blanco de SNAI1, E-cadherina/CDH1 and CDN7
TERT	Modula la señalización Wnt. Juega un importante papel en la angiogénesis y en la apoptosis
WWP1	Ubiquitina y promueve la degradación de SMAD2 en respuesta a la señalización TGF-beta, la cual requiere interacción con TGIF.

LIN9	Actúa como un supresor tumoral. Inhibe la síntesis de ADN. Su habilidad para inhibir la transformación oncogénica es mediada a través de su asociación con RB1.
MTA1	En conjunto con otros componentes de NuRD, actúa como un correpressor transcripcional de BRCA1, ESR1, TFF1 y CDKN1A. Estimula la expresión de Wnt1 inhibiendo la expresión de su correpressor transcripcional SIX3.

4. Antecedentes directos

En nuestro laboratorio, Villegas-Pineda y colaboradores [85] encontraron que en CaOv, el proceso de fucosilación se ve afectado; sin embargo, en ese momento no se conocía qué proteínas se estaban afectando por esta modificación postraducciona. Durante mi proyecto de maestría se identificaron por medio de cromatografía de afinidad y espectrometría de masas (MALDI-TOF) 7 proteínas fucosiladas presentes en células SKOV-3 estimuladas y no estimuladas con ascitis de pacientes con CaOv, de las cuales 5 se encontraban presentes en mayor cantidad bajo el estímulo del líquido ascítico (KRT10, IFFO1, PHF20L1, IGHV1-2 y ZNF224) y 2 más se encontraban disminuidas (BRPF1 y DTNA), en comparación con células incubadas en medio de cultivo normal [86]. A la fecha no existen reportes acerca del estado de fucosilación de estas proteínas. Los resultados obtenidos sugieren que el microambiente tumoral genera cambios que pueden llevar a la sobrerregulación o desregulación de la fucosilación en las proteínas y que estos cambios podrían estar favoreciendo el desarrollo del tumor.

El resultado de la búsqueda sobre las interacciones principales conocidas de la proteína PHF20L1, en las bases de datos, se encuentran las que se presentan en la tabla 1. Es importante resaltar que algunas de estas proteínas tienen implicación en la vía de señalización WNT. Esta vía como se mencionó con anterioridad participa en la TEM. Además, regula procesos como migración, polaridad y organogénesis durante el desarrollo embrionario y por supuesto, en cáncer [88]. Respecto a este último, hay estudios realizados que denotan cierto impacto de la metilación del ADN en la tumorigénesis conducida por WNT. Estos estudios dicen que una disminución en la proteína Mbd2, la cual se une a CpG metilado, disminuye la formación tumorigénica atenuando la vía WNT [88]. La proteína Mbd2 es un represor transcripcional que recluta

histonas desacetilasas y metiltransferasas [89]. Otras proteínas a las cuales se asocia PHF20L1 son DNMT1 y HDAC1 [88]; de esta última se sabe que inhibe la actividad transcripcional de NF- κ B, que a su vez regula la expresión de Snai1, vía mecanismos transcripcionales y postranscripcionales [90]. Snai1, es un efector de la TEM.

Con base en estos antecedentes, el objetivo del presente trabajo es medir la expresión de la proteína en células de cáncer de ovario (*in vivo* e *in vitro*), evaluar su función y su participación en algunos procesos celulares del CaOv.

II. Justificación

El cáncer de ovario (CaOv) es el más agresivo de las malignidades ginecológicas. El líquido ascítico, presente en un porcentaje importante de pacientes con cáncer de ovario, se acumula en la cavidad abdominopélvica y crea un microambiente permisivo específico donde las células de cáncer pueden crecer, proliferar y diseminarse.

Los reguladores transcripcionales desempeñan un papel importante en el fenotipo del tumor y consecuentemente en la progresión y la respuesta al tratamiento. Las proteínas que están involucradas en el control transcripcional se consideran blancos atractivos para una nueva generación de fármacos que afecten sus funciones y de este modo, a los programas que ellas gobiernan.

PHF20L1, es un regulador transcripcional que ha sido muy poco estudiado; sin embargo, se ha detectado su expresión y fucosilación en células SKOV-3 estimuladas con líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario. Debido a esto, el estudio de la expresión de esta proteína, en células de cáncer de ovario expuestas o no expuestas al microambiente del cáncer de ovario, podría ayudar a entender su función y con esto generar estrategias para interferir con el crecimiento y metástasis de células tumorales.

III. Hipótesis

PHF20L1 se expresa mayormente en tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario y en células SKOV-3 bajo el estímulo con ascitis de CaOv. En consecuencia, su expresión elevada afecta funciones esenciales para el fenotipo tumoral.

IV. Objetivos

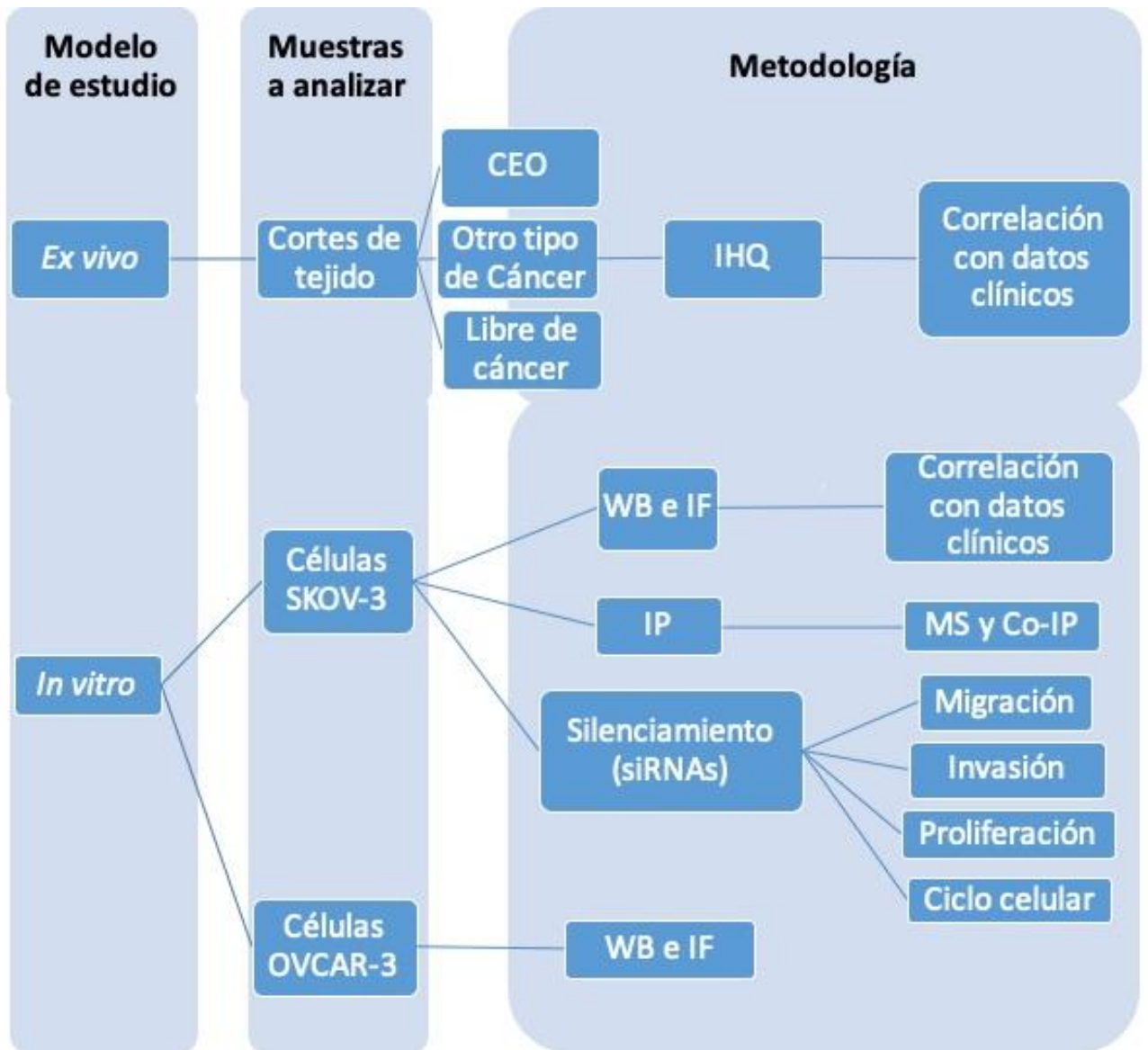
a. General

Analizar el papel de PHF20L1 en cáncer de ovario

b. Específicos

1. Analizar la expresión de PHF20L1 en cortes de tejido tumoral de cáncer de ovario epitelial.
2. Evaluar la expresión del mensajero y de la proteína PHF20L1 en células SKOV-3 por efecto del LA.
3. Identificar proteínas que interaccionan con PHF20L1 y confirmar alguna(s) de las interacciones para inferir su posible función en el cáncer de ovario.
4. Analizar el efecto del silenciamiento de PHF20L1 en migración e invasión de células SKOV-3.

V. Estrategia metodológica



VI. Materiales y métodos

Muestras biológicas

Los líquidos ascíticos y los cortes de tejido embebidos en parafina, se obtuvieron por personal médico del Instituto Nacional de Cancerología, de acuerdo al protocolo aprobado por los Comités de Ética en Investigación y de Investigación-con No. INCAN/CC/134/09 (CB/549/09) bajo la asesoría de la Dra. Dolores Gallardo Rincón, previa firma de autorización de la Carta de Consentimiento Informado por cada una de las pacientes.

Un total de 33 laminillas con cortes de tejido tumoral embebidos en parafina fueron utilizadas en este proyecto, de las cuales 29 correspondieron a cortes de tejido tumoral de pacientes con diferentes subtipos histológicos de cáncer epitelial de ovario (Tabla 2), mientras que 2 correspondieron a cáncer cervicouterino y cáncer de mama. Adicionalmente, se incluyeron dos controles de tejido ovárico con apariencia normal adyacente a tumor, los cuales se contemplaron como control de tejido libre de cáncer.

Por otra parte, se obtuvieron 11 LAs obtenidos de pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario epitelial, cuyas características se mencionan en la Tabla 3, que se utilizaron para el tratamiento de línea celular SKOV-3 (ver adelante). Los líquidos ascíticos se centrifugaron a 108 x g durante 10 min y el sobrenadante libre de células se almacenó a -70°C hasta su utilización.

Tabla 2. Características clínicas de las pacientes con cáncer de ovario cuyos cortes de tejido tumoral fueron empleados en este proyecto.

Características	N=29
Edad (Años)	
Promedio \pm DE	49 \pm 10.65
Mediana (Rango)	50 (28-67)
CA 125 (U/mL)	
Promedio \pm DE	1097.18 \pm 1515.6
Mediana (Rango)	365 (11.4-5958)
Etapas clínicas	% (n/N)
IA	6.9 (2/29)
IC	3.45 (1/29)
IIIA	6.9 (2/29)
IIIB	3.45 (1/29)
IIIC	58.6 (17/29)
IVA	13.8 (4/29)
IVB	6.9 (2/29)
Histología	% (n/N)
SPAG	55.17 (16/29)
SPBG	6.9 (2/29)
Endometrioides	20.68 (6/29)
Células claras	13.8 (4/29)
Mucinoso	3.45 (1/29)
SPAG:	
Seroso Papilar de Alto Grado	
SPBG:	
Seroso Papilar de Bajo Grado	

Tabla 3. Características clínicas de las pacientes con cáncer de ovario cuyos líquidos ascíticos fueron empleados en este proyecto.

Características	N=11
Edad (Años)	
Promedio \pm DE	57 \pm 9.9
Mediana (Rango)	55 (43-73)
CA 125 (U/mL)	
Promedio \pm DE	2781.71 \pm 2760.741
Mediana (Rango)	2225.55 (570.5-13730.2)
Etapas Clínicas	% (n/N)
IIC	40 (5/10)
IVA	10 (1/10)
IVB	50 (5/10)
Histología	
SPAG	90 (10/10)
Endometrioides	10 (1/10)

Líneas celulares y condiciones de crecimiento

Se utilizó la línea celular de referencia SKOV-3 (ATCC HTB-77) para los experimentos *in vitro*. Adicionalmente, algunas líneas celulares fueron empleadas con fines comparativos en el desarrollo de este trabajo: OVCAR-3 (ATCC HTB-161), MCF7 (ATCC HTB-22) y BT20 (ATCC HTB-19).

El modelo SKOV-3 se ha utilizado previamente en nuestro laboratorio como se describe [15]. Brevemente, las células SKOV-3 se cultivaron en medio de cultivo McCoy 5A (Corning, 10-050-CVR) (15 ml) complementado con suero bovino fetal al 10% (Corning, 35-010-CV) a 37 °C y 5% de CO₂. El cultivo se hizo crecer hasta que las células alcanzaron un 75% de confluencia. Luego, se descartó el medio para la posterior adición de ascitis (15 mL). Las células se mantuvieron bajo el estímulo de ascitis a 37 °C y CO₂ al 5% durante los períodos indicados. Las células que se mantuvieron en el medio se utilizaron como control. El cultivo de OVCAR-3 se hizo crecer en medio de cultivo RPMI 1640 (Corning 10-004-CM) complementado con suero bovino fetal al 10% e insulina bovina (Millipore 10516). El cultivo se hizo crecer hasta que las células alcanzaron un 75% de confluencia. Luego, se descartó el medio para la posterior adición de ascitis (15 mL). Las células se mantuvieron bajo el estímulo de ascitis a 37 °C y CO₂ al 5% durante 24 o 48 h. Las células que se mantuvieron en medio se utilizaron como control. Las células MCF7 y BT-20 se crecieron en medio de cultivo RPMI complementado con suero fetal bovino al 10%. Las células se mantuvieron a 37 °C y CO₂ al 5%.

Silenciamiento de PFH20L1

Para lograr el silenciamiento de PFH20L1 se utilizó una mezcla comercial de RNAs interferentes (siRNAs) (SC-77673, Santa Cruz Biotechnology), siguiendo el protocolo que se sugiere en la hoja técnica. Brevemente, 80 000 células SKOV-3 fueron sembradas por cada pozo en una placa de 24 pozos, utilizando medio McCoy 5A y SFB al 10%. En un volumen de 300 µL de medio McCoy sin SFB se preparó una dilución de siRNAs con 2 µL de turbofect para cada condición (Thermo Fisher Scientific R0532). La reacción se resuspendió y se dejó reposar 20 min. El medio con SFB de las células SKOV-3 que previamente ya habían alcanzado una confluencia del 90% fue descartado y se hicieron 3 lavados con medio sin suero para eliminar remanentes del suero. Se adicionó cuidadosamente la reacción previamente preparada y se dejó hacer efecto en las células por 16 h. Se probaron tres concentraciones de siRNAs (20, 40 y 60

pmol), de las cuales se seleccionó, mediante corroboración de la disminución de expresión de la proteína por inmunofluorescencia, la más baja para los ensayos posteriores. Después de que el silenciamiento se llevó a cabo, las células se colocaron en medio de cultivo McCoy 5A o en ascitis, según fuera el caso. Los ensayos funcionales adicionales se realizaron dentro de las 48 horas subsecuentes al tratamiento con los siRNAs.

Inmunohistoquímica

Los tejidos embebidos en parafina se utilizaron para realizar estudios por la técnica de inmunohistoquímica. El protocolo aplicado para el procesamiento de las muestras fue el siguiente: se desparafinaron los tejidos, para lo cual se incubaron toda la noche a 50 °C. A la mañana siguiente, se colocaron en xilol (5 min, 3 veces), y en soluciones con concentración decreciente de etanol (100, 95, 90, 85, 80 %; 30 seg en cada una). Se procedió a realizar la recuperación antigénica utilizando un amortiguador de citratos y calentando las laminillas a 121°C por 20 min. Se lavó con PBS 1X durante 3 veces por 5 min cada uno. Se hizo el bloqueo de peroxidasa endógena incubando la laminilla en una solución de peróxido de hidrógeno durante 1 h a temperatura ambiente. Se lavó 5 veces con PBS 1X. Se realizó el bloqueo utilizando PBS-leche al 10% por 1 h a temperatura ambiente. Después de los lavados correspondientes, se colocó el anticuerpo primario anti-PHF20L1 (Sigma-Aldrich HPA028417) en una dilución 1:100 (PBS 1X-SFB 10%) y se incubó toda la noche a 4 °C. A la mañana siguiente se lavó la laminilla 5 veces con PBS 1X y se colocó el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Peroxidasa de rábano (*HRP, horse radish peroxidase*) en dilución 1:100. Se incubó durante 2 h a temperatura ambiente. Se hicieron los lavados correspondientes y para revelar la reacción se colocó el substrato diaminobencidina (Invitrogen, Número de catálogo 002020) incubando por 5 min. Finalmente, se realizó la contratinción con hematoxilina y se procedió a fijar las laminillas para su observación al microscopio óptico.

Para la cuantificación de la intensidad y cantidad de células positivas se utilizó el programa QuPath (<https://github.com/qupath>). La determinación de la señal positiva fue asignada por el software y existen 3 niveles de intensidad de señal, las cuales son: ligeramente positivas (+1), moderadamente positivas (+2) y fuertemente positivas (+3); las zonas sin tinción fueron catalogadas como negativas (Neg).

Adicionalmente, para la realización de las curvas de supervivencia, se calculó el valor del *score* inmunoreactivo para cada una de las laminillas [91]. Para este análisis, se toma en cuenta el porcentaje de células positivas (A) y la intensidad de la señal (B), finalmente el resultado del valor de A multiplicado por el valor de B, el cual se encuentra en un rango del 0-12 nos permite determinar si la expresión es negativa, ligera, moderada o fuerte.

Incubación de células SKOV-3 con LA de pacientes con COE

Para la obtención de proteínas, los cultivos celulares de SKOV-3 con una confluencia del 90% en cajas de cultivo T-75, se incubaron con 15 ml de LA, previamente descongelado y atemperado, durante los tiempos indicados (24 o 48 h). La incubación se realizó a 37 °C con 5% de CO₂.

Como condición control se utilizaron células mantenidas en medio de cultivo convencional.

Obtención de proteínas

Las células se centrifugaron a 108 x g durante 10 min a 4 °C para empastillarlas y se lavaron agregando 1 ml de PBS 1x estéril y se centrifugaron a 21 255 x g durante 10 min a 4 °C; se lavaron 3 veces bajo las mismas condiciones. Se retiró el PBS y se agregaron 200 µl de amortiguador de lisis (Tris-HCl 5 mM, EDTA 2 mM y Nonidet P-40 al 1%) con inhibidores de proteasas y fosfatasas (1 µg/ml de aprotinina y leupeptina, 1 mM de PMSF, NaF, y Na₂VO₄). Se dejó reposar por 30 min en hielo, después las células se sometieron a 3 ciclos de vórtex/hielo (1 min/3 min respectivamente). A continuación, se sonicó de la forma siguiente: 5 seg de sonificado por 5 seg de reposo en hielo durante 1 min a una potencia de 200 W. Posteriormente, se centrifugó a 21 255 x g durante 10 min a 4 °C y se colectó el sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó utilizando el Kit DC Protein assay (Bio-Rad, No. Cat. 500-0114) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida-SDS (SDS-PAGE)

Extractos proteicos totales de células SKOV-3 (50 µg), se sometieron a SDS-PAGE unidimensional al 10% de acrilamida, de acuerdo con el protocolo descrito por Laemmli (2011). El corrimiento inició aplicando 80 V durante 20 min aumentando el voltaje 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 (MNC) para posteriormente realizar ensayos de western blot (WB), mientras que el otro se tiñó con el kit “Silver Stain Plus” (BIORAD, No. de Cat. 161-0462 al 64), de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Western Blot

Después de la SDS-PAGE, se realizó una electrotransferencia de las proteínas del gel a una MNC utilizando amortiguador de transferencia (10% amortiguador de corrida 10X, 20% de metanol, 70% de agua miliQ). La electrotransferencia se llevó a cabo durante toda la noche a 25V en agitación. La membrana se bloqueó con TBS-T/leche al 5% durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Se lavó 5 veces durante 10 min con TBS-Tween 0.5% en agitación constante en cada ocasión. El anticuerpo primario anti-PHF20L1 (HPA028417, Sigma-Aldrich) en dilución 1:2000 con TBS-T/leche 1% se incubó durante toda la noche a 4 °C en agitación. A la mañana siguiente, se realizaron los lavados correspondientes y se incubó con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a HRP en dilución 1:10000 durante 1 h a temperatura ambiente en agitación. Se realizaron los lavados y finalmente se reveló en el equipo C-digit para obtener una imagen digital. Se utilizó un anticuerpo anti-ERK total (sc-94, Santa Cruz biotechnology) como control de carga en una dilución 1:5000.

Inmunofluorescencia

Células SKOV-3, adheridas a laminillas de vidrio se sometieron a diferentes condiciones de tratamiento. Al finalizar, las células se fijaron con paraformaldehído al 4% por 1 h a 37 °C. Se lavaron 3 veces con PBS 1x filtrado y se permeabilizaron con una solución de 0.2% de Tritón X-100 en PBS 1x por 15 min a temperatura ambiente y en agitación. Se lavaron 3 veces con PBS 1x filtrado y se bloquearon con SFB al 10% por 1 h a 37 °C. Se adicionó el anticuerpo primario en una dilución 1:100 en PBS 1x, y se incubaron toda la noche a 4 °C en cámara húmeda. Al siguiente día se lavaron tres veces con PBS 1x. Se colocó el anticuerpo secundario

anti-conejo TRITC (ab50598, Abcam) y se incubó durante 1 h a 37 °C bajo protección de la luz. Se adicionó Vectashield con DAPI (No. Cat. H-1200) y la laminilla se montó sobre un portaobjeto. Las muestras ya montadas se almacenaron a -20 °C con protección de la luz hasta su observación, la cual se realizó en un microscopio confocal Carl Zeiss LMS 700. Para el análisis de las muestras se usó el software (ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy).

Inmunoprecipitación

A partir de 2 mg de proteína se aforó a 1 mL con agua miliQ. Se agitó 6 veces, con ciclos vórtex/hielo (1 min c/u). Se preclaró el lisado añadiendo 30 µL de la proteína G agarosa sin diluir. Se incubó 2 h a 4 °C en agitación constante. De manera simultánea se procesaron 100 µL de proteína G agarosa adicionando 50 µL de albúmina al 2% (albúmina/PBS, W/V). El tubo de proteína G más albúmina al 2% se dejó en agitación a 4 °C toda la noche. El tubo con los 30 µL de la proteína G agarosa se colocó en hielo y se dejó precipitar durante 30 min. El sobrenadante se colocó en otro tubo eppendorf. Al sobrenadante, se le agregaron 40 µL del anticuerpo y se incubó toda la noche a 4 °C en vórtex. Se agregaron 100 µL de proteína G agarosa previamente bloqueada con albúmina al 2% y se incubó durante 2 h a 4 °C en agitación. Se dejó precipitar 30 min en hielo. El sobrenadante se desechó y el precipitado se lavó agregando 1 ml de amortiguador de lavado (Tris 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 50 mM, NP40 1%) previamente enfriado. Se agitó 1 min y se dejó precipitar durante 30 min en hielo. Se retiró cuidadosamente el sobrenadante para no absorber las perlas de la proteína G-agarosa. Los lavados se repitieron 5 veces. Se eliminó el amortiguador de lavado y se agregaron 20 µL de amortiguador de muestra 2x. Se hirvió durante 5 min y se centrifugó a 15616 x g durante 2 min. El sobrenadante se separó y se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 7.5% o al 10%.

Espectrometría de masas

Las bandas de interés obtenidas de un gel de electroforesis en una dimensión se enviaron, para su identificación, a la Unidad de Proteómica del CINVESTAV. Para este procedimiento se utilizó el equipo NanoAcquity Synapt G2S1. Este análisis se realizó con el apoyo del M. en C. Emmanuel Ríos Castro, responsable del equipo.

En breve, los fragmentos de gel resultantes se digirieron enzimáticamente de acuerdo con el protocolo modificado de Shevchenko A., et al [92]. Posteriormente, se cargaron péptidos

trípticos en la precolumna Symmetry C18 Trap V / M (Waters, Milford, MA); 180 μm X 20 mm, tamaño de poro de 100 \AA , tamaño de partícula de 5 μm desalado utilizando como fase móvil A, ácido fórmico (FA) al 0,1% en H₂O y fase móvil B, FA al 0,1% en acetonitrilo (ACN) bajo el siguiente isocrático gradiente: 99,9% de fase móvil A y 0,1% de fase móvil B a un flujo de 5 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ durante 3 min. Luego, los péptidos se cargaron y separaron en una columna HSS T3 C18 (Waters, Milford, MA); 75 μm X 150 mm, tamaño de poro de 100 \AA , tamaño de partícula de 1,8 μm ; utilizando un UPLC ACQUITY M-Class (Waters, Milford, MA) con las mismas fases móviles bajo el siguiente gradiente: 0 min 7% B, 30,37 min 40% B, 32,03-35,34 min 85% B, 37-47 min 7% B a un caudal de 400 $\text{nL}\cdot\text{min}^{-1}$ y 45 ° C. Los datos de los espectros se adquirieron en un espectrómetro de masas con ionización por electropulverización (ESI) y separación por movilidad iónica (IMS) Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA) utilizando un enfoque de adquisición independiente de datos (DIA) a través del modo HDMSE (Waters, Milford, MA). La página de sintonía para la fuente de ionización se estableció con los siguientes parámetros: 2,75 kV en el capilar del muestreador, 30 V en el cono de muestreo, 30 V en el desplazamiento de la fuente, 70 ° C para la temperatura de la fuente, 0,5 Bar para el gas de nano flujo y 120 L.hr⁻¹ para el flujo de gas de purga. Se adquirieron dos cromatogramas (cromatogramas de baja y alta energía) en modo positivo en un rango de m / z 50-2000 con un tiempo de barrido de 500 ms. No se aplicó energía de colisión para obtener el cromatograma de baja energía, mientras que para los cromatogramas de alta energía, los iones precursores se fragmentaron en la transferencia utilizando una rampa de energía de colisión de 19-55 V. Archivos * .raw generados que contienen espectros de MS y MS/MS se deconvolucionaron y compararon utilizando el software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v3.0.3 (Waters, Milford, MA) con una base de datos Homo sapiens * .fasta invertida (descargada de Uniprot, secuencias de proteínas 73099, última modificación el 27 de junio de 2018) concatenada con su base de datos invertida. Los parámetros del flujo de trabajo fueron: tripsina como enzima de corte y se permitió una escisión perdida; carbamidometilo (C) como modificación fija y amidación (término N), desamidación (N, Q), oxidación (M), fosforilo (S, T, Y) como modificaciones variables. Tolerancia automática de péptidos y fragmentos, coincidencias mínimas de iones de fragmentos por péptido: 2, coincidencias mínimas de iones de fragmentos por proteína: 5, coincidencias mínimas de péptidos por proteína: 1 y una tasa de descubrimiento falso (FDR) $\leq 4\%$. Todas las identificaciones tuvieron un porcentaje $\geq 95\%$ de confiabilidad

(Protein AutoCurate green). Synapt G2-Si se calibró con [Glu1]-Fibrinopéptido, $[M + 2H]^{2+} = 785,84261$ a 1,5 ppm.

Obtención de RNA

A partir de una caja de cultivo T-75 en confluencia, células SKOV-3 tratadas con LA o medio fueron tratadas para la obtención de ARN. El LA o medio se descartó, para adicionar 4 ml de Trizol (Invitrogen, No Cat. 15596-98) previamente atemperado y a continuación estos volúmenes se transfirieron a tubos eppendorf, se homogenizó y se incubó durante 5 min a TA para completar la disociación de los complejos. Se adicionaron 200 μ l de cloroformo por cada ml de Trizol seguido de vortex durante 3 min. A continuación, se centrifugó la muestra a 3904 x g durante 15 min a 4 °C y se recuperó la fase acuosa formada. A partir de entonces se trabajó con ella. Se adicionaron 500 μ l de isopropanol por cada ml de Trizol usado antes y se incubó durante 10 min a TA. Nuevamente, la muestra se centrifugó a 3904 x g durante 10 min a temperatura ambiente para obtener un precipitado correspondiente al ARN. El sobrenadante se descartó y el ARN se lavó con etanol al 75% y se centrifugó a 1328 x g. Finalmente, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en agua libre de RNAsas. se incubó durante 15 min a 55-60 °C para promover la solubilización y se almacenó hasta su uso a -70 °C.

Retrotranscripción acoplada a la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR)

Primeramente, se obtuvo el cDNA utilizando el kit First Strand cDNA (Thermo Scientific, No. Cat. K1612). Brevemente, se mezcla lo equivalente en volumen a 5 μ g de RNA con 15-20 pmol de Oligo (dT) 18 y se lleva a un volumen final de 11 μ l. Se incuba 5 min a 65 °C. Posteriormente se adiciona el buffer de reacción, el inhibidor de la RNAsa (20 U), la mezcla de los dNTPs y la enzima transcriptasa reversa M-MuLV (40 U). Se lleva a un volumen final de 20 μ L. Para la síntesis de ADNc cebado con oligo (dT) 18, se incuba durante 60 min a 37 °C. El paso siguiente fue la obtención del amplificado correspondiente al RNAm de PHF20L1 mediante PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos (Oligo Sentido ACCCTGCCAAGATTGAAGCA; Oligo antisentido GCTGCTTTGACTAAAGCTAT) y el kit PCR Master Mix (Thermo Scientific, No. Cat. K0171).

Las condiciones de la PCR fueron las siguientes:

Primer paso (1 ciclo): Temperatura 94 °C, 5 min

Segundo paso (35 ciclos): Temperatura 94 °C, 45 s

Temperatura Gradiente, 45 s

Temperatura 72 °C, 1 min/kb

Tercer paso (1 ciclo): Temperatura 72 °C, 7 min

Como control se utilizó la amplificación de la enzima gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) (Oligo Sentido 5' – CAAGGTCATCCATGACAACCTTTG – 3'; Oligo antisentido 5' – GTCCACCACCCTGTTGCTGTAG – 3').

Análisis de ciclo celular mediante citometría de flujo

Las células SKOV-3 se despegaron de la caja de cultivo utilizando tripsina (25-051-CI, Corning) previamente atemperada. La reacción de tripsinización se detuvo utilizando suero fetal bovino 10% en medio McCoy. Las células se empastillaron a 244 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron durante 10 min a 244 x g temperatura ambiente. Este paso se repitió una vez más. Las células se fijaron utilizando metanol al 33%. Se dejaron a 4 °C durante toda la noche. A la mañana siguiente, las células se lavaron con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo primario anti-PHF20L1 (dilución 1:100 en PBS 1X/SFB 3%) durante 1 hora a TA. Se realizaron 5 lavados con PBS 1X y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC) en dilución 1:100 durante 1 h a temperatura ambiente, protegido de la luz. Adicionalmente, se incubaron con 20 µL de yoduro de propidio (1 mg / mL) (P3566 Thermo Fisher Scientific) durante 1 h a 37 °C en la oscuridad para marcar el DNA. El contenido relativo de DNA en las células se analizó con un BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson®) basado en fluorescencia roja, y la cuantificación de cada etapa del ciclo celular se realizó con el software Flowjo X.

Ensayo de Cierre de herida

Para estos ensayos se utilizaron placas de 24 pozos en las cuales se sembraron 100 000 células SKOV-3 por pozo en medio McCoy suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las condiciones correspondientes a células mantenidas en medio de cultivo convencional, células bajo el estímulo de ascitis o células con el *knock down* de PHF20L1 se establecieron previo a la realización de la herida. Las células se trataron con mitomicina C a una concentración de 0.02

mg / ml (M4827 Sigma-Aldrich) durante 2 horas a 37 °C para detener la proliferación celular. Posterior al tiempo indicado se descartó la mitomicina C. Para la realización de la herida se utilizó una punta blanca. La herida se realizó en forma de cruz en el centro del pozo, esto con el fin de llevar un mejor seguimiento de la zona a evaluar al momento del registro fotográfico. Para cada condición, después de la realización de la herida se lavó con medio sin suero para descartar a las células que se desprendieron por el procedimiento. El cierre de la herida se siguió durante 48 horas y se tomaron los registros fotográficos correspondientes.

Ensayo de invasión celular

Para estos ensayos, se sembraron 350 mil células SKOV-3 por pozo en placas de 24 pozos utilizando medio McCoy suplementado con suero fetal bovino al 10%. Se establecieron las condiciones correspondientes a células mantenidas en medio de cultivo convencional, células bajo el estímulo de ascitis o células KD de PHF20L1. Una vez realizado el silenciamiento y mantenido toda la noche, a la mañana siguiente las células se despegaron y se contabilizaron para su posterior resiembra en cámaras transwell de una placa de 6 pozos. En la cámara superior, una hora antes de la resiembra se colocaron 600 µL de matrigel, dilución 1:3 con medio McCoy sin suero y se dejó gelificar en la incubadora hasta su uso. Por cada condición, se sembraron 300 mil células e inmediatamente se agregó medio suplementado o ascitis, según correspondiera. Transcurridas 6 h, una vez que las células estaban completamente adheridas al matrigel, el medio o ascitis de la cámara superior fue sustituido por medio McCoy sin suero y en la cámara inferior se colocó medio suplementado con suero fetal bovino al 20% o la ascitis correspondiente. Se dejaron transcurrir 24 h y una vez completado el tiempo, la cámara superior fue descartada al igual que el medio o ascitis de la cámara inferior. Inmediatamente se agregó 1.5 mL de azul de metileno y se dejó reaccionar el colorante durante 15 minutos. Se hicieron dos lavados con PBS 1X y a continuación se realizó el conteo del total de las células que se encontraban en la cámara inferior. Adicionalmente, 20 campos por condición fueron registrados fotográficamente. Los ensayos se realizaron por triplicado y se graficó el número total de células.

Ensayo de proliferación celular

Para el desarrollo de este ensayo, se utilizaron células SKOV-3 en las condiciones correspondientes previamente establecidas. Para el desarrollo de estos ensayos se utilizó el reactivo MTT (M6494, Thermo Fisher Scientific) y se siguió el procedimiento según indica la casa comercial.

Las células se trataron con 20 μ L de MTT (5 mg / mL en 1X PBS, Sigma®) por 4 h. Se utilizó vehículo (DMSO al 0.5% en 1X PBS, v / v) como control negativo. A continuación, se retiró el medio de cultivo y se midió el formazán, producido por las células, a 590 nm en un lector de microplacas (Modelo 680, Bio-Rad). La viabilidad celular se calculó de la siguiente manera: % de viabilidad celular = (Muestra absoluta / Control absoluto) * 100 y análisis de regresión (porcentaje de supervivencia frente a concentración logarítmica), respectivamente.

Red de interacción

Para el análisis de interacción de PHF20L1 se utilizó la base de datos STRING [93], la cual nos permitió realizar una red de interacciones probables, donde se consideran interacciones conocidas e interacciones previstas. Las interacciones incluyen asociaciones directas (físicas) e indirectas (funcionales); dichas interacciones surgen de la predicción computacional, de la transferencia de conocimientos entre organismos y de interacciones agregadas de otras bases de datos (primarias).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad Prism 5. La comparación entre la condición control y la condición problema se evaluó mediante la prueba de *t student*. La comparación entre grupos se realizó mediante la prueba de ANOVA. Los ensayos *in vitro* se realizaron por triplicado, y el promedio de éstos junto a la desviación estándar correspondiente se incluyó en las gráficas. Las diferencias significativas se muestran y corresponden a * $\rho < 0.01$, ** $\rho < 0.001$, *** $\rho < 0.0001$.

Los ensayos de correlación para determinar el estado de fucosilación de PHF20L1 se determinaron mediante el coeficiente de *Pearson* y el valor de ρ se reportó en la tabla correspondiente. Para los ensayos de correlación entre la expresión de PHF20L1 y los datos

clínicos de las pacientes se utilizó la prueba de *Spearman* y el valor de ρ se reportó en las tablas correspondientes.

La supervivencia se analizó mediante el método de Kaplan-Meier. Los criterios de valoración del estudio fueron la supervivencia global (SG) y la supervivencia libre de progresión (SLP). La duración de la SLP fue desde el momento del diagnóstico hasta la progresión de la enfermedad o la recaída. La SG se definió como la duración desde el momento del diagnóstico hasta la muerte o el último seguimiento. Los datos de supervivencia de pacientes vivos sin progresión o los que fallecieron por otra enfermedad fueron censurados.

VII. Resultados

La alta expresión de PHF20L1 correlaciona con la presencia de cáncer en cortes de tejido tumoral de cáncer de ovario epitelial

Previamente, la proteína PHF20L1 se identificó en extractos proteicos de células SKOV-3 que estuvieron bajo el estímulo de ascitis, sin embargo, no se había analizado la expresión de la proteína en tejido tumoral. Por lo anterior, se analizó su expresión en diferentes tejidos provenientes de tumores de pacientes con cáncer de ovario epitelial.

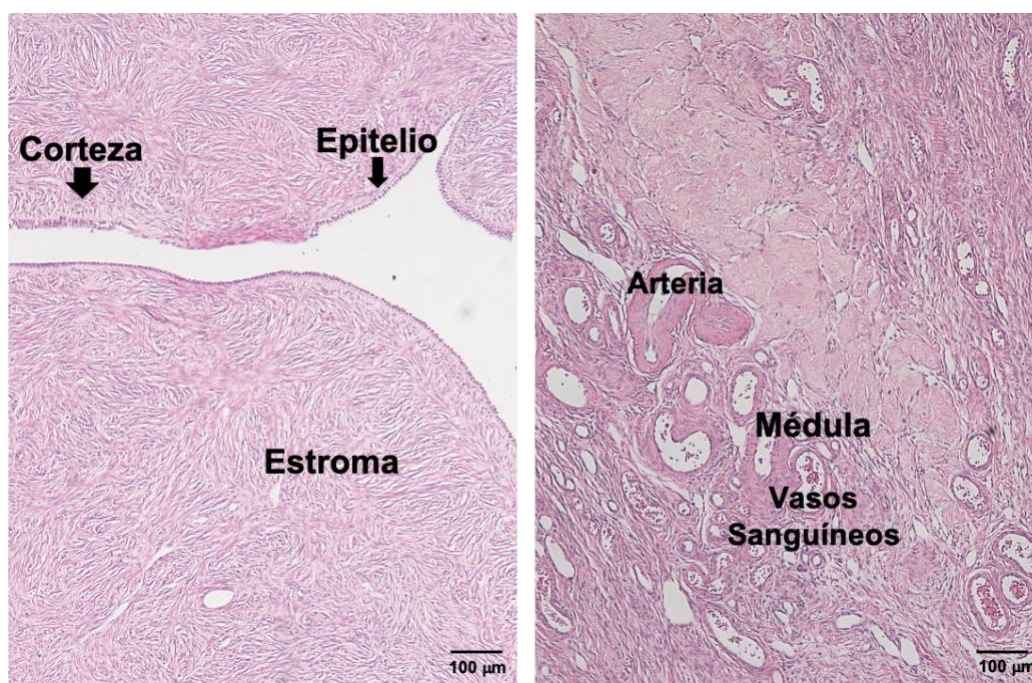


Figura 5. Histología de ovario libre de cáncer. Tinción con H&E de un corte de tejido de ovario libre de tumor. Se muestran dos campos diferentes correspondientes al mismo tejido, ambos a una magnificación de 20X. En el panel izquierdo se observa la zona correspondiente al epitelio y estroma del ovario. En el panel derecho se visualiza una zona altamente vascularizada donde se pueden observar arterias y venas, lo cual corresponde a la médula.

