



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Caracterización fenotípica de células linfoides innatas (ILC) y linfocitos T $\gamma\delta$
en el epiplón de un modelo murino de cáncer de ovario”**

T E S I S

Que presenta

Q.F.B. ALONDRA JIMENEZ BERNAL

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Directora de tesis:

Dra. Patricia Talamás Rohana

Asesores:

Dr. Victor K. Tsutsumi Fujiyoshi (DIPM)

Dr. Marco A. Vega López (DIPM)

Ciudad de México

Noviembre, 2021

INDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	5
CÁNCER DE OVARIO	5
Factores de riesgo	5
Diagnóstico	6
Tratamiento	6
Profilaxis	8
Clasificación patológica.....	8
Estadios del cáncer de ovario	9
Origen del cáncer epitelial.....	10
MICROAMBIENTE TUMORAL.....	10
Ascitis.....	11
Metástasis.....	12
CAPÍTULO I: TEJIDO ADIPOSO Y EPIPLÓN.....	14
Componentes del epiplón	16
Composición inmunológica del epiplón	16
Linfocitos T $\gamma\delta$	17
Células linfoides innatas (ILC)	20
Citocinas en cáncer.....	22
JUSTIFICACIÓN	23
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS	24
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN	39
LIMITACIONES	49
CONCLUSIÓN	49
PERSPECTIVAS.....	50
CAPÍTULO II: ADIPOCITOS Y OXCT-1	51
INTRODUCCIÓN	51

OBJETIVO.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS	52
RESULTADOS.....	53
Capítulo II: Análisis bioinformático de OXCT-1	53
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIÓN	57
REFERENCIAS.....	59

AGRADECIMIENTOS

Al culminar con este proyecto lleno de experiencias, dificultades y aprendizajes. Por ello, es para mí un verdadero placer utilizar este espacio para expresar mi más sinceros agradecimientos a todas las personas que colaboraron en la realización de esta investigación.

Quiero agradecer en primer lugar a las instituciones que me brindaron su apoyo, a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Debo agradecer de manera especial y sincera a la Dra. Patricia Talamas Rohana por aceptarme para realizar esta tesis bajo su dirección, por su apoyo y confianza en mi trabajo, por haberme facilitado siempre los medios suficiente para llevar a cabo este trabajo y su capacidad para guiar mis ideas ha sido un aporte invaluable, no solamente en el desarrollo de este proyecto, sino también en mi formación como investigador.

Agradezco a mi comité tutorial, al Dr. Victor Tsutsumi y al Dr. Marco A. Vega, por las valiosas contribuciones que realizaron en el trabajo y por el tiempo que dedicaron para revisarlo.

A mis compañeros de laboratorio por la orientación, por el apoyo y por todas esas horas de trabajo juntos, que me permitieron un buen aprovechamiento en esta investigación realizada

A el Dr. Javier Cazares por estar conmigo en esta gran aventura, por su paciencia y dedicación, por su apoyo incondicional y por los consejos brindados tanto a nivel científico como personal. "Gracias por estar aquí"

A todos mis amigos por su confianza, por el gran apoyo, por escucharme y por sus palabras de aliento cuando más lo necesite.

Finalmente, agradezco a mi familia por ser siempre el motor que impulsa mis sueños y esperanzas, por su comprensión, comunicación constante y apoyo. De manera muy especial a mis padres sin su apoyo esta meta no se hubiera logrado. Además,

por estar a mi lado en los días y noches más difíciles compartiendo mis alegrías, angustias, tristezas. Gracias por creer en mí.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mi abuelita Amparo Sánchez (+) por brindarme su amor, su paciencia y a quien admiro por su fortaleza para enfrentar todos los problemas.

Se la dedico también a mis padres Jesús y Reyna por su paciencia, amor y esfuerzo que me ha permitido llegar a cumplir este gran sueño, y a mis hermanos Jesús y Montserrat, por estar conmigo siempre y permitirme llevar a cabo todos mis sueños e impulsarme para lograrlos.

RESUMEN

El cáncer de ovario (CaOv) es la neoplasia ginecológica más letal a nivel mundial. Por lo general, se diagnostica en etapas tardías, después de que los tumores se han diseminado dentro de la cavidad peritoneal principalmente al epiplón, lo que limita la eficacia al tratamiento. El epiplón es un tejido adiposo visceral, compuesto principalmente por adipocitos, y otras células, entre ellas, células del sistema inmune predominantemente de tipo innato, como las Células Linfoides Innatas (ILC, por sus siglas en inglés) y los linfocitos T $\gamma\delta$, los cuales se encuentran abundantemente dentro de este tejido. En el contexto tumoral, se han descrito funciones antitumorales y/o protumorales para estas poblaciones celulares. A la fecha se desconoce el papel de las células T $\gamma\delta$ e ILCs en el epiplón, específicamente durante el desarrollo del CaOv. Por lo tanto, el objetivo del presente proyecto fue caracterizar fenotípicamente las ILCs y linfocitos T $\gamma\delta$ en el epiplón de un modelo murino inmunocompetente de CaOv.

Analizamos mediante citometría de flujo las proporciones de ambas poblaciones linfoides en el epiplón a diferentes tiempos de desarrollo de la enfermedad, obteniendo una tendencia sin ser estadísticamente significativa, un aumento en la proporción de Linfocitos T $\gamma\delta$ a las 16 semanas de enfermedad comparado con el control. En el caso de las ILCs, observamos una tendencia sin ser significativa, en la disminución en la proporción de ILCs y del subgrupo ILC2s a partir de las 5 semanas del desarrollo tumoral, comparado con el control. Además, se realizaron ensayos de detección de citocinas por citometría de flujo (CBA) de muestras provenientes del epiplón, suero y líquido ascítico de los ratones en ambas condiciones, encontrando niveles elevados de las citocinas analizadas en el epiplón.

En conclusión, observamos que después de la inoculación intraperitoneal con células tumorales de cáncer de ovario, el primer sitio afectado por la metástasis fue el epiplón. Dentro de este tejido se observó un microambiente inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos T $\gamma\delta$ y una disminución en las ILC2, así como también un aumento en las citocinas IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17.

Por otra parte, se conoce que los adipocitos pueden influir en el desarrollo tumoral debido a que pueden liberar ácidos grasos a través de la lipólisis y éstos son transformados durante la cetólisis para la obtención de ATP, siendo una fuente de energía para las células tumorales. Una de las enzimas claves del metabolismo de los cuerpos cetónicos es la proteína OXCT-1 que cataliza el primer paso de la cetólisis, el producto de OXCT-1 se convierte en acetil-CoA que finalmente alimenta al ciclo del ácido tricarboxílico para la oxidación y producción de ATP. Por lo tanto, se realizaron análisis bioinformáticos de esta proteína y se encontró un dominio conservado de transferasa. Además, se realizó un interactoma, obteniendo asociaciones con proteínas implicadas en el metabolismo de lípidos; se hizo una predicción acerca de la vías metabólicas en las que está involucrada esta proteína, resultando en la síntesis y degradación de cuerpos cetónicos. Hasta este momento, se necesitan más estudios para conocer el papel preciso de esta proteína en el cáncer de ovario.

ABSTRACT

Ovarian cancer is the most lethal gynecological neoplasm in the world. It is usually diagnosed in late stages, after the tumors have spread within the peritoneal cavity mainly to the omentum, limiting the efficacy of treatment. The omentum is a visceral adipose tissue, composed mainly of adipocytes, and other cells, including predominantly innate cells of the immune system, such as Innate Lymphoid Cells (ILC) and $\gamma\delta$ T lymphocytes, the which are found abundantly within this tissue. In the tumor context, antitumor and / or protumoral functions have been described for these cell populations. To date, the role of $\gamma\delta$ T cells and ILCs in the omentum, specifically during the development of CaOv, is unknown. Therefore, the objective of the present project was to characterize phenotypically the ILCs and $\gamma\delta$ T lymphocytes in the omentum of an immunocompetent murine model of CaOv.

We analyzed by flow cytometry the proportions of both lymphoid populations in the omentum at different times of development of the disease, obtaining a trend without being statistically significant, an increase in the proportion of $\gamma\delta$ T lymphocytes at 16 weeks of disease compared to the control. In the case of ILC, we observed a trend without being significant, in the decrease in the proportion of ILC and the ILC2 subgroup after 5 weeks of tumor development, compared to the control. In addition, cytokine detection assays were performed by flow cytometry (CBA) of samples from the omentum, serum and ascites fluid of the mice under both conditions, finding high levels of the cytokines analyzed in the omentum.

In conclusion, we observed that after intraperitoneal inoculation with ovarian cancer tumor cells, the first site affected by metastasis was the omentum. Within this tissue an inflammatory microenvironment composed mainly of $\gamma\delta$ T lymphocytes and a decrease in ILC2 was observed, as well as an increase in the cytokines IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL- 2, IL-4, IL-17.

On the other hand, it is known that adipocytes can influence tumor development because they can release fatty acids through lipolysis and these are transformed during ketolysis to obtain ATP, being a source of energy for tumor cells. One of the key enzymes of ketone body metabolism is the OXCT-1 protein that catalyzes the

first step of ketolysis, the product of OXCT-1 is converted into acetyl-CoA that ultimately feeds the tricarboxylic acid cycle for oxidation and production of ATP. Therefore, bioinformatic analyzes of this protein were performed and a conserved transferase domain was found. In addition, an interactome was performed, obtaining associations with proteins involved in lipid metabolism; A prediction was made about the metabolic pathways in which this protein is involved, resulting in the synthesis and degradation of ketone bodies. Until now, more studies are needed to understand the precise role of this protein in ovarian cancer.

INTRODUCCIÓN

CÁNCER DE OVARIO

El cáncer de ovario es un problema de salud pública debido a que se considera la neoplasia ginecológica más letal en el mundo. Según GLOBOCAN, en el año 2020 se estimaron aproximadamente 313,959 de casos nuevos de cáncer de ovario en la población mundial, además este cáncer es el responsable de 207,252 decesos anuales (Sung *et al.*, 2021) convirtiéndose en el séptimo cáncer más común y la octava causa más frecuente de muerte relacionada con cáncer en las mujeres de todo el mundo (Lisio *et al.*, 2019).

Estas cifras reflejan, en parte, la falta de biomarcadores predictivos, es decir, de opciones de detección temprana, ya que los síntomas y signos son diversos e inespecíficos, lo cual puede repercutir negativamente en el diagnóstico de la enfermedad y en el pronóstico de las pacientes. Cabe mencionar, que la tasa de supervivencia a 5 años en aquellas pacientes diagnosticadas en estadio I, es del 90%. En aquellas con enfermedad regional (propagación en tejidos adyacentes), las tasas de supervivencia a 5 años son alrededor del 80% y en aquellas con enfermedad metastásica es del 25% (C. Stewart *et al.*, 2019) .

Factores de riesgo

En general, existen diferentes factores que pueden conducir al desarrollo de cáncer de ovario. Las mutaciones en la línea germinal BRCA 1/2 (*Breast Cancer 1/2*) representan alrededor del 14.1 % en pacientes con cáncer de ovario, convirtiéndose en uno de los principales factores genéticos predisponentes a esta enfermedad (Alsop *et al.*, 2012). Además, existen otras mutaciones involucradas en la reparación del DNA que pueden incrementar el riesgo a desarrollar cáncer de ovario, como TP53 (Walsh *et al.*, 2011) RAD51D (Norquist *et al.*, 2016), MRE11A (Walsh *et al.*, 2011) y algunos genes involucrados en la vía de la anemia de Fanconi-BRCA (Pennington & Swisher, 2012). Otros factores incluyen la nuliparidad, infertilidad, terapia hormonal posmenopáusica y la edad (Matulonis *et al.*, 2016).

Diagnóstico

Actualmente, no existen métodos de detección fiables para el cáncer de ovario, debido a que la prueba sérica del antígeno del cáncer 125 (CA-125) es inespecífica para esta enfermedad y los estudios de radiología (por ejemplo, ecografía transvaginal, ecografía abdominal, resonancia magnética y/o tomografía por emisión de positrones mejor conocida como PET) no son factibles y sensibles. Sin embargo, la combinación de varias pruebas de diagnóstico puede ayudar a la detección del cáncer de ovario. Además, se ha utilizado la inmunohistoquímica para la diferenciación de los subtipos de carcinoma epitelial contra otros cánceres, debido a que su morfología puede ser muy similar. Por tanto, se utilizan estas tinciones para su identificación (por ejemplo, la tinción para citoqueratina 7 y 20), ayudando a detectar el carcinoma de ovario, el cual a menudo se confunde con tumores gastrointestinales (Lengyel, 2010). En etapas más avanzadas de la enfermedad se puede detectar líquido ascítico dentro de la cavidad abdominal, y para corroborar el diagnóstico se puede realizar una biopsia de tejido (Rojas *et al.*, 2016).

Tratamiento

Durante décadas, la cirugía citorreductora y los agentes quimioterapéuticos combinados con platino-taxano, han sido los pilares en el tratamiento (Piver, 2006). La primera consiste en la extracción macroscópica total de todas las masas neoplásicas diseminadas contenidas dentro de la cavidad peritoneal. Cabe señalar, que el éxito de la cirugía es proporcional al estadio de salud en el que se encuentre la paciente, obteniendo mejores resultados en etapas tempranas del cáncer. La quimioterapia combinada con platino o quimioterapia neoadyuvante se recomienda después de una cirugía citorreductora exitosa. En algunos casos, no se requiere ningún tratamiento adicional postcirugía ya que el diagnóstico es un tumor localizado (estadio I). Sin embargo, la mayoría de las pacientes que se someten a quimioterapia tendrán una respuesta inicial, pero eventualmente recaerán, desarrollando una enfermedad resistente a la quimioterapia (Odunsi, 2017). Actualmente, se están investigando nuevos tratamientos, como los inhibidores de la

angiogénesis, inhibidores de PARP (polimerasas de poli (ADP-ribosa)) e inmunoterapia.

PARP es una familia de enzimas que catalizan la transferencia de ADP-ribosa a proteínas diana (poli ADP-ribosilación); estas enzimas tienen diferentes funciones en varios procesos biológicos, como es la modulación de la estructura de la cromatina, la transcripción y la replicación, entre otros. En el contexto tumoral, los inhibidores de PARP conducen a un aumento del daño del ADN, particularmente en tumores con defectos existentes en la reparación del ADN (Morales *et al.*, 2014; Stewart *et al.*, 2018).

Una alternativa para el tratamiento en pacientes con cáncer de ovario es dirigirse al sistema inmunológico, así, la inmunoterapia con linfocitos T $\gamma\delta$ se ha considerado un blanco para la transferencia celular adoptiva debido a que estas células ejercen actividades antitumorales. Esta terapia consiste en la expansión *ex vivo* de células T, previamente obtenidas y aisladas del tumor o de sangre periférica de un paciente, posteriormente estas células expandidas son reintroducidas al paciente junto con IL-2 recombinante después de una depleción linfoide a través de quimioterapia, todo ello, con el propósito de estimular la actividad antitumoral de los linfocitos autólogos y evitar la supresión inmunológica (McCloskey *et al.*, 2018).

Sin embargo, la eficiencia de la inmunoterapia es limitada (20%). Además, otros estudios destacan que estas células pueden tener un efecto dual, es decir, pueden tener actividades protumorales que le ayudan a las células cancerosas a la progresión del tumor (Zhao *et al.*, 2018). En un informe se demostró que el subgrupo de linfocitos T V γ 9V δ 2 tenían una alta actividad lítica en diferentes líneas celulares. Asimismo, realizan funciones relevantes en la inmunidad infecciosa y la vigilancia antitumoral. Por esta razón, los linfocitos T $\gamma\delta$ se han convertido en células efectoras atractivas para la inmunoterapia en cáncer. Sin embargo, aún faltan estudios para la aprobación de esta terapia contra el cáncer. Una limitante es el uso repetido de fosfoantígenos que puede provocar grandes daños en las células efectoras, también puede inducir reacciones adversas significativas, dando como resultado progresión

tumoral (Zou *et al.*, 2017). Por todo lo anterior, la comunidad científica busca en la inmunoterapia activar la función antitumoral y atenuar la supresión inmunológica.

Profilaxis

Como se mencionó anteriormente, no existen métodos eficientes para la detección temprana del cáncer de ovario. Sin embargo, para pacientes con alto riesgo de desarrollar cáncer de ovario, así como mutaciones en la línea germinal BRCA1 o BRCA2 y otros genes implicados en esta enfermedad, se han implementado estrategias quirúrgicas para reducir el riesgo de padecer esta neoplasia. Una de ellas es la salpingooforectomía bilateral, que tiene como objetivo extirpar los ovarios y las trompas de Falopio (Matulonis *et al.*, 2016).

Clasificación patológica

La clasificación se basa en el origen celular del tumor, a saber, de tres tipos: células epiteliales, células estromales y células germinales. Cada categoría incluye subtipos. Además, existen combinaciones de dos o más subtipos, conocidos como tumores mixtos (Reid *et al.*, 2017).

Los tumores de origen epitelial presentan la mayor incidencia y mortalidad en comparación con otros tipos de cáncer de ovario, en esta categoría se incluyen cuatro subtipos (histotipo) principales que han sido clasificados por los patólogos con relación a la morfología de las células tumorales: seroso, mucinoso, endometriode, y de células claras. El histotipo seroso puede dividirse en bajo grado y el de alto grado, siendo éste el más frecuente, con alrededor del 70% de todos los casos de carcinomas epiteliales, se presenta en pacientes de edad adulta y tiene un peor pronóstico en comparación a el de bajo grado (Kaku *et al.*, 2003; Ramalingam, 2016).

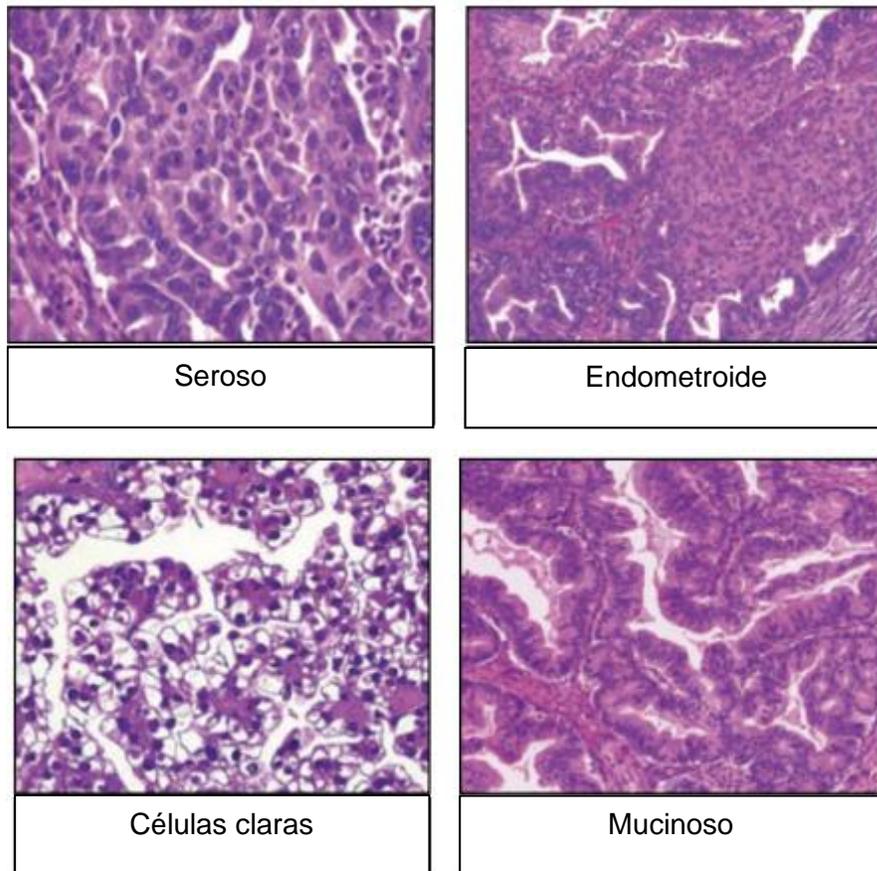


Figura 1. Histotipos en el carcinoma ovárico epitelial, utilizando la tinción H & E. Modificado de: (Rescigno *et al.*, 2013).