Se inició el estudio analizando por la técnica de Hematoxilina y Eosina (H&E), la estructura casi intacta del epitelio del ovario, así como zonas correspondientes al estroma ovárico y la médula, donde se resalta la presencia de arterias y venas, en un corte de tejido ovárico sin cáncer (**Figura 5**).

Se procedió enseguida a la detección de PHF20L1 por inmunohistoquímica y los resultados obtenidos se analizaron mediante el software QuPath (<https://github.com/qupath>). La clasificación obtenida por la diferencia en intensidad de color consiste en tinciones catalogadas como ligeramente positivas (1+), moderadamente positivas (2+) y fuertemente positivas (3+); adicionalmente se reportaron aquellas zonas sin tinción (Neg) (**Figura 6**).

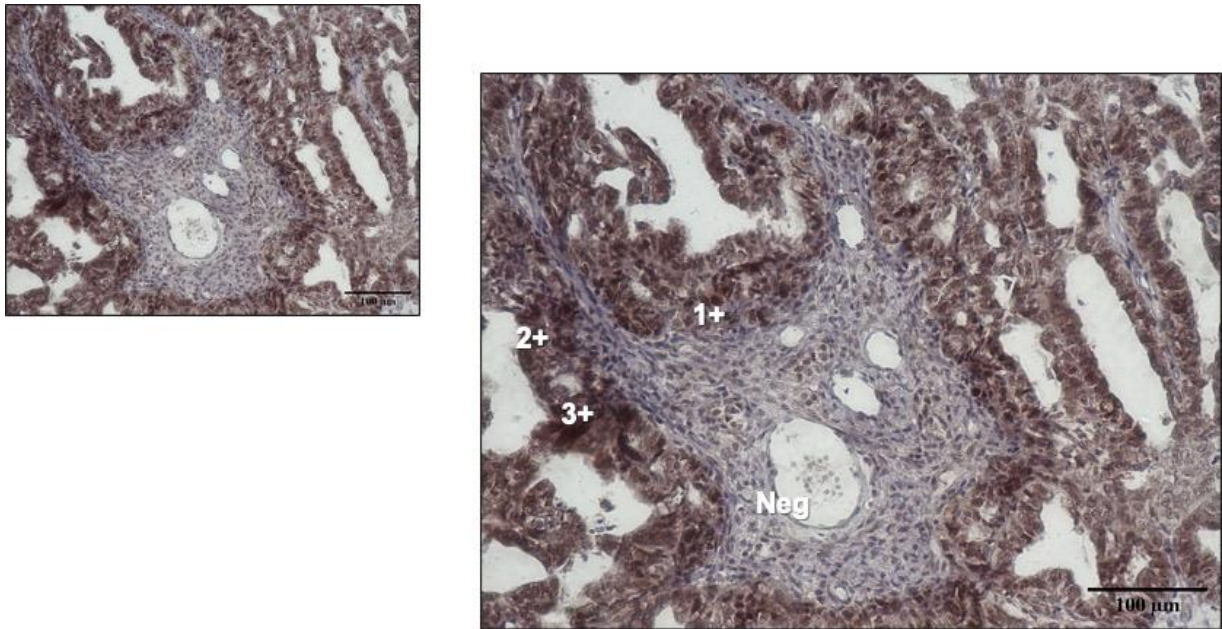


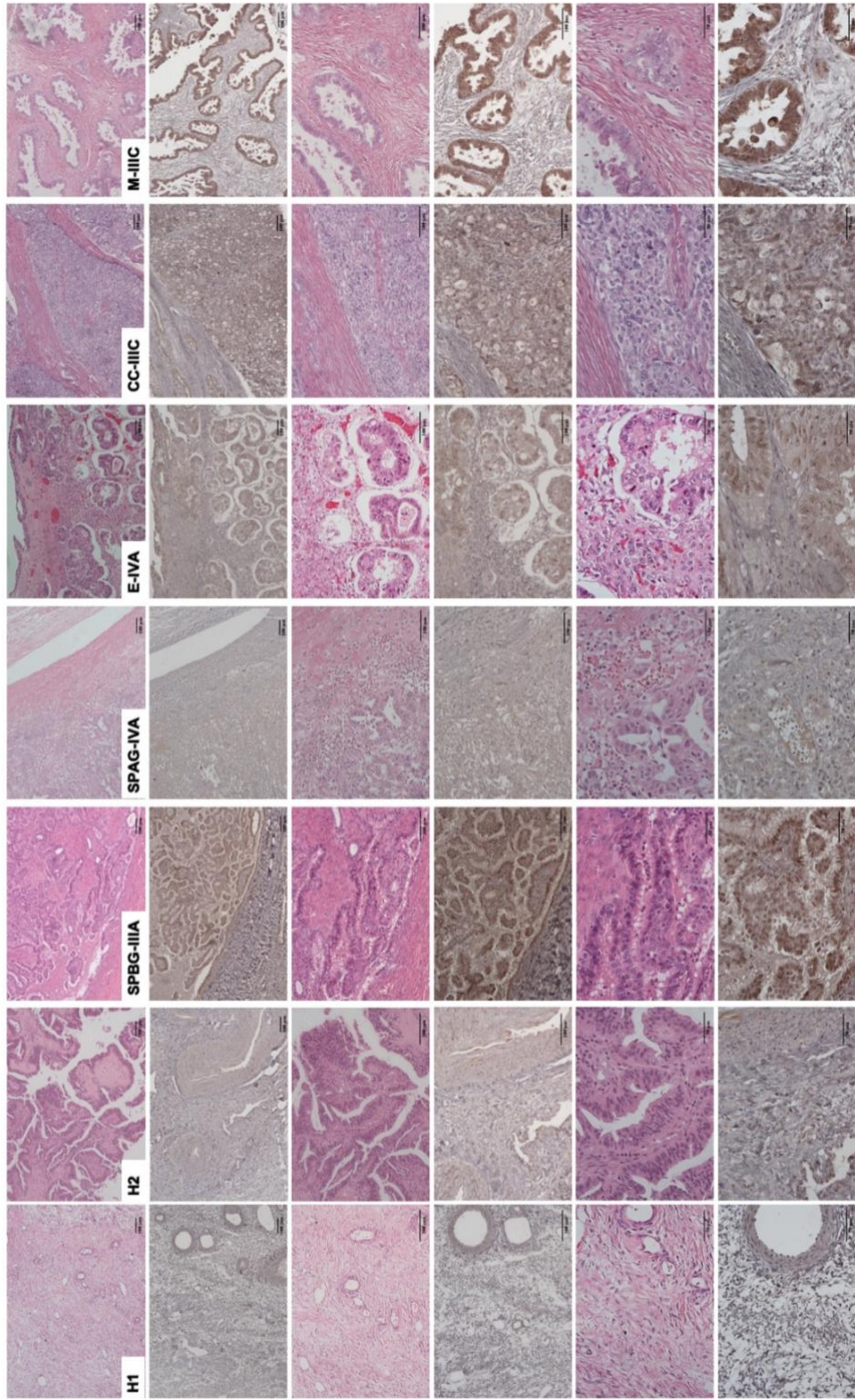
Figura 6. Imagen representativa de la asignación de células positivas y negativas. Se muestra la imagen del tejido número 6 así como un ejemplo de la clasificación obtenida por la diferencia en intensidad de color. En un mismo tejido se observan tinciones catalogadas como ligeramente positivas (1+), moderadamente positivas (2+) y fuertemente positivas (3+); también se observan zonas sin tinción (Neg). Para la cuantificación de la intensidad y cantidad de células positivas se utilizó el programa QuPath (<https://github.com/qupath>).

Se analizaron un total de 29 cortes de tejido tumoral de ovario y dos tejidos libres de cáncer, así como un corte de tejido correspondiente a tumor de mama y otro correspondiente a cáncer cervicouterino (**Figura 7; Tabla 3; Figura suplementaria 1**). Se observó una alta expresión de la proteína en todas las regiones que contienen células con alto contenido citoplásmico y núcleos grandes, que se podrían considerar como las zonas más irregulares del área de tejido analizado (**Figura 7, Figura 8; Tabla 4**). En algunas muestras es posible observar una señal altamente positiva localizada en el núcleo mientras que otras células presentan una señal positiva en el citoplasma (**Figura 8**). La muestra etiquetada como número **27** no es positiva en su mayoría

(solo el 30%), pero sí lo es en una región del tejido donde se observan células de tamaño y morfología distinta a lo observado en la mayor parte del tejido (**Tabla 4; Figura 9**). La muestra número **27 (Figura 9)** es la única en la cual se pudo observar una estructura del tejido ovárico similar a un ovario sano, tal como lo vimos en la primer laminilla, teñida con Hematoxilina y Eosina de la **Figura 4**. Del total de las muestras analizadas, casi el 80% presentaron una elevada expresión de la proteína (**Tabla 4; Figura 10**).

Subtipos histológicos de cáncer de ovario epitelial

Tejido libre de cáncer



10X

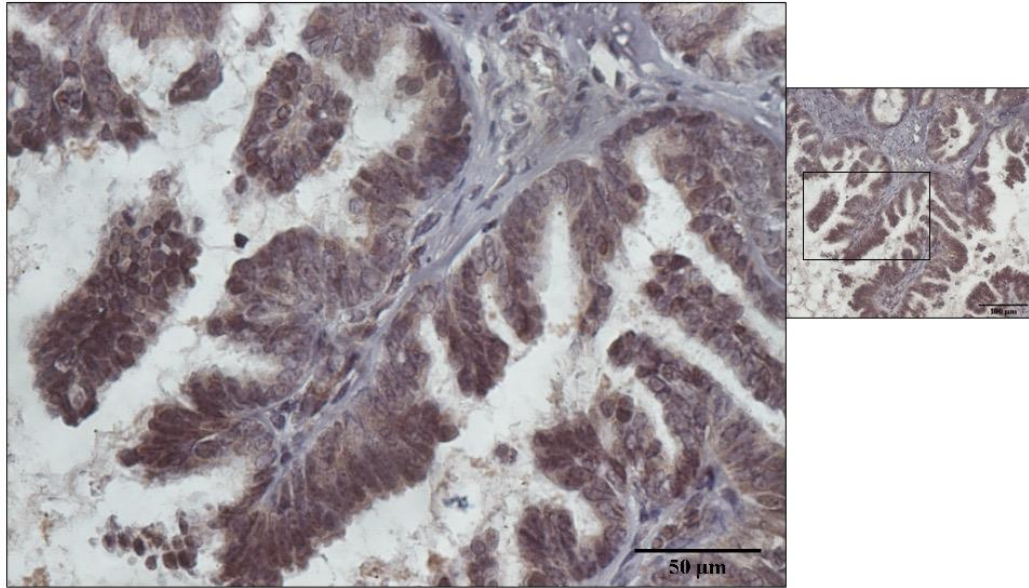
20X

40X

Figura 7. Imágenes representativas de la expresión de PHF20L1 en cortes de tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario epitelial. En la primer y segunda columna se muestran imágenes de los tejidos que se tomaron como control por ser tejidos libres de cáncer (H1 y H2). En las columnas subsecuentes se muestran 5 de los 29 cortes analizados, correspondientes a 5 pacientes diferentes. Las imágenes mostradas se observan a las 3 diferentes ampliaciones analizadas, 10X, 20X y 40X. Todas las imágenes van acompañadas de su correspondiente tinción con H&E. La señal positiva se detecta en diferentes tonalidades de color marrón. Los núcleos se ven en color morado y el citoplasma en tonalidades de rosa.

SPBG: Seroso papilar de bajo grado; SPAG: Seroso papilar de alto grado; E: Endometrioides; CC: Células claras; M: Mucinoso. La etapa clínica de cada tejido también fue anexada, inmediatamente después del subtipo histológico.

A)



B)

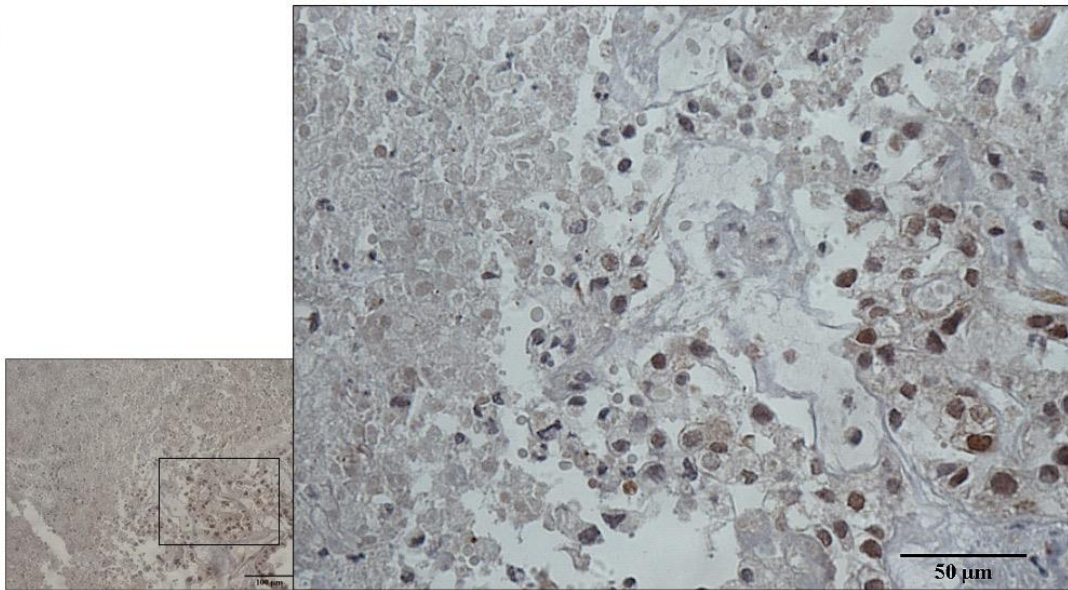


Figura 8. Imágenes representativas de la expresión de PHF20L1 a nivel de citoplasma o núcleo en dos cortes de tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario epitelial. En el panel A) se muestra una imagen y su ampliación de una zona (recuadro) donde se resalta la expresión de la proteína PHF20L1 tanto en citoplasma como en núcleo. En el panel B) se muestra una imagen y su ampliación de una zona (recuadro) la expresión de la proteína principalmente a nivel nuclear.

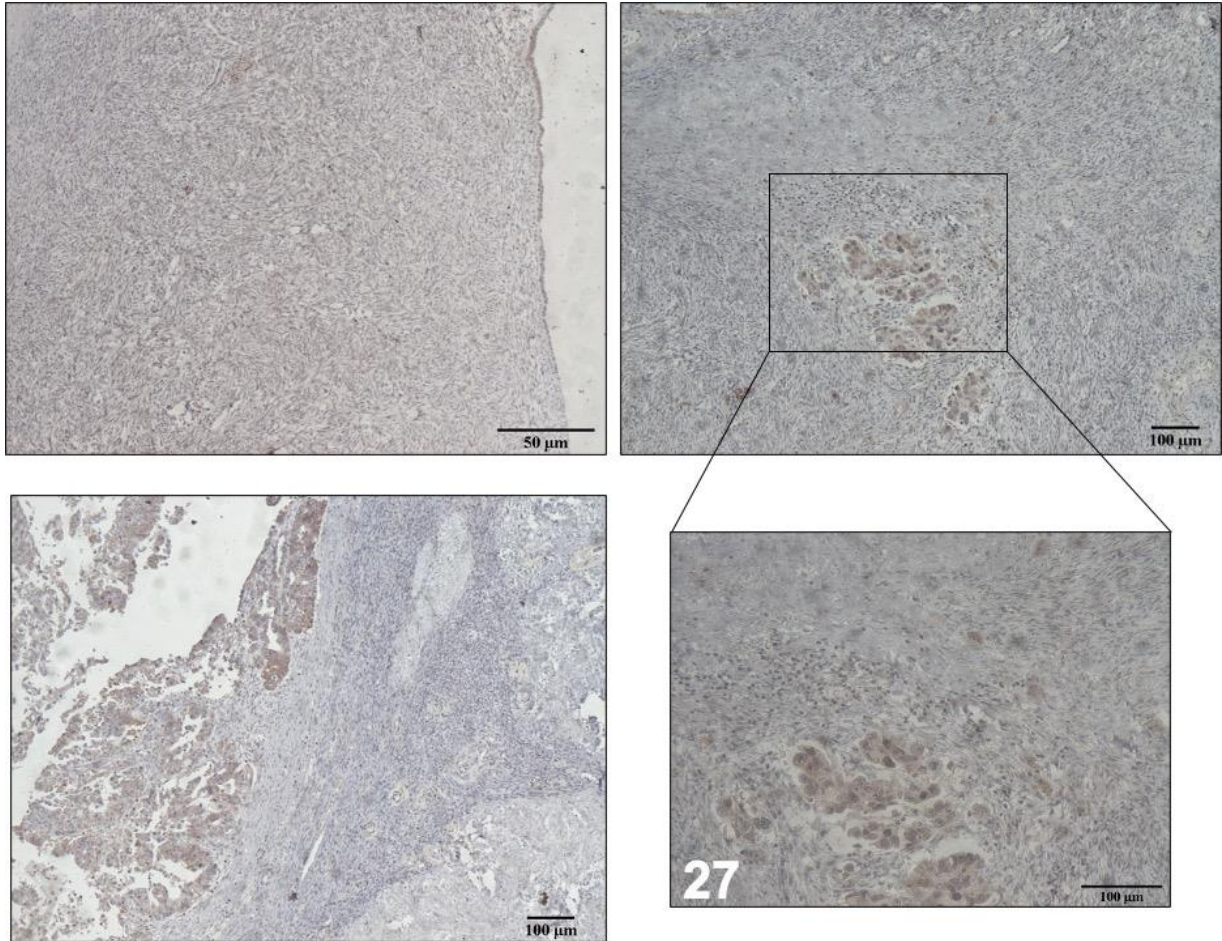


Figura 9. Imágenes del tejido número 27. Se muestran 3 imágenes obtenidas del tejido identificado como número 27, donde se observa el área positiva para la detección de PHF20L1. Las dos imágenes superiores y la imagen inferior izquierda se tomaron a una ampliación de 10X, mientras que la imagen inferior derecha corresponde a una ampliación 20X.

Tabla 4. Porcentaje de células positivas a la expresión de la proteína PHF20L1.

Código de la muestra	% de células positivas	Código de la muestra	% de células positivas	Código de la muestra	% de células positivas
H1	10.66	10	98.43	21	98.06
H2	21.12	11	75.08	22	91.11
1	93.92	12	94.26	23	75.45
2	93.94	13	94.22	24	93.11
3	84.59	14	58.48	25	94.42
4	56.13	15	93.22	26	99.44
5	68.17	16	92.24	27	29.88
6	96.53	17	95.99	28	70.25
7	44.04	18	99.40	29	88.55
8	87.53	19	48.44	CaMama	91.19
9	95.57	20	61.63	CaCU	97.31

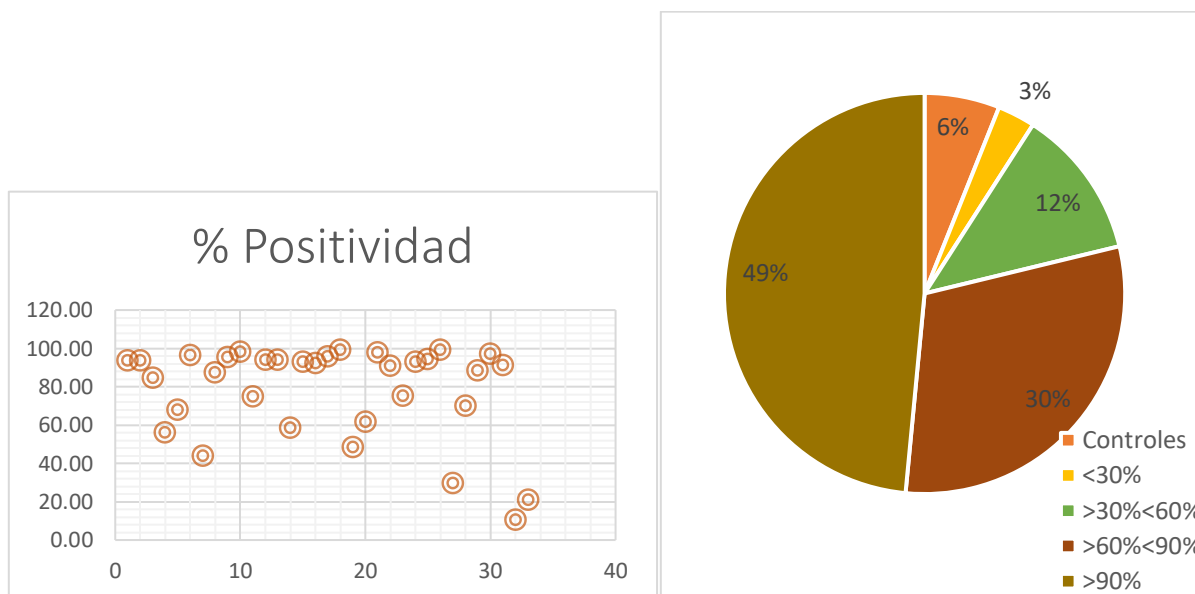


Figura 10. Análisis de la expresión de PHF20L1 en tejido de pacientes con cáncer de ovario. En el panel izquierdo se representa el porcentaje de células positivas a la señal que detecta a PHF20L1 en los ensayos de inmunohistoquímica. En el panel derecho, se graficaron las 33 muestras analizadas en función del porcentaje de positividad obtenido.

Los resultados obtenidos mediante inmunohistoquímica fueron utilizados para realizar un análisis de correlación de *Spearman* (Tabla 5). No se encontró correlación entre la expresión de PHF20L1 y las variables clínicas analizadas. Sin embargo, para el caso de los niveles de

CA125 se encontró una ligera correlación negativa con la baja expresión de PHF20L1 (un valor positivo o negativo mayor a 0.5 es considerado como correlación).

Tabla 5. Análisis de correlación de Spearman entre la expresión de PHF20L1 mediante IHQ y datos clínicos de las pacientes.

Expresión de PHF20L1 en SKOV-3	Spearman r				
	Edad	Etapa Clínica	CA125	SLP	SG
<i>Expresión PHF20L1 95% C. I.</i>	0.1336	-0.2294	-0.2719	-0.1517	-0.0665
<i>Ligera Expresión 95% C. I.</i>	0.294	-0.27	-0.4793	0.1675	0.33
<i>Moderada Expresión 95% C. I.</i>	-0.1069	-0.2104	0.01281	-0.1527	-0.299
<i>Alta Expresión 95% C. I.</i>	-0.1306	0.007537	0.2027	-0.1536	-0.2112

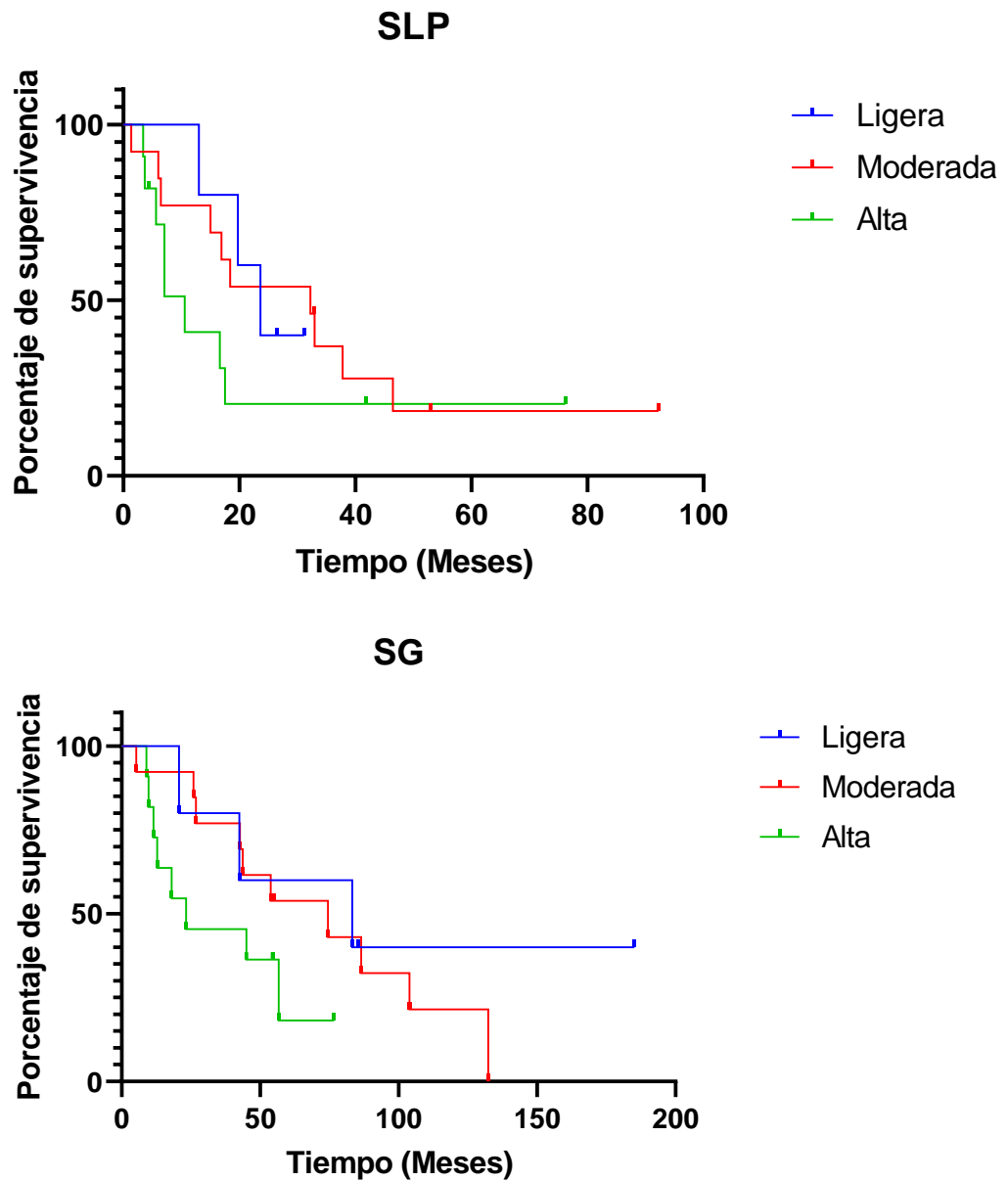


Figura 11. Curvas de supervivencia libre de progresión y supervivencia global. Se esquematizan los datos correspondientes a la curva de supervivencia con respecto a la expresión de PHF20L1, la cual se agrupa en ligera, moderada o alta, según el valor del Score inmunoreactivo (ISR) calculado.

Además, cuando se calculó el score inmunoreactivo, donde se toma en cuenta tanto la intensidad de la señal como el número de células positivas a la tinción, los dos tejidos libres de tumor

fueron catalogados como negativo y ligeramente positivo. Esto indica que, en tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario, se observa un incremento que se presenta como una expresión que va de ligera a elevada. Tomando en cuenta este valor (del score inmunoreactivo), se realizaron dos curvas de Kaplan-Meier tanto para estimar la supervivencia de progresión como para evaluar la supervivencia de las pacientes en función de la expresión de PHF20L1 (**Figura 11**). Los resultados sugieren que una expresión alta de PHF20L1 correlaciona con un periodo libre de progresión más corto, en comparación con las pacientes, cuyos tejidos tuvieron una expresión menor de la proteína, donde el tiempo de progresión es mayor. Para el caso del análisis con respecto a la supervivencia global, podemos notar, de manera similar, que existe una tendencia de las pacientes con una mayor expresión de la proteína a tener un tiempo menor de supervivencia. La SG fue más corta en pacientes con sobreexpresión de PHF20L1 que en aquéllas con baja expresión de PHF20L1 (33 meses frente a 83 meses, $\rho = 0,1993$). La SLP disminuyó en pacientes con un nivel de PHF20L1 elevado en comparación con los pacientes que tenían un nivel de PHF20L1 relativamente bajo (17 meses frente a 22 meses, $\rho = 0,4513$).

Con base en este análisis, se puede observar que la mayoría de las muestras analizadas contienen una expresión que va de media a alta (**Figura 7-9; Tabla 4**), en relación con el porcentaje de expresión de PHF20L1. Se realizó una búsqueda digital acerca de la expresión de PHF20L1 en diferentes tejidos sin cáncer. *The Human Protein Atlas* (<https://www.proteinatlas.org/>) reporta que la expresión de esta proteína en ovario libre de cáncer es baja, y sólo se expresa en células del estroma y en células foliculares. Las muestras que nosotros analizamos y que son etiquetadas como H1 y H2, muestran una ligera expresión de PHF20L1 en el estroma ovárico así como en las células endoteliales que forman la pared de los vasos sanguíneos (**Figura 7**), sin embargo su expresión no supera más del 20% de positividad en las células analizadas (**Tabla 4**). Con base en los resultados obtenidos y en lo reportado en *The Human Protein Atlas*, donde se menciona que la expresión de PHF20L1 en un ovario sano es baja y se limita a las células foliculares y estromales, es posible sugerir que en el tejido de cáncer de ovario hay una sobre expresión de la proteína.

Recordemos que entre las funciones del estroma celular del ovario se encuentra la producción de factores angiogénicos, proteasas, factores de crecimiento, proteínas que regulan la respuesta inmune y otras moléculas de señalización. Sin embargo, en el caso de las muestras tumorales que se analizaron, vemos que la señal presente en el estroma es casi indetectable y al contrario

se concentra fuertemente en las células que podrían corresponder a células tumorales. Esto nos hace preguntarnos acerca del papel que desempeña PHF20L1 y si la ausencia de la proteína afecta significativamente el funcionamiento celular. Estas preguntas se abordaron mediante ensayos adicionales *in vitro*.

El líquido ascítico modifica los niveles de expresión de PHF20L1 en células SKOV-3.

La literatura indica que PHF20L1 tiene al menos 3 isoformas que se expresan con diferente peso molecular: 115, 66 y 37 kDa. Dado que el líquido ascítico es capaz de modular la expresión proteica y con ello el fenotipo celular en células de cáncer de ovario [57], se analizó si la expresión de PHF20L1 y sus isoformas era modulada por el microambiente del cáncer de ovario. Conociendo la heterogeneidad de los componentes de la ascitis, se utilizaron 10 diferentes líquidos ascíticos de pacientes con COE en cultivos de células SKOV-3 para evaluar su efecto sobre la expresión de la proteína PHF20L1 en la línea celular. Los cultivos se mantuvieron durante 24 o 48 h de estímulo con ascitis. Como condición control se utilizaron las células SKOV-3 incubadas en medio de cultivo convencional.

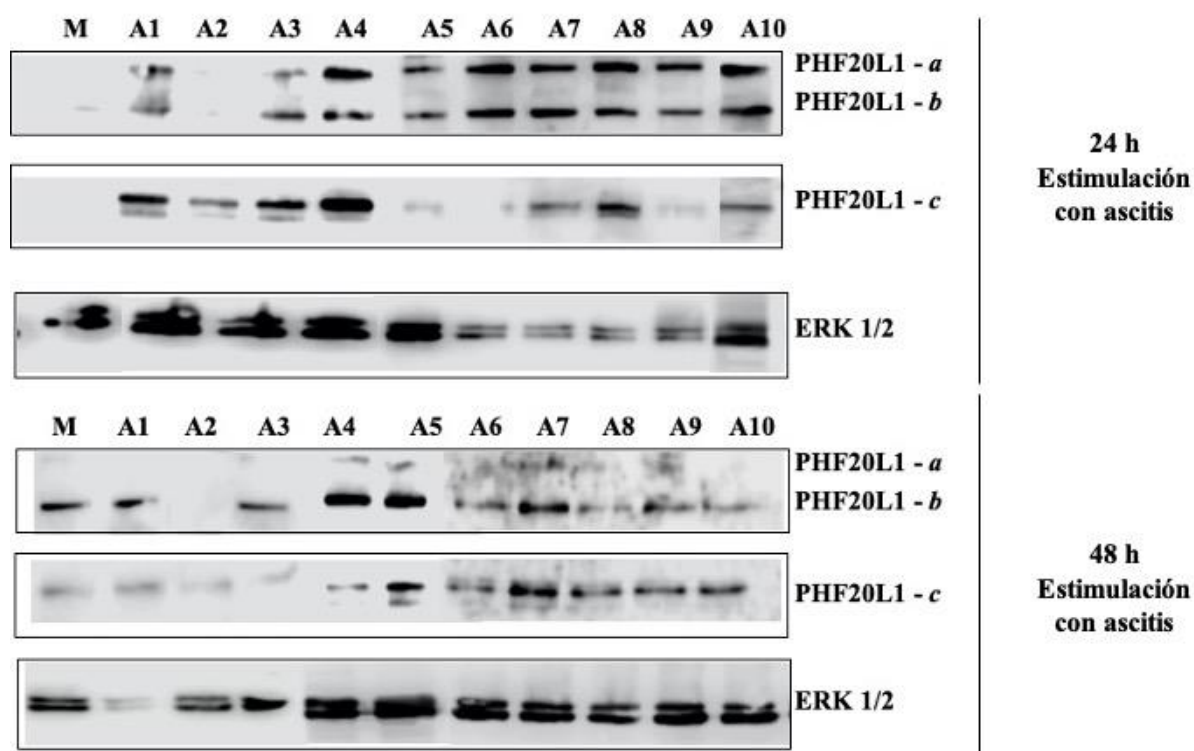


Figura 12. Patrón de expresión de las isoformas de PHF20L1 en células SKOV-3 estimuladas con ascitis de pacientes con cáncer de ovario. Se realizaron ensayos de western blot por triplicado para el análisis de la expresión de PHF20L1 en presencia de medio de cultivo (M) o de ascitis de los pacientes (A1-A10) y se muestra una imagen representativa. Como control de carga se utilizó ERK total.

Mediante ensayos de western blot se analizó la expresión de las 3 isoformas de la proteína (115, 66 y 37 kDa; denominadas como isoforma *a*, isoforma *b* e isoforma *c*, respectivamente) (**Figura 12**). Se observó que la expresión en la condición control es baja y que sólo se expresa la isoforma *b*, la cual es más evidente a las 48 h, donde además se puede ver la expresión de la isoforma *c*. Bajo el estímulo de ascitis, la expresión de todas las isoformas incrementa en casi todos los líquidos ascíticos (**Figura 12**). A las 24 h podemos observar a las 3 isoformas mientras que a las 48 h la expresión de la isoforma *a*, desaparece o disminuye significativamente. Los ensayos se hicieron por triplicado y se hizo un análisis semi-cuantitativo al graficar la intensidad de pixeles de cada banda detectada (**Figura 13**).

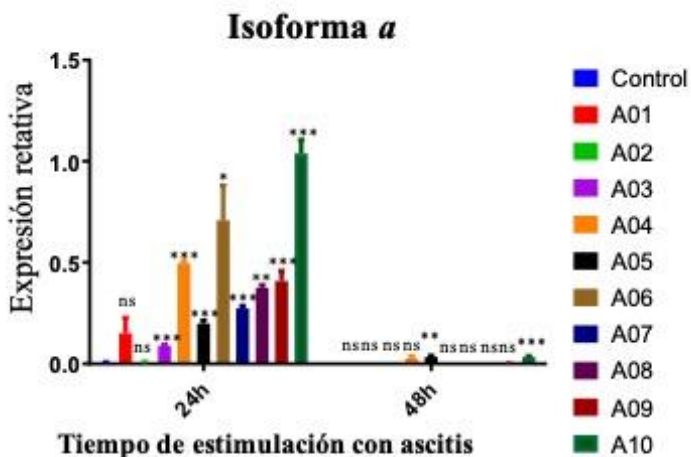
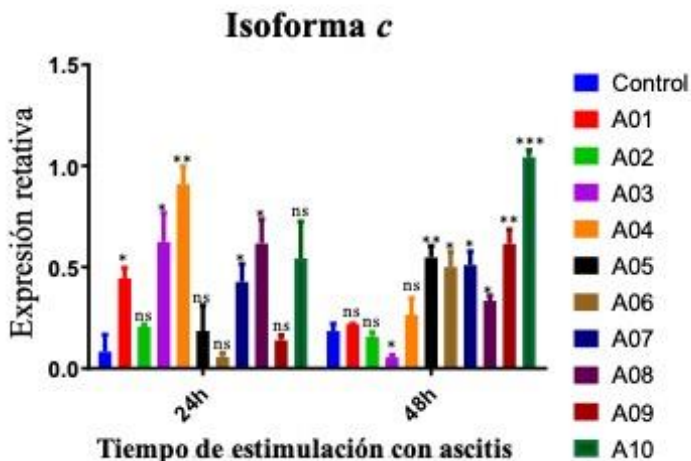
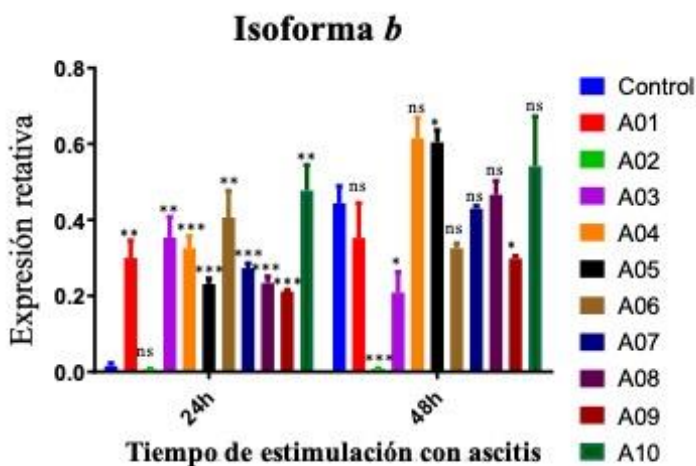


Figura 13. Análisis estadísticos de la expresión de PHF20L1 mediante Western blot. Se realizó el análisis estadístico en el programa Graph Pad. Se muestran 3 gráficos correspondientes a la isoforma *a*, *b*, *c* expresadas a las 24 o 48 h en el control y con estimulación con ascitis. Las diferencias significativas se muestran y corresponden a * $\rho < 0.01$, ** $\rho < 0.001$, *** $\rho < 0.0001$.



Se realizó un análisis de correlación de *Spearman* utilizando variables clínicas obtenidas de los expedientes de las pacientes con cáncer de ovario. Los resultados se encuentran en la **Tabla 6**. Se encontró que la expresión de la isoforma *a* de PHF20L1 correlaciona positivamente con la edad y negativamente con la supervivencia libre de progresión y supervivencia global. De forma similar, la isoforma *b* muestra una correlación negativa con la supervivencia libre de progresión. Todos los datos mencionados son estadísticamente significativos.