Estadios del cáncer de ovario

Además de la clasificación histopatológica, existe otra subclasificación, propuesta en 2014, por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO), ésta se basa según el grado de diseminación del tumor en el momento del diagnóstico. En el estadio I, el cáncer todavía se localiza en los ovarios ó en las trompas de Falopio. En el estadio II, el cáncer se ha expandido a otros órganos dentro de la cavidad abdomino-pélvica, por ejemplo, al útero. En el estadio III, el cáncer ha invadido más allá de la pelvis a órganos ó tejidos dentro de la cavidad peritoneal ó a los ganglios linfáticos retroperitoneales. En el estadio IV, la diseminación sobresale la cavidad peritoneal, esto incluye los pulmones y la afectación de los ganglios linfáticos inguinales y otros ganglios linfáticos extra abdominales. La etapa más avanzada de la enfermedad se puede caracterizar por una obstrucción

intestinal maligna debido a la formación de adherencias fibrosas entre las asas del intestino por los tumores metastásicos. Dentro de las complicaciones a largo plazo para la paciente se encuentran alteraciones alimentarias, causando caquexia, desnutrición y, finalmente, la muerte por factores que pueden incluir una infección intercurrente (Roett & Evans, 2009; Prat & Oncology, 2015).

Origen del cáncer epitelial

Cada uno de los subtipos de los carcinomas epiteliales presenta una alta similitud con las células no malignas que recubren los diferentes órganos del tracto genital femenino; se cree que esto se debe a que estos epitelios derivan de un precursor embriológico común, el mesotelio celómico. En el caso de los tumores serosos, endometrioides y mucinosos, éstos presentan morfologías similares a las células epiteliales no malignas en la Trompa de Falopio, el endometrio y en el endocérvix, respectivamente, a pesar de que el ovario normal no tiene componentes que sean similares a estos tumores (Chen *et al.*, 2003). Una teoría alternativa, describe que los tumores seroso, endometriode y de células claras, derivan del tejido de tipo Müller y no del mesodermo como se pensaba antes, debido a que las trompas de Falopio, el útero y el endometrio proceden de los conductos de Müller; en cambio, el ovario surge del epitelio mesodérmico en la cresta urogenital distante de los conductos de Müller (Dubeau, 2008).

Por otro lado, en el año 2008 se propuso que existe una área de transición epitelial que es susceptible a la conversión maligna, que se asemeja al área de transición del ectocérvix y el endocérvix (Auersperg *et al.*, 2008) .

MICROAMBIENTE TUMORAL

El sistema inmunitario es capaz de contrarrestar el crecimiento y proliferación de las células tumorales por un proceso denominado inmunovigilancia, donde puede reconocer, controlar y eliminar a las células malignas (Rodríguez *et al.*, 2018). Desafortunadamente, se ha reportado que la respuesta antitumoral en pacientes con cáncer de ovario epitelial es deficiente debido a que dentro del microambiente tumoral se encuentran células inmunosupresoras, promoviendo la progresión del

cáncer. Entre los componentes del microambiente tumoral se incluye a fibroblastos, adipocitos en el epiplón, así como células inmunitarias que pueden participar en el microambiente tumoral como promotoras o inmunosupresoras (linfocitos T y B reguladores y efectores, células NK, macrófagos, células mieloides supresoras y linfocitos T $\gamma\delta$) (McCloskey *et al.*, 2018).

Ascitis

Un espacio en el que se presenta un microambiente tumoral es la ascitis ó líquido ascítico, se encuentra en mujeres con cáncer de ovario, ocasionado por una acumulación de grandes volúmenes de líquido en la cavidad abdominal (Penet *et al.*, 2018).

En general, la ascitis está relacionada con un mal pronóstico para los pacientes. Existen diversas causas para el desarrollo del líquido ascítico, que pueden ser no malignas o malignas, entre ellas se incluye, la cirrosis, insuficiencia cardiaca congestiva, nefrosis, pancreatitis, peritonitis, neoplasias malignas primarias o metástasis hepáticas (Sangisetty & Miner, 2012).

Con respecto al cáncer de ovario, generalmente en los estadios IIIC y IV, se produce la acumulación del líquido ascítico en la cavidad abdominopélvica. La ascitis consta de elementos celulares y elementos solubles (Prat & Oncology, 2015). En el caso de los componentes celulares se incluyen fibroblastos, células mesoteliales, células estromales derivadas de tejido adiposo, células endoteliales, adipocitos, células inflamatorias y un repertorio de leucocitos. Dentro de los componentes solubles, se tienen citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, etc., factores angiogénicos y de crecimiento como TGF- β , EGF, VEGF, etc., componentes de la matriz extracelular y exosomas, los cuales son mediadores de comunicación celular (Cohen *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2016).

La formación del líquido ascítico se debe a que las células neoplásicas proliferan e invaden el mesotelio, que posteriormente conlleva a un incremento en la permeabilidad vascular, lo que conduce a una desregulación de la presión oncótica y además, el desprendimiento de las células tumorales trae consigo la obstrucción

del sistema linfático regional, provocando así una acumulación de líquido ascítico en la cavidad peritoneal (Sangisetty & Miner, 2012).

El incremento en la permeabilidad vascular principalmente se da por la desregulación del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que induce la proliferación celular, migración, inhibición de apoptosis, angiogénesis y la permeabilización de los vasos sanguíneos. El mecanismo consiste en la regulación a la baja de la proteína claudina 5 en el endotelio peritoneal, lo que trae como consecuencia un aumento de la permeabilidad peritoneal mediada por VEGF; también otro mecanismo implicado en ello es la fosforilación de tirosina del complejo cadherina-catenina inducida por VEGF, que provoca un aumento de la permeabilidad. Existen diferentes factores que pueden contribuir a la secreción de VEGF en el cáncer de ovario, entre ellos se incluye la hipoxia, el ácido lisofosfatídico, el factor de necrosis tumoral (TNF), la ciclooxigenasa 1, metaloproteinasas de matriz y diversos factores de crecimiento (Kipps *et al.*, 2013).

Metástasis

La metástasis es un proceso por el cual las células tumorales se diseminan a partir de un tumor primario hacia tejidos circundantes y órganos distantes. Este proceso suele ser la causa principal de muerte en aproximadamente 90% de las personas con cáncer (Yousefi *et al.*, 2017). En el cáncer de ovario, la metástasis se puede llevar a cabo por la vía transcelómica o por vía hematógica (Yousefi *et al.*, 2020).

Con respecto a la metástasis transcelómica, ésta ocurre en distintas etapas y afecta generalmente órganos vitales dentro del sistema gastrointestinal y genitourinario. El primer paso es el desprendimiento de las células cancerosas de la superficie ovárica. Después del desprendimiento, las células tumorales flotan en el líquido ascítico para migrar a la cavidad peritoneal y al epiplón. Cabe señalar que esto solo ocurre cuando se acumula una cantidad excesiva de líquido ascítico en el peritoneo. Las células tumorales pueden flotar como células individuales o en mayor parte como esferoides multicelulares. Estos esferoides pueden formarse por agregación de células tumorales o por gemación directa. Además, tienen diferentes ventajas sobre células individuales. Por ejemplo, los esferoides son menos sensibles a los

efectores inmunes antitumorales, exhiben resistencia a los agentes quimioterapéuticos, tienen una mayor capacidad para interactuar con los componentes de la matriz extracelular y las células mesoteliales, facilitando la invasión en el mesotelio y su posterior implantación. Inmediatamente después de la implantación de células de cáncer de ovario, la inflamación y la lesión promueven que las células mesoteliales, células inmunes y estromales asociadas secreten citocinas como la interleucina IL-1, IL-6 e IL-8, que mejoran la angiogénesis tumoral y estimulan la formación de ascitis a través de una secreción elevada de VEGF, favoreciendo el crecimiento de los implantes. Por último, se lleva a cabo el crecimiento de las células tumorales en los sitios secundarios (Yousefi *et al.*, 2020).

Durante mucho tiempo se ha asumido que la vía directa es responsable del desarrollo de la enfermedad metastásica. Sin embargo, en un estudio que utilizó un modelo de parabiosis murino (dos ratones, uno con cáncer de ovario y otro sin cáncer, que comparten un suministro de sangre), se demostró que el cáncer de ovario epitelial tiene preferencia por hacer metástasis en el epiplón mediante la vía hematogena a partir del tumor primario y luego diseminarse a otras superficies peritoneales. Además, en el silenciamiento del eje de señalización del receptor del factor de crecimiento epidérmico 3 (ErbB3, por sus siglas en inglés) / Neuregulina 1 (NRG1 por sus siglas en inglés) utilizando pequeños ARN de interferencia (siRNA), se presentó una disminución en la propagación en la metástasis, por lo que este eje podría estar jugando un papel importante en este evento (Pradeep *et al.*, 2014).

Para una progresión exitosa de los tumores primarios hacia metastásicos, las células epiteliales, antes de desprenderse del tumor, deben someterse a una transición epitelio-mesénquima para facilitar la adhesión al sitio secundario, entre los más comunes se incluye el peritoneo y el epiplón. Esta transición se caracteriza por la ausencia de la expresión de E-cadherina, modificando su regulación positiva hacia otras cadherinas, una de las más comunes en esta transición es la N-cadherina (Huber *et al.*, 2005). Posteriormente estas células cancerosas pueden sobrevivir y proliferar en condiciones de hipoxia adquiriendo un fenotipo invasivo

(Imai *et al.*, 2003). Por otro lado, aun no se conoce completamente si la ascitis se encuentra presente al inicio de la metástasis o si está presente en etapas más avanzadas de la enfermedad (Cannistra, 2004).

CAPÍTULO I: TEJIDO ADIPOSO Y EPIPLÓN

Se considera que el epiplón es el principal sitio de metástasis por las células del cáncer de ovario. El epiplón es un tejido adiposo visceral, en humanos se localiza en el estómago y se extiende cubriendo al intestino, y actúa como un órgano endocrino (Figura 3-B) (Dai *et al.*, 2020). El epiplón humano funciona como un regulador de la homeostasis peritoneal, además, regula el transporte de líquidos y solutos, actividades angiogénicas, elimina patógenos, es fuente de células madre, produce moléculas reguladoras y almacena y suministra lípidos (Clark *et al.*, 2013).

Curiosamente, en el ratón, el epiplón es un depósito pequeño de tejido adiposo y esta interconectado con el páncreas (Figura 3-A). Mientras que el epiplón humano es de mayor tamaño, similar a un delantal que cubre los órganos abdominales y es un depósito importante de grasa abdominal. Sin embargo, el epiplón de ratones y el de humanos tienen similitudes en su composición y función (Khan *et al.*, 2010).

El tejido adiposo se puede dividir en tres principales tipos según su histología: tejido adiposo blanco, un órgano inmunocompetente complejo que representa la mayor proporción de masa adiposa en el cuerpo humano (95%), tejido adiposo café ó marrón, constituye el 1-2% de la grasa en humanos y tejido adiposo beige/*brite*, constituido por células intercaladas dentro del tejido adiposo blanco, las cuales tienen la capacidad de transformarse en adipocitos marrón en condiciones de frío o estimulación adrenérgica; son difíciles de cuantificar. Además de los adipocitos, el tejido adiposo está compuesto por preadipocitos, células madre mesenquimales, células vasculares y células inflamatorias (Del Corno *et al.*, 016; Kahn *et al.*, 2019). En cuanto a su función, el tejido adiposo está involucrado en la regulación del balance energético a través de sus actividades metabólicas, celulares y endocrinas (Lee *et al.*, 2014). El tejido adiposo blanco alberga células inmunitarias que secretan factores proinflamatorios o antiinflamatorios, por lo tanto, se considera al tejido

adiposo como un regulador de la homeostasis inmunitaria y de las actividades metabólicas, alterando su funcionalidad en el tejido de pacientes con obesidad (Del Corno *et al.*, 2018). El tejido adiposo se ubica debajo de la piel y también en diferentes depósitos como músculos, intestinos, epiplón y médula ósea (Figura 2) (Dai *et al.*, 2020).

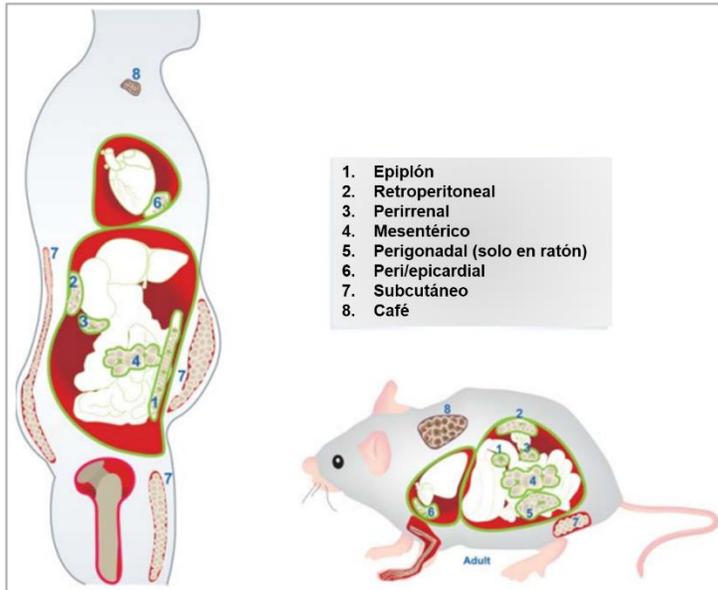


Figura 2. Localización de depósitos de tejido adiposo humano y murino. Modificada de: (Cleal *et al.*, 2017).

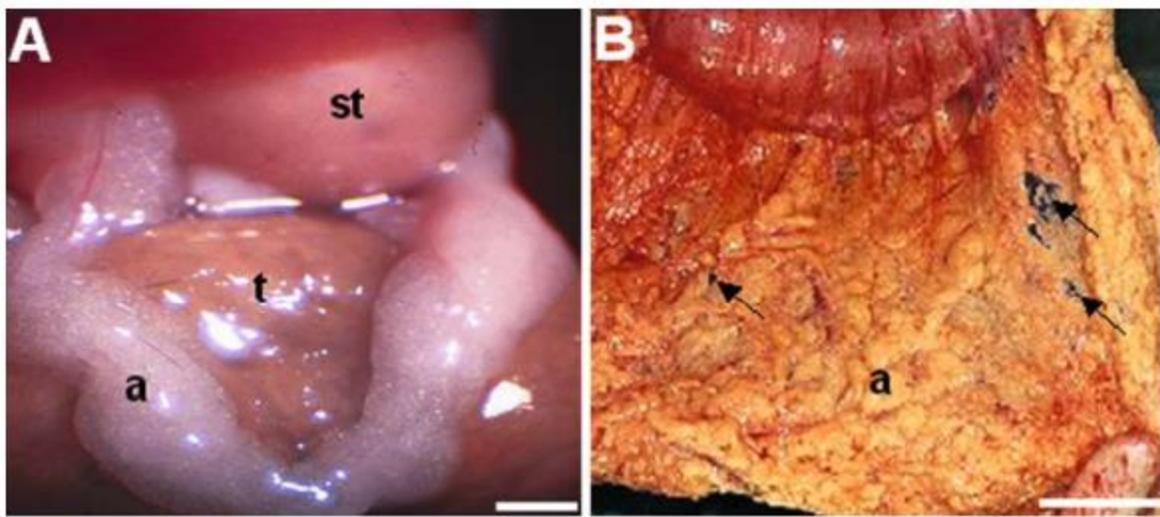


Figura 3. Comparación del aspecto macroscópico entre el epiplón murino y el humano. A) El epiplón murino se extiende desde la curvatura mayor del estómago (st) y está compuesto por un área translúcida (t) rodeada por un borde rico en tejido adiposo (a). B) En el epiplón humano, hay pocas áreas translúcidas (flechas) pero muchas áreas de tejido adiposo (a) están presentes. Modificado: (Wilkosz *et al.*, 2005).

Componentes del epiplón

El epiplón está compuesto de una membrana transparente de colágeno, además, la mayor parte está compuesto por adipocitos, vasos sanguíneos o linfáticos, células inmunitarias, células estromales y componentes de la matriz (Clark *et al.*, 2013).

Composición inmunológica del epiplón

En términos inmunológicos, de diferentes poblaciones celulares en el tejido adiposo, alrededor del 80-90% son de tipo innato como ILC2, células T asesinas naturales invariantes (iNKT), las células T invariantes asociadas a la mucosa, las células asesinas naturales (NK) y células T $\gamma\delta$, en contraste con los órganos linfoides (Figura 4). Cabe mencionar que las células adaptativas son clave en el tejido adiposo, como las células Treg Foxp3+ (Kohlgruber *et al.*, 2018).

Como se mencionó anteriormente, el tejido adiposo está compuesto principalmente de células de tipo innato. Se demostró que en el tejido adiposo las células T $\gamma\delta$ se encuentran enriquecidas y son residentes de ese tejido tanto en humano como ratón, en comparación con otros sitios como son la sangre, el bazo y el hígado; además observaron que los linfocitos T $\gamma\delta$ son productores de IL-17A y de TNF α , ambas moléculas pueden inducir la producción de IL-33 en células del estroma adiposo. IL-33 es una adipocina que en el tejido adiposo tiene como función inducir la proliferación y el mantenimiento de los linfocitos T reguladores y es capaz de inducir la termogénesis (Kohlgruber *et al.*, 2018). Además, se sabe que las ILC2 responden a la IL-33, las cuales se han mostrado desreguladas en tejido adiposo blanco de humanos y ratones obesos, siendo el eje IL-33/ILC2 responsable de la regulación en la homeostasis metabólica, dando como resultado la aparición y secreción de péptidos de encefalina (Brestoff *et al.*, 2015). Por otro lado, se identificó una población única de ILC1 residentes en tejido adiposo, la cual prolifera y se acumula en este sitio por IL-12. También, demostraron que la producción de IFN- γ por estas células, induce la polarización de macrófagos proinflamatorios en el tejido adiposo y contribuye a la resistencia a la insulina relacionada con obesidad (O'Sullivan *et al.*, 2016).

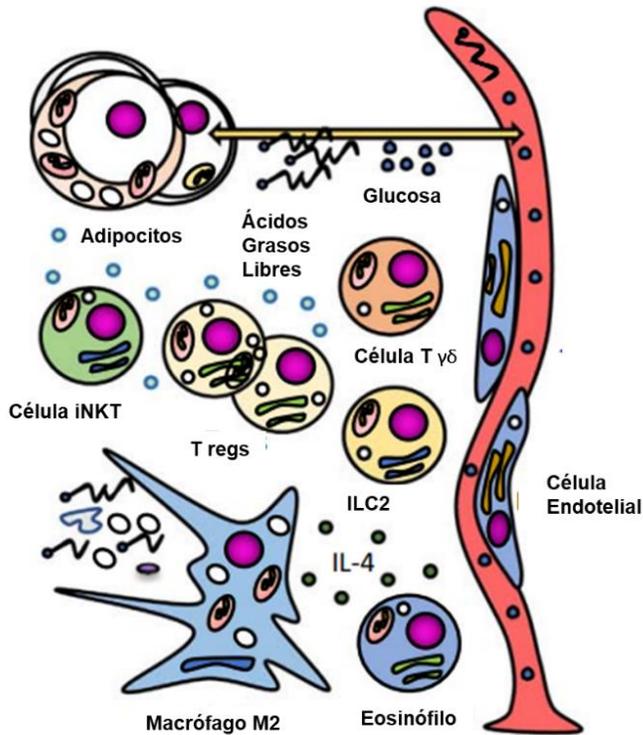


Figura 4. Componentes inmunológicos en el tejido adiposo. Modificado de: (Kane & Lynch, 2019).

Linfocitos T $\gamma\delta$

Los linfocitos T $\gamma\delta$ son un subgrupo de linfocitos T que presentan el TCR1 en su superficie, presentan funciones tanto innatas como adaptativas. El TCR de estos linfocitos está compuesto por dos cadenas de glicoproteínas, una cadena γ y una cadena δ . Además, pueden expresar receptores *natural killer*, como NKG2D. Usualmente no expresan marcadores de linaje, como CD4 o CD8 (Wu *et al.*, 2014).

Representan un pequeño subconjunto de linfocitos T no convencionales (1-10% en sangre). Sin embargo, los linfocitos T $\gamma\delta$ en la mucosa intestinal se encuentran enriquecidos, por ello, son conocidos como “linfocitos intraepiteliales” (Zhao *et al.*, 2018).

En los ratones, los linfocitos T $\gamma\delta$, se clasifican según la expresión de la región variable de su cadena γ , por lo tanto, se conocen V γ 1, V γ 4, V γ 5, V γ 6, V γ 7. Los linfocitos V γ 5 se encuentran exclusivamente en el ratón, no existe una contraparte

en humanos. Por otro lado, los subconjuntos V γ 1, V γ 4, V γ 6 son productores de IL-17. Además, la mayoría del subconjunto V γ 1 expresa la cadena V δ 6, adquiriendo características de las células NK (Bonneville *et al.*, 2010; Pellicci *et al.*, 2020). Mientras que en humanos se clasifican con base a la expresión de la cadena δ , dividiéndose en 4 poblaciones, a saber: δ 1, δ 2, δ 3, δ 5 (Figura 6) (Lafont *et al.*, 2014). Existe otra clasificación, basándose en su función: las células T efectoras $\gamma\delta$ y células T reguladoras $\gamma\delta$. Las primeras ejercen actividades antitumorales al secretar diferentes citocinas y también ejercen actividades citotóxicas dependientes de anticuerpos, mientras que las segundas son conocidas también como células T $\gamma\delta$ supresoras, debido a que pueden alterar la función de las células efectoras, resultando en el crecimiento tumoral (Zhao *et al.*, 2018).