Tabla 6. Análisis de correlación de *Spearman* entre la expresión de PHF20L1 mediante western blot y datos clínicos de las pacientes

Expresión de PHF20L1 en SKOV-3	<i>Spearman r</i>				
	Edad	Etapa Clínica	CA125	SLP	SG
	24 h de estimulación con ascitis				
Isoforma <i>a</i>	0.8008	0.315	-0.224	-0.783	-0.648
95% C. I.					
Isoforma <i>b</i>	0.383	0.315	-0.176	-0.6	-0.2606
95% C. I.					
Isoforma <i>c</i>	-0.174	-0.201	-0.491	0.133	0.127
95% C. I.					
	48 h de estimulación con ascitis				
Isoforma <i>a</i>	0.26	-0.05	-0.73	-0.46	-0.2
95% C. I.					
Isoforma <i>b</i>	0.244	0.422	-0.37	-0.45	-0.394
95% C. I.					
Isoforma <i>c</i>	0.592	0.382	-0.139	-0.45	-0.455
95% C. I.					

Así mismo, mediante ensayos de inmunofluorescencia se analizó la localización subcelular de la proteína y su expresión en líneas celulares de cáncer de ovario (SKOV-3 y OVCAR-3) así como en líneas celulares de cáncer de mama (BT-20 y MCF7) (**Figura 14**). Se observó que la localización subcelular de la proteína corresponde al citoplasma principalmente, aunque

también está presente en el núcleo de algunas células. La expresión de PHF20L1 en varias líneas celulares de cáncer y particularmente en células SKOV-3 mantenidas en medio de cultivo convencional es baja, mientras que cuando se estimula con ascitis (en células SKOV-3) la expresión incrementa considerablemente, tal y como lo veíamos mediante los ensayos de western blot. En el caso de las células OVCAR-3 el incremento en la expresión de PHF20L1 no es tan evidente en todos los líquidos ascíticos empleados, pero si se observa un ligero aumento en comparación con las células no estimuladas con ascitis. Estos resultados fueron comparados con ensayos de western blot realizados en extractos de células OVCAR-3 estimuladas y no estimuladas con 3 diferentes líquidos ascíticos durante 24 y 48 h (**Figura 15**). Aunque no se observan cambios significativos, dado que estos ensayos no se hicieron por triplicado, hay un ligero incremento en la expresión de las isoformas de la proteína, sobre todo de la isoforma *a*, sin embargo, a las 48 h no se presentan los cambios que previamente habíamos observado que suceden con la línea celular SKOV-3, esto es, no observamos una regulación negativa en la expresión de la isoforma *a*, al contrario, vemos que se mantiene en todos los casos. La isoforma *c* parece disminuir su expresión en la mayoría de las muestras de células estimuladas con ascitis. El LA 07 es el que muestra un mayor incremento de la expresión de las isoformas *a* y *b* de la proteína a las 24 h de estimulación. La expresión de PHF20L1 en células SKOV-3 se visualizó mediante inmunofluorescencia utilizando 9 diferentes líquidos ascíticos (**Figura 16**), mientras que en el caso de las células OVCAR-3 se analizaron 5 diferentes ascitis mediante inmunofluorescencia (**Figura 17**). Los resultados sugieren que, tal como sucede en SKOV-3, en el caso de OVCAR-3 también se incrementa la expresión de la proteína por efecto del líquido ascítico. La localización subcelular en células SKOV-3 es tanto a nivel de citoplasma como de núcleo.

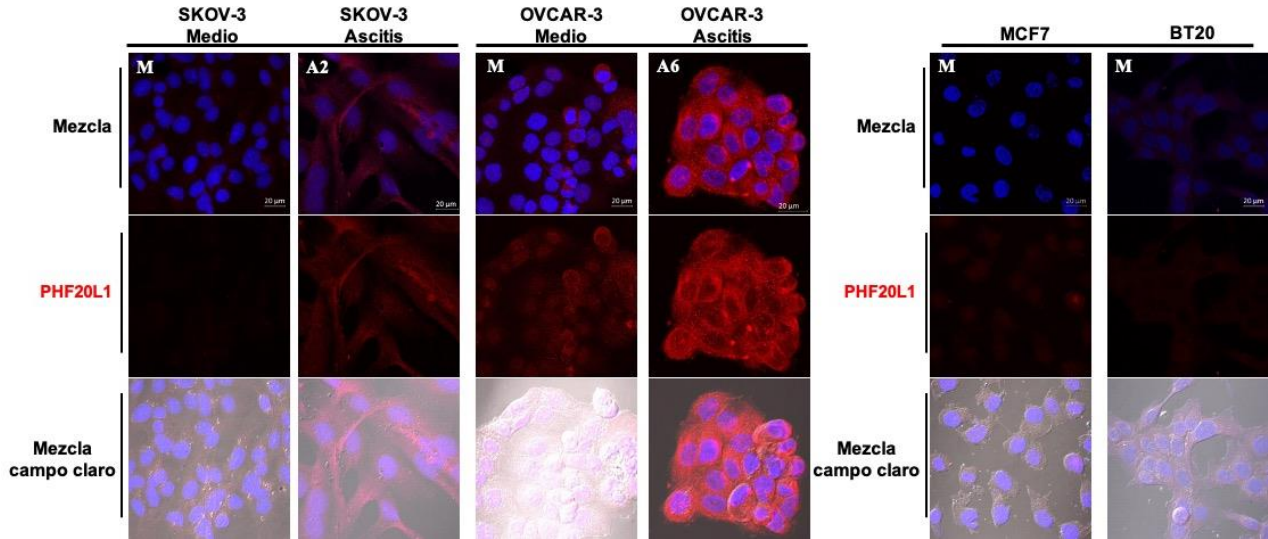


Figura 14. PHF20L1 se expresa de manera basal en diferentes líneas celulares de cáncer. Por inmunofluorescencia se analizó la distribución subcelular y la expresión de PHF20L1 en SKOV-3 y en OVCAR-3 y en dos líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7 y BT-20). En rojo se observa a la proteína en el panel superior y el panel inferior indica la mezcla de núcleos (azul), y la proteína (rojo) y la mezcla de colores junto al campo claro.

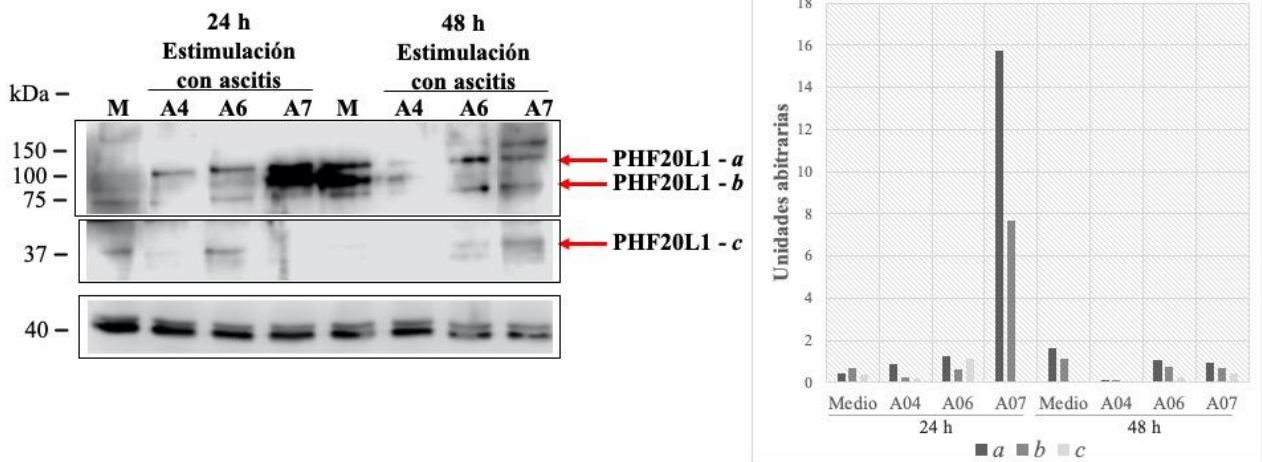
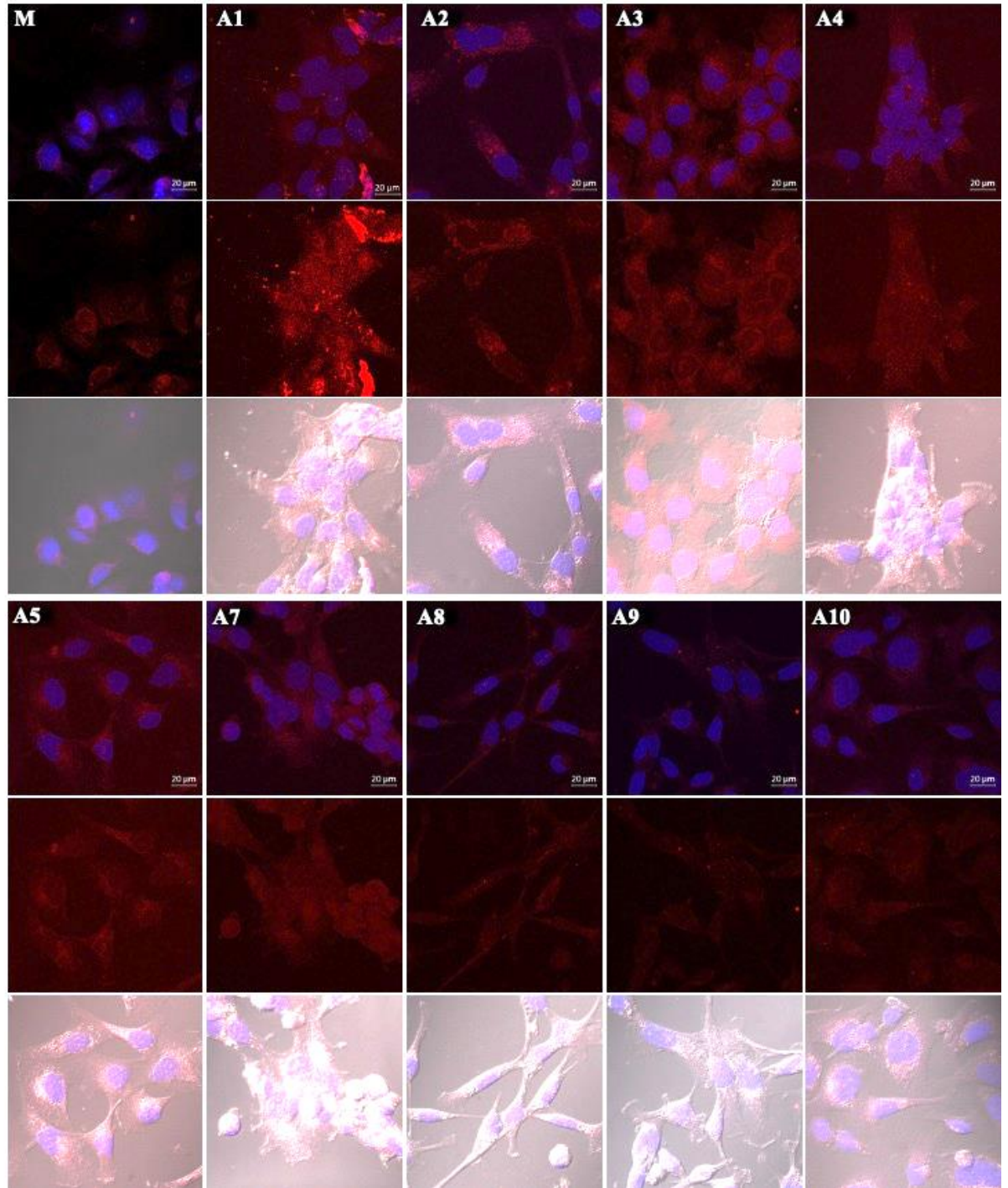


Figura 15. Análisis de la expresión de las isoformas de PHF20L1 en células OVCAR-3 estimuladas con ascitis de pacientes con cáncer de ovario. Se realizaron ensayos de western blot para el análisis de la expresión de PHF20L1. Como control de carga se utilizó ERK total (Panel izquierdo). Adicionalmente, se realizó un análisis densitométrico del resultado de western blot (Panel derecho).

a)



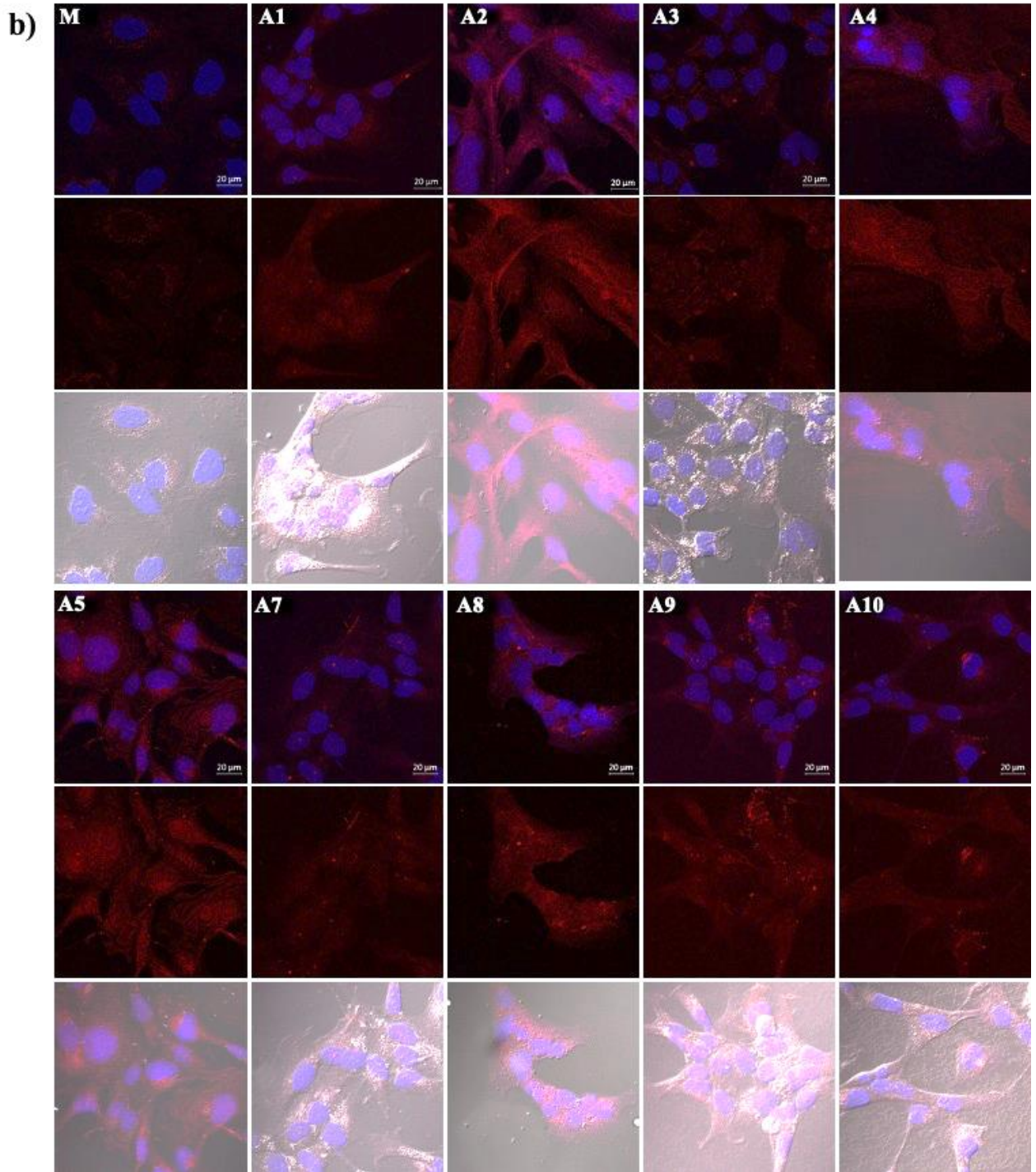


Figura 16. Expresión de PHF20L1 en células SKOV-3 bajo el estímulo de 9 ascitis diferentes. Inmunofluorescencias de células SKOV-3 que se estimularon con diferentes líquidos ascíticos durante 24 h (Panel A) o 48 h (Panel B). En rojo se observa a la proteína y en azul los núcleos.

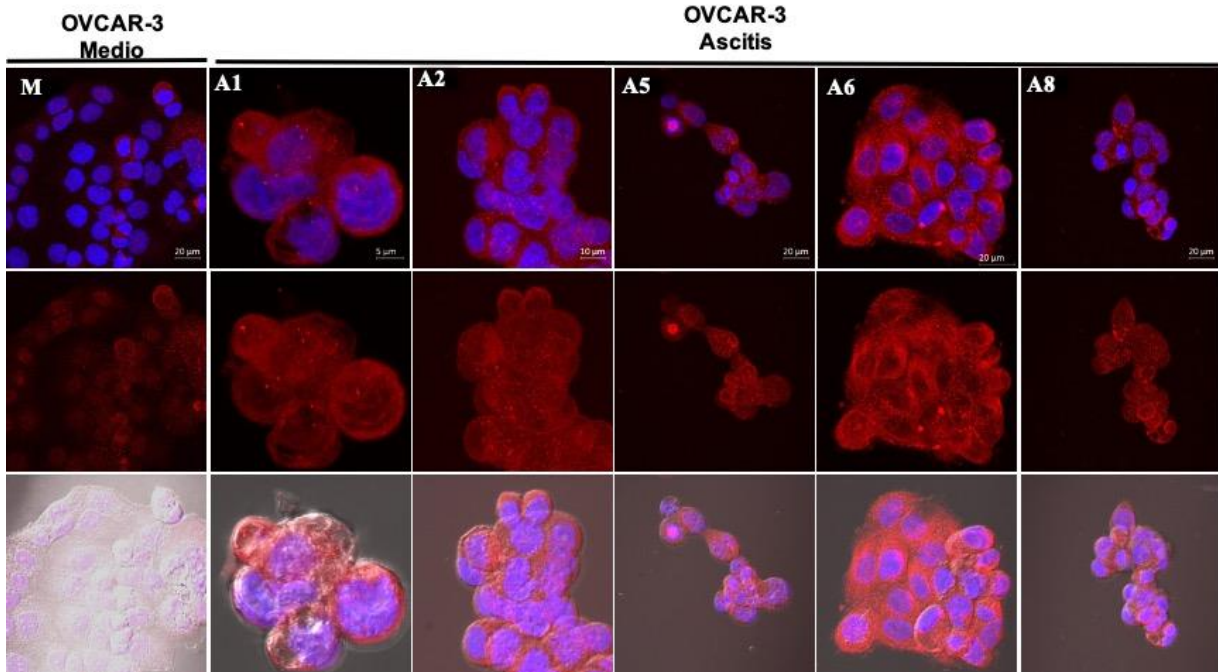


Figura 17. Expresión de PHF20L1 en células OVCAR-3 bajo el estímulo con 5 ascitis diferentes. Inmunofluorescencias de células OVCAR-3 que se estimularon con diferentes líquidos ascíticos durante 24 h. En rojo se observa a la proteína y en azul los núcleos.

La proteína PHF20L1 se identificó originalmente por su estado de fucosilación como resultado de la estimulación de las células SKOV-3 con líquido de ascitis. Por ello, se evaluó el estado fucosilado de la proteína en células SKOV-3 así como en la línea celular OVCAR-3, con estímulo y sin estímulo de ascitis (**Figura 18**) utilizando varios líquidos ascíticos. La mayoría de los líquidos ascíticos provenientes de pacientes con cáncer de ovario indujo la fucosilación de la proteína en células SKOV-3 (se probaron 10 diferentes líquidos ascíticos, aunque no se muestran todos). Con el fin de conocer si el efecto de los líquidos ascíticos sobre el estado de fucosilación era un proceso generalizado, se analizó también el efecto de estos LAs en otra línea celular de cáncer de ovario, OVCAR-3. Los resultados mostraron que PHF20L1 también se fucosila y que además el incremento en su expresión bajo el estímulo con ascitis parece ser mayor incluso que en las células SKOV-3 (**Figura 18**). El coeficiente de correlación de Pearson indica que la proteína PHF20L1 se encuentra fucosilada, tanto en SKOV-3 como en OVCAR-3, esto cuando las líneas celulares son estimuladas con ascitis de pacientes con cáncer de ovario. Este último dato es de interés dado que, como se mencionó antes, PHF20L1 fue analizada y

encontrada a partir de un enriquecimiento de proteínas fucosiladas. Por tal motivo era importante corroborar, al menos de manera indirecta, que se trata de una proteína fucosilada.

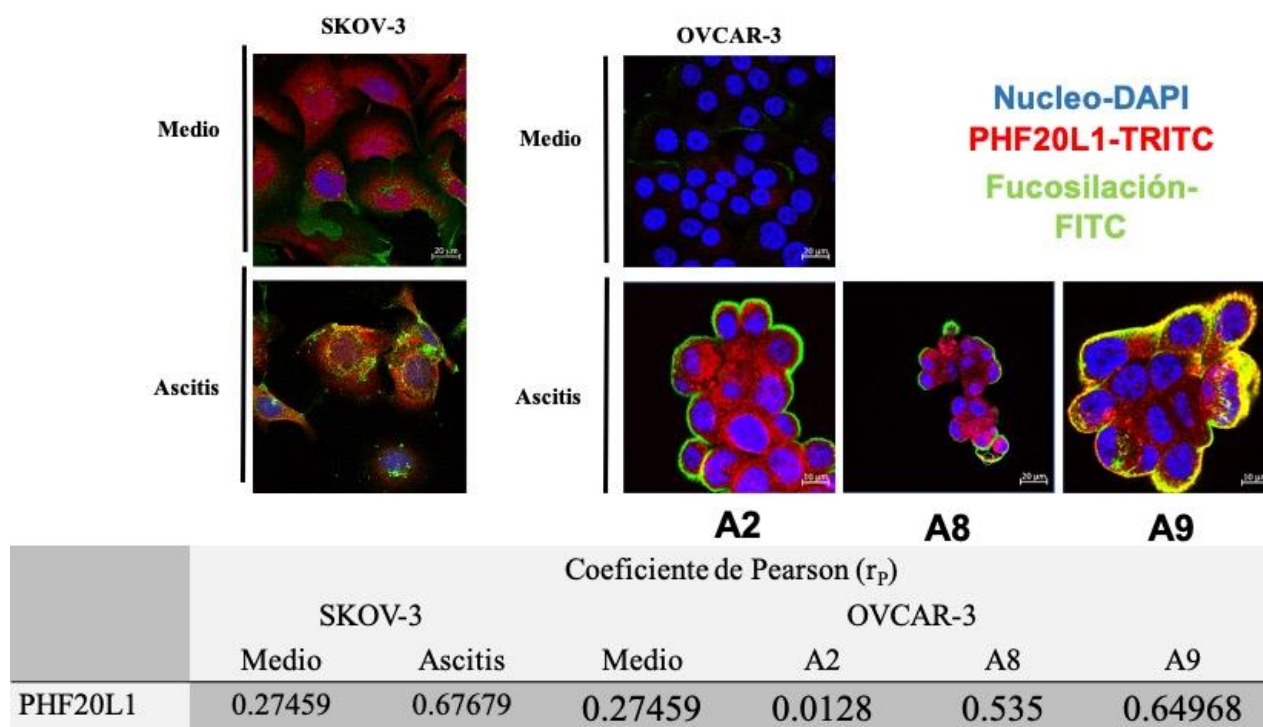


Figura 18. Análisis de correlación entre PHF20L1 y la fucosilación. Se muestran los resultados de inmunofluorescencia resaltando los puntos de colocalización indicados en color amarillo. En la tabla inferior se puede ver el valor de correlación de Pearson para cada condición analizada. Se observan núcleos (azul), fucosilación (verde) y la proteína (rojo).

Con estos resultados es posible concluir que el líquido ascítico induce cambios en la expresión de isoformas de la proteína PHF20L1 y que además induce la fucosilación de esta proteína. Adicionalmente, observamos que hay una expresión basal en líneas celulares de cáncer de mama. Interesantemente, la isoforma *a* muestra una correlación negativa con la supervivencia libre de progresión y la supervivencia global, lo cual podría sugerir que esta isoforma es importante en el fenotipo maligno del cáncer de ovario y que PHF20L1 se asocia a un mal pronóstico de esta patología. Sin embargo, hasta este momento, no conocíamos la función e implicación de esta proteína en el cáncer de ovario.

PHF20L1 interacciona con diferentes proteínas dependiendo del estímulo con LA. Confirmación de alguna(s) de las interacciones para inferir su posible función en el cáncer de ovario.

Con el fin de lograr una mejor comprensión de la posible función de PHF20L1 durante el desarrollo del cáncer de ovario se decidió analizar con cuáles proteínas interacciona en ausencia o en presencia del estímulo de ascitis durante 24 h, tiempo en el cual se expresan mayormente todas las isoformas de la proteína.

Se realizó un ensayo de inmunoprecipitación (IP) utilizando el anticuerpo comercial dirigido hacia la proteína PHF20L1 de humano junto con extractos proteicos de células SKOV-3 estimuladas con ascitis durante 24 h. Como condición control, se utilizaron extractos proteicos de células SKOV-3 mantenidas en medio de cultivo convencional (**Figura 19**).

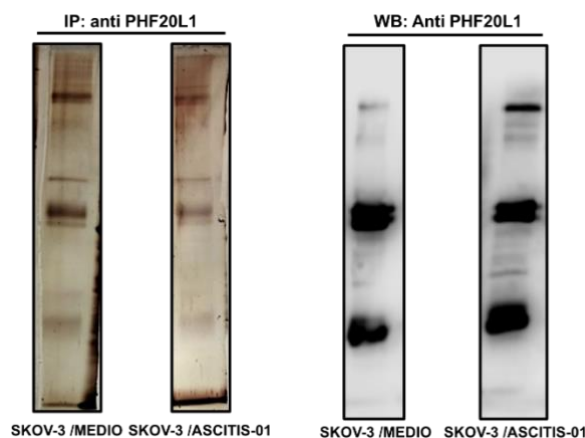


Figura 19. Imagen representativa del inmunoprecipitado. Panel izquierdo: tinción con plata; panel derecho: western blot de la fracción correspondiente al inmunoprecipitado.

El inmunoprecipitado resultante se utilizó para la identificación, mediante espectrometría de masas, de las proteínas que se unieron directa o indirectamente con la proteína de interés. Para este procedimiento se utilizó el equipo *nanoAcquity Synapt G2SI* que se encuentra en la unidad de proteómica del CINVESTAV. Las proteínas identificadas se muestran en la **Tabla 7**. Las proteínas encontradas en ambas condiciones se marcaron en verde. El número de proteínas identificadas, asociadas directa o indirectamente con PHF20L1, fue mayor en la condición bajo el estímulo con ascitis, comparado con la condición control. Los resultados arrojaron la

identificación de proteínas que presentan localización nuclear y funciones que incluyen la regulación del ciclo celular y regulación transcripcional. Sin embargo, no se logró identificar a PHF20L1.

Tabla 7. Proteínas identificadas a partir de la inmunoprecipitación con PHF20L1.

SKOV-3 MEDIO	SKOV-3 ASCITIS
Histone H2A type 1-J	Vimentin
Histone H4	Polyubiquitin-B (Fragment)
Vimentin variant 3	POTE ankyrin domain family member E
Heat shock protein HSP 90-beta	Histone H2A type 1-J
CD2-associated protein	Heat shock protein HSP 90-beta
Breast carcinoma-amplified sequence 3 (Fragment)	Histone H2B type 1-H
Caprin-1 (Fragment)	Caprin-1 (Fragment)
	Cilia- and flagella-associated protein 58
	CD2-associated protein
	Nucleolin
	Coiled-coil domain-containing protein 144A (Fragment)
	Uncharacterized protein
	Wiskott-Aldrich syndrome protein family member 2
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (Fragment)
	Remodeling and spacing factor 1
	Rho GTPase-activating protein 23
	DnaJ homolog subfamily C member 13

Se realizó una red de interacción utilizando la base de datos STRING (**Figuras 20 y 21**, paneles izquierdos). Los resultados muestran a las proteínas identificadas en la condición control (**Figura 20**) así como en la condición de estimulación con ascitis (**Figura 21**). La red de interacción no muestra interacciones conocidas entre la mayoría de las proteínas.

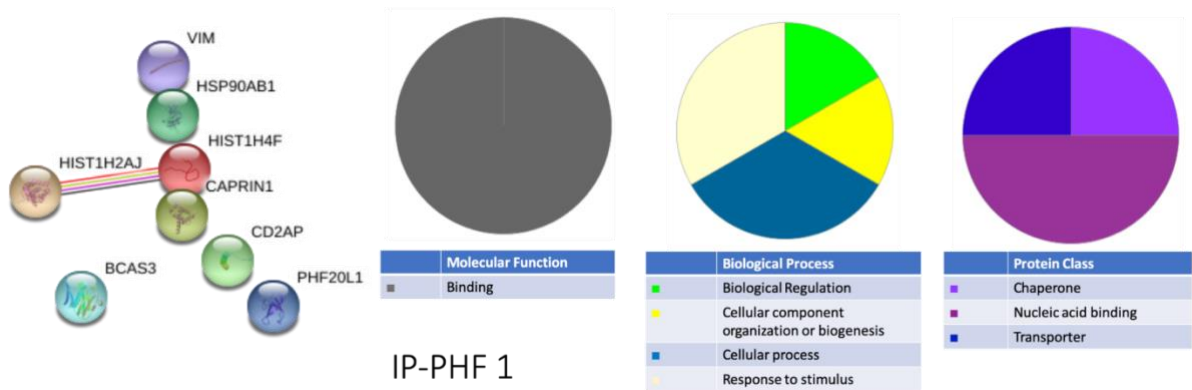


Figura 20. Red de interacción y clasificación de las proteínas identificadas en el complejo proteico formado durante la inmunoprecipitación de extractos de células control, con el anticuerpo anti-PHF20L1.

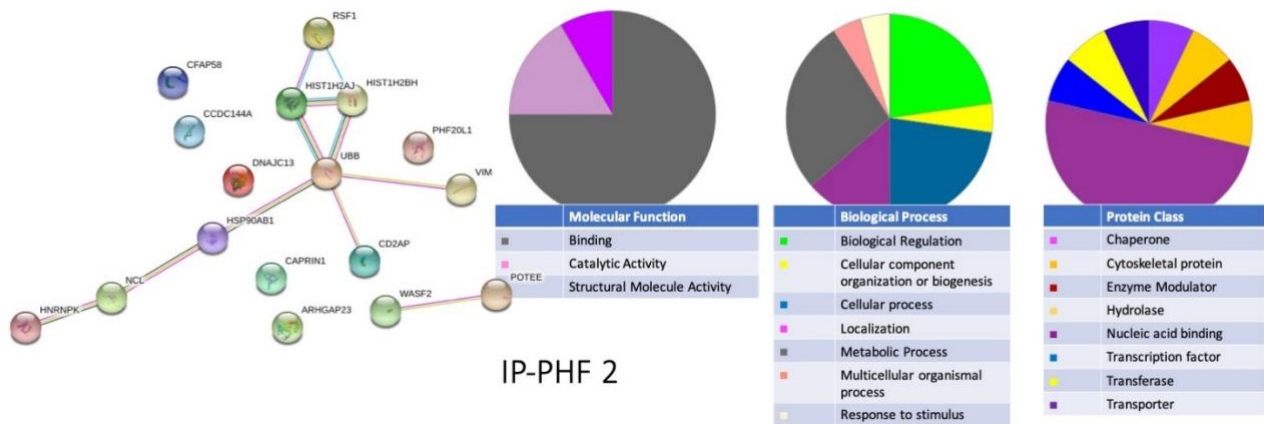


Figura 21. Red de interacción y clasificación de las proteínas identificadas en el complejo proteico formado durante la inmunoprecipitación de extractos de células estimuladas con ascitis, con el anticuerpo anti-PHF20L1.

Se realizó un ensayo de co-inmunoprecipitación para corroborar la interacción entre PHF20L1 y una de las proteínas identificadas. Se seleccionó a la histona 2A (H2A) para hacer un ensayo de co-inmunoprecipitación. Esta selección se basó en las siguientes premisas: que parece unirse tanto en la condición de estímulo con ascitis y sin estímulo, ya que aparece en los resultados de identificación por espectrometría de masas en ambas condiciones; y que cuenta con modificaciones postraduccionales (puede ser metilada en residuos de arginina) que pueden ser reconocidas por los dominios TUDOR presentes en PHF20L1. Recordemos que PHF20L1 es capaz de unirse a proteínas metiladas en residuos de arginina o lisina.

Los resultados mostraron que ambas proteínas interactúan tanto en la condición sin estímulo de ascitis como bajo el estímulo de ascitis (**Figura 22**).

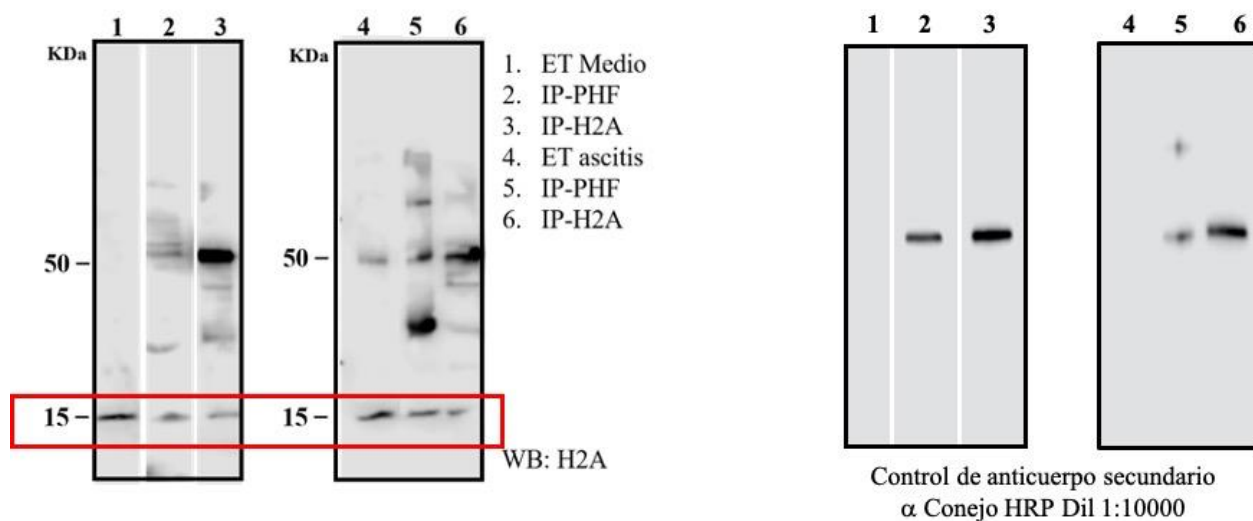


Figura 22. Coimmunoprecipitación- de la Histona 2A con PHF20L1. Se realizó una inmunoprecipitación (IP) de extractos proteicos totales de células SKOV-3 expuestas y no expuestas a líquido ascítico utilizando el anticuerpo anti PHF20L1 o anti H2A. La figura muestra, el control de anticuerpo secundario (derecha) y el resultado de western blot donde se utilizó el anticuerpo anti-H2A, la cual tiene un peso molecular aproximado de 14 kDa. El recuadro rojo indica las bandas correspondientes a la detección de la histona. Adicionalmente se pueden ver las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas.

El hecho de que PHF20L1 interactúe con mayor número de moléculas en las células SKOV-3 que fueron estimuladas con líquido ascítico, sugiere que PHF20L1 y dichas moléculas con las que interactúa podrían tener un papel en el fenotipo maligno de las células de cáncer de ovario. Con base en lo anterior, y conociendo la función que las proteínas identificadas desarrollan, es posible sugerir que PHF20L1 podría participar en procesos biológicos importantes para el desarrollo y metástasis del cáncer de ovario.

Se realizaron ensayos de citometría de flujo (**Figura 23 y 24**) para evaluar a las poblaciones celulares en las diferentes etapas del ciclo celular, utilizando células SKOV-3 estimuladas y no estimuladas con ascitis. Los resultados mostraron que hay un aumento del número de células

en fase de síntesis cuando las células son estimuladas con ascitis, esto es, cuando PHF20L1 tiene mayor expresión.

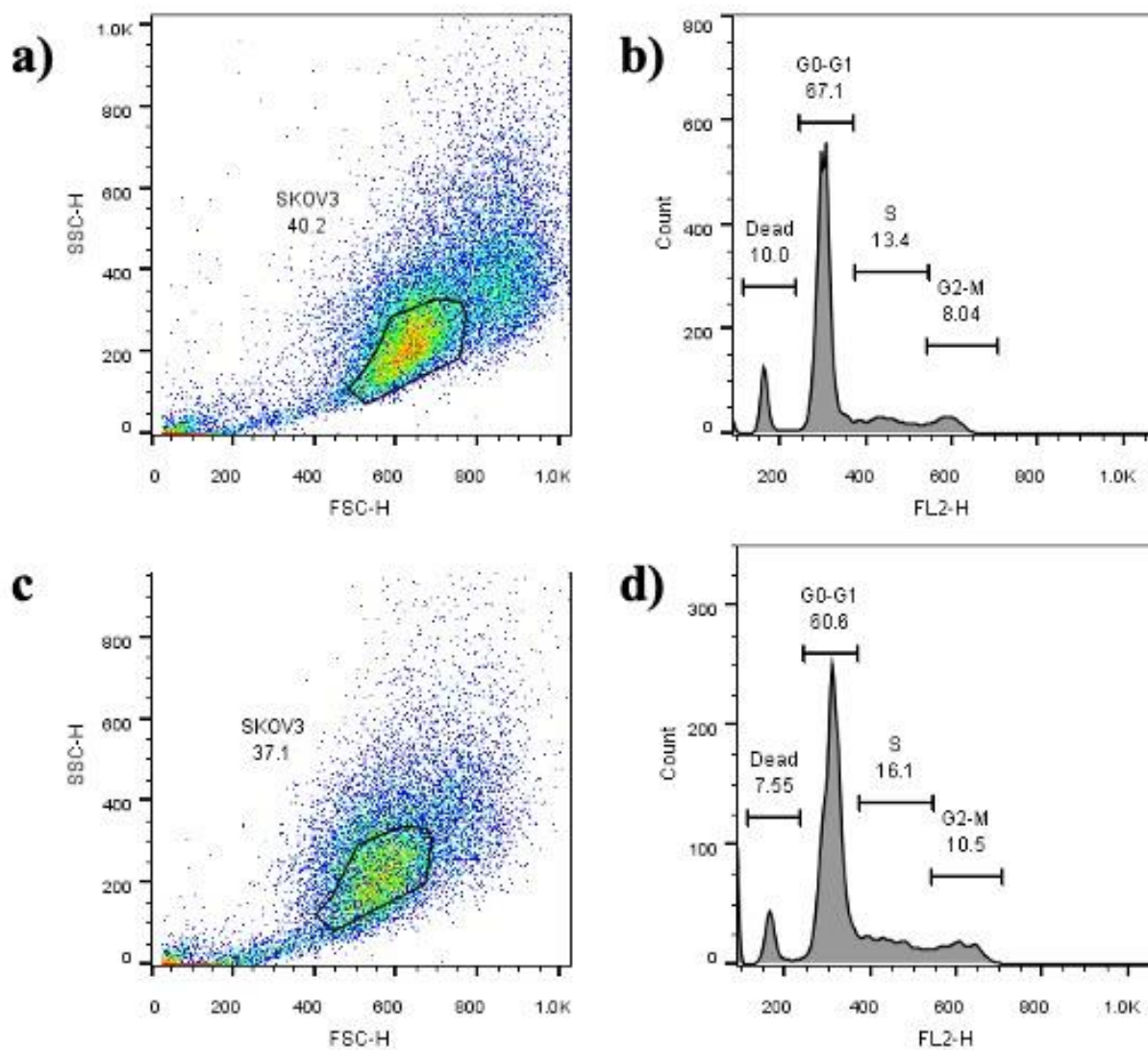


Figura 23. Participación de PHF20L1 en el ciclo celular. Células SKOV-3 mantenidas en medio de cultivo McCoy 5A (panel a y b) o estimuladas con ascitis (panel c y d) fueron analizadas. A partir de células fijadas y teñidas con yoduro de propidio y anticuerpos anti PHF20L1 (FITC) se realizó el ensayo de citometría de flujo. Los paneles a y c muestran la población celular que se seleccionó para el análisis de incorporación de yoduro de propidio, en donde se determinaron las poblaciones correspondientes a células muertas, y células en las fases G0-G1, S o G2-M (panel b y d).

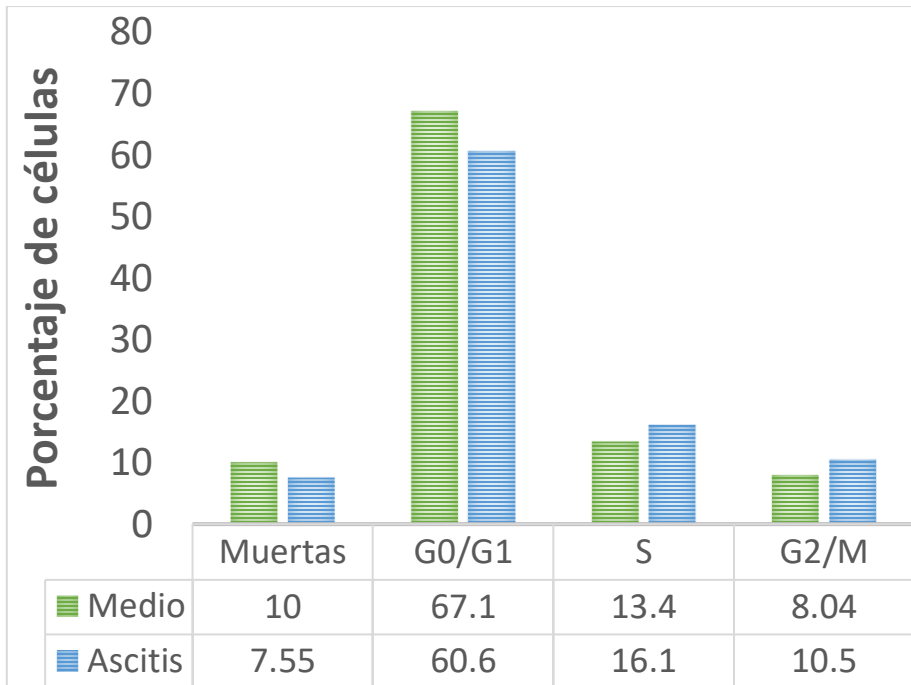


Figura 24. Distribución comparativa de las células en el ciclo celular en presencia y ausencia de ascitis. Las barras verdes corresponden a la condición control y las barras azules a la condición bajo el estímulo de ascitis. Nota: no fue posible realizar análisis estadístico por tratarse de resultados obtenidos de un solo experimento.

Los resultados previamente obtenidos de inmunoprecipitación y espectrometría de masas constituyen la base sobre la cual se planteó evaluar funciones celulares como la migración, invasión y la proliferación celular, procesos involucrados en forma importante en el fenotipo tumoral. Para conocer el impacto que la proteína tiene sobre estos procesos celulares, se decidió obtener un knockdown de PHF20L1. Para ello, se utilizaron siRNAs comerciales para el silenciamiento de todas las isoformas conocidas de PHF20L1 (**Figura 25 y 26**).

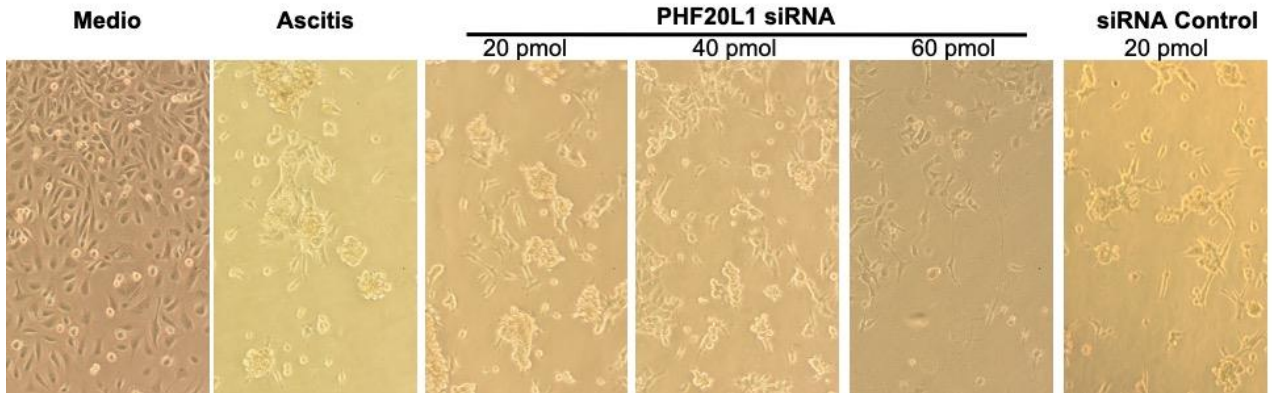


Figura 25. Micrografías de los cultivos que se sometieron al silenciamiento de PHF20L1 en células SKOV-3. Micrografías de los cultivos celulares que se expusieron a 3 concentraciones diferentes de siRNAs para el bloqueo de la expresión de PHF20L1, así como el siRNA control. Como controles se utilizó a SKOV-3 en medio (control negativo) y SKOV-3 bajo estímulo de ascitis (control positivo).

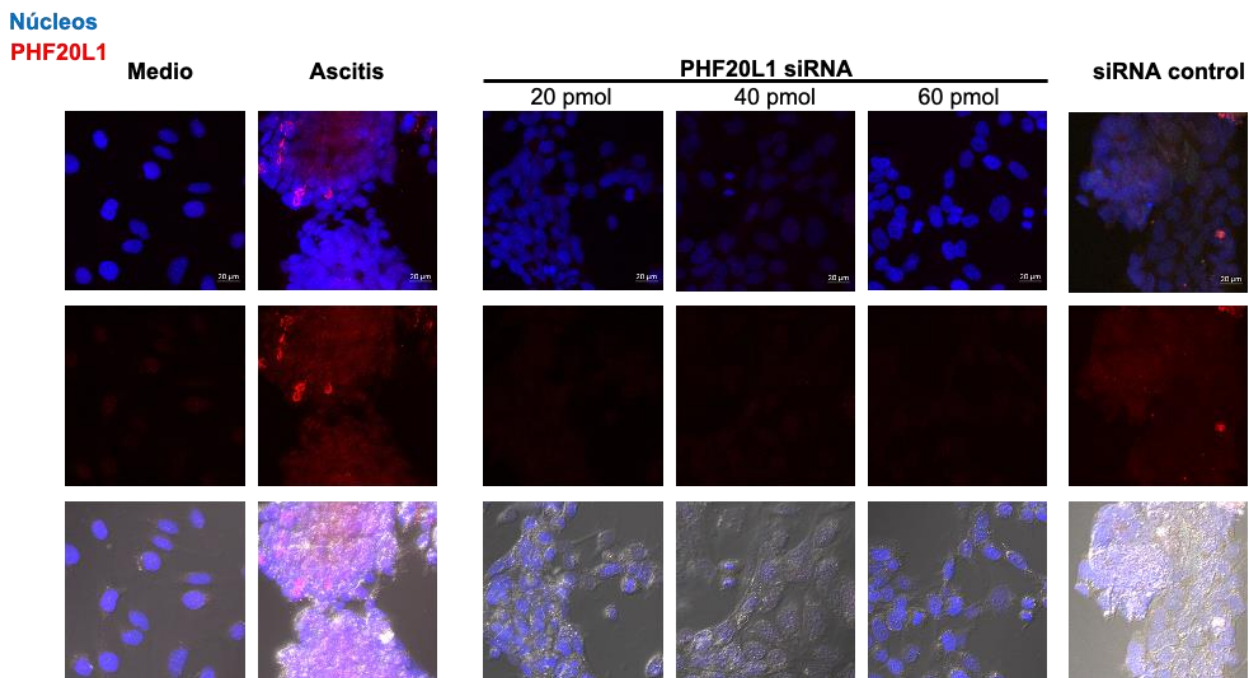


Figura 26. El uso de siRNAs abate la expresión de PHF20L1. Ensayos de inmunofluorescencia para la detección de PHF20L1. Como controles de expresión se utilizó a SKOV-3 en medio (control negativo) y SKOV-3 bajo estímulo de ascitis (control positivo). En rojo se puede ver la señal correspondiente a PHF20L1 y en azul a los núcleos. El panel inferior corresponde a la mezcla que incluye el campo claro.

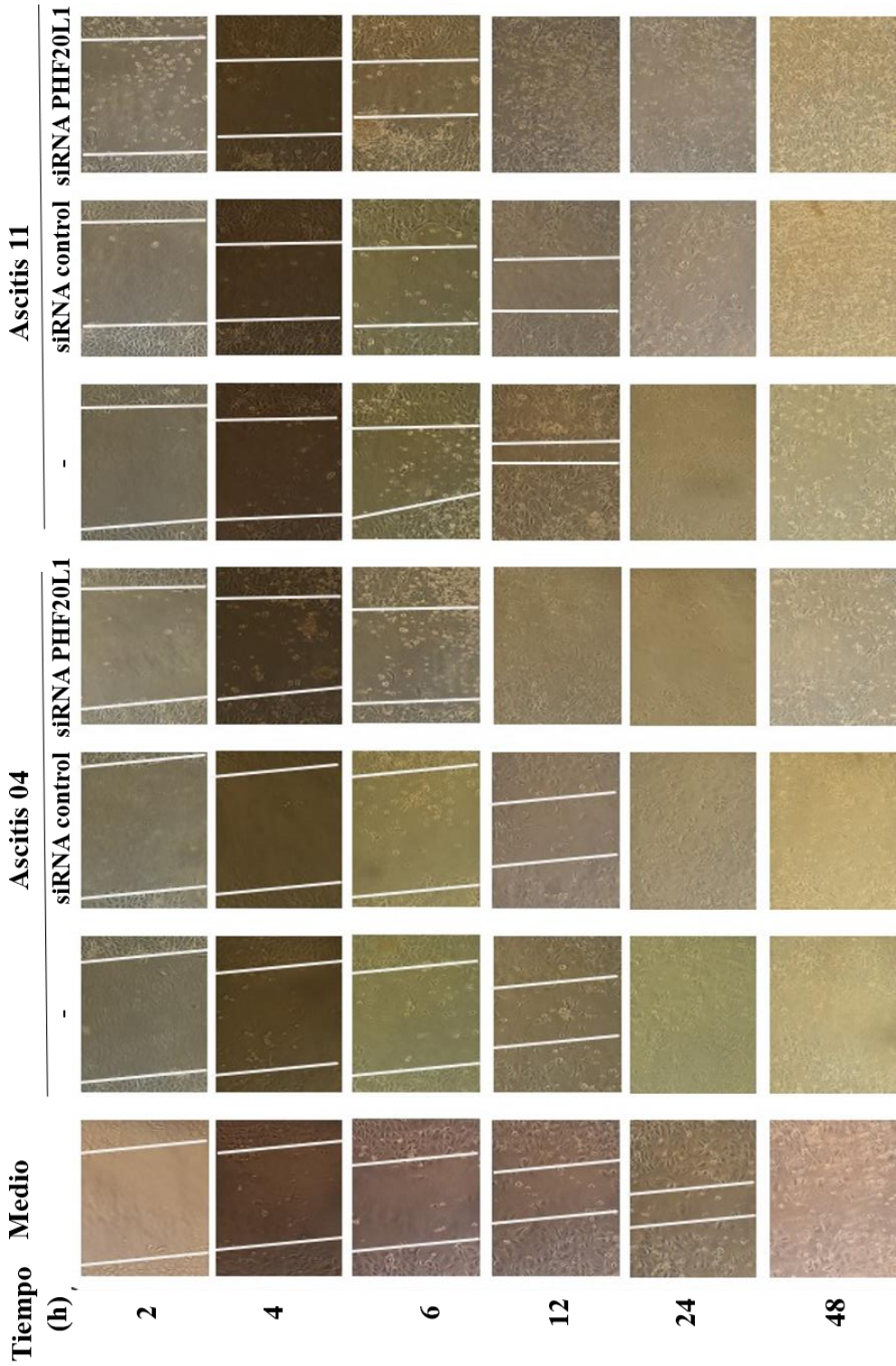


Figura 27. Micrografías de las heridas visualizadas en una cinética de tiempo. Mediante ensayo de herida y cierre se determinó la migración celular. Se muestran las imágenes correspondientes a los diferentes tiempos analizados y bajo el estímulo de dos líquidos ascíticos. En ambos casos se utilizó la

condición control (SKOV-3 en medio), el control positivo (SKOV-3 en ascitis 04 o 11), ascitis con el interferente control y ascitis con el interferente de PHF20L1. En ambos casos se graficó el porcentaje de cierre de la herida. La cinética de tiempo se realizó a las 2, 4, 6, 12, 24 y 48 h. Las líneas blancas delimitan la herida correspondiente. Para el análisis del tamaño de la herida se utilizó ImageJ.

En el caso de la migración celular, los resultados sugieren que el cierre de la herida es más rápido en ausencia de la proteína PHF20L1 (**Figura 27 y 28**), evento que se repite bajo la condición de los dos líquidos ascíticos empleados. Sin embargo, resultó difícil seguir el cierre de la herida cuando las células se han incubado con ascitis de pacientes con cáncer de ovario ya que las células suelen dispersarse a lo largo de toda el área que tengan disponible. Los resultados no muestran diferencias estadísticas significativas, esto es debido a que los tamaños al momento del cierre de la herida varían considerablemente entre réplicas, sin embargo, en el gráfico es posible observar la tendencia que existe en la disminución del tamaño de la herida en células con el KD de PHF20L1 cuando la herida es medida a las 12 h de haber iniciado el experimento. Los resultados sugieren que la ausencia de PHF20L1 no disminuye la migración celular, al contrario, parece ser potenciada. Podría ser posible que la proteína tenga implicaciones en otros procesos celulares.

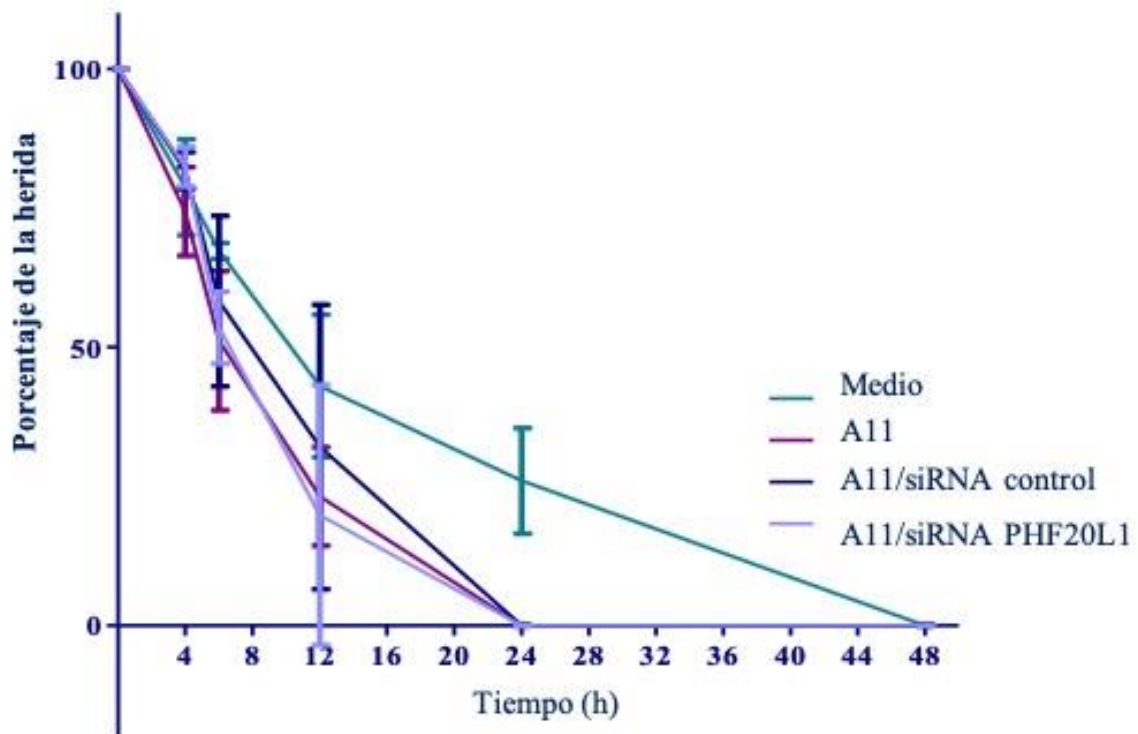
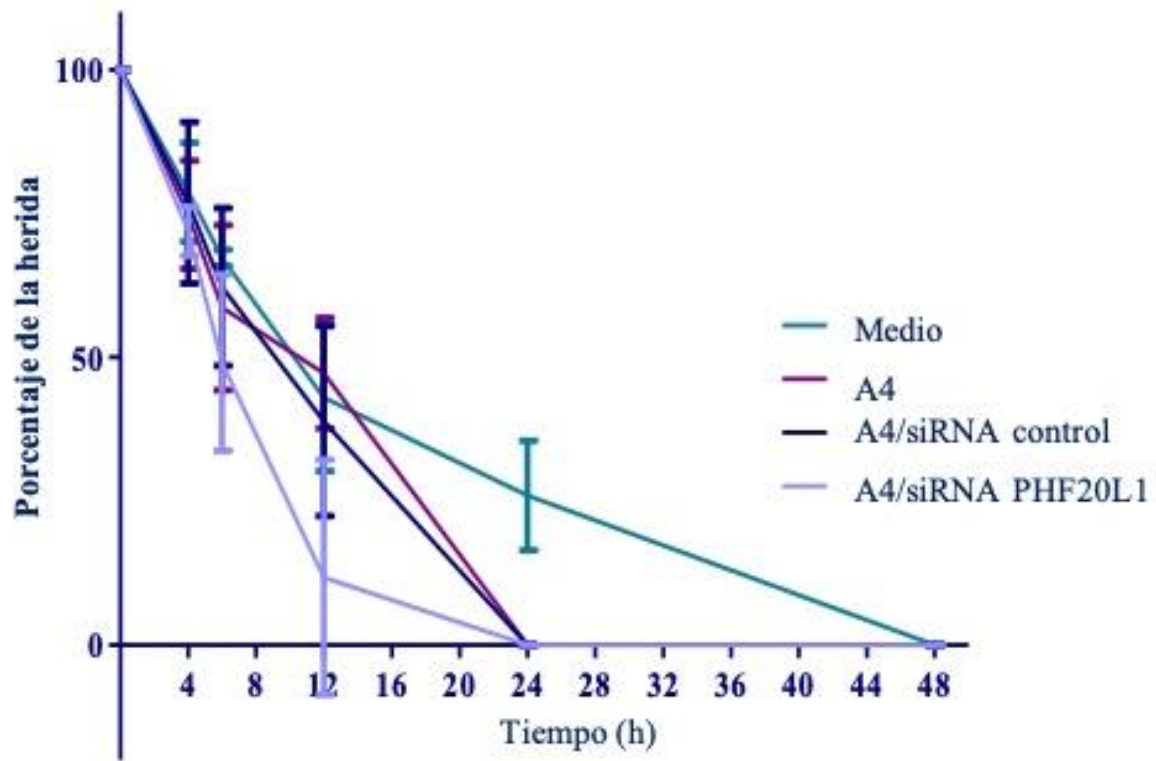


Figura 28. Ensayo de herida y cierre. Mediante ensayo de herida y cierre se determinó la migración celular. Se muestran dos gráficos correspondientes a los dos líquidos ascíticos analizados. En ambos casos se utilizó la condición control (SKOV-3 en medio), el control positivo (SKOV-3 en ascitis 04 o 11), ascitis con el interferente control y ascitis con el interferente de PHF20L1. En ambos casos se graficó el porcentaje de cierre de la herida. Para el análisis del tamaño de la herida se utilizó ImageJ.

Para el análisis de la participación de PHF20L1 en la proliferación celular, se realizó un ensayo usando el método de Bromuro de 3- (4,5-dimetiltiazol2-il) -2,5-difeniltetrazolio (MTT), el cual se basa en medir la actividad enzimática de las células. Los resultados sugieren que la ausencia de PHF20L1 disminuye ligeramente la proliferación celular (**Figura 29**).

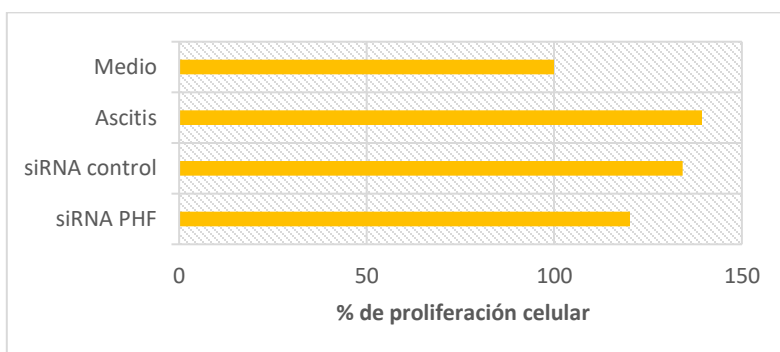


Figura 29. Análisis de proliferación celular. El ensayo de proliferación celular se realizó mediante el uso del reactivo MTT. Se utilizó la condición control (SKOV-3 en medio), el control positivo (SKOV-3 en ascitis 04), ascitis con el interferente control y ascitis con el interferente de PHF20L1. Se graficó el porcentaje de proliferación celular.

Los ensayos de proliferación realizados hasta ahora concuerdan con lo obtenido mediante citometría de flujo, pues se observa un incremento de proliferación bajo el estímulo de ascitis, lo cual no sucede durante el silenciamiento con el siRNA para PHF20L1 (**Figura 29**).

Finalmente, decidimos evaluar la capacidad invasiva de las células en presencia y ausencia de PHF20L1. Se realizó el protocolo de silenciamiento previo a la resiembra de las células en matrigel y se siguió el experimento por 24 h. Los resultados sugieren que la ausencia de PHF20L1 afecta significativamente la capacidad de invasión celular, al menos en uno de los dos líquidos ascíticos probados (**Figura 30**).

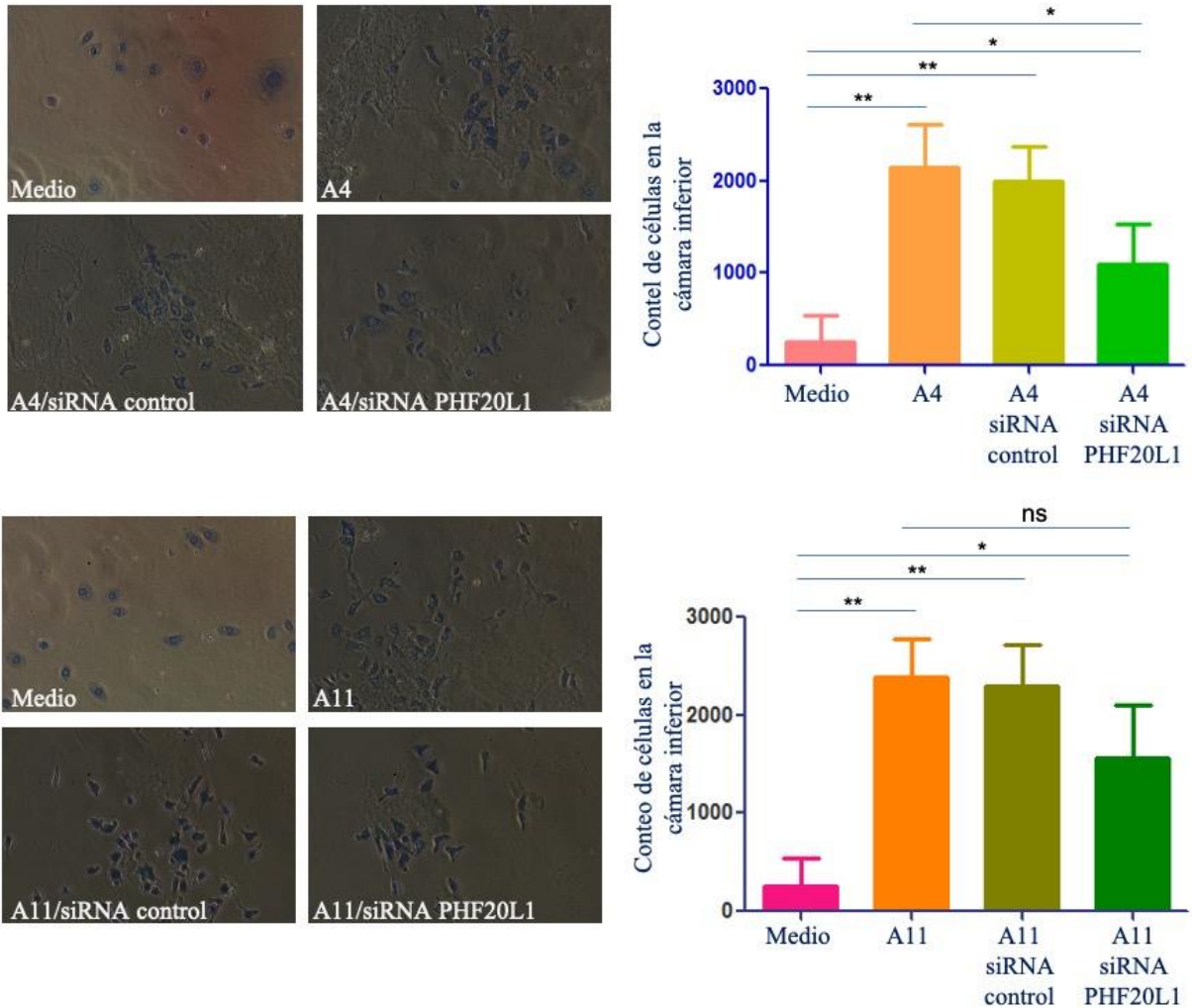


Figura 30. Ensayo de invasión en presencia y ausencia de la expresión de PHF20L1. Se realizó el ensayo de invasión mediante el uso de cámaras transwell con matrigel. Se utilizaron dos diferentes líquidos ascíticos. En los paneles a y c se muestran imágenes representativas de las células de la cámara inferior teñidas con azul de metileno. Los ensayos se hicieron por triplicado y los resultados se graficaron (b y d). El análisis estadístico se realizó utilizando el software GraphPad.

VIII. Discusión

El CaOv es el cáncer ginecológico más letal. Las células del CaOv pueden expresar marcadores epiteliales como keratinas, epCAM y E-cadherina pero también pueden expresar marcadores mesenquimales como vimentina y N-cadherina [94]. Se sabe, por antecedentes directos en nuestro laboratorio que el líquido ascítico potencia la capacidad de las células SKOV-3 de expresar mayormente marcadores mesenquimales y por tanto sufrir la transición epitelio mesénquima, la cual se asocia a un fenotipo celular más agresivo [64]. También, bajo el estímulo de ascitis, la fucosilación se incrementa [86]. Como consecuencia de la regulación que ejerce el líquido ascítico de pacientes con CaOv, algunas proteínas pueden modificar su expresión en células tumorales [64,86]. De entre esas proteínas, PHF20L1 resultó de nuestro interés para su estudio en biopsias de tumores de pacientes diagnosticadas con CaOv, y en una línea celular de CaOv.

PHF20L1 ha sido estudiada en células de cáncer de mama, principalmente [80,]. En algunos de esos reportes, se ha identificado como una proteína que lee modificaciones postraduccionales de otras proteínas tipo histona y no histona y se le ha asociado con un mal pronóstico en cáncer de mama [80, 95].

The Human Protein Atlas reporta una alta expresión de la proteína principalmente en cáncer de tiroides y CaOv. Mientras que en tejido normal se expresa en altos niveles en tiroides, seguido de los testículos y las glándulas adrenales (NCBI). Como se menciona previamente, en cáncer de mama se han hecho algunos estudios respecto a la expresión de esta proteína en tejido, mientras que en CaOv sólo se encuentra el reporte de la base de datos previamente mencionada, pero ningún estudio adicional, previo al nuestro.

En el presente trabajo, los ensayos de inmunohistoquímica realizados en 29 cortes de tejido tumoral de pacientes con CaOv muestran una elevada expresión de la proteína. En un ovario sano, la expresión se limita al estroma y a células foliculares, según se indica en *The Human Protein Atlas*. En el caso de los tejidos tumorales analizados, la expresión se concentró en aquellas células que no muestran una distribución uniforme en el tejido y que cuentan con núcleos grandes y citoplasma abundante, lo que permite suponer que corresponden a las células tumorales. Mientras que, para el caso de los tejidos libres de cáncer, la expresión fue muy ligera, incluso, al calcular el score inmunoreactivo los valores fueron considerados como negativo y

ligera expresión para esos dos tejidos (H1 y H2). Este hecho indica que existe un incremento en la expresión de la proteína en células del tejido tumoral de pacientes con CaOv.

La curva de supervivencia realizada (Figura 11) también sugiere que una sobre-expresión alta de la proteína muestra la probabilidad de una progresión más temprana y un peor pronóstico en cuanto a la supervivencia global. La supervivencia global tiene un mejor pronóstico en una sobre-expresión ligera de la proteína. Se debe considerar que existen diferentes factores clínicos que pueden influenciar el comportamiento de la correlación con estos parámetros de supervivencia. Para este análisis, se han agrupado las muestras de tejido tumoral dependiendo del nivel de expresión de la proteína PHF20L1 y su relación con la supervivencia; sin embargo, resulta primordial determinar la supervivencia por etapa clínica con el fin de conocer el comportamiento de la población estudiada, aunque para ello, sea necesario aumentar la n de las subpoblaciones. Aunque aún se necesita realizar un análisis a mayor profundidad, lo anterior, nos hace sugerir que PHF20L1 podría ser utilizado como un marcador de progresión.

A pesar de su origen de células aplanadas sin características distintivas, los carcinomas ováricos se diferencian en 4 principales histotipos. Los patólogos han señalado una semejanza entre esos histotipos y la diferenciación de las células mucosales normales en el tracto ginecológico e intestinal [96]. En este sentido, se piensa que los carcinomas serosos se parecen al epitelio de las trompas de Falopio, carcinomas endometrioides a endometrio normal, carcinomas de células claras a restos vaginales y carcinomas mucinosos a glándulas endocervicales normales o mucosa intestinal [96]. Las alteraciones moleculares que contribuyen a estos cambios morfológicos fueron estudiadas por Márquez y colaboradores encontrando una correlación significativa entre la expresión génica en mucosa de colon normal y carcinomas mucinosos, trompa de Falopio y carcinoma seroso, mucosa endometrial y carcinoma endometrioide y de células claras [97]. Cabe resaltar que según la base de datos *The Human Protein Atlas*, en estos tejidos hay una expresión baja o media de PHF20L1, y esa expresión en todos los casos corresponde a células glandulares. De las 29 muestras de tejido tumoral analizadas, se observó una elevada expresión proteica en algunas zonas particulares, por ejemplo en las papilas que se forman en los tumores SPAG. Este hecho nos resultó de interés, debido a que esta tinción resulta similar a lo que se observa en un tejido normal de colon, en donde la proteína está localizada en células glandulares que forman el epitelio columnar simple (*The Human Protein Atlas*). Existen reportes de que el patrón de expresión de proteínas de diferentes histotipos de cáncer de ovario epitelial

correlaciona con aquellos en trompas de Falopio, endometrio y colon [97]. Algunos de los genes que correlacionan son SOX-2 y PHF8, proteínas que, de alguna manera, se han asociado a PHF20L1 [96]. SOX-2, cuya interacción con PHF20L1 ya está comprobada, fue encontrada sobreexpresada en carcinoma mucinoso sobre los otros histotipos y con las células de la superficie epitelal de un ovario normal; mientras que PHF8 fue encontrada sobreexpresada en carcinoma de células claras en comparación con los otros histotipos y con las células de la superficie epitelal de un ovario normal. En esos ensayos también se corroboró que los carcinomas mucinosos exhiben un mayor número de genes desregulados que los otros histotipos [97]. Sin embargo, tal como nuestros resultados lo muestran, la sobre-expresión de PHF20L1 no se asocia con ningún histotipo en particular.

PHF20L1 no tiene sitios de unión a ADN, pero posee dominios que leen modificaciones en proteínas tipo histonas y no histonas los cuales resultan de gran importancia en la regulación epigenética [98]. Niveles excesivos de enzimas que actúan como modificadores epigenéticos se han reportado como biomarcadores de cáncer y participan en la progresión tumoral [98]. Una de las funciones que PHF20L1 desempeña al unirse a proteínas no histonas es aumentar su vida media tras impedir la degradación proteosomal [77,82]. Es probable que algunas de las interacciones de PHF20L1 que se identificaron en este trabajo tengan como consecuencia prolongar la vida media de las proteínas y con ello, afectar su función. Es quizá esta la razón por la cual las células tumorales incrementan su expresión, o bien, para regular la epigenética de las células tumorales.

Mediante ensayos *in vitro* utilizando células SKOV-3 estimuladas con ascitis de pacientes con CaOv se analizó la expresión de las isoformas de la proteína. El líquido ascítico de pacientes con CaOv puede modular la expresión de las isoformas de PHF20L1, especialmente la isoforma α , la cual es la isoforma canónica. Esta expresión se asocia negativamente a la supervivencia libre de progresión y a la supervivencia global, lo cual refuerza los datos de expresión hallados en el tejido tumoral. Como se mencionó con anterioridad, según trabajos previos de nuestro laboratorio, las células estimuladas con líquido ascítico adquieren características de un fenotipo más agresivo que cuando no están en contacto con este fluido, lo cual asocia, al menos de manera indirecta, a la expresión de PHF20L1 con este fenotipo agresivo. Respecto a la modulación de la expresión de PHF20L1 no se sabe mucho, sin embargo, en un artículo recientemente publicado se sugiere que los genes MYC y genes de respuesta a hipoxia, HIF1 α , podrían regular

la expresión de PHF20L1 [95]. Como sabemos, MYC es uno de los principales genes involucrados en cáncer [99] y es uno de los cuatro genes (adicional a Oct4, Sox2 y Klf4) que pueden reprogramar fibroblastos a células madre pluripotenciales [100-102]. La expresión de MYC es regulada mediante la activación de diferentes vías de señalización, incluyendo la vía de WNT, a través de receptores tirosina cinasa y a través del TGF β [101]. El TGF β es uno de los principales componentes del líquido ascítico [103], cuya expresión podría ser el motivo por el cual la proteína se sobreexpresa bajo el estímulo de ascitis mediante la regulación de MYC. Sin embargo, en tejido tumoral, donde también vemos expresión elevada de PHF20L1, su regulación podría asociarse tanto a TGF β , el cual se sabe que se sobreexpresa en tejido tumoral de cáncer de ovario [104] pero también a otros componentes, puesto que la señalización a través de WNT o receptores tirosina cinasa tendría más sentido [105]. Para comprobar dicha especulación, se necesita hacer ensayos bajo la inducción de TGF β por ejemplo, o bien con el KD de MYC y corroborar si se afecta o no la expresión de PHF20L1.

Por otro lado, se observó que las diferentes isoformas pueden ser reguladas de manera individual. Tal fue el caso de la isoforma de mayor peso molecular, la *a*, cuya expresión se suprime a las 48 horas de estimulación con ascitis. Cabe mencionar que esta es la isoforma más grande, aunque la isoforma *b* también conserva todos los dominios que se conocen de la proteína. Los estudios que se han realizado hasta el momento, por otros grupos de trabajo, no hablan de la relevancia de alguna isoforma en particular, con excepción de la isoforma *c*, la cual se reportó que es la encargada de hacer interacción con la proteína DNMT1 [77].

Es necesario ampliar el número de muestras a analizar para determinar si PHF20L1 puede ser considerada como un factor pronóstico de CaOv; adicionalmente se pretende analizar la expresión de otros marcadores como CA125 o Ki67 con el objetivo de correlacionar esos datos, puesto que sabemos que esas moléculas pueden sugerir o indicar la recurrencia o la respuesta a terapia de las pacientes (CA125) o bien la alta proliferación celular (Ki67).

El CaOv presenta alteraciones biológicas, como expresión disfuncional o mutación de genes, desregulación de la respuesta inmune del huésped, estrés oxidativo (liberación de especies reactivas de oxígeno), activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumor [106-110]. PHF20L1, al ser un regulador transcripcional, podría desempeñar funciones importantes en la regulación génica de procesos primordiales en el desarrollo o progresión tumoral.

Hasta el momento, lo que se sabe de la función de PHF20L1 es su potencial papel como proteína que lee residuos mono o dimetilados en diferentes proteínas como SOX2 y Rb [82][111].

Nuestros resultados indican que PHF20L1 parece unirse a una diversidad de proteínas, cuyas interacciones se vuelven más complejas bajo el estímulo de ascitis. Algunas de esas moléculas se han asociado a cáncer o están implicadas en procesos de regulación transcripcional, tal como se esperaba.

Por ejemplo, la proteína 1 asociada a proliferación y activación citoplásmica (caprin-1), la cual se encontró en ambas condiciones, con y sin estímulo de ascitis, sugiriendo que esa interacción no está determinada por los componentes inmersos en la ascitis. Caprin-1 es una proteína de unión a RNA, o RBP (RNA-binding protein) por sus siglas en inglés. La función de las RBPs, a nivel postranscripcional, es regular genes a través de la formación de complejos ribonucleoproteicos. Los procesos que pueden regular son metabolismo celular sostenido, coordinar la maduración, transporte, estabilidad y degradación de todas las clases de RNAs, y también mantienen la integridad del genoma [112][113], y responden a una variedad de condiciones de estrés celular, asegurando la homeostasis celular [114][115]. Caprin-1 es una RBP esencial para la proliferación celular [116]. Como caprin-1 está estrechamente asociada con el control del ciclo celular, su alteración está involucrada en oncogénesis, lo cual se ha demostrado en múltiples estudios de distintos cánceres [115-118]. Esta proteína se expresa altamente en células muy proliferativas, como los progenitores hematopoyéticos, y se expresa en bajos niveles en células que se dividen lentamente, como las células del riñón, aunque se han detectado altos niveles en el cerebro [119]. Caprin-1 puede afectar el crecimiento celular a través de la unión selectiva a una variedad de RNAs mensajeros que están involucrados en crecimiento celular, desdiferenciación y migración, incluyendo aquéllos que codifican para c-Myc y ciclina D2 [115,120-124]. Las células sin expresión de caprin-1 muestran una prolongación en la fase G1 del ciclo celular en células DT40 de linfoma de Bursa [115].