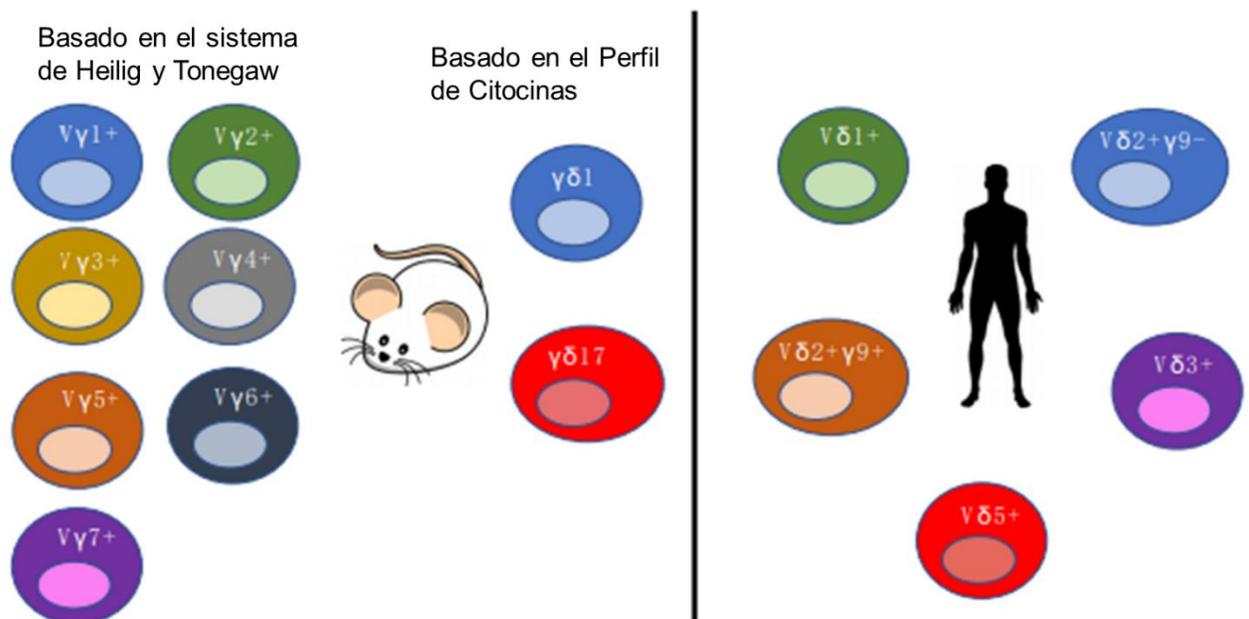


Figura 5. Representación esquemática de las diferentes poblaciones de células T $\gamma\delta$ en ratones y humanos y cómo se clasifican las células T $\gamma\delta$. Modificado de: (Xu *et al.*, 2020).

En general, los linfocitos T $\gamma\delta$ murinos ejercen diversas funciones, por ejemplo, los T V γ 1, participan en la inflamación del pulmón, inhiben el desarrollo de los T reg, entre otras funciones. Los T V γ 4 son productores de IL-17, IFN, TNF, en algunos tejidos pueden promover la inflamación y están implicados en la eliminación de bacterias. Los T V γ 5, promueven la reparación de tejidos y la cicatrización, protegen

contra la carcinogénesis cutánea. Los T V γ 6 participan en la inhibición de la nefritis y previenen la fibrosis pulmonar. Los T V γ 7, se encuentran exclusivamente en intestino y entre sus funciones está la promoción del recambio de células epiteliales, y previenen la colitis (Bonneville *et al.*, 2010).

En el contexto tumoral, a los linfocitos T $\gamma\delta$ se les han atribuido funciones duales, debido a que tienen la capacidad de reconocer y destruir a las células tumorales por su función lítica, independientemente del Complejo Principal de Histocompatibilidad (MHC). Además, poseen una gran capacidad de secretar citocinas, entre las principales se incluye a IFN- γ e IL-17 (Chen *et al.*, 2019). Las funciones efectoras citotóxicas de IFN- γ contra infecciones y tumores, dotan a las células T $\gamma\delta$ de una potente actividad antitumoral, (Rei *et al.*, 2014). Mientras que la IL-17A se ha reportado que tiene un papel inmunitario en el crecimiento tumoral. Asimismo, se demostró que la IL-17A estaba sobre expresada en diferentes tipos de cáncer: de cuello uterino, de mama, de hígado (carcinoma hepatocelular), de pulmón (células no pequeñas) y de páncreas (Chen *et al.*, 2019) . Además, pueden ser capaces de reclutar células supresoras derivadas de mieloides (MDSC), que contribuyen a la progresión tumoral de diversos tipos de cáncer (de mama, de esófago, colorrectal), siendo consideradas estas células como objetivos atractivos para la inmunoterapia (Zhao *et al.*, 2018). También pueden modular positivamente la expresión de Fas y TRAIL, dando como resultado una mejoría en la actividad lítica en tumores sensibles a estos receptores (Fas o TRAIL). Otra función antitumoral de los linfocitos T $\gamma\delta$ consiste en su capacidad para modular la apoptosis debido a la secreción de granzima y perforina (Zou *et al.*, 2017).

Actualmente no se han realizado muchos estudios en donde se investigue el papel de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el cáncer de ovario. En un estudio se reportó que las células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 son capaces de reclutar macrófagos peritoneales pequeños, dando como resultado una proliferación de células malignas (Rei *et al.*, 2014).

Células linfoides innatas (ILC)

Las células linfoides innatas (ILC) son una población que proviene de un precursor linfoide común. Estas células carecen de receptores específicos de antígeno, ya sea TCR o BCR generados por recombinación genética. Pero tienen la capacidad de reaccionar con mayor rapidez a las señales, o citocinas inductoras, expresadas por células residentes del tejido, en comparación a los linfocitos T, que pueden tardar varios días, debido a que se deben someter a la expansión clonal (Vivier *et al.*, 2018). Presentan en su membrana diferentes receptores de citocinas y alarminas. Además, son consideradas las contrapartes innatas de los linfocitos T en la inmunidad. Para poder ser activadas las ILC requieren de señales que provengan indirectamente de patógenos o de otras poblaciones celulares, como células tumorales; una vez activadas son capaces de secretar diferentes moléculas solubles que median las funciones de células efectoras (Trabanelli *et al.*, 2018). Cabe señalar que las ILC2, que expresan moléculas MHC de tipo II, pueden interactuar con los linfocitos T específicos de antígeno para su regulación (Oliphant *et al.*, 2014).

Inicialmente las ILC se habían dividido en 3 grupos, con base en la expresión de los factores de transcripción y de las funciones similares a los subconjuntos de linfocitos T cooperadores, a saber, ILC1, ILC2, ILC3. Sin embargo, actualmente se categorizaron en 5 subconjuntos según su función y desarrollo, incluidos los grupos anteriormente mencionados, células NK y células inductoras de tejido linfoide (Lim & Di Santo, 2019). Con respecto a la expresión de los factores de transcripción, las ILC1 necesitan al factor de transcripción T-bet para cumplir con su función y desarrollo, además son capaces de secretar IFN- γ . En el caso de las ILC2 necesitan de los factores GATA3 y ROR α , y pueden producir IL-5 e IL-13. En las células ILC3 necesitan del factor de transcripción ROR γ t, y pueden secretar IL-22 y/o IL-17 (Ghaedi & Ohashi, 2020).

En términos de su función, las células ILC1 son muy similares a las Th1, ya que ejercen actividades contra patógenos intracelulares y tumores. Mientras que las células ILC2 se asemejan a las Th2, porque reaccionan en contra de alérgenos y

parásitos extracelulares, además están implicadas en la termogénesis y pueden regular a las células epiteliales, tras la producción de anfirregulina. Por último, las células ILC3 tienen similitud a las Th17, actuando contra microorganismos extracelulares, por ejemplo, bacterias y hongos. También cuando son activadas las células epiteliales, las ILC3 pueden regular la tolerancia a las toxinas y algunas irradiaciones (Figura 7). Desafortunadamente, algunas de estas funciones pueden desencadenar el desarrollo tumoral o incrementar la inflamación debido a la presencia de patógenos (Vivier *et al.*, 2018).

Las ILC tienen diferentes funciones en el proceso del cáncer. La ILC1 presenta funciones antitumorales debido a que pueden secretar o expresar citocinas como el IFN- γ , promoviendo la inmunovigilancia y la eliminación del tumor. Desafortunadamente, se ha reportado que en pacientes con cáncer de ovario seroso de alto grado existe una población de células CD56⁺ CD3⁻ capaz de suprimir directamente las respuestas de células T antitumorales (Crome *et al.*, 2017). Las ILC2 juegan un papel protumoral debido a la expresión de IL-13 e IL-12, lo que atrae células supresoras derivadas de mieloides, contribuyendo a la respuesta protumoral en el microambiente debido a que son inmunosupresoras; además pueden expresar anfirregulina, dando como resultado la inhibición de las actividades citotóxicas de las células CD8 en el tumor. Por otro lado, al expresar IL-5 pueden atraer a los eosinófilos o a las células dendríticas que contribuyen al papel antitumoral. Por lo anterior, las ILC2 tienen funciones duales en el cáncer, dependiendo del contexto. En el caso de las ILC3, éstas producen IL-22 o IL-17, las cuales se pueden incrementar en un proceso inflamatorio o de angiogénesis y así contribuir a la diseminación tumoral, además pueden expresar IL-8 para una respuesta antitumoral debido a la infiltración de linfocitos (Ghaedi & Ohashi, 2020).

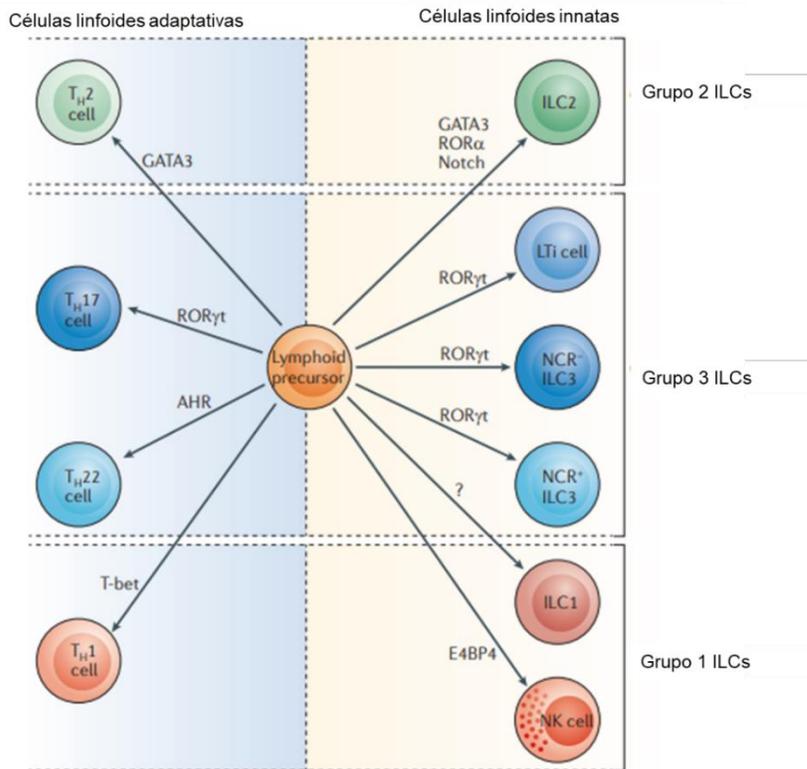


Figura 6. Comparación de subconjuntos de linfocitos T cooperadores e ILC, además, se muestran los factores de transcripción que sirven para la diferenciación de linfocitos T cooperadores e ILC. Modificado de: (Walker *et al.*, 2013).

Citocinas en cáncer

Las citocinas son un grupo amplio de microproteínas secretadas por diferentes células. En particular, existe un subgrupo de ellas, conocido como interleucinas, que actúan como agentes inmunomoduladores en la maduración, diferenciación, migración y adhesión de las células inmunológicas. Aunque pueden ser secretas por numerosas poblaciones, los principales productores son los macrófagos y los linfocitos T cooperadores (Loo & Pui, 2020).

En la actualidad, se ha demostrado que las interleucinas son relevantes en el desarrollo y progresión tumoral (Anestakis *et al.*, 2015). Además, se ha correlacionado la desregulación en los niveles de citocinas con la aparición de varios tipos de cáncer, como el cáncer gástrico y el cáncer colorrectal (Loo & Pui, 2020).

La inflamación crónica puede ser un impulsor en el desarrollo tumoral, como en el cáncer de pulmón, piel, esófago, gástrico, colorrectal y en el carcinoma hepatocelular (Bruni *et al.*, 2020) siendo la IL-1 uno de las más importantes en el

contexto tumoral inducido por la inflamación (Dinarello, 2010), debido a que, impulsa la liberación río abajo de citocinas proinflamatorias como IL-6 y media el reclutamiento de células innatas, desencadenando una cascada de procesos inflamatorios (Mantovani *et al.*, 2019). Asimismo, la sobreexpresión de la IL-6 ha sido relevante en diferentes tipos de cánceres (Loo & Pui, 2020). En un estudio se demostró que la concentración de la IL-6 en individuos sanos era muy baja (Riedel *et al.*, 2005). La desregulación de la IL-6 promueve la caquexia producida por el cáncer al regular la lipólisis del tejido adiposo (Han *et al.*, 2018). Una de las citocinas proinflamatorias es la IL-17, la cual ejerce funciones protumorales en diferentes cánceres como en el cáncer gástrico y el mieloma múltiple (Briukhovetska *et al.*, 2021). Hasta el momento se desconoce el papel de las interleucinas en el cáncer de ovario, por ello, su identificación y cuantificación durante el desarrollo y progresión tumoral nos ayudará a conocer mejor su función.

JUSTIFICACIÓN

- El cáncer de ovario es un problema de salud pública debido a que la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas, cuando se ha desarrollado la metástasis.
- El principal sitio de metástasis es el epiplón, el cual está constituido en mayor proporción por adipocitos y otras células, entre ellas, las células inmunitarias de tipo innato. Las poblaciones de ILCs y los linfocitos T $\gamma\delta$ se encuentran enriquecidas en el epiplón.
- En otros tejidos, ambas poblaciones ejercen actividades antitumorales y/o protumorales.
- A la fecha, se desconoce el papel de las células T $\gamma\delta$ e ILCs en el epiplón, específicamente durante el desarrollo del cáncer de ovario.

HIPÓTESIS

Existen cambios en la proporción y fenotipo de las ILCs y linfocitos T $\gamma\delta$ en el epiplón durante el desarrollo de cáncer de ovario en un modelo murino inmunocompetente.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente las ILCs y linfocitos T $\gamma\delta$ en el epiplón de un modelo murino de cáncer de ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Conocer la proporción de las ILCs y linfocitos T $\gamma\delta$ en el epiplón de un modelo murino de cáncer de ovario.
2. Evaluar las citocinas presentes en el epiplón.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ratones

Se utilizaron ratones hembra C57BL/6 de 7 a 8 semanas de edad de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL), y se mantuvieron en condiciones específicas libres de patógenos en la UPEAL. Se usaron 4 ratones por grupo, asignados aleatoriamente en los diferentes grupos. Tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum* en un ciclo de luz de 12 horas. Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) del Cinvestav, bajo el protocolo No. 0288-19.

Cultivo Celular

La línea celular ID8 (Roby *et al.*, 2000) derivada de la transformación maligna espontánea *in vitro* de las células epiteliales de la superficie del ovario de ratón C57BL/6, fue donada por el Dr. Fidel P. Zavala del Departamento de Microbiología Molecular e Inmunología de la Universidad Johns Hopkins, Maryland, USA. Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM alto en glucosa, 4% de suero fetal bovino (SFB), 1% de suplemento que contenía insulina, transferrina y selenito de sodio y 1% de solución de penicilina-estreptomina en una incubadora con una atmosfera humidificadora con 5% de CO₂ a 37 °C.

Generación de tumores in vivo

Las células ID8 ($15 \times 10^6/200 \mu\text{l}$ de PBS) se inocularon en los ratones por vía intraperitoneal ($n=4$). Como control negativo, se utilizaron ratones ($n=4$) inoculados con $200 \mu\text{l}$ de PBS vía intraperitoneal. Los ratones se monitorearon cada semana y se sacrificaron a las 2, 5 y 16 semanas post inoculación.

Digestión del epiplón

Una vez transcurrido los tiempos de estudio, los ratones se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajo cuidadosamente el epiplón. Posteriormente, cada epiplón fue pesado y se cortó cuidadosamente en pequeños trozos utilizando un bisturí, se digirió con 1 mg/ml de colagenasa tipo IV (Sigma-Aldrich C5138, 0.5% de BSA en RPMI-1640 durante 15 min a 37°C , con agitación suave (120 rpm). Después de la maceración y filtración del tejido en un colador de nylon de $70 \mu\text{m}$, el material no digerido se eliminó; enseguida se centrifugaron las células durante 10 min a 1500 rpm y después se resuspendieron en 1 ml de PBS, se utilizaron $10 \mu\text{l}$ de la suspensión celular para el conteo de células totales del epiplón utilizando una cámara de Neubauer.

Citometría de flujo

La suspensión celular obtenida del epiplón se incubó con un anticuerpo bloqueador del receptor Fc (anti-CD16/32) (Biolenged No. 101330) durante 30 min a 4°C para evitar las uniones inespecíficas de los anticuerpos. Las células muertas se excluyeron utilizando el reactivo Live/Dead Aqua (Molecular probes No. L34957), seguido de tinción superficial estándar para análisis de citometría de flujo con anticuerpos conjugados con diferentes fluorocromos; anticuerpos anti-Lineage *cocktail* (V450) (BD biosciences No. 561301), anti-CD45 (FITC) (eBioscience No. 11-0451-81), anti-CD90.2 (AF700) (Biolenged No. 140323), anti-NK1.1 (APC) (eBioscience 17-5941-81), anti-KLRG1 (BV786) (BD biosciences No.565477) para ILCs; anti- CD45 (FITC) (eBioscience No. 11-0451-81), anti-CD3 (PE-Cy5) (eBioscience No. 15-0031-81), anti-TCR $\gamma\delta$ biotin (streptavidina-PE) (eBioscience No. 13-5711-82), para linfocitos T $\gamma\delta$. Para la detección de ROR γ t y T-bet por las

ILCs, a partir de la tinción con el panel ILCs, las células se incubaron con saponina, un detergente que produce poros de manera reversible en las membranas celulares y con los siguientes anticuerpos, anti-ROR γ t (PE-eFluor610) (eBioscience 61-6981-80) y anti-T-bet (PE) (eBioscience No. 12-5825-80). Las células se analizaron en el citómetro BD LSR Fortessa del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del Cinvestav (LaNSE-Cinvestav), y los resultados se analizaron con el software FlowJo X.

Obtención de muestras para la determinación de citocinas

Para la determinación de las citocinas en el epiplón, se utilizó el sobrenadante de este tejido, para ello, se cortó con bisturí en pequeños trozos sobre hielo en 1 ml de PBS, posteriormente se maceró y se filtró, utilizando una malla de nylon de 70 μ m, lo obtenido se centrifugó por 5 min a 4000 rpm, se descartó el sedimento.

Así mismo, se recolectaron muestras de sangre retroorbital de todos los ratones (n=4 por grupo) y se hizo un pool con dichas muestras. Posteriormente la sangre se centrifugó a 4000 rpm por 5 min, para la obtención del suero.

En el modelo murino de cáncer de ovario, los ratones hembra generan líquido ascítico alrededor de las 10 semanas post inoculación; sin embargo, en este trabajo se decidió analizar también tiempos tempranos de la enfermedad, en este caso, se obtuvieron lavados peritoneales de los ratones. Se recolectaron muestras de líquido ascítico y lavado peritoneal en todos los ratones analizados (n=4 por grupo). Para el lavado peritoneal se utilizaron 5 ml RPMI- 1640. En ambos casos se realizó bajo condiciones de esterilidad, posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 4000 rpm por 5 min.