La proteína WAVE3, un miembro de la familia de proteínas WASP/WAVE, juega un papel importante en motilidad celular, y actúa como oncogén en algunos tipos de cáncer [125]. En cáncer de ovario, mediante inmunohistoquímica se observó una alta expresión de WAVE3 en tejido tumoral y no así en tejido sano [125]. También, líneas celulares de cáncer de ovario mostraron una expresión alta de la proteína asociada a un incremento en proliferación y disminución de apoptosis, incremento de células en fase G2/M y promueve significativamente

la migración celular [125]. De manera correspondiente, el KD de WAVE3 muestra los efectos inversos. Incluso, la alta expresión de WAVE3 promueve la tumorigénesis *in vivo* [125].

Nosotros no encontramos directamente a WAVE3 pero sí a WASP2, cuyas funciones pueden estar asociadas ya que ambas proteínas son miembros de la misma familia. Esa información, más la presencia de Caprin-1, nos hizo preguntarnos qué pasaba con el ciclo celular cuando PHF20L1 se encuentra incrementada, es decir cuando las células SKOV-3 estaban bajo el estímulo de ascitis, y que pasaba cuando el fenotipo de las células SKOV-3 era alterado por la ascitis, pero con una baja expresión de PHF20L1 (Células estimuladas con ascitis con la expresión de PHF20L1 bloqueadas mediante el uso de iRNAs). Por tal motivo, realizamos ensayos de citometría de flujo para evaluar la expresión de PHF20L1 junto con el ciclo celular en presencia o ausencia de ascitis y encontramos que bajo el estímulo de ascitis hay una mayor tendencia de las células a localizarse en fase S, es decir, hay una mayor síntesis de ADN y podríamos suponer que eso tendría como consecuencia una mayor proliferación celular bajo el estímulo de ascitis. La pregunta que surge a continuación es si PHF20L1 podría tener una función crucial en la proliferación celular. Por tal motivo, decidimos realizar ensayos de proliferación, logrando confirmar esta hipótesis de manera parcial por ensayos de MTT los cuales sugieren que las células que muestran un incremento en la expresión de PHF20L1 proliferan más.

Otra de las proteínas que se encontraron asociadas a PHF20L1 fue Rsf-1. Recientemente, se ha reportado que Rsf-1 participa en el desarrollo o selección del amplicón 11q13 en aproximadamente 13-17% de los tumores de CaOv [126]. Los niveles incrementados de Rsf-1 se asocian a un peor pronóstico sugiriendo que puede ser utilizado como un biomarcador del comportamiento tumoral [126]. Los ensayos de correlación de la expresión de PHF20L1 y la etapa clínica de las pacientes cuyos tejidos fueron analizados permitirán conocer si la proteína se asocia a la progresión tumoral.

HSP90 también fue identificada en el inmunoprecipitado, tanto de la condición control como bajo el estímulo de ascitis. Esta proteína juega un papel vital en la regulación epigenética, además de que mantiene la homeostasis celular de las proteínas ya sea de forma directa o indirecta [127]. Actúa como facilitador de unión entre las histonas y el DNA uniéndose entre ellas [127]. La DNMT1 es otra proteína cliente de HSP90 [128] y es responsable de mantener la metilación del ADN [129]. DNMT1 se sobreexpresa y causa la inhibición de genes supresores

de tumor en cáncer humano como CDKN2A [128]. La inhibición de HSP90 lleva a la degradación de DNMT1 [130]. En una línea celular de cáncer de vejiga, T24, se analizaron los efectos del inhibidor de HSP90, sobre la metilación del DNA generada por DNMT1, los cuales se reflejan en la expresión de WIF-1 (antagonista de Wnt) [131]. WIF-1 inhibe la señalización de Wnt/ β -catenina mediante la unión directa a proteínas Wnt, y se hipermetila frecuentemente en cáncer [132, 133]. WIF-1 se re-expresa después de la reducción de DNMT1 [132].

Como se menciona en la introducción, se ha reportado que PHF20L1 se asocia a DNMT1, sin embargo, no se ha reportado nada respecto a la interacción de estas tres proteínas juntas (PHF20L1, HSP90 y DNMT1).

En la regulación de la expresión de genes, la metilación del DNA se entrelaza con la modificación de histonas. Los inhibidores de HSP90 tienen efecto sobre histonas. Por ejemplo, la monometilación en lisina 20 de la histona 4 (H4K20me1), una modificación que se ha implicado en la regulación de diversos procesos que van desde la respuesta al daño del DNA, la condensación mitótica y la replicación del DNA hasta la regulación génica [134], incrementa sus niveles con altas dosis de un inhibidor de HSP90 (GA) en células T24 comparado con las células no tratadas [131]. La trimetilación en lisina 20 de la histona 4 (H4K20me3) también incrementa sus niveles [131]. Esta histona metilada en residuos de lisina se asocia a represión de la cromatina, específicamente en centrómeros y telómeros y su ausencia correlaciona positivamente con el desarrollo del cáncer [135, 136].

La información previa nos hace pensar que HSP90 podría ser crucial en la interacción entre PHF20L1 y las histonas que fueron reportadas mediante el análisis de masas, al menos para la interacción con la histona 2A, que fue encontrada, al igual que la chaperona, tanto la condición de estimulación con ascitis como sin estímulo. Se ha reportado que inhibidores de HSP90 (Geldanamicina) incrementa la toxicidad mediada por paclitaxel en células de cáncer de ovario a través de la activación sostenida del eje p38/H2Ax [137]. Recordemos que PHF20L1 también se ha asociado a resistencia a quimioterapia en cáncer de mama [138]. Es posible que uno de los mecanismos por los cuales PHF20L1 induzca resistencia a las células tumorales sea mediante la vía de señalización previamente mencionada. Sin embargo, para corroborar esta información se necesitan ensayos adicionales.

En un estudio en *Drosophila*, el alelo mutante de Rsf-1 indujo niveles reducidos de dimetilación de H3K9 y de la histona H2A, en la región eucromática yuxtapuesta con la heterocromatina

[139]. En este mismo modelo, se demostró una interacción entre las dos histonas y Rsf-1 en el complejo de maquinaria de intercambio Tip60. Los resultados sugieren que RSF contribuye con el remplazo de la histona H2A en la vía de formación del silenciamiento de la cromatina suprimiendo la expresión de genes involucrados en embriogénesis [139]. Esa información resulta relevante ya que, como se ha mostrado por los ensayos de espectrometría de masas y en los ensayos de co-inmunoprecipitación, PHF20L1 y H2A se asocian entre sí. La interacción entre Rsf-1 y H2A es mediada por el reconocimiento de residuos ubiquitinados en la histona [140]. PHF20L1 por su parte, reconocería metilaciones en la histona, por tanto, resultaría importante evaluar si la unión H2A-Rsf-1 afecta en alguna manera la interacción con PHF20L1 o si se trata de interacciones diferentes y si es posible que la presencia de PHF20L1 afecte la expresión de genes involucrados en embriogénesis.

Otra de las proteínas encontradas fue BCAS3 (Breast carcinoma amplified sequence-3 por sus siglas en inglés). La migración celular en procesos fisiológicos o patológicos depende de cambios coordinados en el citoesqueleto y de adhesiones de la matriz extracelular [141]. Los componentes del citoesqueleto juegan un papel crítico en el establecimiento de la polaridad celular, generación de fuerza, y formación de complejos de adhesión durante la migración celular. BCAS3 es una proteína esencial del citoesqueleto para la angiogénesis durante el desarrollo del ratón y está implicada en metástasis tumoral [141-144]. BCAS3 se une a los microtúbulos y filamentos intermedios y promueve la migración celular [142]. La formación de vasos sanguíneos requiere migración de células endoteliales, lo cual a su vez necesita de remodelación del citoesqueleto [141]. Sin embargo, también se sugiere que BCAS3 podría influenciar el estado del remodelamiento de la cromatina [143].

Es importante resaltar que, muchas de las proteínas encontradas tienen alguna implicación en la regulación epigenética, en mayor o en menor medida, tal como se ha sugerido al describir a algunas de ellas. Como en otros tipos de cáncer, el estroma del CaOv produce y expresa moléculas relevantes para la biología del tumor, y la sola presencia de un solo componente del estroma se asocia con pobre supervivencia en etapas avanzadas de la enfermedad [144]. La composición de la matriz extracelular, metaloproteasas y otras proteínas presentes en el estroma en el CaOv y su relevancia clínica se han estudiado ampliamente. Sin embargo, el estroma también puede contar con reguladores de la transcripción. Los factores de transcripción HOX constituyen una gran familia de proteínas que regulan la embriogénesis y organogénesis y

también regulan la apoptosis, proliferación, diferenciación, motilidad y angiogénesis [145]. Son los encargados de regular la expresión de cadherinas, integrinas, NCAM (CD56) y p53 [144]. HOXA7 se encuentra sobreexpresado en el núcleo de las células tumorales y en el estroma del tejido de CaOv de células claras [146]. HOXA9 en CaOv induce fibroblastos peritoneales y células mesenquimales derivadas de médula ósea y tejido adiposo para el desarrollo de fibroblastos asociados a tumor [147]. Estos genes (HOX), son regulados por la expresión y metilación de la H2A [148].

En tejido ovárico normal, libre de cáncer, PHF20L1 se expresa en bajos niveles; sin embargo, en ese tejido su expresión se observa principalmente a nivel del estroma. Es probable que la función que desempeña de manera normal, que podría ser similar a la de los factores de transcripción HOX, pudiera ser utilizada por las células del cáncer para aumentar la proliferación celular y con esto garantizar el crecimiento del tumor. Para elucidar estas dudas, es necesario realizar un modelo murino que permita determinar si PHF20L1 afecta o no el desarrollo de un tumor.

Cuando se analizó la capacidad de invasión en células SKOV-3, pudimos corroborar que cuando las células se encuentran bajo el estímulo de ascitis se incrementa considerablemente la capacidad invasiva, lo cual concuerda con el hecho de que la TEM, la cual no se evaluó en este proyecto pero que se sabe que se presenta bajo el estímulo de ascitis [64], induce que las células adquieran una capacidad invasiva mayor. Sin embargo, cuando la PHF20L1 está ausente, esta capacidad invasiva se reduce, no tanto como en la condición sin estímulo de ascitis, pero si lo suficiente para ser estadísticamente significativa, esto al menos con uno de los dos líquidos ascíticos evaluados. La asociación que existe entre la expresión de PHF20L1 y el proceso de invasión celular no ha sido caracterizada aún, sin embargo, se pretende hacer estudios adicionales como la evaluación de los niveles de metaloproteasas cuando se inhibe la expresión de PHF20L1. Se sabe que la regulación epigenética es importante para la expresión de ciertas metaloproteasas, por ejemplo, la disminución de DNMT1 junto a la DNMT3B induce la expresión de la MMP3 [149].

La información que se conoce acerca de PHF20L1 y el hecho de encontrar una alta expresión en tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario y en células SKOV-3 estimuladas con ascitis, nos hacen suponer que una de las consecuencias probables de su elevada expresión podría ser un incremento en la expresión y/o función de algunas de las proteínas con las cuales

se une, proteínas cuya función podría estar involucradas en la tumorigénesis. De entre todas las proteínas encontradas por espectrometría de masas, resulta relevante la función de la interacción PHF20L1-H2A, puesto que, si en efecto hay una prolongación de la vida media de la histona, tendría como consecuencia la regulación de genes importantes como los factores de transcripción HOX, con lo cual se desencadenaría una gran cantidad de activación o inactivación en la expresión de genes, postulando a PHF20L1 como un regulador maestro de la expresión génica. Para conocer esta información, sería interesante realizar ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de PHF20L1 seguido del análisis de la expresión global de para investigar si se presentan cambios relevantes.

Conclusiones

En el presente trabajo, hemos observado una elevada expresión de la proteína PHF20L1 en tejido tumoral de CaOv, así como una sobreexpresión de las isoformas de esta proteína inducida por el líquido ascítico de pacientes con CaOv. Este hecho resulta relevante ya que podría sugerir un papel importante de PHF20L1 en células de CaOv. Si recordamos que el número de copias del gen de la proteína también se encuentra incrementado en células de CaOv, según reportes previos, y con la información que hemos generado hasta este momento, PHF20L1 podría ser postulado como un potencial oncogén. Sabemos que PHF20L1 es una proteína que lee metilaciones en lisina y arginina y que es quizá de esta manera que interactúa directa o indirectamente con algunas de las proteínas que identificamos por inmunoprecipitación acoplada a espectrometría de masas. Esta interacción podría desencadenar la activación de vías de señalización importantes o bien la prolongación en la vida media de proteínas que desempeñen funciones primordiales en las células tumorales. En este trabajo se han estudiado procesos importantes para las células tumorales, como la migración celular, la proliferación y la invasión; se demostró que PHF20L1 podría jugar un papel importante en ellos, ya que estos procesos se modifican cuando se inhibe la expresión de PHF20L1. Sin embargo, aún falta conocer cuál es la función particular de esta proteína o el mecanismo que involucra su presencia e incremento en células de CaOv, en diferentes vías de señalización. Si asociamos la función de PHF20L1 a la función de las proteínas identificadas por espectrometría de masas, se pudiera suponer que PHF20L1 estuviera implicada en la regulación del ciclo celular, o la proliferación celular. Para responder esta pregunta, se requieren ensayos adicionales. No obstante, ahora

sabemos que PHF20L1 se incrementa en las células de CaOv y que su incremento tiene un impacto negativo en la supervivencia libre de progresión y en la supervivencia global de las pacientes con cáncer de ovario epitelial.

IX. Perspectivas

- ◆ Validar los hallazgos y análisis aquí descritos con respecto a la proteína PHF20L1 con un número mayor de muestras de pacientes con cáncer de ovario.
- ◆ Realizar ensayos de hibridación *in situ* utilizando sondas que detecten el RNA mensajero de las 3 isoformas principales de PHF20L1 y con ello evaluar mediante esta técnica si hay un incremento del mensajero de la isoforma *a* de la proteína, lo cual se asociaría al incremento que se observa en los ensayos *in vitro*.
- ◆ Cuantificar los niveles de las variantes de PHF20L1 por qRT-PCR.
- ◆ Realizar un análisis comparativo de la expresión de PHF20L1 en cortes de tejido tumoral de pacientes con patologías diferentes a cáncer de ovario, con la finalidad de determinar si el incremento de la expresión proteica es específico de esta patología.
- ◆ Corroborar la interacción de PHF20L1 con las proteínas identificadas por espectrometría de masas.
- ◆ Realizar ensayos bajo la inducción de TGF β o bien con el KD de MYC y corroborar si estos componentes afectan o no la expresión de PHF20L1.
- ◆ Analizar, en cortes de tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario, la expresión de otros marcadores como CA125 o Ki67 con el objetivo de correlacionar esos datos, puesto que sabemos que esas moléculas pueden sugerir o indicar la recurrencia o la respuesta a terapia de las pacientes (CA125) o bien la alta proliferación celular (Ki67).
- ◆ Corroborar la interacción entre PHF20L1 y HSP90 en células SKOV-3.
- ◆ Analizar si inhibidores de HSP90 y de PHF20L1 podrían generar una disminución en la resistencia a fármacos empleados en quimioterapia en células de cáncer de ovario.
- ◆ Evaluar si la unión H2A-Rsf-1 afecta en alguna manera la interacción con PHF20L1 o si se trata de interacciones diferentes y si es posible que la presencia de PHF20L1 afecte la expresión de genes involucrados en embriogénesis.
- ◆ Evaluar, en un modelo murino, si la ausencia de la proteína afecta el crecimiento tumoral, utilizando células que no expresen a PHF20L1.
- ◆ Realizar ensayos de silenciamiento y sobreexpresión de PHF20L1 seguido de una secuenciación de RNA y analizar si se presentan cambios relevantes en los genes regulados por PHF20L1.

X. Referencias

- [1] Jessmon P., Boulanger T., Zhou W., Patwardhan P. (2017) **Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer.** *Expert Review of Anticancer Therapy*; 17(5), 427-437. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1299575>
- [2] GLOBOCAN (2018) Estimated cancer incidence and prevalence worldwide in 2018. <https://gco.iarc.fr/>
- [3] Lheureux L., & Oza A.M. (2015) **Targeting the microenvironment in ovarian cancer.** *The Lancet Oncology*; 16(5), 485-486. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(15\)70157-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(15)70157-9)
- [4] Hennessy B.T., Coleman R.L., Markman M. (2009) **Ovarian cancer.** *Lancet (London, England)*; 374(9698), 1371–1382. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61338-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61338-6)
- [5] Auersperg N., Wong A.S., Choi K.C., Kang S.K., Leung P.C. (2001) **Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology.** *Endocrine Reviews*; 22(2), 255–288. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0422>
- [6] Kurman R.J. & Shih I. (2010) **The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory.** *The American Journal of Surgical Pathology*; 34(3), 433–443. <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79>
- [7] Wang S., Qiu L., Lang J.H., Shen K., Yang J.X., Huang H.F., Pan L.Y., & Wu M. (2013) **Clinical analysis of ovarian epithelial carcinoma with coexisting pelvic endometriosis.** *American Journal of Obstetrics And Gynecology*; 208(5), 413.e1–413.e4135. <https://doi.org/10.1016/j.ajog.2012.12.004>
- [8] Cancer Genome Atlas Research Network (2011) **Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma.** *Nature*; 474(7353): 609e15
- [9] Brown P.O. & Palmer C. (2009) **The preclinical natural history of serous ovarian cancer: defining the target for early detection.** *PLoS medicine*; 6(7), e1000114. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000114>
- [10] Berek J.S., Crumb C. & Friedlander M. (2012) **FIGO cancer report 2012, cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum.** *International Journal of Gynaecology And Obstetrics: The Official Organ of The International Federation of Gynaecology And Obstetrics*; 119 Suppl 2, S118–S129. [https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(12\)60025-3](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(12)60025-3)
- [11] Gallardo-Rincón D., Espinosa-Romero R., Muñoz W.R., Mendoza-Martínez R, Villa-Álvarez S.D., Oñate-Ocaña L., Marquez-Manriquez J.P., Apodaca-Cruz A., Meneses-García A. (2016) **Epidemiological overview, advances in diagnosis, prevention, treatment and management of**

- epithelial ovarian cancer in Mexico.** *Salud Publica De Mexico*; 58(2), 302–308. <https://doi.org/10.21149/spm.v58i2.7801>
- [12] Palma M., Ristori E., Ricevuto E., Giannini G. & Gulino A. (2006) **BRCA1 and BRCA2: the genetic testing and the current management options for mutation carriers.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*; 57(1), 1–23. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2005.05.003>
- [13] Sjøgaard M., Kjaer S.K., & Gayther S. (2006) **Ovarian cancer and genetic susceptibility in relation to the BRCA1 and BRCA2 genes. Occurrence, clinical importance and intervention.** *Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica*; 85(1), 93–105. <https://doi.org/10.1080/00016340500324621>
- [14] Gallardo-Rincón, D., Álvarez-Gómez, R. M., Montes-Servín, E., Toledo-Leyva, A., Montes-Servín, E., Michel-Tello, D., Alamilla-García, G., Bahena-González, A., Hernández-Nava, E., Fragoso-Ontiveros, V., Espinosa-Romero, R., & Cetina-Pérez, L. (2020). Clinical Evaluation of BRCA1/2 Mutation in Mexican Ovarian Cancer Patients. *Translational oncology*, 13(2), 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2019.11.003>
- [15] Rosen E.M., Fan S., Pestell R.G. & Goldberg I.D. (2003) **BRCA1 gene in breast cancer.** *Journal of Cellular Physiology*; 196(1):19 <https://doi.org/10.1002/jcp.10257>
- [16] Baldwin R.L., Nemeth E., Tran H., Shvartsman H., Cass I., Narod S., Karlan B.Y. (2000) **BRCA1 promoter region hypermethylation in ovarian carcinoma: a population-based study.** *Cancer Research*; 60(19):5329-5333.
- [17] Esteller M., Silva J.M., Dominguez G., Bonilla F., Matias-Guiu X., Lerma E., Bussaglia E. *et al* (2000) **Promoter hypermethylation and BRCA1 inactivation in sporadic breast and ovarian tumors.** *Journal of The National Cancer Institute*; 92(7):564.
- [18] Hilton J.L., Geisler J.P., Rathe J.A., Hattermann-Zogg M.A., DeYoung B. Buller R.E. (2002) **Inactivation of BRCA1 and BRCA2 in ovarian cancer.** *Journal of The National Cancer Institute*; 92(7), 564–569. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.7.564>
- [19] Aarnio M., Sankila R., Pukkala E., Salovaara R., Aaltonen L.A., de la Chapelle A., Peltomaki P., Mecklin J.P., Jarvinen H.J. (1999) **Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes.** *International Journal of Cancer*; 81(2), 214–218. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0215\(19990412\)81:2<214::aid-ijc8>3.0.co;2-1](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0215(19990412)81:2<214::aid-ijc8>3.0.co;2-1)
- [20] Saad A.F., Hu W., Sood A.K. (2010) **Microenvironment and pathogenesis of epithelial ovarian cancer.** *Hormones & Cancer*; 1(6), 277–290. <https://doi.org/10.1007/s12672-010-0054-2>
- [21] TCGA Research Network: <https://www.cancer.gov/tcga>

- [22] Trinidad C.V., Tetlow A.L., Bantis L.E., Godwin A.K. (2020) **Reducing ovarian cancer mortality through early detection: approaches using circulating biomarkers.** *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*; 13(3), 241–252. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-19-0184>
- [23] Kim J., Park E.Y., Kim O., Schilder J.M., Coffey D.M., Cho C.H., Bast R.C. Jr (2018). **Cell origins of high-grade serous ovarian cancer.** *Cancers*; 10(11), 433. <https://doi.org/10.3390/cancers10110433>
- [24] Giornelli G.H. (2016) **Management of relapsed ovarian cancer: a review.** *Springer Plus*; 5:1197. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-2660-0>
- [25] Gubbels J.A., Claussen N., Kapur A.K., Connor J.P., & Patankar M.S. (2010) **The detection, treatment, and biology of epithelial ovarian cancer.** *Journal of Ovarian Research*; 3:8. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-3-8>
- [26] Khiewvan, B., Torigian, D. A., Emamzadehfard, S., Paydary, K., Salavati, A., Houshmand, S., Werner, T. J., & Alavi, A. (2017). An update on the role of PET/CT and PET/MRI in ovarian cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 44(6), 1079–1091. <https://doi.org/10.1007/s00259-017-3638-z>
- [27] Sturgeon C.M., Duffy M.J., Stenman U.H., Lilja H., Babaian R., Bast R.C. Jr, Dowell B., *et al* (2008) **National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers.** *Clinical Chemistry*; 54(12): e11- e79. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.105601>
- [28] Schorge J.O., McCann C., Del Carmen M.G. (2010) **Surgical debulking of ovarian cancer: what difference does it make?** *Reviews in Obstetrics & Gynecology*; 3(3):111
- [29] Buys S.S., Skates S.J., Mai P., Horick N.K., Piedmonte M., Drescher C.W., *et al* (2011) **Large prospective study of ovarian cancer screening in high-risk women: CA125 cut-point defined by menopausal status.** *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*; 4(9), 1401–1408. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-10-0402>
- [30] Garibay Cerdaneres O.L., Hernández-Ramírez V.I., Osorio-Trujillo J.C., Hernández-Ortíz M., Gallardo-Rincón D., Cantú de León D., Encarnación-Guevara S., Villegas-Pineda J.C., Talamás-Rohana P. (2014) **Proteomic identification of fucosylated haptoglobin alpha isoforms in ascitic fluids and its localization in ovarian carcinoma tissues from Mexican patients.** *Journal of Ovarian Research*; 7: 27. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-27>
- [31] Coleman R.L., Naumann R.W., Burger R.A., Sausville E.A., Kutarska E., Ghamande S.A., Gabrail N.Y., Depasquale S.E., Nowara E., Gilbert L., Gersh R.H., Teneriello M.G., Harb W.A., Konstantinopoulos P.A., Penson R.T., Symanowski J.T., Lovejoy C.D., Leamon C.P., Morgenstern D.E., Messmann R.A. (2013) **PRECEDENT: a randomized phase II trial comparing vintafolide**

- (EC145) and pegylated liposomal doxorubicin (PLD) in combination versus PLD alone in patients with platinum-resistant ovarian cancer.** *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of The American Society of Clinical Oncology*; 31(35), 4400–4406. <https://doi.org/10.1200/JCO.2013.49.7685>
- [32] Vella N., Aiello M., Russo A.E., Scalisi A., Spandidos D.A., Toffoli G., Sorio R., Libra M., Stivala F. (2011) **'Genetic profiling' and ovarian cancer therapy (review).** *Molecular Medicine Reports*; 4(5): 771–777. <https://doi.org/10.3892/mmr.2011.512>
- [33] Piccart M.J. (2000) **RESPONSE: re: randomized intergroup trial of cisplatin-paclitaxel versus cisplatin-cyclophosphamide in women with advanced epithelial ovarian cancer: three-year results.** *Journal of The National Cancer Institute*; 92(17):1446-1447. <https://doi.org/10.1093/jnci/92.17.1446-a>
- [34] Ozga M., Aghajanian C., Myers-Virtue S., McDonnell G., Jhanwar S., Hichenberg S., & Sulimanoff I. (2015) **A systematic review of ovarian cancer and fear of recurrence.** *Palliative & Supportive Care*; 13(6), 1771–1780. <https://doi.org/10.1017/S1478951515000127>
- [35] Kigawa J. (2013) **New strategy for overcoming resistance to chemotherapy of ovarian cancer.** *Yonago Acta Medica*; 56(2):43-50.
- [36] Wong H.H., Parkinson C., Ledermann J.A., Brenton J.D., Merger M., Shaw A., Patterson A., Shafi M., & Earl H.M. (2012) **Prolonged response of relapsed high grade serous ovarian carcinoma to the oral angiokinase inhibitor nintedanib in a patient with a germline BRCA1 mutation.** *Gynecologic Oncology Case Reports*; 3, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.gynor.2012.10.003>
- [37] Chiappinelli K.B., Strissel P.L., Desrichard A., Li H., Henke C., Akman B., Hein A., Rote N.S., Cope L.M., Snyder A., Makarov V., Budhu S., Slamon D.J., Wolchok J.D., Pardoll D.M., Beckmann M.W., Zahnow C.A., Merghoub T., Chan T.A., Baylin S.B., Strick R. (2016) **Inhibiting DNA methylation causes an interferon response in cancer via dsRNA including endogenous retroviruses.** *Cell*; 164(5): 974–986. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.011>
- [38] Ahmed N., Stenvers K.L. (2013) **Getting to know ovarian cancer ascites: opportunities for targeted therapy-based translational research.** *Frontiers in Oncology*; 3:256. <https://doi.org/10.3389/fonc.2013.00256>
- [39] Ghoneum A., Afify H., Salih Z., Kelly M., Said N. (2018) **Role of tumor microenvironment in the pathobiology of ovarian cancer: Insights and therapeutic opportunities.** *Cancer Medicine*; 7(10), 5047–5056. <https://doi.org/10.1002/cam4.1741>
- [40] Hanahan D, Weinberg RA. (2000) **The hallmarks of cancer.** *Cell*; 100(1): 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

- [41] Luo Z., Wang Q., Bond Lau W., Lau B., Xu L., Zhao L., Yang H., Feng M., Xuan Y., Yang Y., Lei L., Wang C., Yi T., Zhao X., Wei Y., & Zhou S. (2016). **Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis?**. *Cancer Letters*; 377(2), 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.04.038>
- [42] Hirabayashi K., Graham J. (1970) **Genesis of ascites in ovarian cancer**. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*; 106(4), 492–497. [https://doi.org/10.1016/0002-9378\(70\)90031-1](https://doi.org/10.1016/0002-9378(70)90031-1)
- [43] Tan, D. S., Agarwal, R., & Kaye, S. B. (2006). **Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer**. *The Lancet. Oncology*; 7(11), 925–934. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70939-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70939-1)
- [44] Meyers, M. A., Oliphant, M., Berne, A. S., & Feldberg, M. A. (1987). **The peritoneal ligaments and mesenteries: pathways of intraabdominal spread of disease**. *Radiology*; 163(3), 593–604. <https://doi.org/10.1148/radiology.163.3.3575702>
- [45] Coakley, F. V., & Hricak, H. (1999). **Imaging of peritoneal and mesenteric disease: key concepts for the clinical radiologist**. *Clinical Radiology*; 54(9), 563–574. [https://doi.org/10.1016/s0009-9260\(99\)90018-1](https://doi.org/10.1016/s0009-9260(99)90018-1)
- [46] Hilliard T. S. (2018). **The Impact of Mesothelin in the Ovarian Cancer Tumor Microenvironment**. *Cancers*; 10(9), 277. <https://doi.org/10.3390/cancers10090277>
- [47] Cvetkovic D. (2003) **Early events in ovarian oncogenesis**. *Reproductive Biology Endocrinology*; 1:68 <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-68>
- [48] Odicino F., Pecorelli S., Zigliani L., Creasman W.T. (2008) **History of the FIGO cancer staging system**. *International Journal of Gynaecology And Obstetrics: The Official Organ of The International Federation of Gynaecology And Obstetrics*; 101(2), 205–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2007.11.004>
- [49] Kohn EC, Travers LA, Kassis J, Broome U, Klominek J (2005) **Malignant effusions are sources of fibronectin and other promigratory and proinvasive components**. *Diagnostic Cytopathology*; 33(5), 300–308. <https://doi.org/10.1002/dc.20279>
- [50] Neal F.E., Kaldor J.M., Day N.E., Band P., Choi N.W., Clarke E.A., Coleman M.P., Hakama M., Koch M., Langmark F. *et al* (1987) **Second malignancies following testicular cancer, ovarian cancer and Hodgkin's disease: an international collaborative study among cancer registries**. *International Journal of Cancer*; 39(5), 571–585. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910390506>
- [51] Offner F.A., Obrist P., Stadlmann S., Feichtinger H., Klingler P., Herold M., Zwierzina H., Hittmair A., Mikuz G., Abendstein B., Zeimet A., Marth C. (1995) **IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells**. *Cytokine*; 7(6), 542–547. <https://doi.org/10.1006/cyto.1995.0073>

- [52] Matte I., Lane D., Laplante C., Rancourt C., Piche A. (2012) **Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites.** *American Journal of Cancer Research*; 2(5), 566-580.
- [53] Simpson-Abelson M.R., Loyall J.L., Lehman H.K., Barnas J.L., Minderman H., O'Loughlin K.L., Wallace P.K., George T.C., Peng P., Kelleher Jr R.J., Odunsi K., Bankert R.B. (2013) **Human ovarian tumor ascites fluids rapidly and reversibly inhibit T cell receptor-induced NF-kappaB and NFAT signaling in tumor-associated T cells.** *Cancer Immunology*; 13:14
- [54] Matte I., Lane D., Laplante C., Rancourt C., Piche A. (2014) **Role of malignant ascites on human mesothelial cells and their gene expression profiles.** *BMC Cancer*; 14:288. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-288>
- [55] Kim S., Kim B., Song Y.S. (2016) **Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer.** *Cancer Science*; 107(9), 1173-1178. <https://doi.org/10.1111/cas.12987>
- [56] Pokhriyal R., Hariprasad R., Kumar L., Hariprasad G. (2019) **Chemotherapy Resistance in Advanced Ovarian Cancer Patients.** *Biomarkers in cancer*; 11, 1179299X19860815. <https://doi.org/10.1177/1179299X19860815>
- [57] Choi H.J., Pena G.N.A., Pradeep S., Cho M.S., Coleman R.L., Sood A.K. (2015) **Anti-vascular therapies in ovarian cancer: moving beyond anti-VEGF approaches.** *Cancer metastasis reviews*; 34(1), 19–40. <https://doi.org/10.1007/s10555-014-9538-9>
- [58] Gavalas N.G., Karadimou A., Dimopoulos M.A., Bamias A. (2010) **Immune response in ovarian cancer: how is the immune system involved in prognosis and therapy: potential for treatment utilization.** *Clinical & Developmental Immunology*; 791603. <https://doi.org/10.1155/2010/791603>
- [59] Kipps E., Tan D.S.P., Kaye S.B. (2013) **Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research.** *Nature Reviews. Cancer*; 13(4), 273–282. <https://doi.org/10.1038/nrc3432>
- [60] Offner, F. A., Obrist, P., Stadlmann, S., Feichtinger, H., Klingler, P., Herold, M., Zwierzina, H., Hittmair, A., Mikuz, G., & Abendstein, B. (1995). **IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells.** *Cytokine*; 7(6), 542–547. <https://doi.org/10.1006/cyto.1995.0073>
- [61] Dongre A., Weinberg R.A. (2019) **New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*; 20(2), 69–84. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0080-4>
- [62] Thiery J.P. **Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression.** *Nature Reviews. Cancer*; 2(6), 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>

- [63] Taparra K., Tran P.T., Zachara N.E. (2016) **Hijacking the hexosamine biosynthetic pathway to promote eMT-Mediated neoplastic phenotypes.** *Frontiers in Oncology*; 6:85 <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00085>
- [64] Toledo-Leyva A., Villegas-Pineda J.C., Encarnación-Guevara S., Gallardo-Rincón D., Talamás Rohana P. (2018) **Effect of ovarian cancer ascites on SKOV-3 cells proteome: new proteins associated with aggressive phenotype in epithelial ovarian cancer.** *Proteome Science*; 16:3. <https://doi.org/10.1186/s12953-018-0133-9>
- [65] Shaul Y.D., Freinkman E., Comb W.C., Cantor J.R., Tam W.L., Thiru P., Kim D., Kanarek N., Pacold M.E., Chen W.W., Bierie B., Possemato R., Reinhardt F., Weinberg R.A., Yaffe M.B., & Sabatini D. M. (2014) **Dihydropyrimidine accumulation is required for the epithelial-mesenchymal transition.** *Cell*; 158(5), 1094–1109. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.07.032>
- [66] Nolen B.M. & Lokshin A. (2012) **Protein biomarkers of ovarian cancer: the forest and the trees.** *Future Oncology (London, England)*; 8(1), 55–71. <https://doi.org/10.2217/fon.11.135>
- [67] Bradner J., Hnisz D., Young R.A. (2017) **Transcriptional Addiction in Cancer.** *Cell*; 168(4): 629–643. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.013>
- [68] Wang Y., Shi J., Chai K., Yin X., Zhou B.P. (2013) **The role of Snail in EMT and tumorigenesis.** *Current Cancer Drug Targets*; 13(9): 963-972. <https://doi.org/10.2174/15680096113136660102>
- [69] Sur I., Taipale J. (2016) **The role of enhancers in cancer.** *Nature Reviews Cancer*; 16, 483–493 <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.62>
- [70] Kim J., Daniel J., Espejo A., Lake A., Krishna M., Xia L., Zhang Y., Bedford M.T. (2006) **Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation.** *EMBO Reports*; 7(4), 397–403. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400625>
- [71] Wildenauer, D.B., Schwab S.G. (1999) **Chromosomes 8 and 10 workshop.** *American Journal of Medical Genetics*; 88(3), 239–243.
- [72] Alberto-Aguilar DR, Identificación de proteínas fucosiladas. Tesis de Maestría. 2016
- [73] Bateman A., Coghill P., Finn R.D. (2010) **DUFs: families in search of function.** *Acta Crystallographica Section F: Structural Biology Crystallization Communications*; 66 (Pt 10): 1148–1152. <https://doi.org/10.1107/S1744309110001685>
- [74] Bonasio R., Lecona E., Reinberg D. (2010) **MBT domain proteins in development and disease.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*; 21(2), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2009.09.010>
- [75] Sprangers R., Groves M.R., Sinning I., Sattler M. (2003) **High-resolution X-ray and NMR structures of the SMN Tudor domain: conformational variation in the binding site for**

- symmetrically dimethylated arginine residues. *Journal of Molecular Biology*; 327 (2): 507- 520.
[https://doi.org/10.1016/s0022-2836\(03\)00148-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(03)00148-7)**
- [76] Shi X., Kachirskaia I., Walter K. L., Kuo J. H., Lake A., Davrazou F., Chan S. M., Martin D. G., Fingerman I. M., Briggs S. D., Howe L., Utz P. J., Kutateladze T. G., Lugovskoy A. A., Bedford M. T., Gozani O. (2007) **Proteome-wide analysis in *Saccharomyces cerevisiae* identifies several PHD fingers as novel direct and selective binding modules of histone H3 methylated at either lysine 4 or lysine 36.** *The Journal of Biological Chemistry*; 282(4), 2450–2455.
<https://doi.org/10.1074/jbc.C600286200>
- [77] Estève P. O., Terragni J., Deepti K., Chin H. G., Dai N., Espejo A., Corrêa I. R., Jr, Bedford M. T., Pradhan S. (2014). **Methyllysine reader plant homeodomain (PHD) finger protein 20-like 1 (PHF20L1) antagonizes DNA (cytosine-5) methyltransferase 1 (DNMT1) proteasomal degradation.** *The Journal of Biological Chemistry*; 289(12), 8277–8287.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.525279>
- [78] Nady N., Krichevsky L., Zhong N., Duan S., Tempel W., Amaya M.F., Ravichandran M., Arrowsmith C.H. (2012) **Histone recognition by human malignant brain tumor domains.** *Journal of Molecular Biology*; 423(5), 702- 718. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2012.08.022>
- [79] Meng C.F., Dai D.Q., Guo K.J. (2008) **Effects of 5-Aza-2'-deoxycytidine and trichostatin A on DNA methylation and expression of hMLH1 in ovarian cancer cell line COC1/DDP.** *Ai Zheng*; 27(12):1251-1255.
- [80] Jiang Y., Liu L., Shan W., Yang Z.Q. (2015) **An integrated genomic analysis of Tudor domain-containing proteins identifies PHD finger protein 20-like 1 (PHF20L1) as a candidate oncogene in breast cancer.** *Molecular Oncology*; 10(2):292- 302.
<https://doi.org/10.1016/j.molonc.2015.10.013>
- [81] Pharoah P.D., Ponder B.A. (2002) **The genetics of ovarian cancer.** *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynecology*; 16(4), 449- 468. <https://doi.org/10.1053/beog.2002.0296>
- [82] Wang Q., Yu M., Ma Y., Zhang X., Zhang H., Li S., Lan R., Lu F. (2018) **PHF20L1 antagonizes SOX2 proteolysis triggered by the MLL1/WDR5 complexes.** *Laboratory Investigation*; 98(12):1627-1641. <https://doi.org/10.1038/s41374-018-0106-8>
- [83] Sarkar A., Hochedlinger K. (2013). **The sox family of transcription factors: versatile regulators of stem and progenitor cell fate.** *Cell Stem Cell*; 12(1), 15–30.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.12.007>
- [84] Bareiss P.M., Paczulla A., Wang H., Schairer R., Wiehr S., Kohlhofer U., Rothfuss O. C., Fischer A., Perner S., Staebler A., Wallwiener D., Fend F., Fehm T., Pichler B., Kanz L., Quintanilla-Martinez L., Schulze-Osthoff K., Essmann F., Lengerke C. (2013) **SOX2 expression associates**