Todas las muestras se almacenaron a -70 °C, hasta su uso.

Ensayo de perlas citométricas (CBA, cytometric bead array, por sus siglas en inglés)

El análisis de las concentraciones de citocinas en muestras de sobrenadante del epiplón, suero y líquido ascítico, se realizaron utilizando el kit de citocinas para ratón TH1/ TH2/TH17 (BD No. catálogo 560485). Este kit de matriz proporciona una

mezcla de 7 perlas de captura con distintas intensidades de fluorescencia, que fueron recubiertas con anticuerpos de captura específicos para cada citocina. Se mezclaron las siete perlas de captura, colocando 5 μ l de cada una de ellas. Posteriormente, se agregó de manera consecutiva en cada tubo, 35 μ l de la muestra desconocida o diluciones estándar, 35 μ l de las perlas de captura mezcladas y 35 μ l del reactivo de detección de ficoeritrina (PE). Después, se incubaron durante 2 h a temperatura ambiente y en oscuridad. Las muestras se lavaron con 200 μ l de amortiguador de lavado y el sedimento de perlas se resuspendió en 300 μ l de amortiguador de lavado. Las lecturas correspondientes a las citocinas en estudio se adquirieron en el citómetro BD LSR Fortessa de (LaNSE-Cinvestav) y se analizaron en el software FlowJo X. Los estándares de citocinas se prepararon en diluciones seriadas para facilitar la construcción de curvas de calibración, necesarias para la determinación de las concentraciones de proteína en cada muestra.

Análisis estadístico

Los experimentos independientes se repitieron al menos dos o tres veces. Las diferencias estadísticas se determinaron con la prueba de Mann-Whitney. Un valor de $P < 0.05$ se consideró significativo. Se utilizó el software GraphPad Prism 8.0 para todos los análisis estadísticos.

RESULTADOS

Capítulo I: Proporciones de linfocito T $\gamma\delta$ e ILCS en cáncer de ovario y cuantificación de citocinas

El peso del epiplón aumenta en etapas avanzadas de cáncer de ovario

Inicialmente evaluamos la progresión del cáncer de ovario midiendo el peso del epiplón en diferentes momentos de la enfermedad. Como se muestra en la figura 8-A, no observamos cambios significativos en el peso del epiplón en los ratones con 2 y 5 semanas de enfermedad comparados con el control, sin embargo, en los ratones con 16 semanas de cáncer, el peso del epiplón aumentó de manera no significativa comparado con el control, reflejando la progresión tumoral. Además, observamos una sorprendente pérdida de tejido adiposo inguinal y microimplantes

en el epiplón agrandado en este grupo de ratones (16 semanas post inoculación) comparados con el grupo control, los cuales generaron ascitis (Figura 7-B)

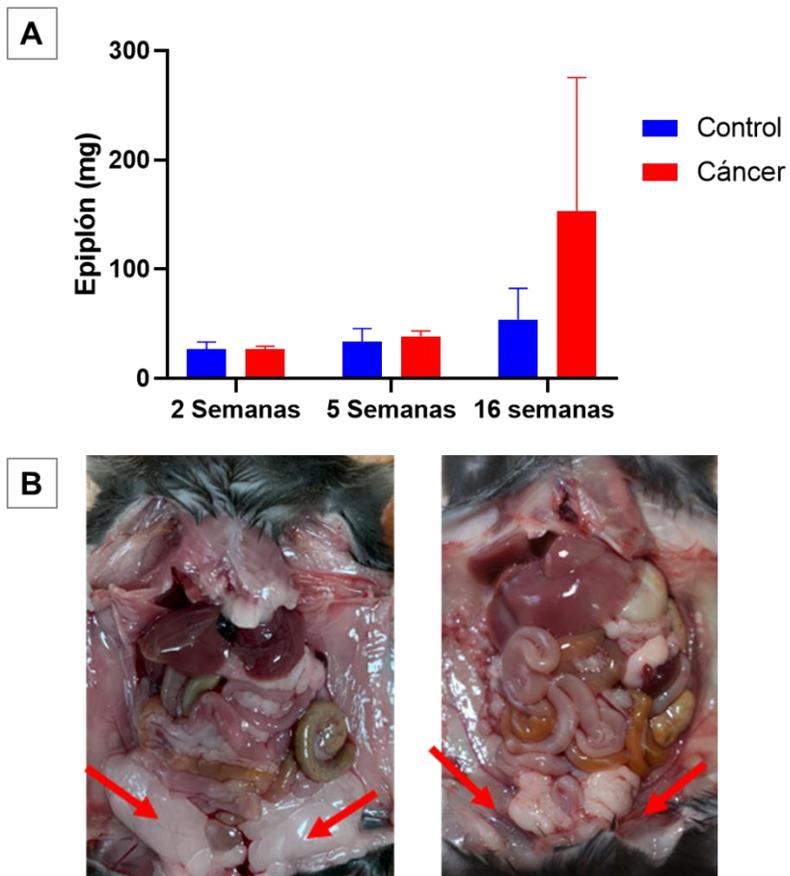


Figura 7. Progresión tumoral en el epiplón.

(A) Peso (mg) del epiplón en ratones C57BL/6 inoculados vía intraperitoneal con células ID8 y PBS respectivamente (n=4 por grupo; prueba de Mann-Witney), se midieron en los puntos de tiempo indicados. (B) Ejemplos representativos que muestran una vista general de la cavidad abdominal de un ratón con 16 semanas de desarrollo de cáncer de ovario (derecha) y un control (izquierda). flechas: tejido adiposo inguinal.

La proporción de linfocitos T $\gamma\delta$ aumenta en el desarrollo tumoral

Los linfocitos T $\gamma\delta$ son críticos para la inmunovigilancia tumoral (Lo Presti *et al.*, 2018). Para conocer la proporción de los Linfocitos T $\gamma\delta$ en el epiplón, se inocularon células ID8 en la cavidad peritoneal de ratones inmunocompetentes C57BL/6 (n=4) y los comparamos con su control (inoculación PBS) en ensayos de citometría de flujo. Para identificar a la población de interés, se realizaron diferentes selecciones como se muestra en la figura 8-A. Observamos una posible tendencia no significativa en el aumento de los linfocitos T $\gamma\delta$ en los diferentes grupos analizados (Figura 8-B). Estos datos sugieren que las proporciones de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el

epiplón se encuentran alteradas desde etapas tempranas de la enfermedad, siendo este fenómeno muy evidente a las 16 semanas de desarrollo del cáncer de ovario.

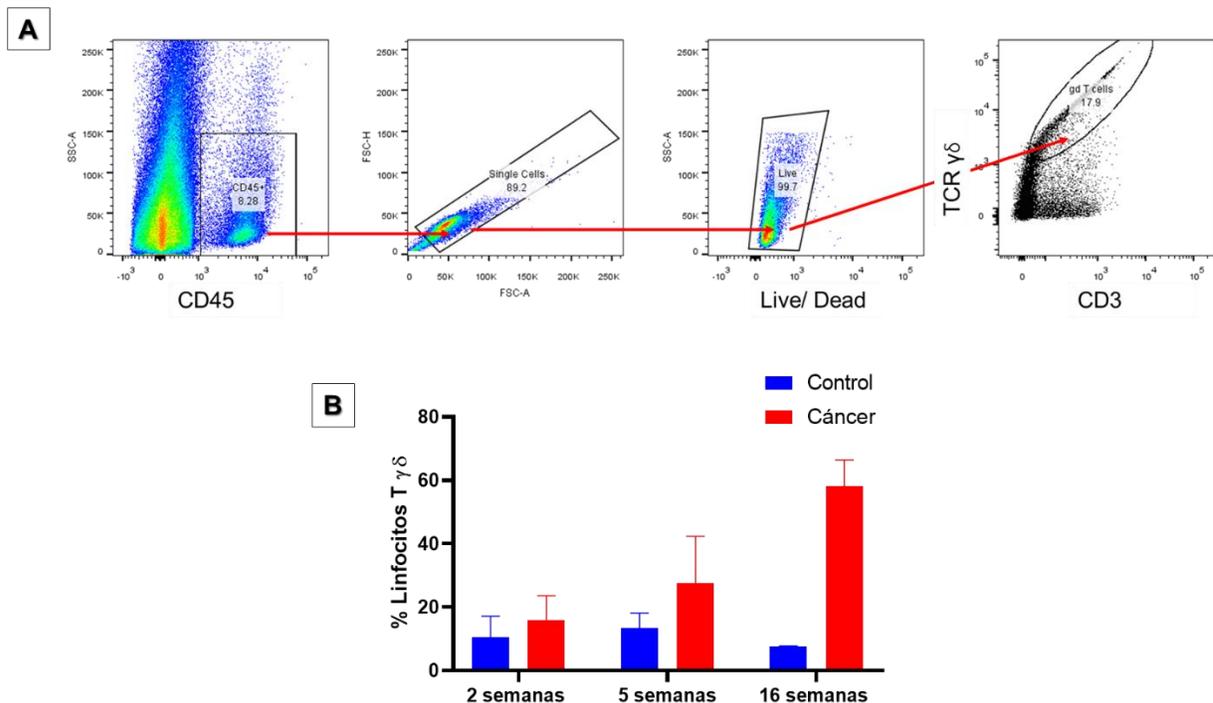


Figura 8. La proporción de los linfocitos T $\gamma\delta$ aumenta durante el desarrollo tumoral. Se inocularon ratones hembra inmunocompetentes de la cepa C57BL/6 (n=4) con células ID8 o controles con PBS, sacrificados en diferentes tiempos de la enfermedad. (A) Gráfico de citometría de flujo representativo de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el epiplón. (B) Proporción de Linfocitos T $\gamma\delta$ en el epiplón en diferentes tiempos del desarrollo tumoral. Para conocer la normalidad se utilizó la prueba Shapiro-Wilk y la prueba Mann-Whitney para conocer las diferencias entre grupos. Los datos son representativos de 3 experimentos independientes.

La proporción de ILCs y el subgrupo ILCs 2 disminuye en el epiplón durante el desarrollo del cáncer de ovario

De igual forma, determinamos la proporción de ILCs y de los subgrupos de ILCs en el epiplón de ratones inoculados vía intraperitoneal con células ID8 (n=4), sacrificándolos a diferentes tiempos de la enfermedad, a saber, 2 semanas, 5 semanas y 16 semanas. En la figura 9-A se muestran gráficos representativos obtenidos en el citómetro de flujo para la identificación de las poblaciones celulares de interés. En ambos casos (ILCs en general y ILCs 2), observamos una posible

tendencia sin ser estadísticamente significativa en la disminución de las proporciones de ILCs en los diferentes grupos analizados (Figura 9 B-C). La población de ILCs 1 no se detectó en ninguna de las condiciones estudiadas, (grafico no presentado). Finalmente, el subgrupo ILCs 3 no mostró una tendencia significativa. (figura 9-D).

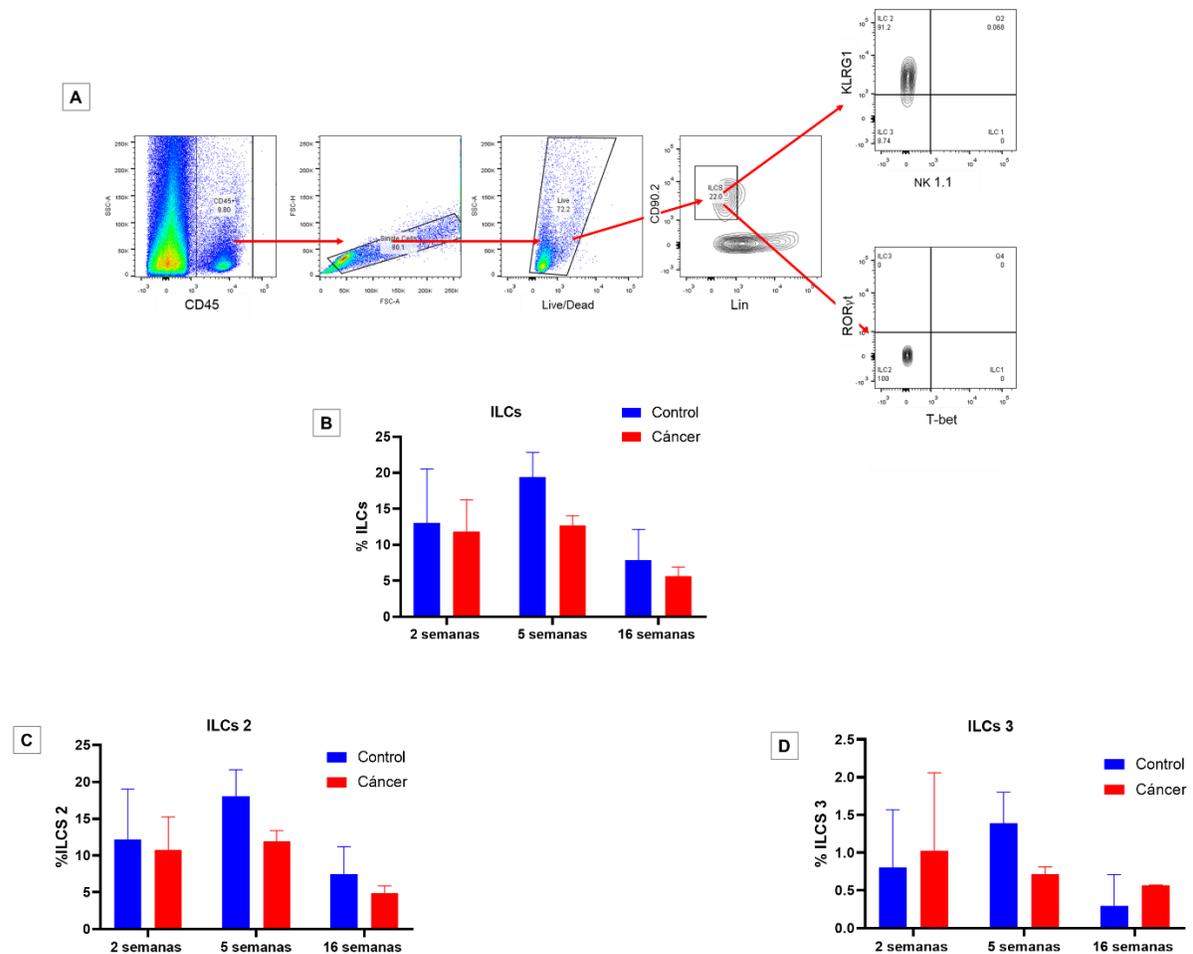


Figura 9. Proporción de ILCs y subgrupo de ILCs en el epíplón durante el desarrollo de cáncer de ovario. Se inocularon ratones hembra inmunocompetentes de la cepa C57BL/6 (n=4) con células ID8 o controles con PBS, sacrificados en diferentes tiempos de la enfermedad. (A) Gráfico de citometría de flujo representativo de las ILCs y sus subgrupos. (B) Proporción de ILCs en diferentes tiempos del desarrollo tumoral. (C y D) Proporciones de ILCs 2 e ILCs 3 en el epíplón de ratones inmunocompetentes con cáncer de ovario. Para conocer la normalidad se utilizó la prueba Shapiro-

Wilk y la prueba Mann-Whitney para conocer las diferencias entre grupos. Los datos son representativos de experimentos independientes.

Por otro lado, las citocinas facilitan el crecimiento tumoral, pero al mismo tiempo, son relevantes para producir una respuesta inmunológica productiva dirigida al tumor (Briukhovetska *et al.*, 2021). Por lo tanto, se cuantificaron algunas citocinas (IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 e IL-2) presentes en el epiplón durante el desarrollo del cáncer de ovario; además, se recolectaron muestras de suero, líquido ascítico y lavado peritoneal (dependiendo de las semanas de avance de la enfermedad). Estas cuantificaciones de citocinas se llevaron a cabo utilizando la tecnología de CBA (ver sección de Materiales y Métodos). En comparación con el método de ELISA tradicional, el CBA permite el análisis de múltiples citocinas en una sola muestra y con menor volumen. Agrupamos los resultados de las concentraciones de citocinas en tres grupos de acuerdo al kit de citocinas utilizado (BD biosciences, CBA mouse Th1/Th2/Th17 No. de catálogo 560485) (Figuras 10,11,12).

Citocinas relacionadas con las células Th1 aumentan en el epiplón desde etapas tempranas del cáncer de ovario en comparación con otros sitios (suero, peritoneo)

Las células Th1 secretan principalmente IL-2, TNF e IFN- γ . La IL-2 juega un papel importante en la diferenciación de las células T (Wei *et al.*, 2014), mostró un aumento sin diferencia estadística en ratones con 2 semanas de cáncer de ovario en el epiplón y suero, en contraste con el peritoneo (lavado peritoneal) donde mostró una disminución en el mismo grupo analizado. Posteriormente a las 5 semanas de enfermedad, en el epiplón, la IL-2 mostró una disminución no significativa, en el suero no hubo diferencias significativas con respecto a su control, y en el peritoneo (líquido ascítico) aumentó en la condición de cáncer. En etapas avanzadas de la enfermedad (16 semanas), en el caso del epiplón, hubo un incremento sin diferencia estadística, sin embargo, tanto en el suero como en el peritoneo (líquido ascítico) no se pudo realizar la estadística debido a que la n fue baja ($n=2$) (Figura 10-A, D, G).

Con respecto, a las otras dos citocinas analizadas, el IFN- γ y TNF en el epiplón, mostraron un aumento significativo a las 2 semanas de cáncer de ovario, en comparación con el suero y el peritoneo (lavado peritoneal), mostrando un decremento en la concentración de ambas citocinas. A las 5 semanas, de desarrollo tumoral, en la concentración IFN- γ no se encontraron cambios entre el grupo problema y su control tanto en el peritoneo (lavado peritoneal) como en el epiplón; en cuanto al suero, mostró un incremento sin ser estadísticamente significativo. En el caso de TNF, tanto en el epiplón como en el peritoneo (lavado peritoneal) mostraron un incremento no significativo; en cuanto al suero, mostro una disminución en comparación a su control en ratones con 5 semanas de cáncer de ovario. En etapas avanzadas del cáncer de ovario, la concentración de IFN- γ aumento en epiplón y suero; con respecto al peritoneo se encontró una disminución comparado con su control. Cabe señalar que estas concentraciones se asemejan a las presentadas en etapas tempranas de la enfermedad. Finalmente, el TNF mostró un aumento en el epiplón y el peritoneo sin diferencia estadística, sin embargo, no se pudo realizar estadística al tener una *n* baja (*n*=2) en la muestra de suero, no mostrando cambios entre el grupo problema y el grupo control (Figura 10-B, C, E, F, H, I).

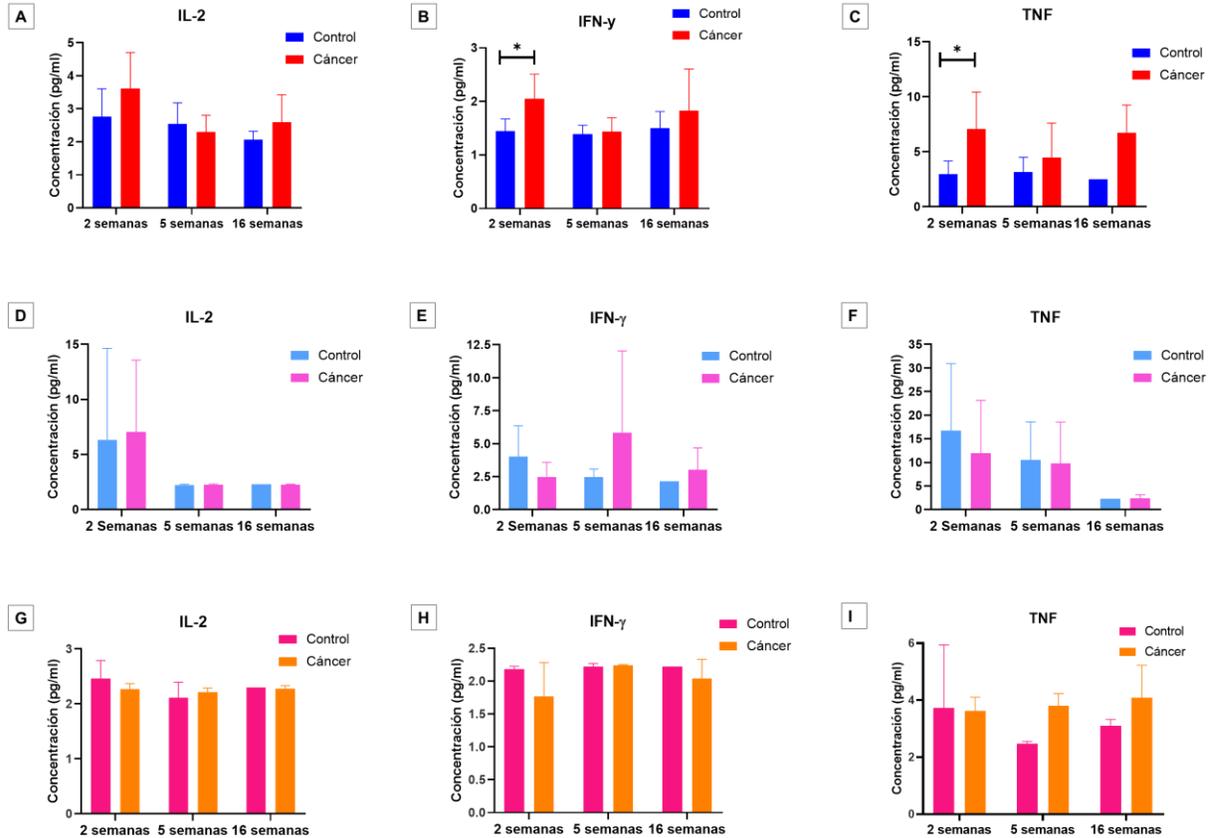


Figura 10. Citocinas relacionadas con las células Th1 en un modelo murino inmunocompetente de cáncer de ovario. Para la determinación de estas citocinas se realizaron ensayos de CBA. (A-C) Concentraciones de IL-2, IFN- γ y TNF respectivamente, en el epilión murino (n=4). (D-F) Concentraciones de IL-2, IFN- γ y TNF respectivamente en muestras de suero murino (IL-2: Semanas 2 n=4, semanas 5 n=3, semanas 16 n=2; IFN- γ : semanas 2 n=4, semanas 5 n=3 y semanas 16 n=3; TNF: semanas 2 n=4, semanas 5 n=3 y semanas 16 n=2) (G-I) Concentraciones de IL-2, IFN- γ y TNF en el peritoneo murino (IL-2: semanas 2 n=4, semanas 5 n=3, semanas 16 n=2; IFN- γ : semanas 2 n=4, semanas 5 n=3, semanas 16 n=3; TNF: semana 2 n=4, semanas 5 n=3, semanas 16 n=3). Para conocer la normalidad se utilizó la prueba de Shapiro -Wilk y para conocer las diferencias entre grupos se utilizó la prueba T-student no pareada. Se consideraron significativos los valores de p inferiores a 0.005.

La concentración de las citocinas relacionadas con las células Th2 (IL-4 y IL-10) aumentan desde etapas tempranas del cáncer de ovario en el epiplón, suero y peritoneo

La IL-4 e IL-10 son citocinas relacionadas con las células Th2. Ambas citocinas, mostraron un incremento significativo en el epiplón a las 2 semanas de cáncer de ovario, de forma similar, mostraron un incremento no significativo en el peritoneo, en el caso del suero solo incrementó la IL-4, mientras que, la IL-10 disminuyó en tiempos tempranos de la enfermedad. Por otra parte, a las 5 semanas del desarrollo tumoral, ambas citocinas se encontraron aumentadas en todas las muestras analizadas en condición de cáncer comparado con su control, siendo más evidente este cambio en suero y peritoneo (lavado peritoneal). Del mismo modo, la IL-4 mostró un aumento no significativo a las 16 semanas de cáncer de ovario en todas las muestras analizadas, mientras que, la IL-10 no mostró cambios en el peritoneo y suero debido a que el número de muestras analizadas no fue suficiente para realizar la estadística, y en el epiplón aumentó de manera no significativa (Figura 11).

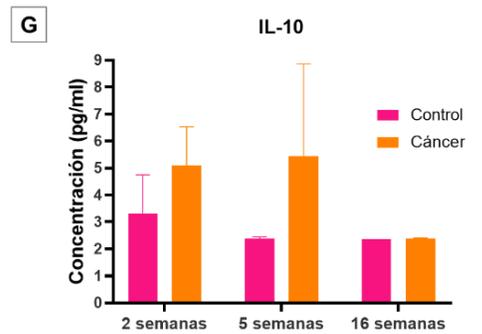
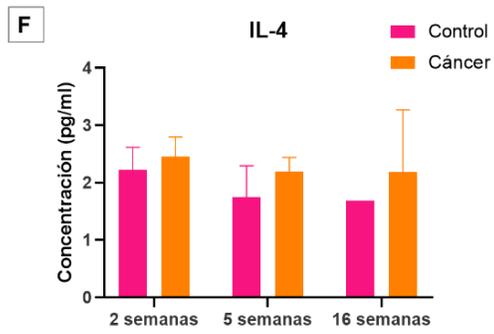
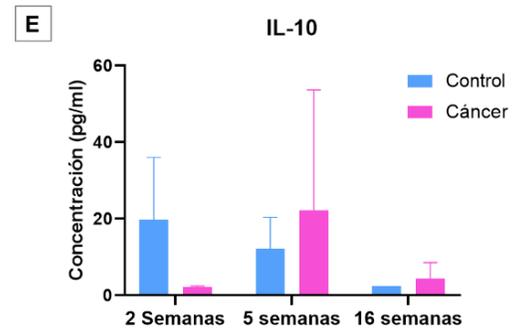
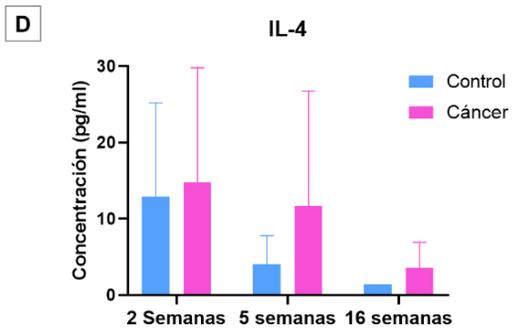
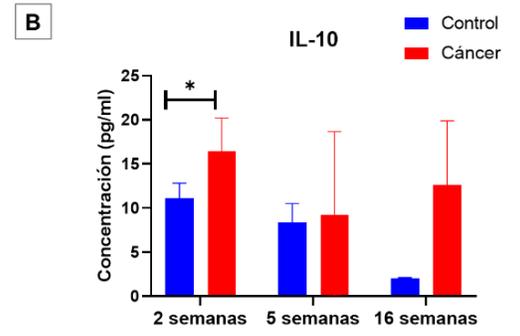
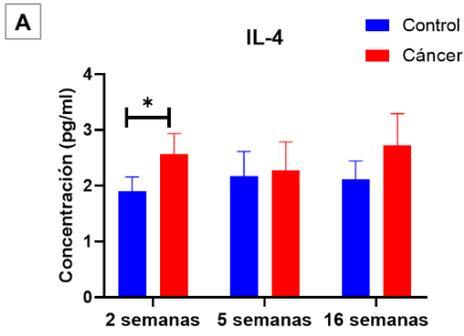


Figura 11. Citocinas relacionadas con las células Th2 en un modelo murino inmunocompetente de cáncer de ovario. Para la determinación de estas citocinas se realizaron ensayos de CBA. (A-B) Concentraciones de IL-4 e IL-10 respectivamente, en el epiplón murino (n=4). (C-D) Concentraciones de IL-4 e IL-10 respectivamente, en muestras de suero murino (IL-4: semanas 2 n=4, semanas 5 n=3 y semanas 16 n=3; IL-10: semana 2 n=4, semanas 5 n=3, semanas 16 n=2) (E-F) Concentraciones de IL-4 e IL-10 respectivamente en el peritoneo murino (IL-4: semanas 2 n=4, semanas 5 y 16 n=3; IL-10: semanas 2 n=4, semanas 5 n=3 y semanas 16 n=2). Para conocer la normalidad se utilizó la prueba de Shapiro -Wilk y para conocer las diferencias entre grupos se utilizó la prueba T-student no pareada. Se consideraron significativos los valores de p inferiores a 0.005.

La concentración de la IL-6 relacionada con las células Th17 aumenta en etapas tempranas del cáncer de ovario en el epiplón, suero y peritoneo.

La IL-17 e IL-6 se producen a partir de las células Th17 activadas. La concentración de IL-6 mostró una tendencia al alza en la condición de cáncer en todas las muestras analizadas, siendo solo significativo a las 2 semanas de enfermedad; asimismo, el suero presenta la menor evidencia de esta tendencia (Figura 12-A, D, F).

Por otro lado, la IL-17 mostró una tendencia al alza de manera no significativa en el epiplón en todos los tiempos analizados, en el caso del suero, esta interleucina mostró una tendencia al alza sin ser significativa a partir de las 5 semanas de enfermedad. Por último, en el peritoneo, a las 5 semanas se encontró una disminución en la concentración de esta interleucina y en etapas avanzadas de la enfermedad (16 de semanas) no se pudo realizar la estadística debido a que la n ($n=2$) utilizada fue baja (Figura 12-B, E, G).

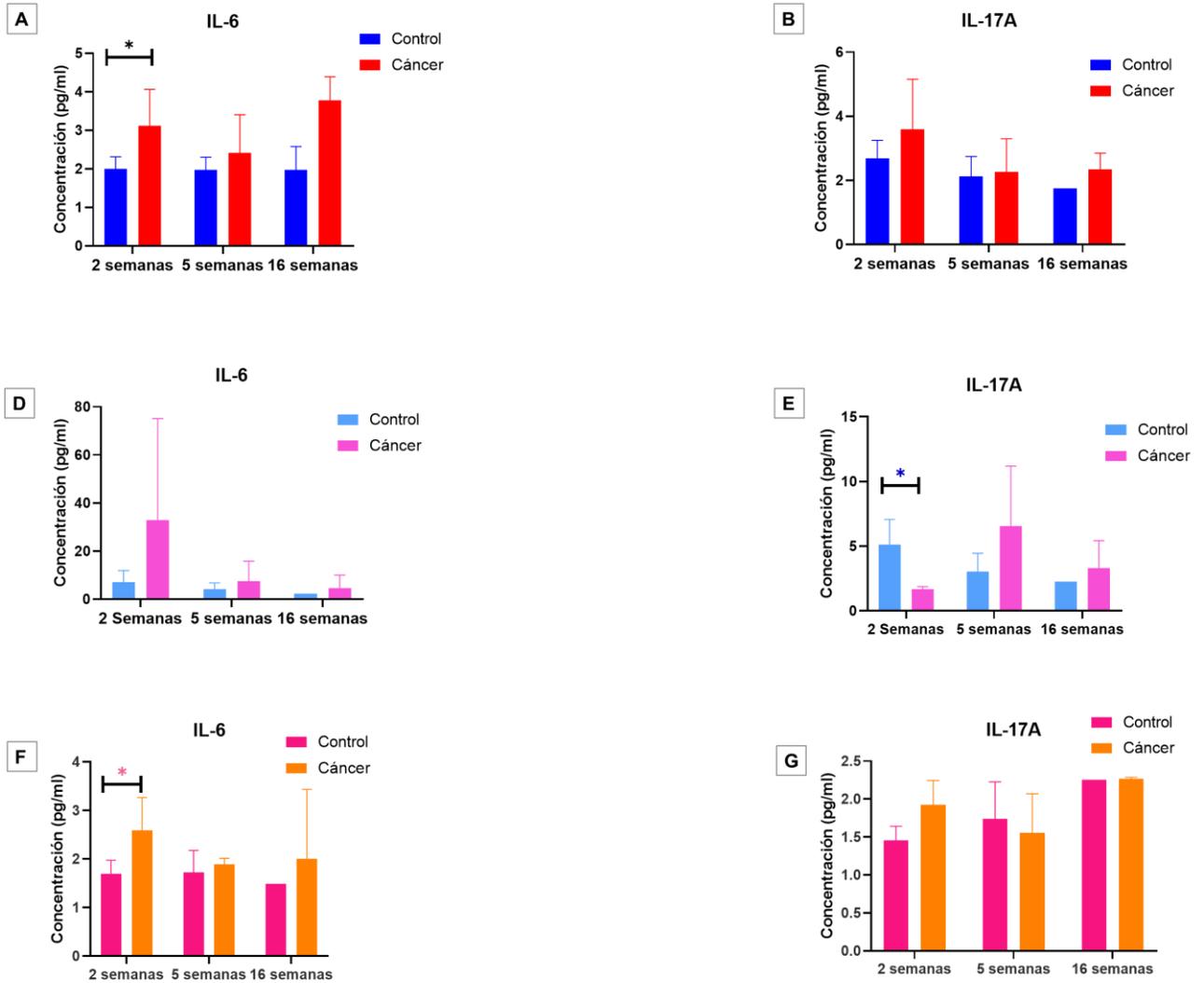


Figura 12. Citocinas relacionadas con las células Th17 en un modelo murino inmunocompetente de cáncer de ovario. Para la determinación de estas citocinas se realizaron ensayos de CBA. (A-B) Concentraciones de IL-6 e IL-17 respectivamente, en el eplión murino (n=4). (C-D) Concentraciones de IL-6 e IL-17 respectivamente, en muestras de suero murino (IL-6: semanas 2 n=4, semanas 5 n=3 y semanas 16 n=3; IL-17A: semanas 2 n=4, semanas 5 n=3 y semanas 16 n=3). (E-F) Concentraciones de IL-6 e IL-17 respectivamente en el peritoneo murino (IL-6: semanas 2 n=4, semanas 5 n=3 y semanas 16 n=3; IL-17A: semanas 2 n=4, semanas 5 n=3 y semanas 16 n=2). Para conocer la normalidad se utilizó la prueba de Shapiro -Wilk y para conocer las diferencias entre grupos se utilizó la prueba T-student no pareada. Se consideraron significativos los valores de *p* inferiores a 0.005.

DISCUSIÓN

El cáncer de ovario es una enfermedad heterogénea, conformada de tumores con diferentes tipos de histología, grados y características moleculares (Lheureux *et al.*, 2019). La mayoría de las pacientes que padecen esta enfermedad, muestran un resultado clínico desfavorable, debido a que el diagnóstico se realiza en etapas avanzadas cuando el tumor se ha diseminado a la cavidad peritoneal y los órganos abdominales superiores (Kuroki & Guntupalli, 2020), lo que ocasiona una alta tasa de mortalidad. Aproximadamente el 80% de las pacientes con cáncer de ovario presentan metástasis en el epiplón, sitio donde se genera la primera etapa de metástasis del cáncer de ovario (Dai *et al.*, 2020).

Se tienen antecedentes claros de que el cáncer de ovario para diseminarse, tiene una preferencia por el tejido adiposo dentro de la cavidad abdominal, tal es el caso del epiplón; además, este nicho enriquecido en adipocitos ofrece a las células tumorales nutrientes y factores de crecimiento (Nieman *et al.*, 2011).

En este trabajo determinamos las proporciones de linfocitos T $\gamma\delta$ e ILCs en el epiplón. Para esto, utilizamos un modelo murino inmunocompetente singénico de cáncer de ovario (ID8) ampliamente utilizado, debido a que este modelo tiene características clínicas similares al cáncer de ovario seroso de alto grado (el más común de los histotipos). Esto incluye las características morfológicas, la diseminación por toda la cavidad peritoneal y la acumulación del líquido ascítico (Roby *et al.*, 2000); asimismo, el sistema inmune está intacto, lo que permite estudiar el impacto de las células inmunitarias en la progresión de cáncer. Después de la inoculación intraperitoneal de las células ID8, los ratones fueron sacrificados en diferentes tiempos de la enfermedad, a saber, 2, 5, 16 semanas, para la obtención del epiplón a través de una cirugía. En los 2 primeros tiempos analizados no se pudieron observar nódulos tumorales dentro del epiplón. Sin embargo, a las 16 semanas de desarrollo de cáncer de ovario, el epiplón en su totalidad fue invadido por las células tumorales ocasionando un aumento drástico en el tamaño y peso, junto con el desarrollo de ascitis. Sorprendentemente, observamos pérdida de tejido adiposo inguinal, lo que sugiere que la formación de ascitis se asoció con

la pérdida del tejido adiposo. Se cree que en cuanto mayor es el volumen y la frecuencia con la que se acumula la ascitis, peor es el pronóstico (Ayantunde & Parsons, 2007).

En relación con la respuesta inmune, a la fecha, las células T $\gamma\delta$ murinas se han implicado en la homeostasis epitelial, la cicatrización de heridas cutáneas y el mantenimiento de la mucosa intestinal, y se han destacado como de tipo innato, expresando TCR canónicos (Hunter *et al.*, 2018). Actualmente se ha descrito que las células T $\gamma\delta$ pueden ejercer efectos que promueven o suprimen el tumor, y estos efectos varían según el contexto tumoral (Zhao *et al.*, 2018). En diferentes estudios se demostró que los linfocitos T $\gamma\delta$ tienen actividades antitumorales críticas (Raspollini *et al.*, 2005), debido a que pueden reconocer y destruir varios tipos de células tumorales a través de la actividad lítica no restringida del MHC y una abundante capacidad de secreción de citocinas, a diferencia de las células T $\alpha\beta$ (Chen *et al.*, 2019). El papel de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el cáncer de ovario no se ha descrito con claridad. Por lo tanto, con el fin de contribuir a un mejor entendimiento de la función de estas células en esta patología, determinamos la proporción de esta población inmune en el epiplón. Nuestros resultados mostraron una tendencia en aumento, sin ser estadísticamente significativa, en los linfocitos T $\gamma\delta$ en diferentes etapas de la progresión tumoral. Este aumento de las células T $\gamma\delta$ también se ha reportado en el cáncer de mama, constituyendo una población dominante en el microambiente supresor durante la progresión tumoral; por ello, estas células pueden servir como un biomarcador pronóstico valioso e independiente (Ma *et al.*, 2012).

Generalmente en humanos, las células T $\gamma\delta$ se dividen en dos subconjuntos principales dependiendo de su cadena δ de su TCR: las células T V δ 2, que se encuentran en mayor proporción en la sangre periférica y actúan en infecciones microbianas y las células T V δ 1 o células intraepiteliales, cuando existe un daño estructural o estrés (Wu *et al.*, 2017). Es conocido, que en tumores de cáncer de mama actúa como una población dominante (células T $\gamma\delta$ 1), teniendo la capacidad para suprimir las respuestas de las células T vírgenes y efectoras, y bloquear la

maduración y función de las células dendríticas (Peng *et al.*, 2007). En varios estudios, utilizando modelos murinos de tumores, se demostró, que las células T $\gamma\delta$ existentes en el microambiente tumoral, implicadas en la inducción de la tolerancia inmunológica específica del tumor (Ma *et al.*, 2012).

Hasta la fecha se necesita una comprensión más detallada sobre la regulación negativa de las células T $\gamma\delta$ en cáncer. Sin embargo, las células T $\gamma\delta$ siguen siendo objetivos atractivos para la terapia antitumoral, por su alta actividad citotóxica y por el reconocimiento de antígenos sin la necesidad de las moléculas del MCH. Particularmente en cáncer de ovario, la información es contradictoria. Por una parte, los modelos murinos de xenoinjerto demostraron que las células T $\gamma\delta$ redujeron la carga tumoral a través de la producción de la IL-17, es decir, que las células T $\gamma\delta$ pueden matar eficazmente las células madre de cáncer de ovario (Lai *et al.*, 2012). No obstante, se informó que la producción de IL-17 por las células T $\gamma\delta$ infiltrantes del tumor podría estar desempeñando funciones supresoras dentro del microambiente de cáncer de ovario. Asimismo, en tejido de tumores ováricos se encontró un mayor número de las células T $\gamma\delta$ junto con una capacidad citotóxica parcialmente afectada contra las células tumorales en comparación con tejido de ovario normal. Los sobrenadantes de este microambiente tumoral promueven la acumulación de las células T $\gamma\delta$ atrayéndolas y reclutándolas en este espacio (Chen *et al.*, 2019). En ese mismo año, otro grupo reportó que las células T $\gamma\delta$ del subgrupo V δ 2 erradicaron por completo los tumores en etapas tempranas del cáncer de ovario epitelial tanto *in vitro* como *in vivo*, a través de su capacidad citotóxica (Mao *et al.*, 2019).