- with stem cell state in human ovarian carcinoma.** *Cancer Research*; 73(17), 5544–5555. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-4177>
- [85] Villegas-Pineda J.C., Garibay-Cerdenares O.L., Hernández-Ramírez V.I., Gallardo-Rincón D., Cantú de León D., Pérez-Montiel-Gómez M.D., Talamás-Rohana P. (2015) **Integrins and haptoglobin: Molecules overexpressed in ovarian cancer.** *Pathology, Research and Practice*; 211(12), 973–981. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.10.002>
- [86] Alberto-Aguilar D.R., Hernández-Ramírez V.I., Osorio-Trujillo J.C., Gallardo-Rincón D., Toledo-Leyva A., Talamás-Rohana P. (2019) **Ascites from ovarian cancer induces novel fucosylated proteins.** *Cancer Microenvironment: Official Journal of The International Cancer Microenvironment Society*; 12(2-3), 181–195. <https://doi.org/10.1007/s12307-019-00227-z>
- [87] Chatr-Aryamontri A., Oughtred R., Boucher L., Rust J., Chang C., Kolas N. K., O'Donnell L., Oster S., Theesfeld C., Sellam A., Stark C., Bretkreutz B. J., Dolinski K., Tyers M. (2017) **The BioGRID interaction database: 2017 update.** *Nucleic Acids Research*; 45(D1), D369–D379. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1102>
- [88] Kahn M., (2014). **Can we safely target the WNT pathway?.** *Nature reviews. Drug discovery*, 13(7), 513–532. <https://doi.org/10.1038/nrd4233>
- [89] Sansom O.J., Berger J., Bishop S.M., Hendrich B., Bird A., Clarke A.R. (2003) **Deficiency of Mbd2 suppresses intestinal tumorigenesis.** *Nature Genetics*; 34(2), 145–147. <https://doi.org/10.1038/ng1155>
- [90] Ip Y.T., Park R.E., Kosman D., Yazdanbakhsh K., Levine M. (1992) **Dorsal-twist interactions establish snail expression in the presumptive mesoderm of the Drosophila embryo.** *Genes & Development*; 6(8), 1518–1530. <https://doi.org/10.1101/gad.6.8.1518>
- [91] Fedchenko N, Reifenrath J. Different approaches for interpretation and reporting of immunohistochemistry analysis results in the bone tissue - a review. *Diagn Pathol.* 2014;9:221. Published 2014 Nov 29. doi:10.1186/s13000-014-0221-9
- [92] Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). **In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes.** *Nature protocols*; 1(6), 2856–2860. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.468>
- [93] STRING Data Base (<https://string-db.org/>) Jensen et al. *Nucleic Acids Res.* 2009, 37(Database issue):D412-6
- [94] Auersperg N. (2013) **The stem-cell profile of ovarian surface epithelium is reproduced in the oviductal fimbriae, with increased stem-cell marker density in distal parts of the fimbriae.** *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of The International Society of Gynecological Pathologists*; 32(5), 444–453. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e3182800ad5>

- [95] Hou, Y., Liu, W., Yi, X., Yang, Y., Su, D., Huang, W., Yu, H., Teng, X., Yang, Y., Feng, W., Zhang, T., Gao, J., Zhang, K., Qiu, R., & Wang, Y. (2020). **PHF20L1 as a H3K27me2 reader coordinates with transcriptional repressors to promote breast tumorigenesis.** *Science advances*; 6(16), eaaz0356. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaz0356>
- [96] Feeley K.M., Wells M. (2001) **Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy.** *Histopathology*; 38:87-95. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2559.2001.01042.x>
- [97] Marquez, R. T., Baggerly, K. A., Patterson, A. P., Liu, J., Broaddus, R., Frumovitz, M., Atkinson, E. N., Smith, D. I., Hartmann, L., Fishman, D., Berchuck, A., Whitaker, R., Gershenson, D. M., Mills, G. B., Bast, R. C., Jr, & Lu, K. H. (2005). **Patterns of gene expression in different histotypes of epithelial ovarian cancer correlate with those in normal fallopian tube, endometrium, and colon.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*; 11(17), 6116–6126. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-2509>
- [98] Baxter E., Windloch K., Gannon F., Lee J.S. (2014) **Epigenetic regulation in cancer progression.** *Cell & Bioscience*; 4, 45. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-4-45>
- [99] Beroukhim R., Mermel C. H., Porter D., Wei G., Raychaudhuri S., Donovan J., Barretina J., Boehm J. S., Dobson J., Urashima M., Mc Henry K. T., Pinchback R. M., Ligon A. H., Cho Y. J., Haery L., Greulich H., Reich M., Winckler W., Lawrence M. S., Weir B. A., Meyerson, M. (2010). **The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers.** *Nature*; 463(7283), 899–905. <https://doi.org/10.1038/nature08822>
- [100] Laurenti E., Wilson A., Trumpp A. (2009) **Myc's other life: stem cells and beyond.** *Current Opinion in Cell Biology*; 21(6), 844–854. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.09.006>
- [101] Singh A. M., Dalton S. (2009) **The cell cycle and Myc intersect with mechanisms that regulate pluripotency and reprogramming.** *Cell Stem Cell*; 5(2), 141–149. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2009.07.003>
- [102] Takahashi K., Tanabe K., Ohnuki M., Narita M., Ichisaka T., Tomoda K., Yamanaka S. (2007) **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.** *Cell*; 131(5), 861–872. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019>
- [103] Santin A.D., Bellone S., Ravaggi A., Roman J., Smith C.V., Pecorelli S., Cannon M.J., Parham G.P. (2001) **Increased levels of interleukin-10 and transforming growth factor-beta in the plasma and ascitic fluid of patients with advanced ovarian cancer.** *BJOG: An International Journal of Obstetrics And Gynaecology*; 108(8), 804–808. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0528.2001.00206.x>

- [104] Wang S.T., Liu, J.J., Wang C.Z., Lin B., Hao Y.Y., Wang Y.F., Gao S., Qi, Y., Zhang S.L., & Iwamori M. (2012) **Expression and correlation of Lewis y antigen and TGF- β 1 in ovarian epithelial carcinoma.** *Oncology reports*; 27(4), 1065–1071. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1575>
- [105] Huang,F., Chen, Y.G. (2012) **Regulation of TGF- β receptor activity.** *Cell & bioscience*; 2, 9. <https://doi.org/10.1186/2045-3701-2-9>
- [106] Nieman K.M., Kenny H.A., Penicka C.V., Ladanyi A., Buell-Gutbrod R., Zillhardt M.R., Romero I.L., Carey M.S., Mills G.B., Hotamisligil G. S., Yamada S.D., Peter M.E., Gwin K., Lengyel E. (2011) **Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth.** *Nature Medicine*; 17(11), 1498–1503. <https://doi.org/10.1038/nm.2492>
- [107] Dirat B., Bochet L., Dabek M., Daviaud D., Dauvillier S., Majed B., Wang Y.Y., Meulle A., Salles B., Le Gonidec S., Garrido I., Escourrou G., Valet P., Muller C. (2011) **Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion.** *Cancer Research*; 71(7), 2455–2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>
- [108] Chiang C.L., Kandalaf L.E., Tanyi J., Hagemann A.R., Motz G.T., Svoronos N., Montone K., Mantia-Smaldone G.M., Smith L., Nisenbaum H.L., Levine B.L., Kalos M., Czerniecki B.J., Torigian D.A., Powell D.J., Jr Mick R., Coukos G. (2013) **A dendritic cell vaccine pulsed with autologous hypochlorous acid-oxidized ovarian cancer lysate primes effective broad antitumor immunity: from bench to bedside.** *Clinical Cancer Research: An Official Journal of The American Association For Cancer Research*; 19(17), 4801–4815. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1185>
- [109] Mittal D., Gubin M.M., Schreiber R.D., Smyth M.J. (2014) **New insights into cancer immunoediting and its three component phases--elimination, equilibrium and escape.** *Current Opinion in Immunology*; 27, 16–25. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.01.004>
- [110] Melero I., Rouzaut A., Motz G.T., Coukos G. (2014) **T-cell and NK-cell infiltration into solid tumors: a key limiting factor for efficacious cancer immunotherapy.** *Cancer Discovery*; 4(5), 522–526. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0985>
- [111] Carr S.M., Munro S., Sagum C.A., Fedorov O., Bedford M.T., La Thangue N.B. (2017) **Tudor-domain protein PHF20L1 reads lysine methylated retinoblastoma tumour suppressor protein.** *Cell Death and Differentiation*; 24(12), 2139–2149. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.135>
- [112] Nishida K., Kuwano Y., Nishikawa T., Masuda K., Rokutan K. (2017) **RNA Binding Proteins and Genome Integrity.** *International Journal of Molecular Sciences*; 18(7), 1341. <https://doi.org/10.3390/ijms18071341>
- [113] Kai M. (2016) **Roles of RNA-Binding Proteins in DNA Damage Response.** *International Journal of Molecular Sciences*; 17(3), 310. <https://doi.org/10.3390/ijms17030310>

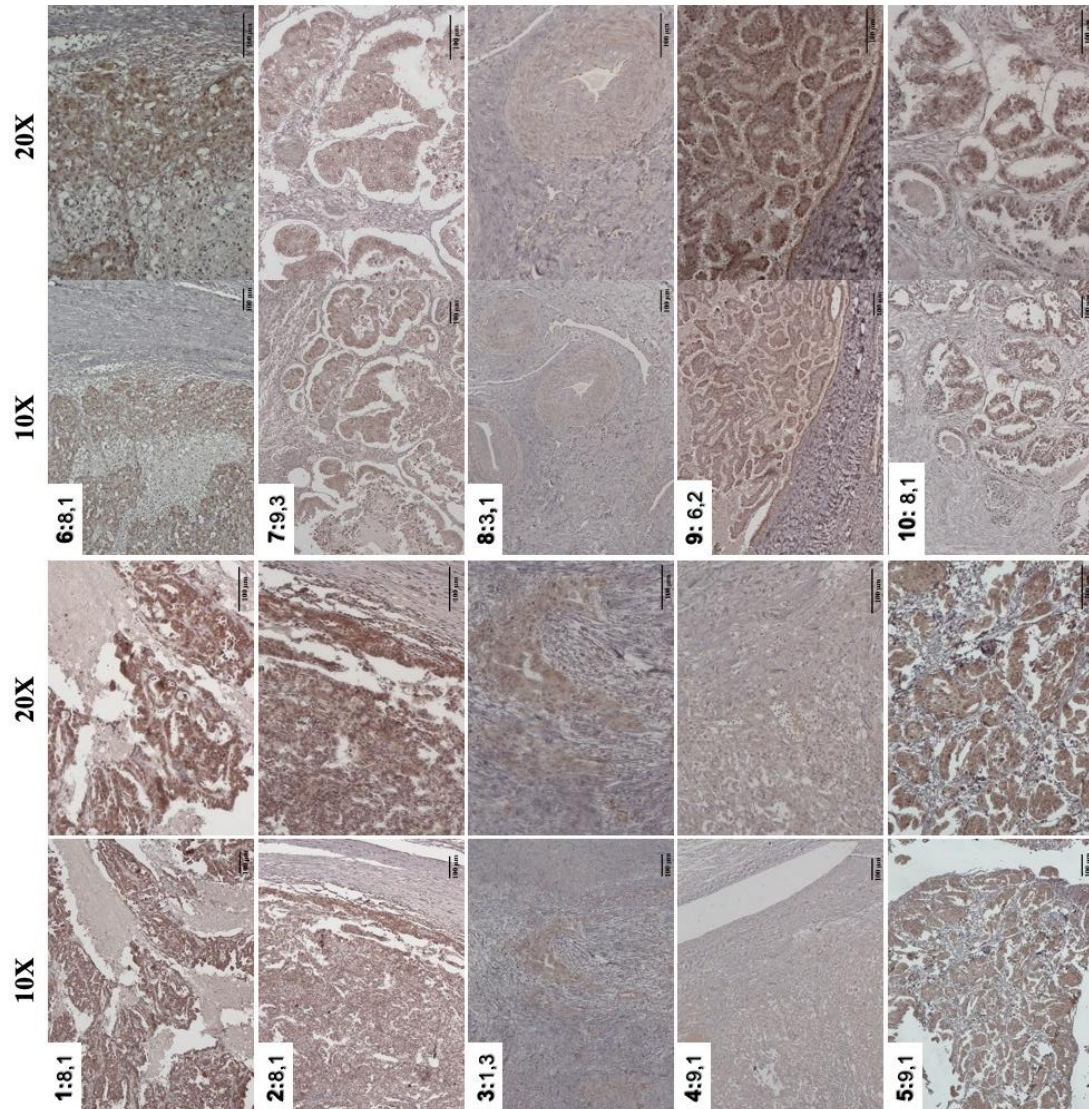
- [114] Harvey R., Dezi V., Pizzinga M., Willis A.E. (2017) **Post-transcriptional control of gene expression following stress: the role of RNA-binding proteins.** *Biochemical Society Transactions*; 45(4), 1007–1014. <https://doi.org/10.1042/BST20160364>
- [115] Sheinberger J., Shav-Tal Y. (2017) **mRNPs meet stress granules.** *FEBS Letters*; 591(17), 2534–2542. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12765>
- [116] Wang B., David M.D., Schrader J.W. (2005) **Absence of caprin-1 results in defects in cellular proliferation.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*; 175(7), 4274–4282. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.7.4274>
- [117] Solomon S., Xu Y., Wang B., David M.D., Schubert P., Kennedy D., Schrader J.W. (2007) **Distinct structural features of caprin-1 mediate its interaction with G3BP-1 and its induction of phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2alpha, entry to cytoplasmic stress granules, and selective interaction with a subset of mRNAs.** *Molecular and Cellular Biology*; 27(6), 2324–2342. <https://doi.org/10.1128/MCB.02300-06>
- [118] Reich J., Papoulas O. (2012) **Caprin controls follicle stem cell fate in the Drosophila ovary.** *PloS One*; 7(4), e35365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035365>
- [119] Qiu Y.Q., Yang C. W., Lee Y.Z., Yang R.B., Lee C.H., Hsu H.Y., Chang C.C., Lee S.J. (2015) **Targeting a ribonucleoprotein complex containing the caprin-1 protein and the c-Myc mRNA suppresses tumor growth in mice: an identification of a novel oncotarget.** *Oncotarget*; 6(4), 2148–2163. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3236>
- [120] Grill B., Wilson G.M., Zhang K.X., Wang B., Doyonnas R., Quadroni M., Schrader J.W. (2004) **Activation/division of lymphocytes results in increased levels of cytoplasmic activation/proliferation-associated protein-1: prototype of a new family of proteins.** *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*; 172(4), 2389–2400. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.4.2389>
- [121] Gong B., Hu H., Chen J., Cao S., Yu J., Xue J., Chen F., Cai Y., He H., Zhang L. (2013) **Caprin-1 is a novel microRNA-223 target for regulating the proliferation and invasion of human breast cancer cells.** *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie*; 67(7), 629–636. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2013.06.006>
- [122] Sabile A.A., Arlt M.J., Muff R., Husmann K., Hess D., Bertz J., Langsam B., Aemisegger C., Ziegler U., Born W., Fuchs B. (2013) **Caprin-1, a novel Cyr61-interacting protein, promotes osteosarcoma tumor growth and lung metastasis in mice.** *Biochimica et Biophysica Acta*; 1832(8), 1173–1182. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.03.014>
- [123] Xiao H., Zeng J., Li H., Chen K., Yu G., Hu J., Tang K., Zhou H., Huang Q., Li A., Li Y., Ye Z., Wang J., Xu H. (2015) **MiR-1 downregulation correlates with poor survival in clear cell renal**

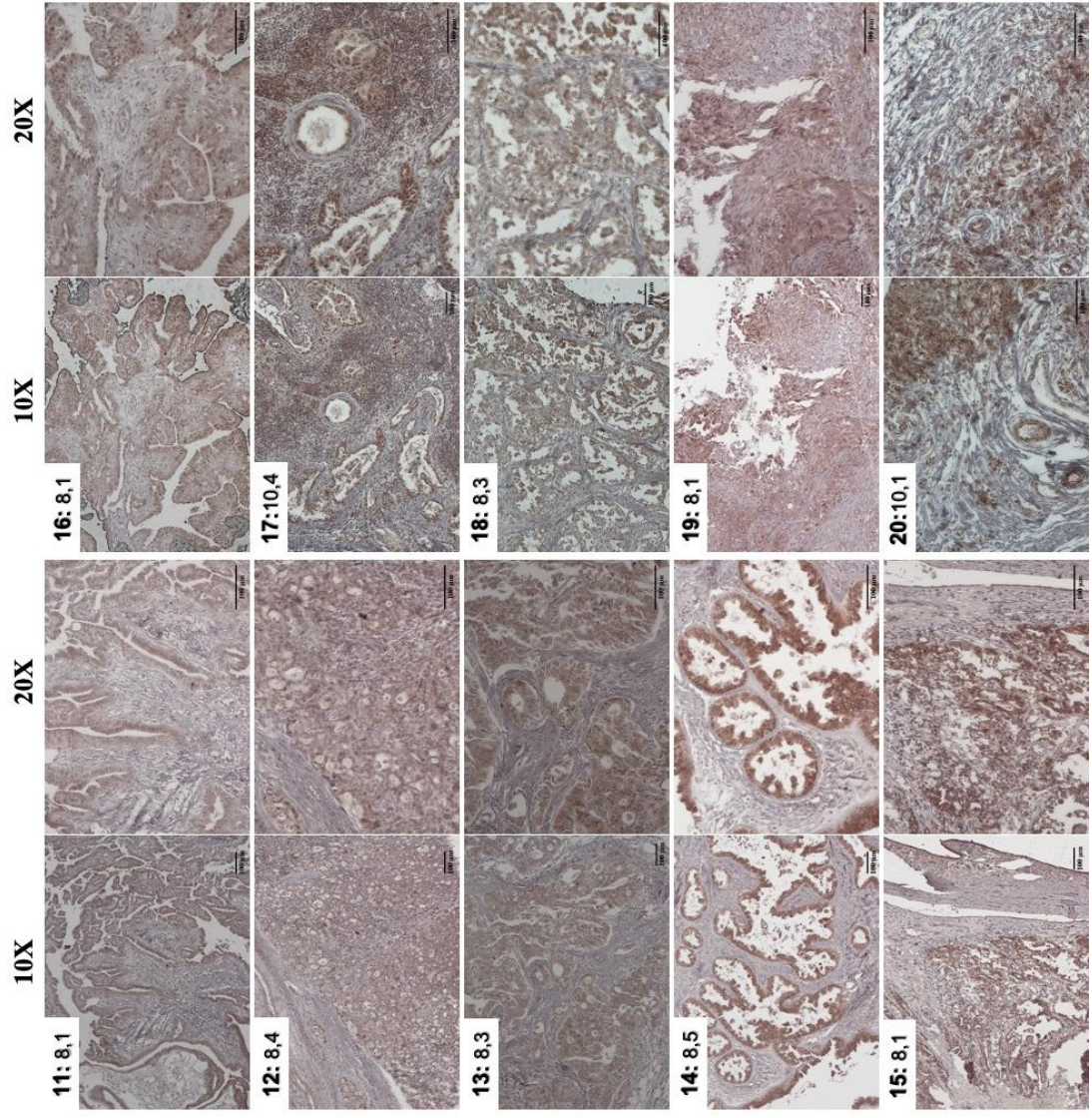
- cell carcinoma where it interferes with cell cycle regulation and metastasis.** *Oncotarget*; 6(15), 13201–13215. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3915>
- [124] Teng Y., Ren Y., Hu X., Mu J., Samykutty A., Zhuang X., Deng Z., Kumar A., Zhang L., Merchant M.L., Yan J., Miller D.M., Zhang H.G. (2017) **MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression.** *Nature Communications*; 8, 14448. <https://doi.org/10.1038/ncomms14448>
- [125] Lu J., Wang S.L., Wang Y.C., Wu Y.N., Yu X., Zhao W.Z., Wang J.H. (2017) **High WAVE3 expression correlates with proliferation, migration and invasion in human ovarian cancer.** *Oncotarget*; 8(25), 41189–41201. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.17141>
- [126] Shih, I., Sheu, J. J., Santillan, A., Nakayama, K., Yen, M. J., Bristow, R. E., Vang, R., Parmigiani, G., Kurman, R. J., Trope, C. G., Davidson, B., & Wang, T. L. (2005). **Amplification of a chromatin remodeling gene, Rsf-1/HBXAP, in ovarian carcinoma.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39), 14004–14009. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504195102>
- [127] Zabinsky, R. A., Mason, G. A., Queitsch, C., & Jarosz, D. F. (2019). **It's not magic - Hsp90 and its effects on genetic and epigenetic variation.** *Seminars in cell & developmental biology*; 88, 21–35. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2018.05.015>
- [128] Robert M.F., Morin S., Beaulieu N., Gauthier F., Chute I.C., Barsalou A., MacLeod A.R. (2003) **DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells.** *Nature Genetics*; 33(1), 61–65. <https://doi.org/10.1038/ng1068>
- [129] Lyko F. (2018). The DNA methyltransferase family: a versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature reviews. Genetics*, 19(2), 81–92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- [130] Isaacs J.S. (2016) **Hsp90 as a "Chaperone" of the Epigenome: Insights and Opportunities for Cancer Therapy.** *Advances in Cancer Research*; 129, 107–140. <https://doi.org/10.1016/bs.acr.2015.09.003>
- [131] Coban N., Varol N. (2019) **The effect of heat shock protein 90 inhibitors on histone 4 lysine 20 methylation in bladder cancer.** *EXCLI Journal*; 18, 195–203. <https://doi.org/10.17179/excli2018-1807>
- [132] Varol N., Konac E., Onen I.H., Gurocak S., Alp E., Yilmaz A., Menevse S., Sozen S. (2014) **The epigenetically regulated effects of Wnt antagonists on the expression of genes in the apoptosis pathway in human bladder cancer cell line (T24).** *DNA and Cell Biology*; 33(7), 408–417. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2285>
- [133] Zhang J., Zhou B., Liu Y., Chen K., Bao P., Wang Y., Wang J., Zhou Z., Sun X., Li, Y. (2014) **Wnt inhibitory factor-1 functions as a tumor suppressor through modulating Wnt/β-catenin**

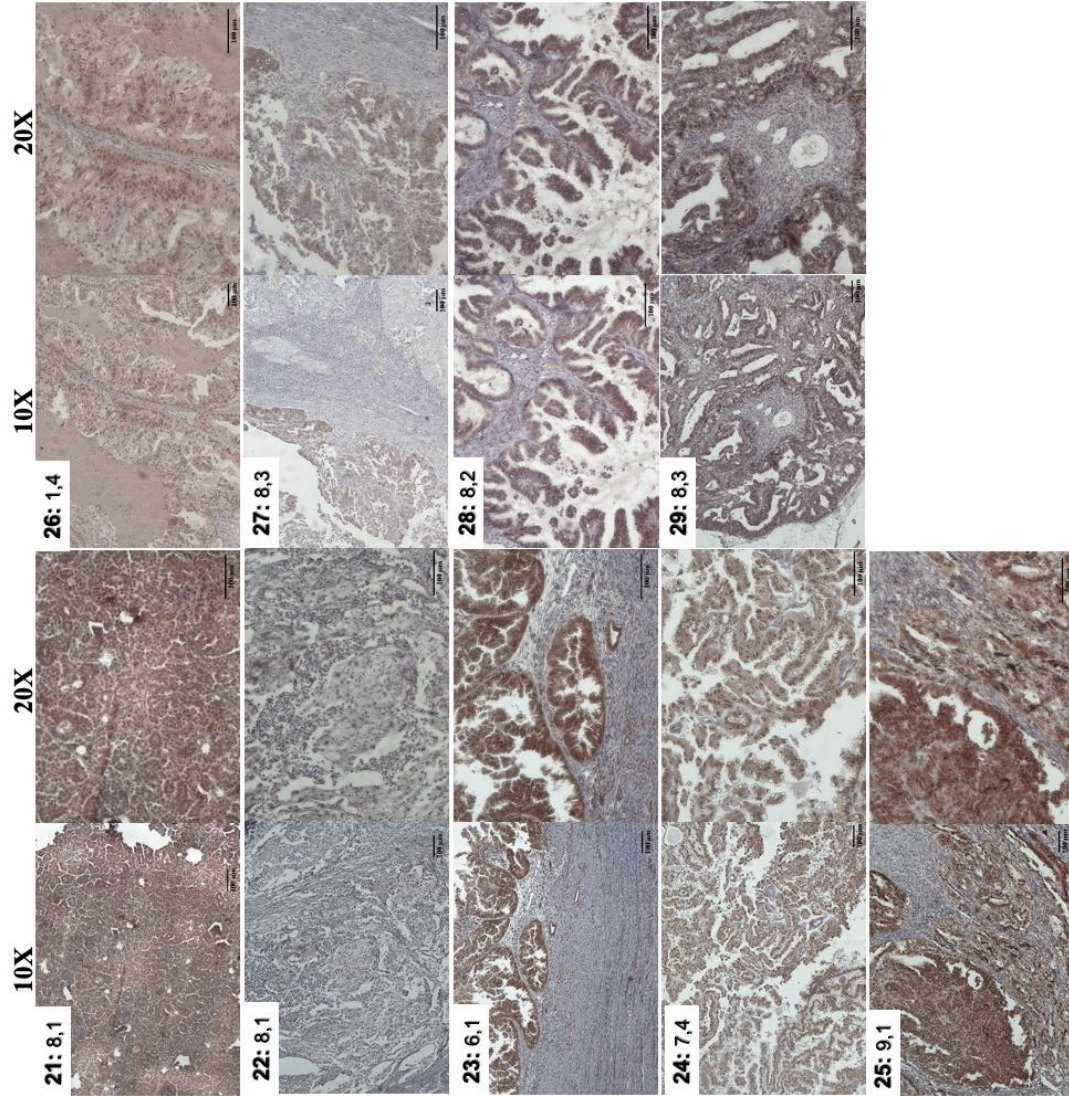
- signaling in neuroblastoma.** *Cancer Letters*; 348(1-2), 12–19. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.02.011>
- [134] Beck, D. B., Oda, H., Shen, S. S., & Reinberg, D. (2012). **PR-Set7 and H4K20me1: at the crossroads of genome integrity, cell cycle, chromosome condensation, and transcription.** *Genes & development*; 26(4), 325–337. <https://doi.org/10.1101/gad.177444.111>
- [135] Pogribny I.P., Tryndyak V.P., Muskhelishvili L., Rusyn I., Ross S.A. (2007) **Methyl deficiency, alterations in global histone modifications, and carcinogenesis.** *The Journal of Nutrition*; 137(1 Suppl), 216S–222S. <https://doi.org/10.1093/jn/137.1.216S>
- [136] Balakrishnan L., Milavetz B. (2010) **Decoding the histone H4 lysine 20 methylation mark.** *Critical Reviews In Biochemistry And Molecular Biology*; 45(5), 440–452. <https://doi.org/10.3109/10409238.2010.504700>
- [137] Mo Q., Zhang Y., Jin X., Gao Y., Wu Y., Hao X., Gao Q., Chen P. (2016) **Geldanamycin, an inhibitor of Hsp90, increases paclitaxel-mediated toxicity in ovarian cancer cells through sustained activation of the p38/H2AX axis.** *Tumour Biology: The Journal of The International Society For Oncodevelopmental Biology and Medicine*; 37(11), 14745–14755. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5297-2>
- [138] Carr S. M., Munro S., Sagum C.A., Fedorov O., Bedford M.T., & La Thangue N.B. (2017) **Tudor-domain protein PHF20L1 reads lysine methylated retinoblastoma tumour suppressor protein.** *Cell Death & Differentiation*; 24(12), 2139–2149. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.135>
- [139] Hanai K., Furuhashi H., Yamamoto T., Akasaka K., Hirose S. (2008) **RSF governs silent chromatin formation via histone H2Av replacement.** *PLoS Genetics*; 4(2), e1000011. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000011>
- [140] Zhang Z., Jones A.E., Wu W., Kim J., Kang Y., Bi X., Gu Y., Popov I.K., Renfrow M.B., Vassilyeva M.N., Vassilyev D.G., Giles K.E., Chen D., Kumar A., Fan Y., Tong Y., Liu C.F., An W., Chang C., Luo J., Wang H. (2017) **Role of remodeling and spacing factor 1 in histone H2A ubiquitination-mediated gene silencing.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 114(38), E7949–E7958. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711158114>
- [141] Joshi D., Inamdar M.S. (2019) **Rudhira/BCAS3 couples microtubules and intermediate filaments to promote cell migration for angiogenic remodeling.** *Molecular Biology of The Cell*; 30(12), 1437–1450. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-08-0484>
- [142] Jain M., Bhat G.P., Vijayraghavan K., Inamdar M.S. (2012) **Rudhira/BCAS3 is a cytoskeletal protein that controls Cdc42 activation and directional cell migration during angiogenesis.** *Experimental Cell Research*; 318(6), 753–767. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.01.016>

- [143] Shetty R., Joshi D., Jain M., Vasudevan M., Paul J.C., Bhat G., Banerjee P., Abe T., Kiyonari H., VijayRaghavan K., Inamdar M.S. (2018) **Rudhira/BCAS3 is essential for mouse development and cardiovascular patterning.** *Scientific Reports*; 8(1), 5632. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24014-w>
- [144] Siva K., Venu P., Mahadevan A., S.K.S., Inamdar M.S. (2007) **Human BCAS3 expression in embryonic stem cells and vascular precursors suggests a role in human embryogenesis and tumor angiogenesis.** *PLoS One*; 2(11), e1202. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001202>
- [145] Labiche A., Heutte N., Herlin P., Chasle J., Gauduchon P., Elie N. (2010) **Stromal compartment as a survival prognostic factor in advanced ovarian carcinoma.** *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of The International Gynecological Cancer Society*; 20(1), 28–33. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181bda1cb>
- [146] Davidson B., Trope C.G., Reich R. (2014) **The role of the tumor stroma in ovarian cancer.** *Frontiers in Oncology*; 4, 104. <https://doi.org/10.3389/fonc.2014.00104>
- [147] Ota T., Gilks C.B., Longacre T., Leung P.C., Auersperg N. (2007) **HOXA7 in epithelial ovarian cancer: interrelationships between differentiation and clinical features.** *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*; 14(6), 605–614. <https://doi.org/10.1177/1933719107307781>
- [148] Ko S.Y., Barengo N., Ladanyi A., Lee J.S., Marini F., Lengyel E., Naora, H. (2012) **HOXA9 promotes ovarian cancer growth by stimulating cancer-associated fibroblasts.** *The Journal of Clinical Investigation*; 122(10), 3603–3617. <https://doi.org/10.1172/JCI62229>
- [149] Chernov A.V., Strongin A.Y. (2011) **Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases and their collagen substrates in cancer.** *Biomolecular Concepts*; 2(3), 135–147. <https://doi.org/10.1515/BMC.2011.017>

XI. Anexo 1: Imágenes obtenidas para el análisis de PHF20L1 mediante IHQ







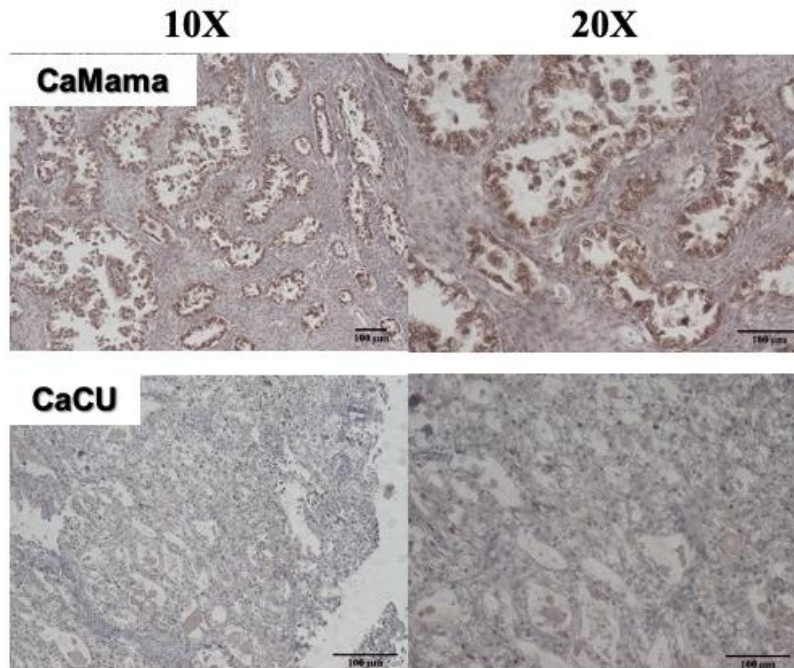


Figura suplementaria 1. Imágenes representativas de los 31 cortes de tejido tumoral analizados mediante IHQ. Se anexa una imagen representativa por corte, correspondiente a un aumento de 10X y 20X, para cada tejido analizado. Los tejidos fueron enumerados del 1 al 29, los cuales corresponden a tejido tumoral de pacientes con cáncer de ovario. En la parte superior izquierda se colocó un código de números, los cuales representan, en orden de izquierda a derecha el número de muestra: la etapa clínica, subtipo histológico; la numeración corresponde a la siguiente: para la etapa clínica: 1:IA, 3:IC, 6:IIIA, 7: IIIB, 8:IIIC, 9:IVA, 10:IVB
 Para el subtipo histológico: 1: SPBG, 2: SPAG, 3: Endometrioides, 4: CC, 5: Mucinoso.

Tabla suplementaria 1. Datos generales de las pacientes cuyos tejidos fueron utilizados en este estudio

	Porcentaje de positividad	Edad al diagnóstico	Etapa clínica	Subtipo histológico	Estado	1	2	3	CA125 (lab basal)	Supervivencia libre de progresión (meses)	Supervivencia Global (Meses)	A	B	Score inmunoreactivo
1	93.92	59	8	1	M	88.63	5.19	0.1	1121	32.99	43.7	4	1	4
2	93.94	44	8	1	M	88.8	5.04	0.1	11.4	32.23	74.51	4	1	4
3	84.59	47	1	3	V	74.48	9.93	0.18	61.1	92.25	104.08	4	1	4
4	56.13	65	9	1	M	56.13	0	0	3161	19.75	83.32	3	1	3
5	68.17	33	9	1	M	37.53	24.71	5.93	2005	10.61	12.78	3	3	9
6	96.53	56	8	1	V	58.56	28.7	9.27	1068	4.37	54.47	4	2	8
7	44.04	36	9	3	M	41.6	2.44	0	4998	13.01	20.67	2	1	2
8	87.53	62	3	1	M	54.04	29.35	4.14	24.7	16.62	18.07	4	2	8
9	95.57	43	6	2	V	47.41	45.12	3.04	381	41.86	54.77	4	2	8
10	98.43	65	8	1	M	41.13	33	24.3	1779	17.51	56.77	4	3	12
11	75.08	50	8	1	V	74.38	0.7	0	231	26.41	85.26	3	1	3
12	94.26	52	8	4	M	74.8	19.06	0.4	74.9	7.06	45.01	4	2	8
13	94.22	40	8	3	M	74.11	20.11	0	344	3.71	8.9	4	2	8
14	58.475	33	8	5	V	11.63	19.397	27.448	771	76.19	76.68	3	3	9

1 5	93.22	58	8	1	M	79. 38	13. 77	0.0 7	5958	15.01	132.37	4	1	4
1 6	92.24	59	8	1	V	89. 05	3.1 9	0	14.2	32.92	55.06	4	1	4
1 7	95.988	52	10	4	M	40. 36	39. 53	16. 098	214	3.42	9.69	4	3	12
1 8	99.40	49	8	3	M	98. 49	0.9 0	0.0 0	210	1.35	5.26	4	1	4
1 9	48.44	38	8	1	V	43. 86	3.8 8	0.7	246	31.18	185.17	2	1	2
2 0	61.63	45	10	1	M	30. 23	17. 10	14. 31	2932	6.05	25.99	3	2	6
2 1	98.06	28	8	1	M	30. 08	59. 87	8.1 1	596	6.47	42.68	4	2	8
2 2	91.11	67	8	1	M	89. 69	1.4 2	0	120	18.4	86.54	4	1	4
2 3	75.45	62	6	1	M	36. 63	14. 52	24. 29	499	5.62	11.47	3	3	9
2 4	93.11	50	7	4	M	50. 57	33. 65	8.8 9	91.7	16.92	26.84	4	2	8
2 5	94.42	52	9	1	M	25. 21	20. 32	48. 90	1267	7.1	23.29	4	3	12
2 6	99.44	58	1	4	V	60. 14	37. 2	2.1	31.3	52.9	53.95	4	2	8
2 7	29.88	48	8	3	M	29. 48	0.4	0	365	23.62	42.55	1	1	1
2 8	70.25	33	8	2	M	43. 52	22. 01	4.7 2	3067	37.78	53.88	3	2	6
2 9	88.55	45	8	3	M	75. 97	12. 48	0.1	176	46.46	103.89	4	1	4
H 1	10.66	61				10. 215	0.4 24	0.0 21				1	1	1
H 2	21.13					21. 06	0.0 7	0				2	1	2

XII. Anexos (incluir artículos aceptados o publicados)

Alberto-Aguilar D.R., Hernández-Ramírez V.I., Osorio-Trujillo J.C., Gallardo-Rincón D., Toledo-Leyva A., Talamás-Rohana P. (2019) **Ascites from ovarian cancer induces novel fucosylated proteins.** *Cancer Microenvironment: Official Journal of The International Cancer Microenvironment Society*; 12(2-3), 181–195. <https://doi.org/10.1007/s12307-019-00227-z>



Ascites from Ovarian Cancer Induces Novel Fucosylated Proteins

Dulce Rosario Alberto-Aguilar¹ & Verónica Ivonne Hernández-Ramírez¹ & Juan Carlos Osorio-Trujillo¹ & Dolores Gallardo-Rincón² & Alfredo Toledo-Leyva² & Patricia Talamás-Rohana¹

Received: 9 October 2018 / Accepted: 24 May 2019

Springer Nature B.V. 2019

Abstract

Ovarian cancer is considered to be the most lethal type of gynecological cancer. During the advanced stages of ovarian cancer, an accumulation of ascites is observed. Fucosylation has been classified as an abnormal post-translational modification that is present in many diseases, including ovarian cancer. Ovarian cancer cells that are cultured with ascites stimulation change their morphology; concomitantly, the fucosylation process is altered. However, it is not known which fucosylated proteins are modified. The goal of this work was to identify the differentially fucosylated proteins that are expressed by ovarian cancer cell lines that are cultured with ovarian cancer patients' ascites. *Aleuria aurantia* lectin was used to detect fucosylation, and some changes were observed, especially in the cell membrane. Affinity chromatography and mass spectrometry (MALDI-TOF) were used to identify 6 fucosylated proteins. Four proteins (Intermediate filament family orphan 1 [IFFO1], PHD finger protein 20-like protein 1 [PHF20L1], immunoglobulin gamma 1 heavy chain variable region partial [IGHV1-2], and Zinc finger protein 224 [ZNF224]) were obtained from cell cultures stimulated with ascites, and the other two proteins (Peregrin [BRPF1] and Dystrobrevin alpha [DTNA]) were obtained under normal culture conditions. The fucosylated state of some of these proteins was further analyzed. The experimental results show that the ascites of ovarian cancer patients modulated the fucosylation process. The PHD finger protein 20-like protein 1, Zinc finger protein 224 and Peregrin proteins colocalize with fucosylation at different levels.