Por otro lado, se encontró que las células T $\gamma\delta$ eran más abundantes en varios depósitos de tejido adiposo murino, particularmente en el epiplón y epidídimo en comparación con otros órganos, incluidos el pulmón, hígado, sangre y bazo (Kohlgruber *et al.*, 2019). En recientes estudios, se encontró una población de T $\gamma\delta$ en ratones, distinguiéndose por medio del CD27 en dos subconjuntos. Las células T $\gamma\delta$ CD27⁺ que producen IFN- γ , ubicadas en la mayoría de los tejidos y el otro subconjunto son las células T $\gamma\delta$ CD27⁻ del tejido adiposo. Este último subconjunto,

tiene una alta expresión de CD3 y PLZF y producen $TNF\alpha$, ejercen funciones relacionadas con la inflamación, regulación de la termogénesis y son una fuente importante para la producción de IL-17A *in situ* (Mentha *et al.*, 2015; Kohlgruber *et al.*, 2019). Asimismo, se encontró que las células T $\gamma\delta$ residentes de tejido adiposo inducen la producción de IL-33 por las células estromales a través de la secreción de IL-17A y $TNF-\alpha$ (Kohlgruber *et al.*, 2019). En un estudio reciente, se investigó la distribución de las células T $\gamma\delta$ en el epiplón e hígado de pacientes con adenocarcinoma de esófago, demostrando que los subgrupos V δ 1 y V δ 3 son los más prevalentes, expresan predominantemente citocinas Th1 y Th17, las cuales presentan un potencial de desgranulación, lo que indica su capacidad citotóxica, por último, se encontró una abundancia de los linfocitos T $\gamma\delta$ CCR6⁺ en hígado y epiplón, lo que se sugiere que el CCR6 gobierna la migración de las células T $\gamma\delta$ a esos sitios (Melo *et al.*, 2021).

En este trabajo se observó una tendencia en aumento de los linfocitos T $\gamma\delta$ observadas en el epiplón del modelo murino de cáncer de ovario, esto sugiere que este tipo celular migra al microambiente tumoral y en etapas avanzadas de esta enfermedad, se observa una mayor acumulación de este tipo celular, las cuales posiblemente actúan suprimiendo la actividad antitumoral.

Por otra parte, se sabe que las ILCs son efectoras y reguladoras del sistema inmunológico de tipo innato y han sido objeto de investigación en los últimos años, debido al papel que presentan en infecciones, inflamación, homeostasis metabólica y cáncer (Artis & Spits, 2015).

En conjunto de los resultados previamente mencionados, se conoce que el tejido adiposo comprende un amplio espectro de células inmunes, incluyendo a los linfocitos T $\gamma\delta$, y las ILCs, particularmente de tipo 1 y 2 (Michailidou *et al.*, 2021). Por esto, en este trabajo se analizaron las proporciones de las ILCs y sus subgrupos en el epiplón durante diferentes tiempos de desarrollo del cáncer de ovario, observando la ausencia del subgrupo ILC1 en todas las condiciones analizadas, a diferencia de lo previamente reportado (O'Sullivan *et al.*, 2016), que demostraron una acumulación de ILC1 en el tejido adiposo de ratones alimentados con una dieta alta

en grasas, induciendo directamente una inflamación local y resistencia sistémica a la insulina (Wang *et al.*, 2019). Al igual que en pacientes con obesidad y diabetes mellitus tipo 2, se obtuvo un aumento del número de ILC1 adiposas, provocando fibrogénesis adiposa dependiente de IFN- γ (Wang *et al.*, 2019).

A continuación, se analizó las proporciones de las ILC2, observando una mayor proporción en comparación con los otros subgrupos en el epiplón murino. Consistente con nuestros resultados, se conoce que el subgrupo 2 (ILC2) es residente de la mayoría de los tejidos adiposos de manera fisiológica (Benezech & Jackson-Jones, 2019), así como, en la submucosa del pulmón y el intestino, y en la dermis, ejerciendo funciones similares a las células Th2. Este subgrupo es activado principalmente por células epiteliales en respuesta a patógenos u otros estímulos ambientales, iniciando así la respuesta inmune local (Maggi *et al.*, 2020). Las ILC2 murinas responden a la estimulación con IL-25, IL-2 e IL-7 pero estas citocinas provocan una respuesta débil en comparación con IL-33 (Kane & Lynch, 2019). De acuerdo con esto, las células ILC2 dentro del tejido adiposo expresan la proteína de unión a GATA-3 y el receptor de IL-33 (Del Corno *et al.*, 2018), por lo tanto, son activadas en respuesta a IL-33, produciendo IL-5 e IL-13. Se sabe que las células mesoteliales del epiplón son fuentes sólidas de IL-33, principalmente después de una respuesta inflamatoria. Además, se ha observado en ratones que carecen de células T $\gamma\delta$ e IL-17A una reducción en la expresión de IL-33, así como una disminución en las frecuencias de ILC2 y T reg; sugiriendo que estas poblaciones celulares requieren de la IL-33 para su supervivencia, siendo esta secretada por las células estromales al ser estimuladas por los linfocitos T $\gamma\delta$ (Kane & Lynch, 2019). Posteriormente, los eosinófilos son reclutados en el tejido adiposo en respuesta a la producción IL-5 y macrófagos similares a M2 en respuesta a la secreción IL-13 e IL-4 por las ILC2 en ambos casos (Liu *et al.*, 2021). En la inflamación crónica que se observa en proceso de obesidad, se observó que los ratones obesos tienen menos eosinófilos en el tejido adiposo blanco en comparación con ratones delgados (Knights *et al.*, 2020). Igualmente, la producción de IL-13 e IL-4, cooperan funcionalmente para la activación de la proliferación y diferenciación de las células precursoras de adipocitos beige (PDGFR) (Lee *et al.*, 2015). Por lo tanto, en un

aumento de la inflamación del tejido adiposo como la obesidad y otras patologías, las ILC2 se agotan y son inhibidas funcionalmente, sugiriendo que las ILC2 suprimen la inflamación y promueven un perfil inmunológico de tipo Th2 en el tejido adiposo magro, es decir, sano, sin embargo, esto se revierte en la obesidad (Lee *et al.*, 2015). Dado esto, en lo observado en nuestro trabajo respecto la disminución de las ILC2 sugiere que en el epiplón hay un aumento de la inflamación debido al desarrollo del cáncer de ovario.

Cabe señalar que, en un estado saludable, el sistema inmunitario dentro del tejido adiposo contribuye al mantenimiento de la homeostasis tisular, en cambio, en la obesidad el perfil inmunológico del tejido adiposo cambia, pasando a un estado de inflamación crónico de bajo grado que gradualmente se vuelve sistémico (Michailidou *et al.*, 2021). De hecho, la inflamación fue designada como un sello distintivo en el cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Diferentes citocinas y quimiocinas existentes en el microambiente tumoral activan moléculas de señalización relacionadas con la inflamación y reclutan células inmunosupresoras, ocasionando la inmunosupresión, promoción de la angiogénesis y progresión tumoral (Chen *et al.*, 2019).

Por lo mencionado previamente y para comprender mejor el papel de las citocinas y las posibles vías señalización activadas en el epiplón durante el cáncer de ovario, analizamos las concentraciones de diferentes citocinas. Se debe tener en cuenta que los datos acerca de las concentraciones de citocinas fueron obtenidos a partir de un pool celular del epiplón y no de una población celular en particular; asimismo, los resultados se presentaron dependiendo de las células Th que las secretan.

Durante la inflamación hay un desequilibrio entre las cantidades de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias. Las citocinas proinflamatorias como IL-1 β , TNF α e IL-6 juegan un papel crucial en la inflamación; entre ellas, la IL-6 es relevante en enfermedades crónicas, autoinmunes, cáncer y tormentas de citocinas (Hirano, 2021). Se produce en respuesta a citocinas proinflamatorias locales, por ejemplo, TNF- α , siendo una de las principales interleucinas expresada constitutivamente en la mayoría de los carcinomas de ovario (Browning *et al.*, 2018).

En este trabajo, observamos un aumento de la IL-6 en suero, sobrenadante del epiplón y peritoneo de ratones con cáncer de ovario desde las primeras semanas de la enfermedad. En otros trabajos relacionados también se demostró, que concentraciones elevadas de IL-6 en suero y líquido peritoneal se relacionaron más comúnmente con carcinomas ováricos metastásicos agresivos y de mal pronóstico (Browning *et al.*, 2018; Rodrigues *et al.*, 2020).

Por otro lado, la IL-6 en altas concentraciones tiene efectos sobre las células inmunitarias al inhibir la expresión de IL-2, provocando una disminución en la activación de las células T y promoviendo la apoptosis de los linfocitos, lo que puede prevenir la vigilancia inmunitaria sobre las células cancerosas (Maccio & Madeddu, 2012); contrario a estos datos reportados, en este trabajo no se observó una disminución en la concentración de la IL-2 a pesar del incremento en la concentración de la IL-6, mostrando ambas citocinas un patrón similar.

Teniendo en cuenta que la IL-6 puede ser secretada por diferentes células. En un estudio, se reportó que, en el líquido peritoneal, los macrófagos polarizados a M2 fueron los secretores primarios de esta interleucina, mostrando principalmente efectos promotores de tumores (Woo *et al.*, 2017), demostrando con esto, que los adipocitos atraen a las células del cáncer de ovario al epiplón por la secreción de 5 citocinas principalmente: IL-6, IL-8, proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1), inhibidor tisular de metaloproteinasas-1 (TIMP-1) y adiponectina (Nieman *et al.*, 2011) . Después de la secreción de estas citocinas, las células cancerosas inducen la reprogramación metabólica y estimulan la lipólisis en estos adipocitos diferenciados maduros. Existe evidencia de que IL-6 induce la lipólisis y la oxidación de los ácidos grasos en adipocitos y miotubos *in vitro* al aumentar la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) (Carey *et al.*, 2006). Por lo que en el líquido ascítico, la concentración de IL-6 es significativamente mayor que en la sangre, lo que indica una secreción elevada de esta citocina en el microambiente del tumor de ovario (Wroblewski *et al.*, 2021). Se ha reportado que la IL-6 induce la atrofia del tejido adiposo blanco murino durante la caquexia por cáncer colorrectal y gástrico acelerando la lipólisis y el pardeamiento de este mismo tejido (Han *et al.*, 2018).

Han y colaboradores (2019) sugirieron que la IL-6 es el factor principal en la promoción de la lipólisis en pacientes femeninas con caquexia, lo que da como resultado una elevación de ácidos grasos libres. La caquexia por cáncer es un síndrome complejo y multifacético caracterizado por una pérdida continua de tejido esquelético y tejido adiposo, gasto energético elevado, fatiga, anorexia, fuerza muscular reducida y signos sistémicos de inflamación.

La lipólisis es el proceso metabólico mediante el cual los triacilgliceroles (TAG) se descomponen por hidrólisis en sus moléculas constituyentes: glicerol y ácidos grasos libres (Edwards & Mohiuddin, 2021). Los ácidos libres generados a partir de la lipólisis, se transfieren a las células del cáncer de ovario proporcionándoles a estas la energía requerida para su crecimiento (McClement, 2021).

En concordancia con lo mencionado anteriormente, en nuestro modelo murino de cáncer de ovario también observamos una disminución del tejido adiposo en etapas avanzadas de la enfermedad (16 semanas). Estos resultados sugieren que muy posiblemente la IL-6 presente en el líquido ascítico está induciendo la lipólisis en los adipocitos.

Otro mediador inflamatorio implicado en la metástasis del cáncer de ovario es el TNF- α (Browning *et al.*, 2018), involucrado en la pérdida de tejido adiposo al disminuir la actividad de la lipoproteína lipasa durante la lipólisis, ser un potente inhibidor de la lipogénesis y suprimir la expresión del gen responsable de varios factores de transcripción nucleares requeridos para la diferenciación y función de los adipocitos (Han *et al.*, 2019). De igual manera que la IL-6, encontramos niveles aumentados de esta citocina en la condición de cáncer. En otros estudios se observó que los niveles concomitantemente elevados de TNF α e IL-6 se relacionaron con una progresión más rápida de la enfermedad, sugiriendo una interacción entre estas citocinas en la progresión del cáncer epitelial de ovario avanzado (Rodrigues *et al.*, 2020) y correlacionan con la disminución del índice de masa corporal durante el desarrollo del cáncer (Kern *et al.*, 2018). Adicionalmente, el TNF- α sérico se relacionó positivamente con los ácidos grasos en etapas tempranas en la caquexia, pero no en etapas tardías en comparación a la IL-6. Esto

sugiere una relación entre la lipólisis y el aumento de inflamación en el epiplón, debido al incremento de estas dos citocinas (IL-6 e TNF- α).

Otro factor importante es el IFN- γ que ejerce efectos inmunológicos antitumorales induciendo la diferenciación de las células Th1 y mejorando la actividad de las células NK, macrófagos y células T citotóxicas (Dunn *et al.*, 2006). En nuestros resultados observamos un aumento del IFN- γ en el epiplón a las 2 semanas de cáncer de ovario, disminuyendo su concentración a las 5 semanas de enfermedad y reestableciendo el aumento de sus niveles en etapas avanzadas de cáncer. Estos datos sugieren que a pesar de las concentraciones elevadas de IFN- γ no se pudo prevenir el desarrollo tumoral. Nuestros datos son consistentes con estudios previamente reportados, sugiriendo que los niveles altos de IFN- γ se asociaron con enfermedad avanzada (Chen *et al.*, 2013) y en modelos de tumores murinos, el IFN- γ elevado se correlacionó con la anorexia y la pérdida de peso durante el desarrollo del tumor (Petruzzelli & Wagner, 2016). En contraste con lo anterior, Gao y colaboradores (2021) demostraron que IFN- γ suprimió la multiplicación de las células de cáncer de ovario de una manera dependiente de su concentración.

Por otra parte, también, se analizaron los niveles de la IL-10, la cual es una citocina antiinflamatoria que regula la respuesta inmune e inhibe las funciones proinflamatorias de las células presentadoras de antígenos (Sheikhpour *et al.*, 2018). La IL-6 e IL-10 son abundantes en microambientes tumorales originados a partir de células mieloides, fibroblastos y células tumorales (Fu *et al.*, 2017). En este trabajo observamos niveles elevados de IL-10 en las primeras etapas de la progresión de la enfermedad, los cuales disminuyen a las 5 semanas, restableciéndose en las etapas avanzadas. Consistente con nuestros datos, en un estudio se observaron concentraciones elevadas de IL-10 en suero de pacientes con cáncer de mama en comparación con individuos sanos, relacionándose con malos resultados clínicos, debido a que la IL-10 promovió la proliferación y metástasis de las células tumorales e inhibió la proliferación y función de las células T (Sheikhpour *et al.*, 2018). Lo que sugiere que la IL-10 en el epiplón podría estar contrarrestando el aumento del estado inflamatorio, causado por otras células,

sin embargo, la actividad antitumoral de IL-10 está mediada por la inhibición de la angiogénesis y la regulación negativa de algunas citocinas en las cuales se incluye la IL-6 (Sheikhpour *et al.*, 2018). En relación a nuestro trabajo, estas dos citocinas se encuentran elevadas ejerciendo actividades protumorales, como lo demostraron García-Tunon y colaboradores (2005), que IL-10 promueve la expresión y síntesis de IL-6, lo que provoca la proliferación celular a través de la regulación positiva del linfoma de células B-2 (Bcl-2) y cambia la equivalencia de proliferación / apoptosis hacia la proliferación de células neoplásicas.

La señalización de IL-6 también participa en la diferenciación de las células T, que expresan IL-17A, a células T $\alpha\beta$ (Th17 y las Tc17) y células T $\gamma\delta$ (Chen *et al.*, 2020). Recientemente se ha demostrado, que las células T $\gamma\delta$ son la principal fuente de IL-17A en el cáncer colorrectal humano y pueden contribuir a la progresión del cáncer (Wu *et al.*, 2014). En modelos murinos se ha mostrado que las células T $\gamma\delta$ productoras de IL-17 podrían facilitar el crecimiento tumoral mediante la promoción de la angiogénesis (Wakita *et al.*, 2010). En un estudio se demostró que las células T $\gamma\delta$ que infiltran el tumor, pero no las células Th17 o las células Tc17, fueron las principales productoras de IL-17 en el cáncer colorrectal humano. Sin embargo, en este trabajo no se pudo determinar que célula fue la principal productora de IL-17.

Se encontró que los niveles séricos de IL-17 fueron significativamente elevados en pacientes con cáncer gástrico. De acuerdo con lo anterior, nuestros resultados mostraron niveles elevados a las 2 semanas de cáncer de ovario en el epiplón, estas observaciones sugieren que la IL-17A podría actuar como un posible promotor tumoral en el cáncer de ovario. Además, se encontró que IL-17A promueve la absorción de ácidos grasos a través del eje IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 para impulsar el crecimiento del cáncer de ovario en un microambiente rico en adipocitos (Yu *et al.*, 2020). La función de FABP4 es promover la absorción de ácidos grasos de cadena larga y participar en el transporte de lípidos y la regulación metabólica, lo que nos indica que la IL-17A puede estar involucrada en la generación de energía a través de la lipólisis dentro del adipocito.

Finalmente, se sabe que la IL-6 dirige la diferenciación de las células Th2 productoras de IL-4, mientras que inhibe la diferenciación de las células Th1 productoras de IFN- γ (Rincon *et al.*, 1997). La IL-4 es secretada principalmente por las células Th2, así como también por otros tipos de células inmunes incluyendo las ILCs, células cebadas, basófilos, y eosinófilos; siendo la IL-4 una de las principales inductoras de los Macrófagos M2 con ayuda de la IL-13 (Ho & Miaw, 2016), estos macrófagos M2 están implicados en la progresión tumoral en varios cánceres (Ho *et al.*, 2016). En diferentes tipos de cáncer se ha demostrado que el aumento de la IL4 e IL-13 están estrechamente relacionadas con la termogénesis y metástasis. Además, observaron niveles elevados de IL-4 en el plasma de pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático (Shi *et al.*, 2021). En este trabajo, encontramos niveles elevados de IL-4 en el epiplón coincidiendo con lo previamente descrito, esto sugiere que posiblemente puede participar en la progresión del cáncer de ovario.

Analizando en conjunto estos resultados, es posible sugerir que la presencia simultánea de IL-6, IL-4, IL-10 y TNF- α está favoreciendo la progresión tumoral.

LIMITACIONES

Este trabajo se llevó a cabo durante la etapa de confinamiento debido a la pandemia de COVID-19. Por esta razón, el número de experimentos realizados fue limitado y debido al tamaño de la muestra en algunos casos no fue posible realizar análisis estadísticos. Por lo tanto, será necesario en un futuro realizar experimentos adicionales para validar nuestros resultados.

CONCLUSIÓN

En conclusión, observamos que en el desarrollo del cáncer de ovario el primer sitio afectado por la metástasis de estas células tumorales es el epiplón. Dentro de este tejido se observó un microambiente inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos T $\gamma\delta$ y una disminución en las ILC2, junto con un aumento en las citocinas IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-17.

PERSPECTIVAS

Nuestros estudios futuros se centrarán en la identificación de los mecanismos responsables de la acumulación de células T $\gamma\delta$ en el microambiente tumoral y la disminución de los ILC1, además de profundizar en el papel de IL-6 en el epitelio en diferentes tiempos de la progresión del cáncer de ovario.

CAPÍTULO II: ADIPOCITOS Y OXCT-1

INTRODUCCIÓN

Los adipocitos han cobrado relevancia en diferentes cánceres debido a que pueden estar implicados en la progresión tumoral. En general, los adipocitos tienen la capacidad de secretar diferentes moléculas conocidas como “adipocitocinas”, como adiponectina, leptina, citocinas proinflamatorias y otros factores (Cao, 2014). En el epiplón, se conoce que los adipocitos pueden atraer a las células tumorales de cáncer de ovario a través de la secreción de adipocitocinas. Además, proporcionan ácidos grasos libres para un rápido crecimiento tumoral. Otro hallazgo importante fue la proteína de unión a ácidos grasos 4 (FABP4, por sus siglas en inglés) la cual se considera como un excelente blanco terapéutico para impedir eficazmente la metástasis en cáncer de ovario, debido a que FAB4 regula las interacciones entre las celular cancerosas y los adipocitos, lo que da como resultado, el incremento de la disponibilidad de lípidos (Nieman *et al.*, 2011). Para que las células cancerosas puedan generar energía a partir de los ácidos grasos libres derivados de la lipólisis en los adipocitos, se requiere del metabolismo de los cuerpos cetónicos, en el cual, están involucradas 4 enzimas, a saber, las 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa 1/2 (BDH 1/2), las succinil-CoA:3 oxiacido CoA transferasa 1/2 (OXCT1/2) (Zhang *et al.*, 2018).