Keywords Ascites · BRPF1 · Fucosylation · Ovarian cancer · PHF20L1 - ZNF224

Introduction

Ovarian cancer is considered to be the most lethal type of gynecological cancer, despite ranking eighth in worldwide cancer incidence. In Mexico, the reported incidence in 2018 was 4759 cases and a mortality of 2765 cases [1].

Ovarian cancer can be classified into different histotypes; nevertheless, epithelial ovarian cancer is the most common and the most lethal [2]. In the majority of ovarian cancer cases, the cancer metastasizes into the abdominal cavity, and the presence of tumor cells is frequently associated with ascites accumulation [3]. This ascites

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12307-019-00227-z>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Patricia Talamás-Rohana
ptr@cinvestav.mx

Dulce Rosario Alberto-Aguilar
dalberto@cinvestav.mx

Verónica Ivonne Hernández-Ramírez
arturomvi@hotmail.com

Juan Carlos Osorio-Trujillo
clostrujillo2@yahoo.com.mx

Dolores Gallardo-Rincón
dgallardorincon@gmail.com

Alfredo Toledo-Leyva
toledo_leyva@hotmail.com

¹ Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, Col. San Pedro Zacatenco, Delegación Gustavo A. Madero, 07360 Ciudad de México, Mexico

² Instituto Nacional de Cancerología, Av. San Fernando No. 22, Col. Sección XVI, Delegación Tlalpan, 07360 Ciudad de México, Mexico

accumulation is observed during the advanced stages [4] and can contribute to transcoelomic metastasis.

Ascites is a highly heterogeneous fluid that contains a wide variety of soluble factors and a mixture of cell populations, including tumoral, stromal and immune cells [5, 6]. The composition of ascites from various origins has been analyzed by different groups, and these analyses have demonstrated their complexity and heterogeneity [7, 8]. Thus, given the diversity of molecules found in it, ascites is a stimulus that could alter various biological processes, among which, fucosylation may be included. Typically, fucosylation and sialylation are terminal carbohydrate chain-modifications of glycoproteins (which means that fucose and sialyl are frequently located at the end of the carbohydrate chain) [9, 10]. Fucosylation and sialylation mediate biological functions and have also been implicated in cancer [9, 11, 12].

An increase in the fucosylation of tumor cells contributes to several abnormal characteristics, such as a decrease in cellular adhesion and uncontrolled tumor growth [13]. However, there is limited information on the function of fucosylation and/or the fucosylated status of glycoproteins during the development and progression of ovarian cancer. More recently, Hu et al. [14] showed that when the CD147 glycoprotein was modified by Lewis Y antigen, the glycoprotein improved the survival capacity of ovarian cancer cells by restricting autophagic cell death; thus, CD147 plays an important role in the malignant progression of ovarian cancer [14]. Additional studies on this antigen have shown that the overexpression of Lewis Y antigen promotes the human epididymis protein 4-mediated invasion and metastasis of ovarian cancer cells [15], p27 degradation by regulating ubiquitin-proteasome activity in the CAOV-3 and SKOV-3 cell lines [16], and chemotherapeutic resistance in ovarian cancer [17]. A few examples of modified fucosylated proteins are haptoglobin in several cancers, including ovarian cancer [18–20], transferrin and alpha-fetoprotein in liver cancer [21, 22] and thyroglobulin in thyroid cancer [23]. In particular, previous results from our group have shown that the level of fucosylation of haptoglobin increases with stage progression [19] and was found to be highly fucosylated in different subtypes of epithelial ovarian cancer [20].

It has been confirmed that ascites can change the cellular phenotype, and the ascites compounds that are produced by or in response to malignant cells may be a good alternative to the microenvironment in which malignant cells are immersed [24]; these components could participate in the altered regulation of different processes, including fucosylation. For this reason, the goal of our work was to determine the differentially fucosylated proteins in ovarian cancer cell lines cultured with ascites stimulation. Experimental results have shown that the ascites of ovarian cancer modulate the fucosylation process since the profiles of the fucosylated proteins were altered

in the ascites-treated SKOV-3 and OVCAR-3 cell lines. In particular, among the differentially fucosylated proteins, PHD finger protein 20-like protein 1, Zinc finger protein 224, and Peregrin were detected. Together, our results suggest that ascites may favor tumor progression through the modification of cellular processes, such as fucosylation.

Materials and Methods

Study Model

The SKOV-3 (ATCC HTB-77) and OVCAR3 (ATCC HTB 161) cell lines were used. The SKOV-3 model has been used previously in our laboratory as described [24]. Briefly, SKOV-3 cells were cultured in McCoy's 5A (Corning, 10-050-CVR) culture medium (15 mL) supplemented with 10% fetal bovine serum (Corning, 35-010-CV) and 1% penicillin/streptomycin (PAA, P11-010) at 37 °C and 5% CO₂. The culture was grown until the cells reached 75% confluence. Then, the medium was discarded for the subsequent addition of ascites (15 mL). The cells were maintained under the ascites stimulus at 37 °C and 5% CO₂ for the indicated time periods. The cells that were maintained in the medium were used as a control. OVCAR-3 culture was grown in RPMI 1640 (Corning, 10-004-CM) culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum and bovine insulin (Millipore, I0516). The culture was grown until the cells reached 75% confluence. Then, the medium was discarded for the subsequent addition of ascites (2 mL). The cells were maintained under the ascites stimulus at 37 °C and 5% CO₂ for 24 h. The cells that were maintained in medium were used as a control. The OVCAR-3 cell line was employed only for use in immunofluorescence assays.

Biologicals Samples

Epithelial ovarian cancer (EOC) ascites were obtained from patients diagnosed with epithelial ovarian cancer at the Instituto Nacional de Cancerología (INCan) under the approval of the Scientific and Bioethical Committees (009/029/GOI) (CB/549/09); before obtaining the samples, informed consent letters were signed by the patients. The samples were used based on the Declaration of Helsinki about the ethical principles of medical research involving human samples. The clinical and pathological characteristics of the epithelial ovarian cancer patients are described in Table 1.

Whole ascites were collected by medical personnel. Ascites samples contaminated with blood were excluded from the study. Approximately 100 mL was centrifuged at 1000 rpm for 10 min to recover the supernatant and the cell pellet. Only cell-free ascites (supernatants) were further employed for experiments and were stored at -70 °C until use. Before use, ascites were defrosted and warmed at room temperature.

Table 1 Clinical and pathological characteristics of EOC patients

Characteristics	% (n/N) N = 13
Age (Years)	
Mean ± SD	56.8 ± 9.1
Median (Range)	56 (44–73)
CA 125 (U/ml)	
Mean ± SD	4507.02 ± 4649.85
Median (Range)	2330.35 (570.5–13,730.2)
Clinical Stage	
Undetermined	7.69 (1/13)
IIIC	30.77 (4/13)
IVA	23.08 (3/13)
IVB	38.46 (5/13)
Histology	
Undetermined	7.69 (1/13)
HGSP	84.62 (11/13)
Endometrioid	7.69 (1/13)
Status	
Alive	53.85 (7/13)
Dead	46.15 (6/13)

HGSP: High Grade Serous Papillary

Treatment of SKOV-3 Cells with Ovarian Cancer Ascites A03 and Cellular Protein Extraction

At the end of the treatment time (24 h) of SKOV-3 cells with ascites 03 and the control condition, the cultures were washed with sterile 1x phosphate-buffered saline (PBS) and were subsequently recovered using Cell Stripper Solution (Corning, 25-056-CI). Cell lysis was carried out using RIPA buffer (5 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, 50 mM NaCl and 1% Nonidet P-40) with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (1 mg/ml of aprotinin and leupeptin, and 1 mM of PMSF, NaF, and Na₃VO₄). Finally, the samples were quantified using a DC Protein Assay Kit (Bio-Rad, 500-0114).

Affinity Chromatography with Aleuria Aurantia Lectin (AAL)

The purification of the fucosylated proteins was performed using AAL coupled to an agarose resin (Vector Labs, B-1393). The total protein extracts of SKOV-3 cells obtained from the control or experimental conditions were incubated with AAL for 16 h at 4 °C; afterward, the unbound proteins were removed by washing with TBS-T (contained Tween 20), while the fucosylated proteins bound to the resin were eluted with 200 µl elution buffer for AAL (Vector Labs, ES3100). The recovered fucosylated proteins were dialyzed using a dialysis membrane with a molecular weight cutoff of 8–12 kDa (Spectrum laboratories, 3787-F15). Dialysis was performed

with 1x PBS while stirring at 4 °C for 48 h, and the 1x PBS was changed four times.

SDS-PAGE and Overlay

The total protein extracts (50 µg) and fractions that were washed and eluted from the affinity chromatography column were visualized by 10% SDS PAGE. The gel was stained with a Silver Stain Plus Kit (Bio-Rad, 161-0462, -0463, -0464). A replicate of the gel was transferred to a nitrocellulose membrane. The nitrocellulose membrane was incubated with *Aleuria aurantia* lectin (Vector Labs, B-1395 1:2000 dilution in PBS) for 2 h at room temperature. Afterward, the membrane was washed twice with PBS-T (contained 1% Tween), and streptavidin alkaline phosphatase (Vector Labs, S5512) was added to the membrane, which was incubated for 1 h at room temperature. Again, the membrane was washed twice with PBS-T (contained 1% Tween). Finally, it was incubated with the NBT/BCIP substrate (Vector Labs, SK5400) for development.

Confocal Microscopy Analysis

Briefly, SKOV-3 and OVCAR-3 cells were treated for different time periods with different ascites. Afterward, the cells in the ascites or culture medium conditions were fixed using 4% *p*-formaldehyde (Sigma Aldrich, 6148) for 1 h at 37 °C. The cultures were washed three times with 1x PBS and were then blocked with 10% fetal bovine serum (Corning, 35-010-CV) for 1 h at 37 °C; previously, some samples were permeabilized with 0.2% Triton X-100, and the rest were maintained until the next step. In the case of the colocalization assays, the corresponding primary antibody was added (anti-PHD finger protein 20-like protein 1, Sigma Aldrich HPA028417; anti-Zinc finger protein 224, Santa Cruz Biotechnology, sc-293,394; anti-Peregrin, Santa Cruz Biotechnology sc-81,059) in a 1:50 dilution and incubated for 16 h at 4 °C. Then, the samples were washed three times with 1x PBS. The cultures were incubated with AAL-biotin (1:50 dilution, Vector Labs, B-1395) for 1 h at 4 °C. Subsequently, the samples were washed three times with 1x PBS, and then streptavidin-fluorescein (1:200 dilution, Life Technologies, 43-4311) was added to the cultures, and the cultures were incubated for 1 h at room temperature. The corresponding secondary antibodies (anti-mouse Alexa Fluor 594, Invitrogen, A21203 at a 1:100 dilution and anti-rabbit Alexa Fluor 647, Abcam, ab150063 at a 1:300 dilution) were added together with streptavidin-fluorescein. Negative controls were included for each condition and were incubated only with streptavidin-fluorescein and with or without the corresponding secondary antibodies. The nuclei were stained with DAPI (1:50 dilution, Molecular Probes, D1306) for 5 min at room temperature. Finally, the samples were mounted with VectaShield® mounting medium (Vector Laboratories,

H-1000). The analysis and quantification of fluorescence (arbitrary units of fluorescence) were performed using a Carl Zeiss Microscope (Carl Zeiss LMS 700) and the microscope software (ZEN 2012, Carl Zeiss Microscopy).

Mass Spectrometry (MALDI-TOF) and Protein Identification

The samples were processed as described previously [24] with some modifications. Briefly, peptide digestion was performed using mass grade trypsin (Sigma-Aldrich, T 6567). The peptide mass and identity were obtained using an Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics, Germany) that was configured in a delayed extraction mode and in reflectron mode. The peaks produced by the autolysis of trypsin and the contamination derivatives were excluded from the list. The monoisotopic masses of the spectrum were used for protein identification using the MASCOT v2.2 search engine (www.matrixscience.com). The search was carried out in the NCBI and/or SwissProt DB. The search parameters were as follows: peptide tolerance, 0.5–1 Da; and species, *Homo sapiens*. The maximum number of enzymatic cuts lost was set at 1.

Bioinformatics Analyses

Bioinformatic analyses were performed using The Human Protein Atlas, NetNGlyc and STRING 10.0 for protein-protein interaction (PPI) networks and to propose the possible functions exerted under our experimental conditions.

Statistical Analysis

For confocal microscopy images analysis, one-way ANOVA in GraphPad Prism 7 was performed to determine changes between each ascites time compared. A Bonferroni post hoc test was applied to compare multiple groups. Pearson correlation was used for colocalizing analyses.

The correlation analysis was performed for nonparametric samples due to the size of the sample; therefore, the Spearman correlation coefficient (r) was used, and the confidence intervals were established at 85.7% due to the characteristics of the population. The association was determined for clinical characteristics, such as the levels of CA125 (U/ml), the histological subtype, and the clinical stage. Additionally, we sought the association with the progression-free period (PFS) and the overall survival (OS) of the patients included in the study. Both the clinical characteristics and the association with survival were made based on the level of fucosylation of the cell membranes at 24 h; the fucosylation was induced by each of the 13 ascites in the SKOV-3 and OVCAR3 ovarian cancer cell lines. SPSS Ver 23, Inc., Chicago, III, US was employed to analyze the data.

Results

Membrane Fucosylation is Altered by Ascites Stimulation

To determine if ascites were involved in the induction of fucosylated proteins, SKOV-3 cells were stimulated with different ascites that emulate the natural microenvironment for malignant cells. Changes in protein fucosylation were observed. The expression level of fucosylated proteins in ascites-treated cells compared to those in the control conditions was analyzed by confocal microscopy. SKOV-3 cells cultured in control conditions showed a homogeneous distribution of fucosylation (Fig. 1, culture medium, nonpermeabilized cells). When SKOV-3 cells were permeabilized, they showed a perinuclear label for this post-translational modification that seemed to colocalize with the nuclear label (Fig. 1, culture medium, permeabilized cells). The morphology and fucosylation intensity changed under ascites stimulation. Membrane fucosylation (Fig. 1, nonpermeabilized, A01, A02) decreased at 24 h, and this effect was more evident when the cells were stimulated with ascites A01, but the level of fucosylation was reestablished at 72 h (Fig. 1; Supplementary Fig. 1). However, fucosylation was not completely lost; in the permeabilized cells, this glycoprotein modification was observed within the cytoplasm at all times of stimulation (Fig. 1, permeabilized cells, A01, A02). To confirm that the effect of ascites on the fucosylation level was universal, we analyzed the effects of different ascites (10 different samples) on SKOV-3 cells (Supplementary Fig. 2a) and on the OVCAR-3 cell line that was stimulated for 24 h (Supplementary Fig. 2b); we also analyzed the effects of two different ascites on Caco-2 and BEAS-2B cells that were stimulated for 24 h (Supplementary Fig. 2d). We found that ascites stimulated the fucosylation of all cells analyzed. The OVCAR-3 cell line cultured without ascites showed a very discreet level of fucosylation; however, when ascites-stimulated cells were analyzed, 8 out of 10 ascites significantly increased the membrane fucosylation levels (Supplementary Fig. 2b). Morphology was also modified by ascites, which induced the rounding of the cells and the formation of spheroids (Supplementary Fig. 2c). These fucosylation levels and the cell morphology were also modified in Caco-2 cells and BEAS-2B cells (Supplementary Fig. 2d). Taken together, these results confirm that in general, ascites have the ability to modulate the fucosylation process in different cell populations.

When correlation analyses were performed, no significant correlations were found (Table 2); however, for SKOV-3, an inversely proportional tendency was found that correlated with the levels of fucosylation and the

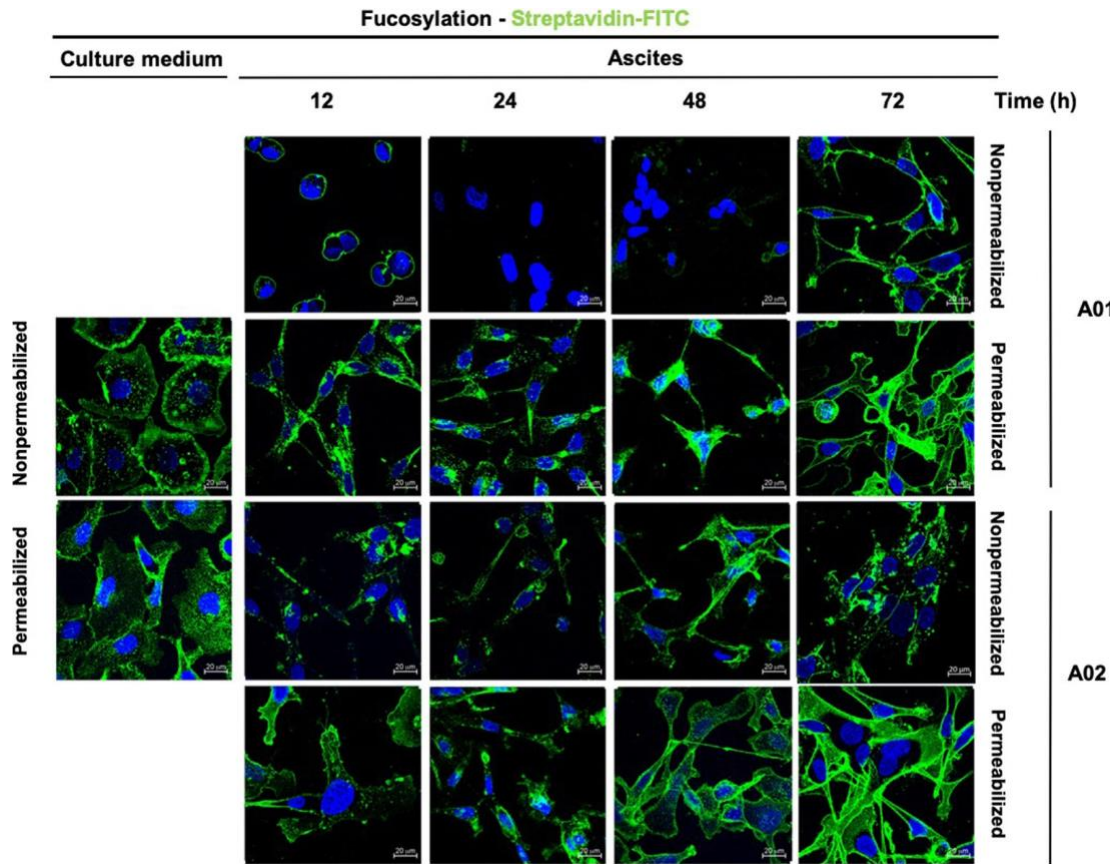


Fig. 1 Fucosylation is modified due to ascites stimulation. SKOV-3 cells were treated for different time periods with ascites from EOC patients (A01 and A02) and were analyzed by confocal microscopy. Non-permeabilized cells were employed to analyze membrane fucosylation, and the permeabilized cells were used to analyze cytoplasmic

fucosylation. Fucosylation was detected by biotinylated *Aleuria aurantia* lectin (1:200 dilution) and FITC-conjugated streptavidin (1:200 dilution). The nuclei were stained with DAPI. The selected images are representative of three independent biological replicates

advanced clinical stages of the disease (CS III, IV) with an $r = -0.432$. The levels of the CA125 tumor marker also showed a slight, but direct, tendency to correlate with the levels of fucosylation and had an $r = 0.309$. On the other hand, the OVCAR3 cell line showed a stronger and directly proportional tendency to correlate between the fucosylation levels and the clinical stage with an $r =$

0.528. In this cell line, a directly proportional tendency of association between CA125 and the fucosylation levels was also obtained. In our study population, fucosylation did not show any correlation with patient survival; however, in all cases, it will be necessary to increase the sample size to determine or rule out the existence of an association between these variables.

Table 2 Correlation analysis of fucosylation and clinical characteristics

Correlation Matrix	Spearman r				
	Histological Subtype	Clinical Stage	CA125	PFS	OS
SKOV-3 Fucosylation	0.234	-0.432	0.309	0.129	0.042
85.7% C. I.	-0.355 to 0.641	-0.806 to -0.033	-0.302 to 0.741	-0.595 to 0.605	-0.674 to 0.605
<i>p</i> value	ns*	ns*	ns*	ns*	ns*
OVCAR-3 Fucosylation	0.078	0.528	0.382	0.031	0.079
85.7% C.I.	-0.482 to 0.451	-0.109 to 0.820	-0.465 to 0.953	-0.291 to 0.481	-0.225 to 0.481
<i>p</i> value	ns*	ns*	ns*	ns*	ns*

SKOV-3 Cells that Are Stimulated with Ascites from Patients with EOC Have a Differentially Fucosylation Protein Profile

Under normal culture conditions, SKOV-3 cells showed a characteristic morphology, i.e., large cells with an abundant cytoplasm [25] (Fig. 2, culture medium, light microscopy). When fucosylation was evaluated with *Aleuria aurantia* lectin (AAL)

in cells maintained in culture medium, fucosylation was strongly detected in the high molecular weight proteins (Fig. 2, 10% SDS-PAGE; overlay-AAL, upper panel). On the other hand, ascites-treated cells showed a much more accentuated spindle-shaped morphology (Fig. 2, ascites, light microscopy), as has been previously reported [24]. These morphological changes were observed with the 13 different ascites tested in this work. When overlay assays were performed, high molecular weight

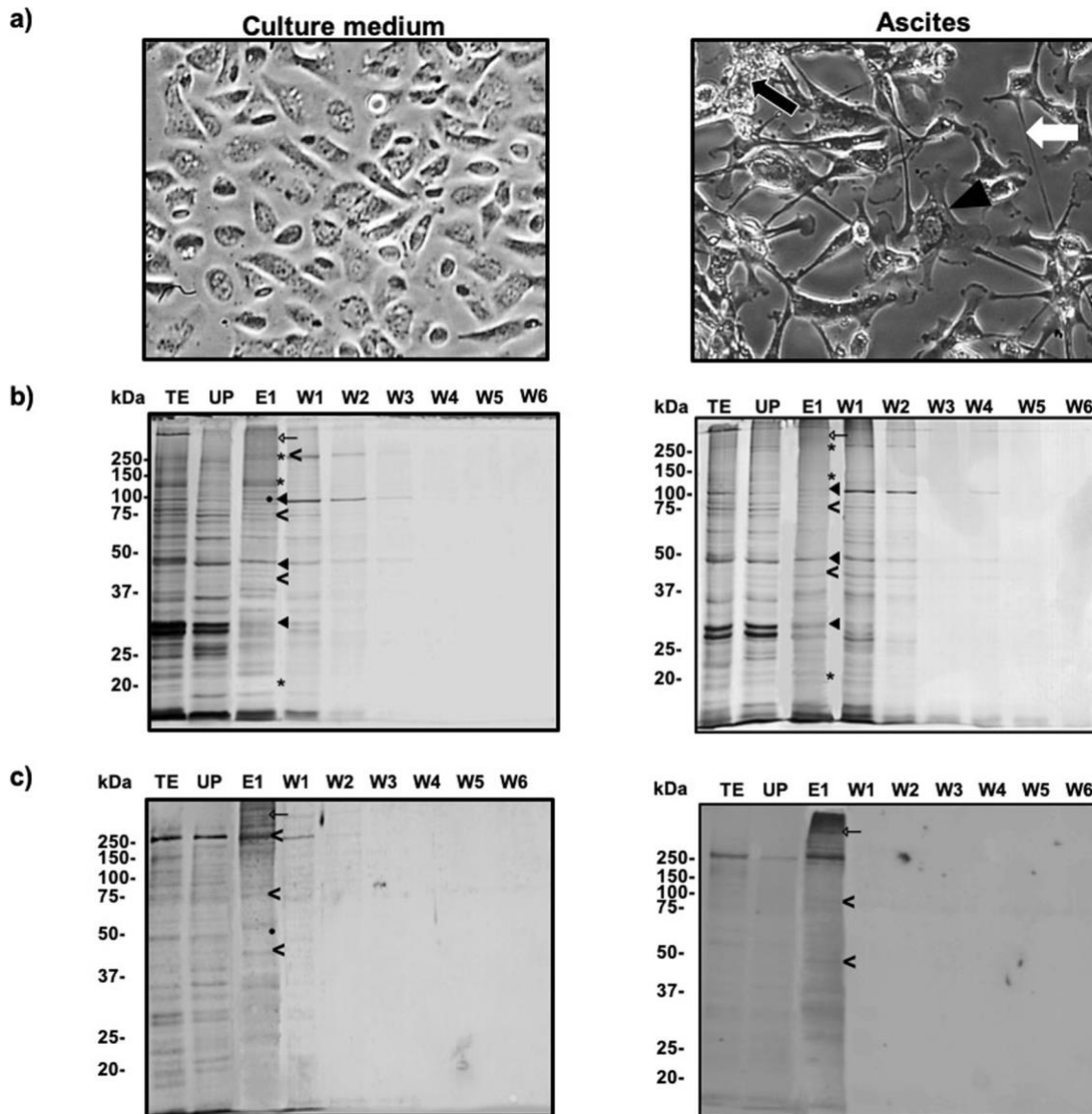


Fig. 2 Purification of fucosylated proteins by affinity chromatography with *Aleuria aurantia* lectin. SKOV-3 cells show a characteristic morphology under control conditions (Light microscopy, right panel, 2a). In SKOV-3 cells that were stimulated with ascites (light microscopy, left panel, 2a), abundant mucus was observed (black arrow, light microscopy, right panel, 2a), some large cells (black arrowhead, light microscopy, right panel, 2a) and membranes with large protrusions (white arrow, light microscopy, right panel, 2a). Fucosylated proteins were purified by *Aleuria aurantia* lectin affinity chromatography; different fractions were obtained and analyzed by 10% SDS-PAGE (2b). The overlay assay

shows fucosylation in TE, UP, E1, and W1 fractions (2c). Black arrow-heads (▶): similarities between the control condition (left panel) and the ascites-treated condition (right panel). Asterisks (*): differences between the control and experimental conditions. Arrowhead (<): similarities in fucosylation between the overlay test and the polyacrylamide gel. Arrows (↑): fucosylated proteins that are present in the overlay but are not present in the polyacrylamide gel. Dot (·): proteins that are present in the polyacrylamide gel but are not present in the overlay. TE: total extract; UP: unbound proteins; E1: eluate 1; W1-W6: washes

fucosylated proteins were detected (Fig. 2, 10% SDS-PAGE; overlay-AAL, lower panel). Although there were some similar bands in both conditions (black arrowheads, 10% SDS-PAGE, upper and lower panel), there were also some marked differences (asterisks, 10% SDS-PAGE, upper and lower panel). When comparing the pattern of fucosylated proteins, there were some proteins detected by AAL that could not be seen in the purification column (E1, 10% SDS-PAGE) (arrowheads, 10% SDS-PAGE and overlay-AAL, upper and lower panels). In contrast, some bands that appeared in the purification assay (E1, 10% SDS-PAGE) were not observed with AAL (dot, SDS-PAGE and overlay-AAL, upper and lower panels), suggesting that these proteins were not fucosylated.

Identification of Fucosylated Proteins

To identify which proteins had altered fucosylation as a result of ascites treatment, experiments were performed to purify the fucosylated proteins by affinity chromatography, and the profiles of the fucosylated proteins were obtained. In general, under ascites stimulation, more fucosylated proteins were observed; this pattern was conserved among all three biological replicates that were run in triplicate (Fig. 3). The protein profile showed changes, especially in some high molecular weight proteins (100–150 kDa) and in some low molecular weight proteins (15–25 kDa). The high molecular weight proteins were more visible in the control conditions (culture

medium), and the low molecular weight proteins were more enriched in the experimental conditions (ascites); these results are highlighted in the extended right panels (Fig. 3). Thus, for identification purposes, the proteins that were present in the highlighted sections were chosen.

Enriched fucosylated proteins that showed differences between both conditions were selected for their identification by MALDI-TOF (Fig. 3, numbers in circle, assay 2). The five following proteins were identified: Intermediate filament family orphan 1 [IFFO1], PHD finger protein 20-like protein 1 [PHF20L1], Peregrin [BRPF1], Dystrobrevin alpha [DTNA], Zinc finger protein 224 [ZNF224], and an immunoglobulin fragment (immunoglobulin gamma 1 heavy chain variable region, partial [IGHV1-2]). The main mass spectrometry data are shown in Table 3. To determine the post-translational modifications that might affect the proteins, different databases were reviewed; it has been reported that although some proteins can be phosphorylated or acetylated, fucosylation and glycosylation have not been described. However, in silico analyses in the database NetNGlyc showed many probable glycosylation sites, and this makes fucosylation possible (Supplementary Fig. 3).

Fucosylation Levels are Different among Proteins

To validate that the proteins identified by mass spectrometry were indeed fucosylated, three of them were further analyzed

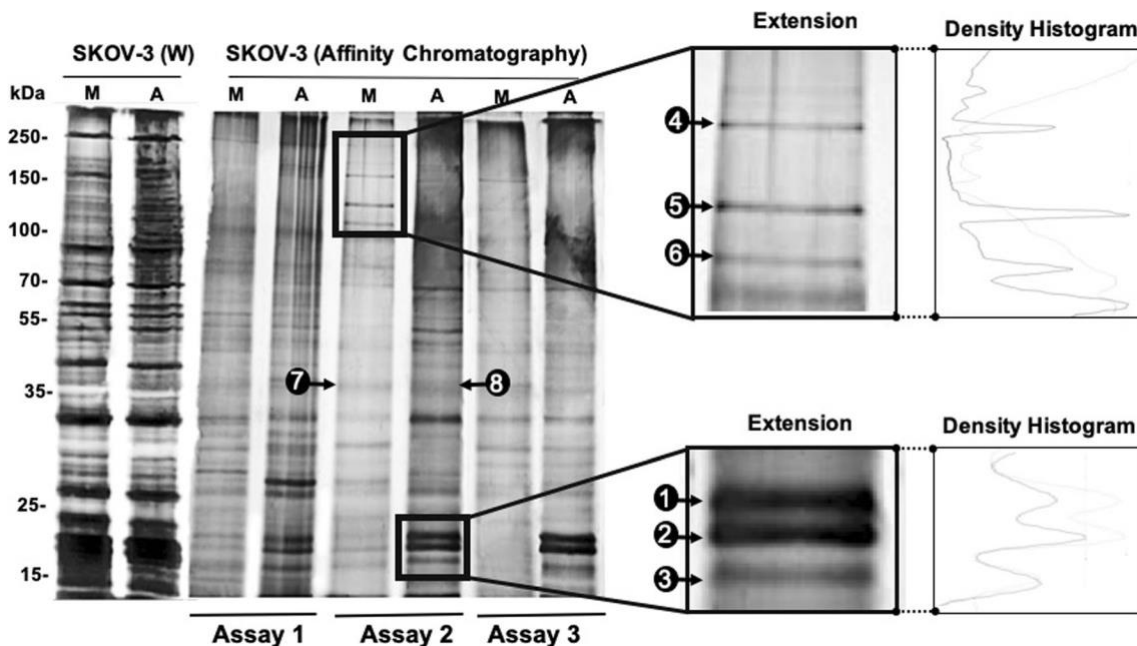


Fig. 3 Fucosylated proteins in SKOV-3 cells under control conditions and treated with ascites. Whole protein extracts of SKOV-3 cells (W) stimulated with ascites or in medium are shown in the first two lanes. The subsequent lanes show the protein elution patterns of the fucosylated proteins corresponding to E1 obtained from the control conditions (M) and the experimental conditions (A); the proteins were selected from three

independent biological replicates (assay 1–3). The amplified areas highlight the differences in the conditions studied and the histogram of the density of the amplified bands (darker lines correspond to the control conditions, while gray lines correspond to the experimental conditions). Protein bands labeled with numbers 1–8 were selected for MS identification

Table 3 Proteins identified by mass spectrometry

B	SequencesMatched	Protein	Gene	MW (g)	MW (e)	MW (t)	Score	% coverage	Access ID	UniProt ID
1	8	Intermediate filament family orphan 1 isoform X11	IFFO1	22	40.43	61.97	70	29	gi767,971,301	Q0D215
3 Mixture	10	PHD finger protein 20-like protein 1 isoform X12	PHF20L1	20	64.65	115.01	59	12	gi767,953,111	A8MW92
		Immunoglobulin gamma 1 heavy chain variable region	IGHV1-2	20	14.20	11.91	57	41	gi304,562,702	A0A0F7T6Q1
6	7	Dystrobrevin alpha	DTNA	120	84.64	83.90	57	12	DTNA_HUMAN	Q13499
7	10	Peregrin	BRPF1	33	139.06	137.49	61	7	BRPF1_HUMAN	P55201
8	7	Zinc finger protein 224	ZNF224	33	84.90	82.28	61	14	ZNF224_HUMAN	Q9NZL3

* The first column shows the number corresponding to the selected protein (protein band, B) obtained from the selection shown in Fig. 3. The protein bands 6 and 7 were obtained from the control conditions (M, medium)

** MW (g), SDS-PAGE was used to obtain the molecular weight; MW (e), experimental molecular weight; MW (t), theoretical molecular weight

*** The number of matches, score, coverage percentage and access ID were obtained from Mascot 2.2

in both the SKOV-3 and OVCAR-3 cell lines. By confocal microscopy, it was possible to confirm that they were fucosylated by colocalization with AAL (Fig. 4, upper panel). All of the proteins analyzed showed colocalization at different levels, and all of them showed even more colocalization when the cells were incubated with ascites (Fig. 4, intermediate panel), including Peregrin (a protein identified from the control conditions). These results confirm the fucosylated state of these proteins and suggest that ascites stimulates the fucosylation of the three proteins (Pearson correlation coefficient was >0.5 in ascites conditions). The same three proteins in OVCAR-3 cells were analyzed, confirming that they were also fucosylated and showed colocalization with AAL (Fig. 4, lower panel).

Protein-Protein Interaction (PPI) Network Analyses of Fucosylated Proteins in SKOV-3 Cells

To understand the possible role of the identified proteins during tumor progression, the STRING database was used to generate an interaction network (Fig. 5). In addition, a detailed search of all the identified proteins was performed. The proteins that were identified to have a structural function were Intermediate filament family orphan 1 and Dystrobrevin alpha; it was determined that the remaining proteins PHD finger protein 20-like protein 1, Peregrin and Zinc finger protein 224 act as transcription regulators. An analysis of expression was performed in The Human Protein Atlas database (<https://www.proteinatlas.org>); this analysis indicated that most proteins, except for PHD finger protein 20-like protein 1 and Zinc finger protein 224 (which have either moderate or high expression levels), have low protein expression levels in different types of cancer tissues, including ovarian cancer.

Discussion

Ascites, the accumulation of fluid in the abdominopelvic cavity, typically manifests in many types of advanced cancer, such as colon, pancreatic, stomach, breast, lymphoma, lung, and ovarian cancer [26, 27]. Usually, in the case of ovarian cancer, ascites contains growth factors, cytokines, and lipid mediators among other molecules [28, 29]. Together, these components favor the tumor, and some spheroids and cells can move through it, favoring metastasis [30, 31]. Actually, the presence of ascites favors conditions that promote proliferation, invasion, anti-apoptosis, chemoresistance and tumor heterogeneity [32–34]; these characteristics are because the cellular components then promote tumor growth, angiogenesis, and attenuate apoptosis [35–38].

The elements that conform to the different ascites are crucial to understanding how these ascites regulate the cells; in this case, the SKOV-3 and OVCAR-3 cell lines. However, it is

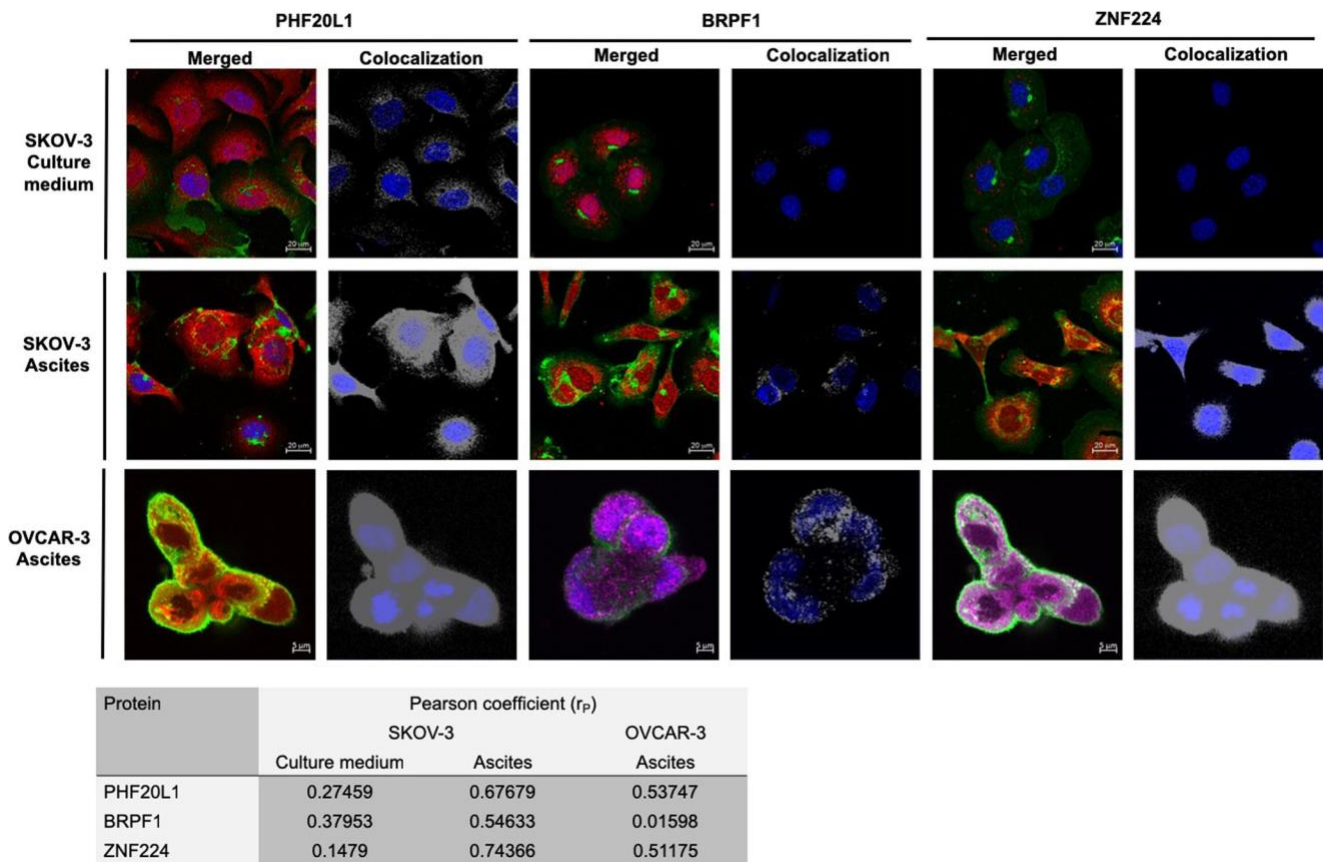


Fig. 4 Colocalization between identified proteins and fucosylation. For the colocalizing assay, ascites O2 was employed for SKOV-3 cells, and ascites A04 was employed for OVCAR-3 cells. Three of the proteins that were previously identified were analyzed (in red). *Aleuria aurantia* lectin was employed to follow fucosylation and is visualized in green. Merged

images are shown, and the colocalization images are shown where the white spots indicate the points of colocalization between each protein and fucosylation. Pearson correlation was performed using the Zen 2.3 program

very difficult to define the composition of each of these ascites. It is important to mention that IL-6 is usually found in ovarian cancer ascites [39]. Moreover, IL-6 and IL-8 are among the most abundant interleukins in ascites [40]. This is relevant because there are some reports that have indicated that the increased levels of fucosylation could be related to the higher levels of IL-6 in pancreatic cancer cells [41]. IL-6 signaling in ovarian cancer can regulate tumor cell proliferation, invasion and angiogenesis [42–44]. Additionally, an elevation of TGF- β , IL-6 and IL-8 act as oncogenic stimuli that modulate the process of epithelial mesenchymal transition, allowing invasion to occur more easily [35, 45]. To confirm this hypothesis, it will be necessary to determine the IL-6 levels in our ascites samples.

As reported by Toledo-Leyva et al. (2018) [24], the presence of ascites changes the phenotype of SKOV-3 cells, and this acquired phenotype (mesenchymal) is associated with increased invasion and migration properties [46]. Fucosylation is also modified, and this was demonstrated in this work, using cell-free ascites; therefore, we can affirm that the alterations observed in the fucosylation patterns are related to the soluble factors present in ascites and not to overgrowth of ascites

tumor cells. However, we cannot discard the role of soluble immune modulators such as IL-6 or TGF- β . Most likely, not all ascites will induce the same change; however, at least for ascites with time-tested kinetics, there seemed to be a tendency to decrease the membrane-associated fucosylation levels (Fig. 1), whereas an increase in the cytoplasmic signal was observed (Fig. 1).

However, in OVCAR-3 cells, increased membrane fucosylation was observed (Supplementary fig. 2); this could be related to the morphology and cell phenotype; indeed, it has been reported that fucosylation could vary among cell and tissue types [47]. Although the fucosylation profile might be different, PHD finger protein 20-like protein 1 and Zinc finger protein 224 and Peregrin fucosylated proteins were also found in OVCAR3 cells (Fig. 4). Nevertheless, it is possible that if the membrane proteins were analyzed, we could find important differences between these two cell lines in terms of their fucosylated proteins. Thus, fucosylation can be an important biochemical process for malignant cells.

We decided to use the SKOV-3 cell line because it is the most representative cell line of ovarian cancer, and many articles have used it as a reference. On the other hand, we

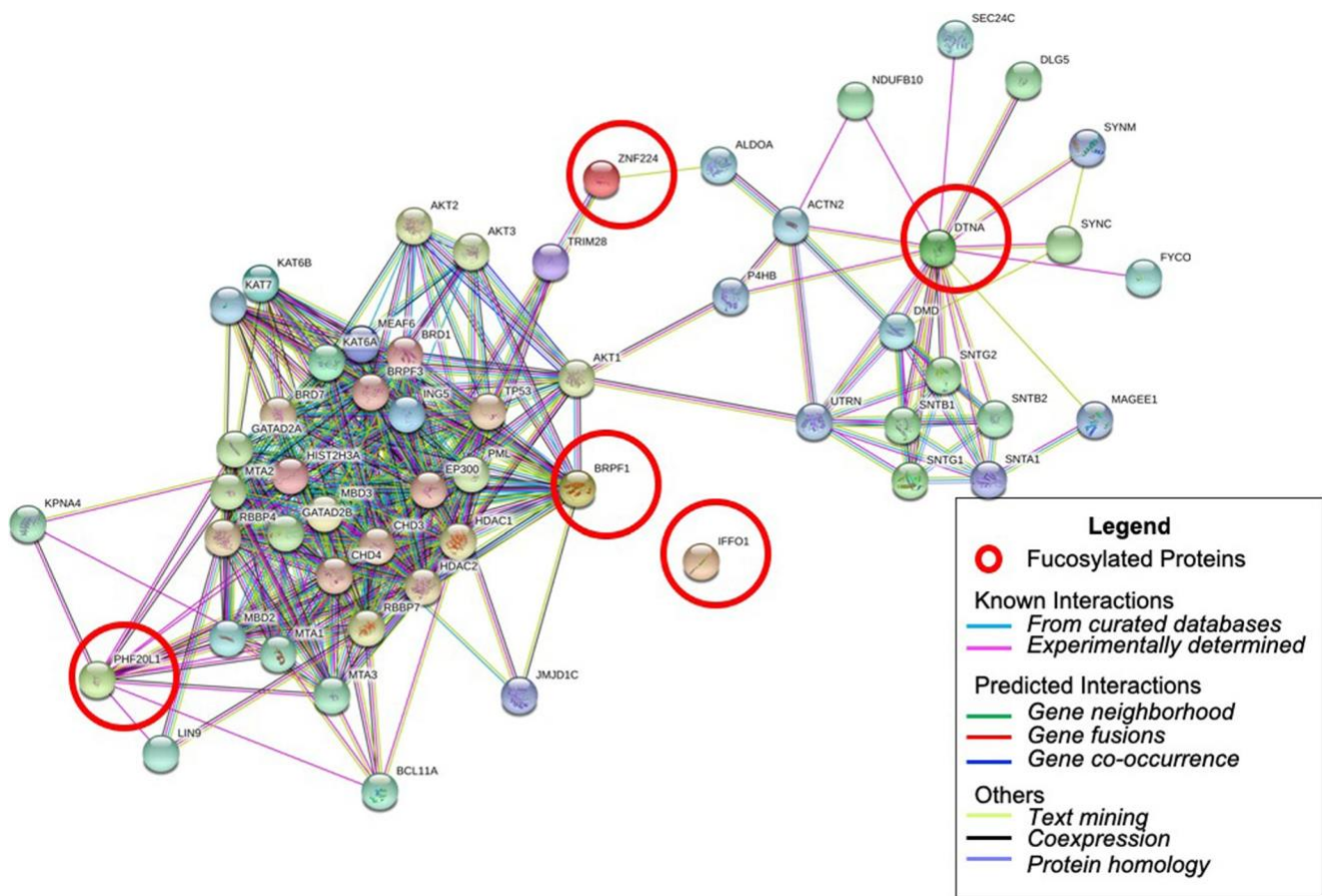


Fig. 5 Interaction network of fucosylated proteins. Identified fucosylated proteins in our work (highlighted in red circles) were employed for the design of an interaction network. The interaction network was obtained from STRING 10.0

noticed that the fucosylation of OVCAR-3 was mainly maintained in the membrane under all conditions of stimulation with ascites; however, when the SKOV-3 cells were permeabilized, the fucosylation label was distributed throughout the cytoplasm. The proteins identified by mass spectrometry were analyzed in OVCAR-3, and it was found that at the fucosylation colocalization points, the protein was located at the plasma membrane; this is a situation that is not expected for proteins with a nuclear function; thus all of these results must be analyzed in depth. There are reports on nuclear and cytoplasmic glycosylation. Several studies have also strongly indicated that high-mobility-group proteins, important structural components of chromatin, are glycoproteins [48]. The increased fucosylation of proteins with transcriptional regulation functions would increase the protein size; this could become an issue when the proteins are being transported inside the nucleus to perform their functions. However, it has been demonstrated that the neoglycoproteins BSA-fucose, BSA-mannose and BSA-glucose are rapidly transported inside the nuclei, whereas BSA itself is not [49]. This implies that fucosylation facilitates the translocation to the nuclei and maybe also towards other organelles. Sugar-mediated nuclear transport appears distinct from the basic peptide-

mediated NLS pathway [49]. This must be corroborated with additional experiments.

According to the background in ovarian cancer and other types of cancer, the fucosylation process is altered. Therefore, we decided to evaluate the total level of fucosylation both, in permeabilized and non-permeabilized cells. Typically this type of glycosylation is normally established in the secretory pathway and then presented on the cell surface in mammals. We consider that regardless of whether fucosylation occurs in the secretory pathway, the visualization of the level of intracellular fucosylation could provide information on the total levels of fucosylation. Moreover, given that we are studying tumor cells, we believe that intracellular fucosylation could reflect alterations in the mechanisms of membrane secretion of fucosylated proteins, which do not move efficiently towards the cell surface. However, we found that at least for SKOV-3 cells, at 24 h the level of membrane fucosylation (nonpermeabilized cells) was very low; therefore intracellular fucosylation (permeabilized cells) was sought, all under the same experimental conditions. Our results suggest that while what we see inside the cell are proteins that have the membrane as their final destination, for some reason they do not reach it. In the same way, experiments with permeabilized

cells allowed us to observe that although membrane fucosylation did not increase drastically, total fucosylation did so, suggesting an exacerbated fucosylation process and/ or a deficiency of the fucosylated protein secretory system.

Nevertheless, why is fucosylation important? Protein fucosylation affects immune cell recognition, cell interactions, and general biology [50–52]. FX is an important enzyme for the de novo synthesis of fucose, and its deletion in mice induced a defect that impaired the self-renewal capacity of bone marrow hematopoietic stem cells [53]. In healthy conditions in the human body, this post-translational modification is an essential component of several blood group antigens, and it is implicated in host-microbe interactions and in numerous ontogenetic events [54–58]. It also regulates cell adhesion molecules and growth factor receptors [59, 60]. Moreover, it has been implicated in pathological conditions, including cancer, where it has been shown to have a strong impact in different ways; for example, it has been associated with multidrug resistance in breast cancer cells [61], cell proliferation [62], cell migration and tumor formation [63]. In addition, there are reports that suggest that fucosylated glycans in neuroepithelial cells are required to guide the migration of neurons in the developing zebrafish hindbrain [64].

Additionally, some reports have indicated that a deficiency in fucosylation leads to TRAIL-induced apoptosis resistance [65]. TRAIL induces apoptosis in many types of human cancer cells but does not induce apoptosis in normal cells. Therefore, a decrease in membrane fucosylation could disfavor cell apoptosis as an evasion strategy.

Considering that there is enough literature describing the heterogeneity among ascitic fluids, the characterization of their content was beyond our reach. The purpose was to show that, in general terms, most of these ascitic fluids induce changes in the cells, which are relevant for the development and progression of the tumor. Of the 10 ascitic fluids analyzed, eight increased the level of fucosylation. These ascites are rich in cells from many sources including immunological, tumor, stromal, and other. However, as described in the [materials and methods](#) section, we processed these ascites to obtain ascites without cells before incubation with the cell lines. SKOV-3 cells that were stimulated with ascites for 72 h had a higher expression of fucosylation that correlated with the change in the phenotype acquired by these cells under ascites stimuli (epithelial-to-mesenchymal transition), which may increase the cellular migration. In fact, there are reports indicating that fucosylation is important during migration [64]. On the other hand, OVCAR-3 cells were also susceptible to ascitic fluids and their stimulation induced an increase in fucosylation levels. Moreover, OVCAR-3 cells showed a very different morphology (Supplementary Fig. 1c) compared with that of SKOV-3 cells stimulated with the same ascites. OVCAR-3 cells were rounded by ascites and, in some cases, the formation of spheroids was observed. This could also be related to a

higher migration capacity and may lead to the establishment of a metastatic tumor. Additionally, high fucosylation in OVCAR-3 could be an important feature that confers resistance to cisplatin [66, 67].

OVCAR-3 cells were obtained from the malignant ascites of a patient with progressive adenocarcinoma of the ovary, and the cultured cells exhibit androgen and estrogen receptors (ATCC HTB 161). SKOV-3 is an ovarian cancer cell line derived from the ascites of a 64-year-old Caucasian female with an ovarian serous cystadenocarcinoma (ATCC HTB 77). Both are ovarian cancer cell lines, but it has been described that there may be cell-type and tissue-specific variations in glycosylation [68, 69].

At this time we do not dare to provide clinical relevance to our results. We only present experimental results that could become clinically relevant once a larger number of samples can be analyzed. Moreover, when a correlation analysis was made between the fucosylation and the different clinical characteristics of the patients, no statistically significant differences were found, probably because the number of samples is insufficient. However, we found an interesting association between fucosylation and the clinical stage.

The identification of fucosylated proteins that are associated with particular diseases (in this case, ovarian cancer) opens the possibility to analyze them for future applications. For example, some of the fucosylated proteins have been employed as biomarkers, such as haptoglobin and alpha-fetoprotein, which are proteins that undergo central fucosylation, and that are used as tumor markers in hepatocellular cancer [70, 71]. Moreover, changes in the fucosylation of particular proteins could affect their interaction with other molecules; this would, in turn, alter their participation in different processes, including cell adhesion, differentiation, and signaling pathways. It is also known that these fucosylated antigens facilitate the invasion and spread of tumor cells [72–75]. In relation to cancer, a study conducted in 2016 by Mehta et al.

[76] showed that the increase in central fucosylation is associated with the dedifferentiation of primary hepatocytes and with the appearance of markers that are indicative of the transition of the cells from an epithelial to a mesenchymal state [76]. Another study reported that the inhibition of the fucosylation of annexin A4 inhibited cell proliferation in ovarian clear cell carcinoma [77].

Studies with the serum of patients with ovarian cancer, where the type of glycans found in the glycoproteins was evaluated, found an increased expression level of tri- and tetra-antennal oligosaccharides with variations in sialylation and fucosylation [78]. Previous work in our laboratory has shown that high levels of fucosylation occur in biopsies from the tumors of patients diagnosed with EOC [20]. At the same time, other groups have highlighted the relevance of fucosylation in ovarian cancer (described above). Thus, we hypothesize that the altered fucosylation of the proteins

identified here affects their function. In this context, it is known that some receptors and ligands lose their affinity, and this leads to alterations in the signaling pathways in which they participate [79]. Therefore, a more detailed analysis is necessary regarding the effects of fucosylation on the structure and function of the identified proteins, which are mainly transcriptional regulators; this implies that the proteins need to bind to specific protein domains to exert their functions [80].

The analysis of protein through the design of the network (Fig. 5) was to support the possible role of the identified proteins during the progression of the tumor instead of using them to understand the process of fucosylation itself. Alterations at the glycan level in some proteins have been used for therapeutic purposes, and this is one of the current strategies for cancer treatment [81, 82]. The deletion of a specific glycan or the modification of glycan chains with fucose or sialic acid on the antibodies enhances antibody-dependent cellular cytotoxicity, which is a key pathway in the elimination of cancerous tissue [83–85].

In conclusion, our results suggest that ascites from ovarian cancer patients are able to induce fucosylation on different cell types. Therefore, our results may be the foundation for further studies that will allow us to obtain evidence that supports the use of this information in the search for diagnostic biomarkers; our results may also be a foundation for the discovery of possible therapeutic targets or biomarkers for cancer prognosis and progression.

Acknowledgments We gratefully acknowledge Gabriel Martinez Batallar for mass spectrometry analysis at the laboratory of Dr. Sergio Encarnación Guevara from Centro de Ciencias Genómicas, UNAM, Mexico; Jessica Márquez Dueñas for her help in the purchase and procurement of materials.

Funding This project was supported by a grant for Health Research (233739), from CONACYT and the Health Ministry, México; DRAA was a recipient of a PhD fellowship also from CONACYT, México (338858).

References

1. GLOBOCAN, 2018. Estimated cancer incidence and prevalence worldwide in 2018. [online] Available at: <http://globocan.iarc.fr> [Last access: 24th March 2019]
2. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC (2001) Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev* 22(2):255–288
3. Cvetkovic D (2003) Early events in ovarian oncogenesis. *Reprod Biol Endocrinol* 1(68):68. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-1-68>
4. Odicino F, Pecorelli S, Zigliani L, Creasman W (2008) History of the FIGO cancer staging system. *Int J Gynecol Obstet* 101(2):205–210. <https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2007.11.004>
5. Pasquet M, Golzio M, Mery E, Rafii A, Benabbou N, Mirshahi P, Hennebelle I, Bourin P, Allal B, Teissie J, Mirshahi M, Couderc B (2010) Hospicells (ascites-derived stromal cells) promote tumorigenicity and angiogenesis. *Int J Cancer* 126(9):2090–2101. <https://doi.org/10.1002/ijc.24886>
6. Lane D, Bachvarov D, Rancourt C, Piche A (2014) Role

of malignant ascites on human mesothelial cells and their gene expression profiles. *BMC Cancer* 14:288. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-288>

7. Shender VO, Pavlyukov MS, Ziganshin RH, Arapidi GP, Kovalchuk SI, Anikanov NA, Altukhov IA, Alexeev DG, Butenko IO, Shavarda AL, Khomyakova EB, Evtushenko E, Ashrafyan LA, Antonova IB, Kuznetsov IN, Gorbachev AY, Shakhparonov MI, Govorun VM (2014) Proteome–metabolome profiling of ovarian Cancer ascites reveals novel components involved in intercellular communication. *Mol Cell Proteomics* 13(12):3558–3571. <https://doi.org/10.1074/mcp.M114.041194>
8. Bery A, Leung F, Smith CR, Diamandis EP, Kulasingam V (2014) Deciphering the ovarian cancer ascites fluid peptidome. *Clin Proteomics* 11(1):13. <https://doi.org/10.1186/1559-0275-11-13>
9. Pinho S, Reis C (2015) Glycosylation in cancer: mechanism and clinical implications. *Nat Rev Cancer* 15(9):540–555. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.06.001>
10. Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T (2008) Biological function of fucosylation in cancer biology. *J Biochem* 143(6):725–729. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn011>
11. Shah M, Telang S, Shah P, Patel P (2008a) Tissue and serum α 2-3- and α 2-6-linkage specific sialylation changes in oral carcinogenesis. *Glycoconj J* 25(3):279–290. <https://doi.org/10.1007/s10719-007-9086-4>
12. Shah M, Telang S, Raval G, Shah P, Patel PS (2008b) Serum fucosylation changes in oral cancer and oral precancerous conditions. *Cancer J* 13(2):336–346. <https://doi.org/10.1002/cncr.23556>
13. Vajaria B, Patel P (2016) Glycosylation: a hallmark of cancer? *Glycoconj J* 34(2):147–156. <https://doi.org/10.1007/s10719-016-9755-2>
14. Hu Z, Cai M, Deng L, Zhu L, Gao J, Tan M, Liu J, Lin B (2016) The fucosylated CD147 enhances the autophagy in epithelial ovarian cancer cells. *Oncotarget* 7(50):82921–82932. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13289>
15. Zhuang H, Hu Z, Tan M, Zhu L, Liu J, Liu D, Yan L, Lin B (2014) Overexpression of Lewis y antigen promotes human epididymis protein 4-mediated invasion and metastasis of ovarian cancer cells. *Biochimie* 105:91–98. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2014.06.022>
16. Cai M, Jin S, Deng L, Zhu L, Hu Z, Liu D, Liu J, Tan M, Gao J, Wang H, Lin B (2017) Lewis y antigen promotes p27 degradation by regulating ubiquitin-proteasome activity. *Oncotarget* 8(66): 110064–110076. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.22617>
17. Liu J, Zheng M, Qi Y, Wang H, Liu M, Liu Q, Lin B (2018) Lewis(y) antigen-mediated positive feedback loop induces and promotes chemotherapeutic resistance in ovarian cancer. *Int J Oncol* 53(4):1774–1786. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4496>
18. Thomson S, Dargan E, Turner GA (1992) Increased fucosylation and other carbohydrate changes in haptoglobin in ovarian cancer. *Cancer Lett* 66:43–48
19. Garibay-Cerdenares OL, Hernández-Ramírez VI, Osorio-Trujillo JC, Hernández-Ortiz M, Gallardo-Rincón D, Cantú de León D, Encarnación-Guevara S, Villegas-Pineda JC, Talamás-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. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-27>
20. Villegas-Pineda JC, Garibay-Cerdenares OL, Hernández-Ramírez VI, Gallardo-Rincón D, Cantú de León D, Pérez-Montiel-Gómez MD, Talamás-Rohana P (2015) Integrins and haptoglobin: molecules overexpressed in ovarian cancer. *Pathol Res Pract* 211(12): 973–981. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2015.10.002>

21. Yarnashita K, Korde N, Endo T, Iwaki Y, Kobata A (1989) Altered glycosylation of serum transferrin of patients with hepatocellular carcinoma. *J Biol Chem* 264:2415–2423
22. Aoyagi Y, Isernura M, Yosizawa Z, Suzuki Y, Sekine C, Ono T, Ichida F (1985) Fucosylation of serum o-fetoprotein in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 830:217–223
23. Yamamoto K, Tsujii T, Tarutani O, Osawa T (1984) Structural changes of carbohydrate chains of human thyroglobulin accompanying transformations of thyroid glands. *Eur J Biochem* 143:133–144
24. Toledo-Leyva A, Villegas-Pineda JC, Encarnación-Guevara S, Gallardo-Rincón D, Talamás-Rohana P (2018) Effect of ovarian cancer ascites on SKOV-3 cells proteome: new proteins associated with aggressive phenotype in epithelial ovarian cancer. *Proteome Sci* 16:3. <https://doi.org/10.1186/s12953-018-0133-9>
25. Carduner L, Picot CR, Leroy-Dudal J, Blay L, Kellouche S, Carreiras F (2014) Cell cycle arrest or survival signaling through α v integrins, activation of PKC and ERK1/2 lead to anoikis resistance of ovarian cancer spheroids. *Exp Cell Res* 320(2):329–342. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.11.011>
26. Runyon BA (1994) Care of patients with ascites. *N Engl J Med* 330: 337–342. <https://doi.org/10.1056/NEJM199402033300508>
27. Shen-Gunther J, Mannel RS (2002) Ascites as a predictor of ovarian malignancy. *Gynecol Oncol* 87(1):77–83
28. Offner FA, Obrist P, Stadlmann S, Feichtinger H, Klingler P, Herold M, Zwierzina H, Hittmair A, Mikuz G, Abendstein B, Zeimet A, Marth C (1995) IL-6 secretion by human peritoneal mesothelial and ovarian cancer cells. *Cytokine* 7(6):542–547
29. Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C, Piche A (2012) Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am J Cancer Res* 2(5):566–580
30. Matte I, Lane D, Bachvarov D, Rancourt C, Piche A (2014) Role of malignant ascites on human mesothelial cells and their gene expression profiles. *BMC Cancer* 14:288. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-288>
31. Matte I, Lane D, Laplante C, Garde-Granger P, Rancourt C, Piche A (2015) Ovarian cancer ascites enhance the migration of patient-derived peritoneal mesothelial cells via cMet pathway through HGF-dependent and -independent mechanisms. *Int J Cancer* 137(2):289–298. <https://doi.org/10.1002/ijc.29385>
32. Bhowmick NA, Neilson EG, Moses HL (2004) Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432(7015):332–337
33. Wels J, Kaplan RN, Rafii S, Lyden D (2008) Migratory neighbors and distant invaders: tumor-associated niche cells. *Genes Dev* 22(5):559–574. <https://doi.org/10.1101/gad.1636908>
34. Villegas-Pineda JC, Toledo-Leyva A, Osorio-Trujillo C, Hernández-Ramírez VI, Talamás-Rohana P (2017) The translational blocking of α 5 and α 6 integrin subunits affects migration and invasion, and increases sensitivity to carboplatin of SKOV-3 ovarian cancer cell line. *Exp Cell Res* 351(2):127–134. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.01.010>
35. So KA, Min KJ, Hong JH, Lee JK (2015) Interleukin-6 expression by interactions between gynecologic cancer cells and human mesenchymal stem cells promotes epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol* 47(4):1451–1459. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.3122>
36. Lane D, Matte I, Rancourt C, Piche A (2012) Osteoprotegerin (OPG) protects ovarian cancer cells from TRAIL-induced apoptosis but does not contribute to malignant ascites-mediated attenuation of TRAIL-induced apoptosis. *J Ovarian Res* 5(1):34. <https://doi.org/10.1186/1757-2215-5-34>
37. Reid PE, Brown NJ, Holen I (2009) Breast cancer cells stimulate osteoprotegerin (OPG) production by endothelial cells through direct cell contact. *Mol Cancer* 8:49. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-8-49>
38. Yin J, Zeng F, Wu N, Kang K, Yang Z, Yang H (2015) Interleukin-8 promotes human ovarian cancer cell migration by epithelial-mesenchymal transition induction *in vitro*. *Clin Transl Oncol* 17(5):365–370. <https://doi.org/10.1007/s12094-014-1240-4>
39. Lane D, Matte I, Rancourt C, Piché A (2011) Prognostic significance of IL-6 and IL-8 ascites levels in ovarian cancer patients. *BMC Cancer* 30(11):210. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-210>
40. Giuntoli RL, Webb TJ, Zoso A, Rogers O, Diaz-Montes TP, Bristow RE, Oelke M (2009) Ovarian cancer-associated ascites demonstrates altered immune environment: implications for anti-tumor immunity. *Anticancer Res* 29:2875–2884
41. Terao N, Takamatsu S, Minehira T, Sobajima T, Nakayama K, Kamada Y, Miyoshi E (2015) Fucosylation is a common glycosylation type in pancreatic cancer stem cell-like phenotypes. *World J Gastroenterol* 21(13):3876–3887. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i13.3876>
42. Syed V, Ulinski G, Mok SC, Ho SM (2002) Reproductive hormone-induced, STAT3-mediated interleukin 6 action in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *J Natl Cancer Inst* 94:617–629
43. Obata NH, Tamakoshi K, Shibata K, Kikkawa F, Tomoda Y (1997) Effects of interleukin-6 on *in vitro* cell attachment, migration and invasion of human ovarian carcinoma. *Anticancer Res* 17:337–342
44. Nilsson MB, Langlely RR, Fidler IJ (2005) Interleukin-6, secreted by human ovarian carcinoma cells, is a potent proangiogenic cytokine. *Cancer Res* 65:10794–10800. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-0623>
45. Wang Y, Xu RC, Zhang XL, Niu XL, Qu Y, Li LZ, Meng XY (2012) Interleukin-8 secretion by ovarian cancer cells increases anchorage-independent growth, proliferation, angiogenic potential, adhesion and invasion. *Cytokine* 59(1):145–155. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2012.04.013>
46. Soon H, Moon A (2010) Epithelial-mesenchymal transition and cell invasion. *Toxicol Res* 26(4):245–252. <https://doi.org/10.5487/TR.2010.26.4.245>
47. Smith PL, Myers JT, Rogers CE, Zhou L, Petryniak B, Becker DJ, Homeister JW, Lowe JB (2002) Conditional control of selectin ligand expression and global fucosylation events in mice with a targeted mutation at the FX locus. *J Cell Biol* 158:801–815
48. Chao YB, Scovell WM, Yan SB (1994) High mobility group protein, HMG-1, contains insignificant glycosyl modification. *Protein Sci* 3(12):2452–2454. <https://doi.org/10.1002/pro.5560031230>
49. Hart GW, Haltiwanger RS, Holt GD, Kelly WG (1989) Glycosylation in the nucleus and cytoplasm. *Annu Rev Biochem* 58:841–874
50. Feizi T (2000) Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity. *Immunol Rev* 173:79–88
51. Marth JD, Grewal PK (2008) Mammalian glycosylation in immunity. *Nat Rev Immunol* 8:874–887
52. Pickard JM, Maurice CF, Kinnebrew MA, Abt MC, Schenten D, Golovkina TV, Bogatyrev SR, Ismagilov RF, Pamer EG, Turnbaugh PJ, Chervonsky AV (2014) Rapid fucosylation of intestinal epithelium sustains host-commensal symbiosis in sickness. *Nature* 514:638–641. <https://doi.org/10.1038/nature13823>
53. Myers J, Huang Y, Wei L, Yan Q, Huang A, Zhou L (2010) Fucose-deficient hematopoietic stem cells have decreased self-renewal and aberrant marrow niche occupancy. *Transfusion* 50:2660–2669. <https://doi.org/10.1111/j.1537-2995.2010.02745.x>
54. Soochi K, Boyun K, Sang Song Y (2016) Ascites modulates cancer cell behavior, contributing to tumor heterogeneity in ovarian cancer. *Cancer Sci* 107(9):1173–1178. <https://doi.org/10.1111/cas.12987>
55. Larsen RD, Ernst LK, Nair RP, Lowe JB (1990) Molecular cloning, sequence, and expression of a human GDP-L-fucose:beta-D-galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase cDNA that can form the H blood group antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6674–6678

56. Kelly RJ, Ernst LK, Larsen RD, Bryant JG, Robinson JS, Lowe JB (1994) Molecular basis for H blood group deficiency in Bombay (oh) and Para-Bombay individuals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5843–5847
57. Hooper LV, Gordon JI (2001) Glycans as legislators of host- microbial interactions: spanning the spectrum from symbiosis to pathogenicity. *Glycobiol* 11:1R–10R. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.2.1R>
58. Tonetti M, Sturla L, Bisso A, Benatti U, De Flora A (1996) Synthesis of GDP-L fucose by the human FX protein. *J Biol Chem* 271(44):27274–27279
59. Lowe JB (1997) Selectin ligands, leukocyte trafficking, and fucosyltransferase genes. *Kidney Int* 51(5):1418–1426
60. Wang Y, Shao L, Shi S, Harris RJ, Spellman MW, Stanley P, Haltiwanger RS (2001) Modification of epidermal growth factor- like repeats with O-fucose. Molecular cloning and expression of a novel GDP-fucose protein O-fucosyltransferase. *J Biol Chem* 276(43):40338–40345
61. Feng X, Zhao L, Gao S, Song X, Dong W, Zhao Y, Zhou H, Cheng L, Miao X, Jia L (2016) Increased fucosylation has a pivotal role in multidrug resistance of breast cancer cells through miR-224-3p targeting FUT4. *Gene* 578(2):232–241. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.12.028>
62. Carrascal MA, Silva M, Ramalho JS, Pen C, Martins M, Pascoal C, Amaral C, Serrano I, Oliveira MJ, Sackstein R, Videira PA (2017) Inhibition of fucosylation in human invasive ductal carcinoma reduces E-selectin ligand expression, cell proliferation and ERK1/2 and p38 MAPK activation. *Mol Oncol* 2(5):579–593. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12163>
63. Zhou Y, Fukuda T, Hang Q, Hou S, Isaji T, Kameyama A, Gu J (2017) Inhibition of fucosylation by 2-fluorofucose suppresses human liver cancer HepG2 cell proliferation and migration as well as tumor formation. *Sci Rep* 7(1):11563. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11911-9>
64. Ohata S, Kinoshita S, Aoki R, Tanaka H, Wada H, Tsuruoka-Kinoshita S, Tsuboi T, Watabe S, Okamoto H (2009) Neuroepithelial cells require fucosylated glycans to guide the migration of vagus motor neuron progenitors in the developing zebrafish hindbrain. *Development* 136(10):1653–1663. <https://doi.org/10.1242/dev.033290>
65. Moriwaki K, Narisada M, Imai T, Shinzaki S, Miyoshi E (2010) The effect of epigenetic regulation of fucosylation on TRAIL- induced apoptosis. *Glycoconj J* 27(7–9):649–659. <https://doi.org/10.1007/s10719-010-9310-5>
66. Blanas A, Sahasrabudhe NM, Rodríguez E, van Kooyk Y, van Vliet SJ (2018) Fucosylated antigens in Cancer: an Alliance toward tumor progression, metastasis, and resistance to chemotherapy. *Front Oncol* 23(8):39. <https://doi.org/10.3389/fonc.2018.00039>
67. Lv X, Song J, Xue K, Li Z, Li M, Zahid D, Cao H, Wang L, Song W, Ma T, Gu J, Li W (2019) Core fucosylation of copper transporter 1 plays a crucial role in cisplatin-resistance of epithelial ovarian cancer by regulating drug uptake. *Mol Carcinog* 58:1–14. <https://doi.org/10.1002/mc.22971>
68. Anugraham M, Jacob F, Nixdorf S, Everest-Dass AV, Heinzelmann-Schwarz V, Packer NH (2014) Specific glycosylation of membrane proteins in epithelial ovarian cancer cell lines: glycan structures reflect gene expression and DNA methylation status. *Mol Cell Proteomics* 13(9):2213–2232. <https://doi.org/10.1074/mcp.M113.037085>
69. Medzihradsky KF, Kaasik K, Chalkley RJ (2010) Tissue-specific glycosylation at the Glycopeptide level. *Mol Cell Proteomics* 14(8): 2103–2110. <https://doi.org/10.1074/mcp.M115.050393>
70. Aoyagi Y, Isemura M, Yosizawa Z, Suzuki Y, Sekine C, Ono T, Ichida F (1985) Fucosylation of serum alpha fetoprotein in patients with primary hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta* 830(3):217–223
71. Noda K, Miyoshi E, Kitada T, Nakahara S, Gao CX, Honke K, Shiratori Y, Moriwaki H, Sasaki Y, Kasahara A, Hori M, Hayashi N, Taniguchi N (2002) The enzymatic basis for the conversion of non-fucosylated to fucosylated alpha-fetoprotein by acyclic retinoid treatment in human hepatoma cells: activation of alpha 1,6 fucosyltransferase. *Tumor Biol* 23(4):202–211
72. Yan LM, Lin B, Zhu LC, Hao YY, Qi Y, Wang CZ, Gao S, Liu SC, Zhang SL, Iwamori M (2010) Enhancement of the adhesive and spreading potentials of ovarian carcinoma rmg-1 cells due to increased expression of integrin alpha5beta1 with the Lewis y-structure on transfection of the alpha 1,2- fucosyltransferase gene. *Biochim* 92(7):852–857. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2010.02.012>
73. Gao L, Yan L, Lin B, Gao J, Liang X, Wang Y, Liu J, Zhang S, Iwamori M (2011) Enhancing effects of Lewis y antigen on cd44- mediated adhesion and spreading of human ovarian cancer cell line rmg-i. *J Exp Clin Cancer Res* 30:15. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-30-15>
74. Wang X, Gu J, Ihara H, Miyoshi E, Honke K, Taniguchi N (2006) Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor- mediated intracellular signaling. *J Biol Chem* 281(5):2572–2577
75. Orczyk-Pawilowicz M (2007) The role of fucosylation of glycoconjugates in health and disease. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 61:240–252
76. Mehta A, Comunale MA, Rawat S, Casciano JC, Lamontagne J, Herrera H, Ramanathan A, Betesh L, Wang M, Norton P, Steel LF, Bouchard MJ (2016) Intrinsic hepatocyte dedifferentiation is accompanied by upregulation of mesenchymal markers, protein sialylation and core alpha 1,6 linked fucosylation. *Sci Rep* 6: 27965. <https://doi.org/10.1038/srep27965>
77. Wang H, Deng L, Cai M, Zhuang H, Zhu L, Hao Y, Gao J, Liu J, Li X, Lin B (2016) Annexin A4 fucosylation enhances its interaction with the NF- κ B p50 and promotes tumor progression of ovarian clear cell carcinoma. *Oncotarget* 8(64):108093–108107. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10226>
78. Mitra I, Alley WR Jr, Goetz JA, Vasseur JA, Novotny MV, Jacobson SC (2013) Comparative profiling of N-glycans isolated from serum samples of ovarian cancer patients and analyzed by microchip electrophoresis. *Proteome Res* 12(10):4490–4496. <https://doi.org/10.1021/pr400549e>
79. Wang Y, Fukuda T, Isaji T, Lu J, Im S, Hang Q, Gu W, Hou S, Ohtsubo K, Gu J (2015) Loss of α 1,6-fucosyltransferase inhibits chemical-induced hepatocellular carcinoma and tumorigenesis by down-regulating several cell signaling pathways. *FASEB J* 29(8): 3217–3227. <https://doi.org/10.1096/fj.15-270710>
80. Phillips T (2008) Regulation of transcription and gene expression in eukaryotes. *Nature Education* 1(1):199
81. Prendergast JM, Galvao da Silva AP, Eavarone DA, Ghaderi D, Zhang M, Brady D, Wicks J, DeSander J, Behrens J, Rueda BR (2017) Novel anti-Sialyl-Tn monoclonal antibodies and antibody- drug conjugates demonstrate tumor specificity and anti-tumor activity. *MAbs* 9(4):615–627. <https://doi.org/10.1080/19420862.2017.1290752>
82. Basso EY, Kasahara A, Chiusolo V, Jacquemin G, Boydell E, Zamorano S, Riccadonna C, Pellegatta S, Hulo N, Dutoit V, Derouazi M, Dietrich PY, Walker PR, Martinvalet D (2017) ER- mitochondria contacts control surface glycan expression and sensitivity to killer lymphocytes in glioma stem-like cells. *EMBO* 36(11):1493–1512. <https://doi.org/10.15252/embj.201695429>
83. Sato Y, Isaji T, Tajiri M, Yoshida-Yamamoto S, Yoshinaka T, Somehara T, Fukuda T, Wada Y, Gu J (2009) An N-glycosylation site on the β -propeller domain of the integrin α 5 subunit plays key roles in both its function and site-specific modification by β 1, 4-N-acetylglucosaminyltransferase III. *J Biol Chem* 284(18):11873–11881. <https://doi.org/10.1074/jbc.M807660200>

84. Shields RL, Lai J, Keck R, O'Connell LY, Hong K, Meng YG, Weikert SH, Presta LG (2002) Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human fc gamma RIII and antibody-dependent cellular toxicity. *J Biol Chem* 277(30): 26733–26740
85. Shinkawa T, Nakamura K, Yamane N, Shoji-Hosaka E, Kanda Y, Sakurada M, Uchida K, Anazawa H, Satoh M, Yamasaki M, Hanai N, Shitara K (2003) The absence of fucose but not the presence of galactose or bisecting N-acetylglucosamine of human IgG1 complex-type oligosaccharides shows the critical role of enhancing antibody-dependent cellular cytotoxicity. *J Biol Chem* 278(5): 3466–3473

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

XIII. Formato de jurado de tesis