Algunas investigaciones sugieren que OXCT-1 participa en la tumorigénesis y la señalización de las células cancerosas (Zhang & Xie, 2017). En estudios en donde se encontró un incremento en la expresión de la proteína OXCT-1 en la línea celular MDA-MB-231 de cáncer de mama humano, se obtuvo un incremento en el crecimiento tumoral y en la capacidad metastásica (Martinez-Outschoorn *et al.*, 2012). Por otra parte, este aumento de la OXCT-1 en tumores de cáncer de mama se correlacionó con una tendencia no significativa a una mayor supervivencia de las pacientes (Maldonado *et al.*, 2021). En otro estudio se informó que las células del carcinoma hepatocelular reactivan la cetólisis al inducir a OXCT-1 por la señalización de mTORC-AKT-SP1, desencadenada por la carencia de nutrientes, con el fin de utilizar los cuerpos cetónicos en el suministro de energía; además, el

aumento en la expresión de OXCT-1 en muestras de pacientes con carcinoma hepatocelular predice una mayor mortalidad (Huang *et al.*, 2016).

En el caso particular del cáncer de ovario, usando QRT-PCR se determinaron los niveles de expresión de la proteína OXCT-1 en diferentes líneas celulares, encontrado niveles elevados en la línea celular SVOK-3. Además, este grupo de trabajo, evaluó los efectos de la dieta cetogénica (dieta rica en grasas y baja en carbohidratos) en ratones con tumores que tenían una expresión baja de OXCT-1 y ratones con tumores con una expresión elevada de OXCT-1, obteniendo una mejor respuesta a la dieta cetogénica en tumores de baja expresión, sugiriendo que OXCT-1 puede ser utilizado como biomarcador para determinar la sensibilidad a la dieta cetogénica y ser utilizada como tratamiento antitumoral (Zhang *et al.*, 2018). En ese mismo año, nuestro grupo de trabajo a partir de estudios de proteómica (MALDI-TOF), encontró niveles elevadas de la OXCT-1 en células SVOK-3 tratadas con líquido ascítico (Toledo-Leyva *et al.*, 2018). Por esta razón, nos interesó profundizar en el análisis de esta proteína (Ver resultado más adelante).

OBJETIVO

1. Analizar *in silico* la proteína OXCT-1

MATERIALES Y MÉTODOS

Análisis bioinformático de OXCT-1

Se utilizó la base de datos UniProt para la obtención de la secuencia FASTA de la proteína OXCT-1 en *Homo sapiens* (humano). Para la identificación de dominios conservados se utilizó la base de datos de dominio conservados (CD-Search) de NCBI, usando la secuencia en formato fasta de la proteína. Por otro lado, a través de la base de datos STRING, se identificaron las interacciones proteína-proteína de OXCT-1 en *Homo sapiens*. Por último, usando la base de datos Reactome y KEGG se obtuvieron las rutas metabólicas en las que está implicada la OXCT-1.

RESULTADOS

Capítulo II: Análisis bioinformático de OXCT-1

La proteína OXCT-1 implicada en el metabolismo de los cuerpos cetónicos

La reprogramación metabólica en las células cancerosas es un sello distintivo en la progresión del cáncer (Hanahan & Weinberg, 2011). Por lo tanto, las células cancerosas adquieren la capacidad de utilizar diferentes metabolitos para la producción de energía, satisfacer sus necesidades biosintéticas y metabólicas, promoviendo una rápida proliferación celular (Biswas, 2015). Un tipo de metabolitos que ha adquirido importancia en el desarrollo tumoral, son los cuerpos cetónicos, derivados de los ácidos grasos obtenidos a partir de la lipólisis dentro de los adipocitos. En la cetólisis se genera acetil-CoA que posteriormente podrá ser metabolizada en el ciclo de los triacilgliceroles, obteniendo energía. Una de las enzimas relevantes en la cetólisis es la OXCT-1. Por todo lo mencionado en el capítulo 2 y lo anterior, nosotros realizamos estudios bioinformáticos sobre esta proteína. Estos análisis nos ayudarán a comprender el papel de OXCT-1 en cáncer de ovario.

Primeramente, evaluamos la estructura primaria de OXCT-1 (P55809) a través del servidor UniProt, La proteína humana presenta dos isoformas, siendo la isoforma 2 más corta, debido a que su secuencia consta de 123 aminoácidos, careciendo de la primera parte de la proteína (1-397). En cuanto a la isoforma 1, ésta ha sido elegida como la secuencia canónica y consta de 520 aminoácidos.

El análisis de la predicción de dominios conservados se realizó utilizando la secuencia en formato FASTA de la proteína humana a través de la base de datos de NCBI. Cabe mencionar que cada dominio generalmente se asocia con aspectos discretos de la función de la proteína. Los resultados mostraron que la proteína OXCT-1 en el intervalo de 41-274 aminoácidos presenta el dominio **AtoD: Acil CoA, Acetato/3-cetoácido CoA transferasa, unidad alfa**, implicado en el transporte y metabolismo de lípidos. Además, **AtoD** es un miembro de la superfamilia de las

isomerasas de fosfato de azúcar (señalado como SugarP-isomerasa superfamily en la figura 13) (Figura 13).

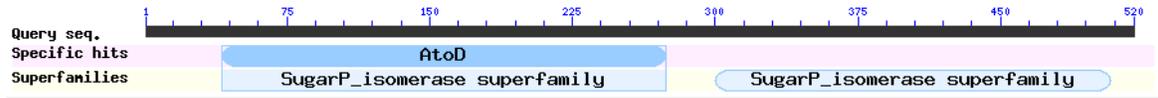


Figura 13. Resumen gráfico de los dominios conservados de la proteína OXCT-1 Humana. El “specific hit”, representa una asociación de alta confianza entre la secuencia de OXCT-1 y un modelo de dominio (indicado en azul brillante). El “specific hit” pertenece a la superfamilia Sugar P-isomerasa (indicado de color pastel).

Posteriormente se realizó un interactoma utilizando el servidor STRING. El análisis reveló que OXCT-1 interactúa con HADH (Hidroxiacil-coenzima A deshidrogenasa, mitocondrial), HMGCS 1-2 (Hidroximetilglutaril-CoA sintasa), ACAT 1-2 (Acetil-CoA acetiltransferasa), HMGCL (Hidroximetilglutaril-CoA liasa), EHHADH (Enzima bifuncional peroxisomal; enoil-CoA hidratasa y 3-hidroxiacil CoA deshidrogenasa), BHD 1-2 (D-beta-hidroxibutirato deshidrogenasa). La función de la mayoría de estas proteínas indica que, posiblemente OXCT-1 participa principalmente en la vía metabólica de los lípidos. Solo la proteína BDH2, tiene un papel clave en la homeostasis y transporte de hierro (Figura 14).

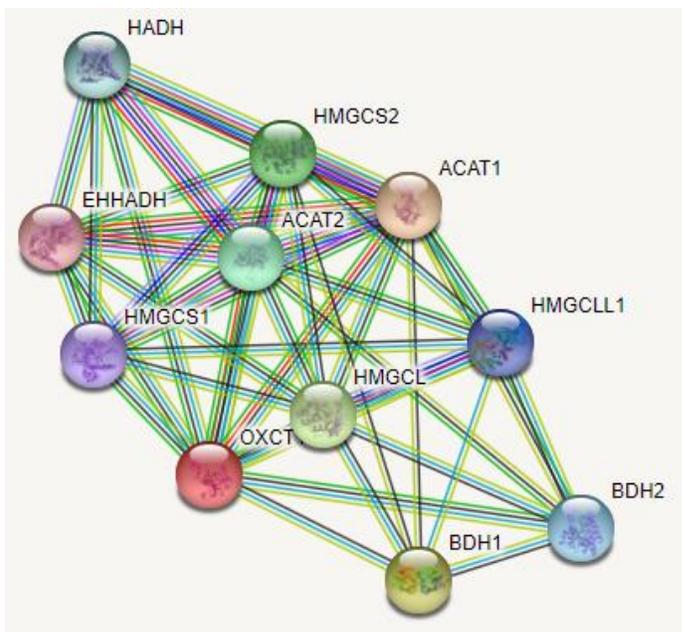


Figura 14. Análisis de la red de interacción proteína-proteína de la proteína OXCT-1 de *Homo sapiens*.

Finalmente realizamos un análisis de vía (metaboloma) en las bases de datos de Reactome y KEGG, utilizando la proteína OXCT-1 de *Homo sapiens*. En KEGG, identificamos 4 vías: (hsa0072) síntesis y degradación de cuerpos cetónicos, (hsa00280) degradación de valina, leucina e isoleucina, (hsa00650) metabolismo del butanoato y (hsa01100) rutas metabólicas (Figura 15-A). En “reactome”, identificamos una vía implicada en el metabolismo de lípidos, particularmente, en el metabolismo de cuerpos cetónicos (Figura 15-B).

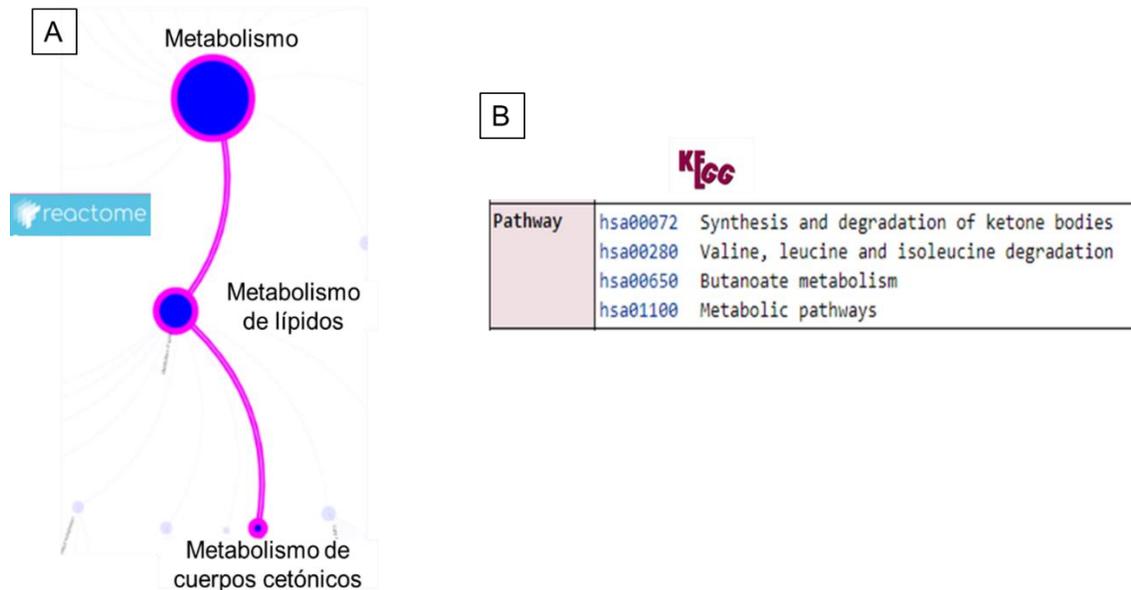


Figura 15. Vías metabólicas relacionadas con la proteína OXCT-1. (A) Vía obtenida de la base de datos de “reactome”. (B) Resumen de las vías relacionadas con OXCT-1 obtenidas de la base de datos KEGG.

DISCUSIÓN

La proteína OXCT-1 participa en la reutilización de las cetonas, puesto que cataliza el primer paso de la cetólisis. Recientemente, se han informado funciones contradictorias para OXCT-1 en varios cánceres (Zhang & Xie, 2017). Por lo tanto, es urgente aclarar el papel de esta proteína para el desarrollo de métodos de diagnóstico y marcadores tumorales tempranos eficaces, particularmente en el cáncer de ovario.

Aunque en ocasiones resulta difícil y costoso la realización de algunos experimentos, hoy en día, se han desarrollado numerosos programas computacionales, convirtiéndose también en una herramienta esencial para el estudio de muchas enfermedades; así, antes de comenzar con el estudio experimental podemos predecir los resultados de tales experimentos. Por ello, en el presente estudio se realizaron diferentes análisis bioinformáticos para la proteína OXCT-1.

Primeramente, se analizó la estructura primaria de esta proteína utilizando Uniprot, demostrando que presenta dos isoformas de diferente tamaño, una de ellas la canónica compuesta de 520 aminoácidos, correspondiente a 56 Da y la otra compuesta de 123 aminoácidos, difiere con la secuencia canónica en 1-397 aminoácidos, correspondiente a 13,358 Da.

En seguida, se analizaron los dominios conservados de esta proteína, mostrando solo un dominio AtoD (Acil CoA, Acetato/3-cetoácido CoA transferasa, unidad alfa). Cabe señalar que los dominios en una proteína son las unidades funcionales, estructurales y evolutivas, e intervienen en aproximadamente el 75% de las interacciones proteína-proteína (Peterson *et al.*, 2017). En consistencia con nuestro resultado, utilizando el gen de caballo OXCT-1 como referencia, se identificó el dominio de transferasa de coenzima A en análisis transcriptómicos derivados de los músculos esqueléticos (Nam *et al.*, 2012). Además, este dominio conservado pertenece a la superfamilia de las isomerasas de fosfato de azúcar, en donde varios de sus miembros están relacionados con algún tipo de cáncer; por ejemplo, la alta expresión la glucosamina-6-fosfato isomerasa se asoció con un mal pronóstico en el carcinoma hepatocelular (Li *et al.*, 2020). Otro miembro de esta superfamilia es la ribosa 5 fosfato isomerasa A, una enzima ubicua importante en la vía de las pentosas fosfato y es responsable de catalizar la isomerización entre D-ribulosa 5-fosfato y D-ribosa 5-fosfato (Chen *et al.*, 2020), reportando su papel en el carcinoma hepatocelular (Ghashghaeinia *et al.*, 2019).

Posteriormente, se analizó el interactoma de la proteína OXCT-1 humana, en donde la mayoría de las proteínas que interactúan con ésta, participan en el metabolismo

de lípidos. Para conocer más acerca de OXCT-1, investigamos si alguna de estas proteínas está relacionada con cáncer; por ejemplo, ACAT-1 y ACAT2 (acetil-CoA acetiltransferasa) catalizan la formación reversible de acetoacetyl-CoA a partir de dos moléculas de acetil-CoA durante cetogénesis y cetólisis respectivamente y ACAT1 también participa en la ruta de degradación de isoleucina. En el contexto tumoral ACAT1 se informó que tiene una elevada actividad en diferentes líneas celulares de cáncer humano (Goudarzi, 2019). Particularmente en el cáncer de ovario, se demostró que esta enzima aumentó su expresión en líneas celulares de cáncer de ovario (OC-314, SKOV-3 e IGROV-1) en comparación con las células epiteliales de ovario primarias (Ayyagari *et al.*, 2020).

Otra enzima que posiblemente pudiera interactuar con OXCT-1 es la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa 1 (BHD1). Se midieron los niveles de expresión de dos enzimas cetolíticas clave en los tumores, a saber, BDH1 y OXCT-1 y la respuesta a la dieta cetogénica, en donde demostraron que los tumores que presentaban una expresión baja de estas dos enzimas tenían una mejor respuesta al tratamiento con la dieta cetogénica que aquellos tumores con alta expresión de estas dos enzimas, sugiriendo que estas proteínas pueden ser utilizadas como posibles biomarcadores para la determinación de la sensibilidad del cáncer a este tipo de tratamientos (Zhang *et al.*, 2018).

CONCLUSIÓN

La OXCT-1 es una proteína relacionada con el metabolismo de lípidos y cuya actividad da como resultado la generación de ATP; en su momento este ATP será utilizado por las células tumorales para su crecimiento.

Por lo tanto, integrando los resultados obtenidos en nuestro laboratorio que muestran una expresión elevada de OXCT-1 en células SKOV-3 estimuladas con líquido ascítico, las concentraciones elevadas de IL-6 en esta ascitis, que inducen la lipólisis de los adipocitos y la información recabada acerca de la función de esta enzima permiten sugerir que esta proteína podría estar participando también en la pérdida del tejido adiposo en etapas tardías del cáncer de ovario. Así mismo, queda

abierta la posibilidad de utilizar a OXCT-1 como un posible biomarcador en la sensibilidad al tratamiento alternativo con dieta cetogénica.

En futuros estudios se explorará si los resultados *in silico* son predictivos de lo que pudiera ocurrir en condiciones *in vitro* - *in vivo*.

REFERENCIAS

- Alsop, K., Fereday, S., Meldrum, C., deFazio, A., Emmanuel, C., George, J., . . . Mitchell, G. (2012). BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: a report from the Australian Ovarian Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(21), 2654-2663. doi:10.1200/JCO.2011.39.8545
- Anestakis, D., Petanidis, S., Kalyvas, S., Nday, C. M., Tsave, O., Kioseoglou, E., & Salifoglou, A. (2015). Mechanisms and applications of interleukins in cancer immunotherapy. *Int J Mol Sci*, *16*(1), 1691-1710. doi:10.3390/ijms16011691
- Artis, D., & Spits, H. (2015). The biology of innate lymphoid cells. *Nature*, *517*(7534), 293-301. doi:10.1038/nature14189
- Auersperg, N., Woo, M. M., & Gilks, C. B. (2008). The origin of ovarian carcinomas: a developmental view. *Gynecologic oncology*, *110*(3), 452-454. doi:10.1016/j.ygyno.2008.05.031
- Ayantunde, A. A., & Parsons, S. L. (2007). Pattern and prognostic factors in patients with malignant ascites: a retrospective study. *Ann Oncol*, *18*(5), 945-949. doi:10.1093/annonc/mdl499
- Ayyagari, V. N., Wang, X., Diaz-Sylvester, P. L., Groesch, K., & Brard, L. (2020). Assessment of acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT-1) role in ovarian cancer progression-An in vitro study. *PLoS One*, *15*(1), e0228024. doi:10.1371/journal.pone.0228024
- Benezech, C., & Jackson-Jones, L. H. (2019). ILC2 Orchestration of Local Immune Function in Adipose Tissue. *Front Immunol*, *10*, 171. doi:10.3389/fimmu.2019.00171
- Biswas, S. K. (2015). Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. *Immunity*, *43*(3), 435-449. doi:10.1016/j.immuni.2015.09.001
- Bonneville, M., O'Brien, R. L., & Born, W. K. (2010). Gammadelta T cell effector functions: a blend of innate programming and acquired plasticity. *Nature reviews Immunology*, *10*(7), 467-478. doi:10.1038/nri2781
- Brestoff, J. R., Kim, B. S., Saenz, S. A., Stine, R. R., Monticelli, L. A., Sonnenberg, G. F., . . . Artis, D. (2015). Group 2 innate lymphoid cells promote beiging of white adipose tissue and limit obesity. *Nature*, *519*(7542), 242-246. doi:10.1038/nature14115
- Briukhovetska, D., Dorr, J., Endres, S., Libby, P., Dinarello, C. A., & Kobold, S. (2021). Interleukins in cancer: from biology to therapy. *Nat Rev Cancer*, *21*(8), 481-499. doi:10.1038/s41568-021-00363-z
- Browning, L., Patel, M. R., Horvath, E. B., Tawara, K., & Jorcyk, C. L. (2018). IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag Res*, *10*, 6685-6693. doi:10.2147/CMAR.S179189
- Bruni, D., Angell, H. K., & Galon, J. (2020). The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. *Nat Rev Cancer*, *20*(11), 662-680. doi:10.1038/s41568-020-0285-7
- Cannistra, S. A. (2004). Cancer of the ovary. *New England Journal of Medicine*, *351*(24), 2519-2529. doi:10.1056/NEJMra041842
- Cao, H. (2014). Adipocytokines in obesity and metabolic disease. *Journal of Endocrinology*, *220*(2), T47-59. doi:10.1530/JOE-13-0339
- Carey, A. L., Steinberg, G. R., Macaulay, S. L., Thomas, W. G., Holmes, A. G., Ramm, G., . . . Febbraio, M. A. (2006). Interleukin-6 increases insulin-stimulated glucose disposal in humans and glucose uptake and fatty acid oxidation in vitro via AMP-activated protein kinase. *Diabetes*, *55*(10), 2688-2697. doi:10.2337/db05-1404
- Chen, J., Wu, H., Zhang, W., & Mu, W. (2020). Ribose-5-phosphate isomerases: characteristics, structural features, and applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, *104*(15), 6429-6441. doi:10.1007/s00253-020-10735-4

- Chen, V. W., Ruiz, B., Killeen, J. L., Cote, T. R., Wu, X. C., & Correa, C. N. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*, *97*(10 Suppl), 2631-2642. doi:10.1002/cncr.11345
- Chen, X., Shang, W., Xu, R., Wu, M., Zhang, X., Huang, P., . . . Pan, S. (2019). Distribution and functions of gammadelta T cells infiltrated in the ovarian cancer microenvironment. *J Transl Med*, *17*(1), 144. doi:10.1186/s12967-019-1897-0
- Chen, X., Zhang, X., Xu, R., Shang, W., Ming, W., Wang, F., & Wang, J. (2020). Implication of IL-17 producing abetaT and gammadeltaT cells in patients with ovarian cancer. *Hum Immunol*, *81*(5), 244-248. doi:10.1016/j.humimm.2020.02.002
- Chen, Y. L., Cheng, W. F., Chang, M. C., Lin, H. W., Huang, C. T., Chien, C. L., & Chen, C. A. (2013). Interferon-gamma in ascites could be a predictive biomarker of outcome in ovarian carcinoma. *Gynecol Oncol*, *131*(1), 63-68. doi:10.1016/j.ygyno.2013.07.105
- Clark, R., Krishnan, V., Schoof, M., Rodriguez, I., Theriault, B., Chekmareva, M., & Rinker-Schaeffer, C. (2013). Milky spots promote ovarian cancer metastatic colonization of peritoneal adipose in experimental models. *American Journal of Pathology*, *183*(2), 576-591. doi:10.1016/j.ajpath.2013.04.023
- Cohen, M., Pierredon, S., Wullemin, C., Delie, F., & Petignat, P. (2014). Acellular fraction of ovarian cancer ascites induce apoptosis by activating JNK and inducing BRCA1, Fas and FasL expression in ovarian cancer cells. *Oncoscience*, *1*(4), 262-271. doi:10.18632/oncoscience.31
- Crome, S. Q., Nguyen, L. T., Lopez-Verges, S., Yang, S. Y., Martin, B., Yam, J. Y., . . . Ohashi, P. S. (2017). A distinct innate lymphoid cell population regulates tumor-associated T cells. *Nature medicine*, *23*(3), 368-375. doi:10.1038/nm.4278
- Dai, L., Song, K., & Di, W. (2020). Adipocytes: active facilitators in epithelial ovarian cancer progression? *Journal of Ovarian Research*, *13*(1), 115. doi:10.1186/s13048-020-00718-4
- Del Corno, M., Conti, L., & Gessani, S. (2018). Innate Lymphocytes in Adipose Tissue Homeostasis and Their Alterations in Obesity and Colorectal Cancer. *Frontiers in immunology*, *9*, 2556. doi:10.3389/fimmu.2018.02556
- Del Corno, M., D'Archivio, M., Conti, L., Scazzocchio, B., Vari, R., Donninelli, G., . . . Gessani, S. (2016). Visceral fat adipocytes from obese and colorectal cancer subjects exhibit distinct secretory and omega6 polyunsaturated fatty acid profiles and deliver immunosuppressive signals to innate immunity cells. *Oncotarget*, *7*(39), 63093-63105. doi:10.18632/oncotarget.10998
- Dinarelli, C. A. (2010). Why not treat human cancer with interleukin-1 blockade? *Cancer Metastasis Rev*, *29*(2), 317-329. doi:10.1007/s10555-010-9229-0
- Dubeau, L. (2008). The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncology*, *9*(12), 1191-1197. doi:10.1016/S1470-2045(08)70308-5
- Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*, *6*(11), 836-848. doi:10.1038/nri1961
- Edwards, M., & Mohiuddin, S. S. (2021). Biochemistry, Lipolysis. In *StatPearls*. Treasure Island (FL).
- Fu, X. L., Duan, W., Su, C. Y., Mao, F. Y., Lv, Y. P., Teng, Y. S., . . . Zhao, Y. L. (2017). Interleukin 6 induces M2 macrophage differentiation by STAT3 activation that correlates with gastric cancer progression. *Cancer Immunol Immunother*, *66*(12), 1597-1608. doi:10.1007/s00262-017-2052-5
- Gao, A. H., Hu, Y. R., & Zhu, W. P. (2021). IFN-gamma inhibits ovarian cancer progression via SOCS1/JAK/STAT signaling pathway. *Clin Transl Oncol*. doi:10.1007/s12094-021-02668-9
- Garcia-Tunon, I., Ricote, M., Ruiz, A., Fraile, B., Paniagua, R., & Royuela, M. (2005). IL-6, its receptors and its relationship with bcl-2 and bax proteins in infiltrating and in situ human breast carcinoma. *Histopathology*, *47*(1), 82-89. doi:10.1111/j.1365-2559.2005.02178.x

- Ghaedi, M., & Ohashi, P. S. (2020). ILC transdifferentiation: roles in cancer progression. *Cell research*, 30(7), 562-563. doi:10.1038/s41422-020-0326-5
- Ghashghaeinia, M., Koberle, M., Mrowietz, U., & Bernhardt, I. (2019). Proliferating tumor cells mimic glucose metabolism of mature human erythrocytes. *Cell Cycle*, 18(12), 1316-1334. doi:10.1080/15384101.2019.1618125
- Goudarzi, A. (2019). The recent insights into the function of ACAT1: A possible anti-cancer therapeutic target. *Life Sci*, 232, 116592. doi:10.1016/j.lfs.2019.116592
- Han, J., Lu, C., Meng, Q., Halim, A., Yean, T. J., & Wu, G. (2019). Plasma concentration of interleukin-6 was upregulated in cancer cachexia patients and was positively correlated with plasma free fatty acid in female patients. *Nutr Metab (Lond)*, 16, 80. doi:10.1186/s12986-019-0409-9
- Han, J., Meng, Q., Shen, L., & Wu, G. (2018). Interleukin-6 induces fat loss in cancer cachexia by promoting white adipose tissue lipolysis and browning. *Lipids Health Dis*, 17(1), 14. doi:10.1186/s12944-018-0657-0
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013
- Hirano, T. (2021). IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. *Int Immunol*, 33(3), 127-148. doi:10.1093/intimm/dxaa078
- Ho, I. C., & Miaw, S. C. (2016). Regulation of IL-4 Expression in Immunity and Diseases. *Adv Exp Med Biol*, 941, 31-77. doi:10.1007/978-94-024-0921-5_3
- Ho, V. W., Hofs, E., Elisia, I., Lam, V., Hsu, B. E., Lai, J., . . . Krystal, G. (2016). All Trans Retinoic Acid, Transforming Growth Factor beta and Prostaglandin E2 in Mouse Plasma Synergize with Basophil-Secreted Interleukin-4 to M2 Polarize Murine Macrophages. *PLoS One*, 11(12), e0168072. doi:10.1371/journal.pone.0168072
- Huang, Li, T., Wang, L., Zhang, L., Yan, R., Li, K., . . . Zhang, H. (2016). Hepatocellular carcinoma redirects to ketolysis for progression under nutrition deprivation stress. *Cell Res*, 26(10), 1112-1130. doi:10.1038/cr.2016.109
- Huber, M. A., Kraut, N., & Beug, H. (2005). Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Current opinion in cell biology*, 17(5), 548-558. doi:10.1016/j.ceb.2005.08.001
- Hunter, S., Willcox, C. R., Davey, M. S., Kasatskaya, S. A., Jeffery, H. C., Chudakov, D. M., . . . Willcox, B. E. (2018). Human liver infiltrating gammadelta T cells are composed of clonally expanded circulating and tissue-resident populations. *J Hepatol*, 69(3), 654-665. doi:10.1016/j.jhep.2018.05.007
- Imai, T., Horiuchi, A., Wang, C., Oka, K., Ohira, S., Nikaido, T., & Konishi, I. (2003). Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *American Journal of Pathology*, 163(4), 1437-1447. doi:10.1016/S0002-9440(10)63501-8
- Kahn, C. R., Wang, G., & Lee, K. Y. (2019). Altered adipose tissue and adipocyte function in the pathogenesis of metabolic syndrome. *Journal of Clinical Investigation*, 129(10), 3990-4000. doi:10.1172/JCI129187
- Kaku, T., Ogawa, S., Kawano, Y., Ohishi, Y., Kobayashi, H., Hirakawa, T., & Nakano, H. (2003). Histological classification of ovarian cancer. *Medical Electron Microscopy* 36(1), 9-17. doi:10.1007/s007950300002
- Kane, H., & Lynch, L. (2019). Innate Immune Control of Adipose Tissue Homeostasis. *Trends Immunol*, 40(9), 857-872. doi:10.1016/j.it.2019.07.006
- Kern, L., Mittenbuhler, M. J., Vesting, A. J., Ostermann, A. L., Wunderlich, C. M., & Wunderlich, F. T. (2018). Obesity-Induced TNFalpha and IL-6 Signaling: The Missing Link between Obesity and

- Inflammation-Driven Liver and Colorectal Cancers. *Cancers (Basel)*, 11(1). doi:10.3390/cancers11010024
- Khan, S. M., Funk, H. M., Thiollou, S., Lotan, T. L., Hickson, J., Prins, G. S., . . . Rinker-Schaeffer, C. W. (2010). *In vitro* metastatic colonization of human ovarian cancer cells to the omentum. *Clinical and Experimental Metastasis*, 27(3), 185-196. doi:10.1007/s10585-010-9317-0
- 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. doi:10.1111/cas.12987
- Kipps, E., Tan, D. S., & 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. doi:10.1038/nrc3432
- Knights, A. J., Vohralik, E. J., Houweling, P. J., Stout, E. S., Norton, L. J., Alexopoulos, S. J., . . . Quinlan, K. G. R. (2020). Eosinophil function in adipose tissue is regulated by Kruppel-like factor 3 (KLF3). *Nat Commun*, 11(1), 2922. doi:10.1038/s41467-020-16758-9
- Kohlgruber, A. C., Gal-Oz, S. T., LaMarche, N. M., Shimazaki, M., Duquette, D., Koay, H. F., . . . Lynch, L. (2018). gammadelta T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. *Nature Immunology*, 19(5), 464-474. doi:10.1038/s41590-018-0094-2
- Kohlgruber, A. C., Gal-Oz, S. T., LaMarche, N. M., Shimazaki, M., Duquette, D., Koay, H. F., . . . Lynch, L. (2019). Author Correction: gammadelta T cells producing interleukin-17A regulate adipose regulatory T cell homeostasis and thermogenesis. *Nat Immunol*, 20(3), 373. doi:10.1038/s41590-019-0330-4
- Kuroki, L., & Guntupalli, S. R. (2020). Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ*, 371, m3773. doi:10.1136/bmj.m3773
- Lafont, V., Sanchez, F., Laprevotte, E., Michaud, H. A., Gros, L., Eliaou, J. F., & Bonnefoy, N. (2014). Plasticity of gammadelta T Cells: Impact on the Anti-Tumor Response. *Frontiers in immunology*, 5, 622. doi:10.3389/fimmu.2014.00622
- Lai, D., Wang, F., Chen, Y., Wang, C., Liu, S., Lu, B., . . . Guo, L. (2012). Human ovarian cancer stem-like cells can be efficiently killed by gammadelta T lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother*, 61(7), 979-989. doi:10.1007/s00262-011-1166-4
- Lee, M. W., Odegaard, J. I., Mukundan, L., Qiu, Y., Molofsky, A. B., Nussbaum, J. C., . . . Chawla, A. (2015). Activated type 2 innate lymphoid cells regulate beige fat biogenesis. *Cell*, 160(1-2), 74-87. doi:10.1016/j.cell.2014.12.011
- Lee, Y. H., Mottillo, E. P., & Granneman, J. G. (2014). Adipose tissue plasticity from WAT to BAT and in between. *Biochimica et biophysica acta*, 1842(3), 358-369. doi:10.1016/j.bbadis.2013.05.011
- Lengyel, E. (2010). Ovarian cancer development and metastasis. *American Journal of Pathology*, 177(3), 1053-1064. doi:10.2353/ajpath.2010.100105
- Lheureux, S., Braunstein, M., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin*, 69(4), 280-304. doi:10.3322/caac.21559
- Li, D., Cheng, X., Zheng, W., & Chen, J. (2020). Glucosamine-6-Phosphate Isomerase 1 Promotes Tumor Progression and Indicates Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Manag Res*, 12, 4923-4935. doi:10.2147/CMAR.S250094
- Lim, A. I., & Di Santo, J. P. (2019). ILC-poiesis: Ensuring tissue ILC differentiation at the right place and time. *European journal of immunology*, 49(1), 11-18. doi:10.1002/eji.201747294
- Lisio, M. A., Fu, L., Goyeneche, A., Gao, Z. H., & Telleria, C. (2019). High-Grade Serous Ovarian Cancer: Basic Sciences, Clinical and Therapeutic Standpoints. *International journal of molecular sciences*, 20(4), 952. doi:10.3390/ijms20040952

- Liu, M., Silva-Sanchez, A., Randall, T. D., & Meza-Perez, S. (2021). Specialized immune responses in the peritoneal cavity and omentum. *J Leukoc Biol*, *109*(4), 717-729. doi:10.1002/JLB.5MIR0720-271RR
- Lo Presti, E., Pizzolato, G., Corsale, A. M., Caccamo, N., Sireci, G., Dieli, F., & Meraviglia, S. (2018). gammadelta T Cells and Tumor Microenvironment: From Immunosurveillance to Tumor Evasion. *Front Immunol*, *9*, 1395. doi:10.3389/fimmu.2018.01395
- Loo, S. W., & Pui, T. S. (2020). Cytokine and Cancer Biomarkers Detection: The Dawn of Electrochemical Paper-Based Biosensor. *Sensors (Basel)*, *20*(7). doi:10.3390/s20071854
- Ma, C., Zhang, Q., Ye, J., Wang, F., Zhang, Y., Wevers, E., . . . Peng, G. (2012). Tumor-infiltrating gammadelta T lymphocytes predict clinical outcome in human breast cancer. *J Immunol*, *189*(10), 5029-5036. doi:10.4049/jimmunol.1201892
- Maccio, A., & Madeddu, C. (2012). Inflammation and ovarian cancer. *Cytokine*, *58*(2), 133-147. doi:10.1016/j.cyto.2012.01.015
- Maggi, E., Veneziani, I., Moretta, L., Cosmi, L., & Annunziato, F. (2020). Group 2 Innate Lymphoid Cells: A Double-Edged Sword in Cancer? *Cancers (Basel)*, *12*(11). doi:10.3390/cancers12113452
- Maldonado, R., Talana, C. A., Song, C., Dixon, A., Uehara, K., & Weichhaus, M. (2021). beta-hydroxybutyrate does not alter the effects of glucose deprivation on breast cancer cells. *Oncol Lett*, *21*(1), 65. doi:10.3892/ol.2020.12326
- Mantovani, A., Dinarello, C. A., Molgora, M., & Garlanda, C. (2019). Interleukin-1 and Related Cytokines in the Regulation of Inflammation and Immunity. *Immunity*, *50*(4), 778-795. doi:10.1016/j.immuni.2019.03.012
- Mao, T. L., Miao, C. H., Liao, Y. J., Chen, Y. J., Yeh, C. Y., & Liu, C. L. (2019). Ex Vivo Expanded Human Vgamma9Vdelta2 T-Cells Can Suppress Epithelial Ovarian Cancer Cell Growth. *Int J Mol Sci*, *20*(5). doi:10.3390/ijms20051139
- Martinez-Outschoorn, U. E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., & Lisanti, M. P. (2012). Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle*, *11*(21), 3964-3971. doi:10.4161/cc.22137
- Matulonis, U. A., Sood, A. K., Fallowfield, L., Howitt, B. E., Sehouli, J., & Karlan, B. Y. (2016). Ovarian cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *2*, 16061. doi:10.1038/nrdp.2016.61
- McClement, S. (2021). Adipose Tissue and Cancer Cachexia: What Nurses Need to Know. *Asia Pac J Oncol Nurs*, *8*(5), 445-449. doi:10.4103/apjon.apjon-2134
- McCloskey, C. W., Rodriguez, G. M., Galpin, K. J. C., & Vanderhyden, B. C. (2018). Ovarian Cancer Immunotherapy: Preclinical Models and Emerging Therapeutics. *Cancers*, *10*(8), 244. doi:10.3390/cancers10080244
- Mehta, P., Nuotio-Antar, A. M., & Smith, C. W. (2015). gammadelta T cells promote inflammation and insulin resistance during high fat diet-induced obesity in mice. *J Leukoc Biol*, *97*(1), 121-134. doi:10.1189/jlb.3A0414-211RR
- Melo, A. M., Mylod, E., Fitzgerald, V., Donlon, N. E., Murphy, D. M., Foley, E. K., . . . Conroy, M. J. (2021). Tissue distribution of gammadelta T cell subsets in oesophageal adenocarcinoma. *Clin Immunol*, *229*, 108797. doi:10.1016/j.clim.2021.108797
- Michailidou, Z., Gomez-Salazar, M., & Alexaki, V. I. (2021). Innate Immune Cells in the Adipose Tissue in Health and Metabolic Disease. *J Innate Immun*, 1-27. doi:10.1159/000515117
- Morales, J., Li, L., Fattah, F. J., Dong, Y., Bey, E. A., Patel, M., . . . Boothman, D. A. (2014). Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, *24*(1), 15-28. doi:10.1615/critreveukaryotgeneexpr.2013006875

- Nam, G. H., Ahn, K., Bae, J. H., Cho, B. W., Park, K. D., Lee, H. K., . . . Kim, H. S. (2012). Identification of ORF sequences and exercise-induced expression change in thoroughbred horse OXCT1 gene. *Gene*, *496*(1), 45-48. doi:10.1016/j.gene.2012.01.021
- Nieman, K. M., Kenny, H. A., Penicka, C. V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M. R., . . . Lengyel, E. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine*, *17*(11), 1498-1503. doi:10.1038/nm.2492
- Norquist, B. M., Harrell, M. I., Brady, M. F., Walsh, T., Lee, M. K., Gulsuner, S., . . . Birrer, M. J. (2016). Inherited Mutations in Women With Ovarian Carcinoma. *JAMA oncology*, *2*(4), 482-490. doi:10.1001/jamaoncol.2015.5495
- O'Sullivan, T. E., Rapp, M., Fan, X., Weizman, O. E., Bhardwaj, P., Adams, N. M., . . . Sun, J. C. (2016). Adipose-Resident Group 1 Innate Lymphoid Cells Promote Obesity-Associated Insulin Resistance. *Immunity*, *45*(2), 428-441. doi:10.1016/j.immuni.2016.06.016
- Odunsi, K. (2017). Immunotherapy in ovarian cancer. *Annals of Oncology*, *28*(suppl_8), viii1-viii7. doi:10.1093/annonc/mdx444
- Oliphant, C. J., Hwang, Y. Y., Walker, J. A., Salimi, M., Wong, S. H., Brewer, J. M., . . . McKenzie, A. N. (2014). MHCII-mediated dialog between group 2 innate lymphoid cells and CD4(+) T cells potentiates type 2 immunity and promotes parasitic helminth expulsion. *Immunity*, *41*(2), 283-295. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.016
- Pellicci, D. G., Koay, H. F., & Berzins, S. P. (2020). Thymic development of unconventional T cells: how NKT cells, MAIT cells and gammadelta T cells emerge. *Nature reviews Immunology*. doi:10.1038/s41577-020-0345-y
- Penet, M. F., Krishnamachary, B., Wildes, F. B., Mironchik, Y., Hung, C. F., Wu, T. C., & Bhujwala, Z. M. (2018). Ascites Volumes and the Ovarian Cancer Microenvironment. *Front Oncol*, *8*, 595. doi:10.3389/fonc.2018.00595
- Peng, G., Wang, H. Y., Peng, W., Kiniwa, Y., Seo, K. H., & Wang, R. F. (2007). Tumor-infiltrating gammadelta T cells suppress T and dendritic cell function via mechanisms controlled by a unique toll-like receptor signaling pathway. *Immunity*, *27*(2), 334-348. doi:10.1016/j.immuni.2007.05.020
- Pennington, K. P., & Swisher, E. M. (2012). Hereditary ovarian cancer: beyond the usual suspects. *Gynecologic oncology*, *124*(2), 347-353. doi:10.1016/j.ygyno.2011.12.415
- Peterson, T. A., Gauran, I. I. M., Park, J., Park, D., & Kann, M. G. (2017). Oncodomains: A protein domain-centric framework for analyzing rare variants in tumor samples. *PLoS Comput Biol*, *13*(4), e1005428. doi:10.1371/journal.pcbi.1005428
- Petruzzelli, M., & Wagner, E. F. (2016). Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. *Genes Dev*, *30*(5), 489-501. doi:10.1101/gad.276733.115
- Piver, M. S. (2006). Treatment of ovarian cancer at the crossroads: 50 years after single-agent melphalan chemotherapy. *Oncology (Williston Park)*, *20*(10), 1156, 1158. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17024868>
- Pradeep, S., Kim, S. W., Wu, S. Y., Nishimura, M., Chaluvally-Raghavan, P., Miyake, T., . . . Sood, A. K. (2014). Hematogenous metastasis of ovarian cancer: rethinking mode of spread. *Cancer Cell*, *26*(1), 77-91. doi:10.1016/j.ccr.2014.05.002
- Prat, J., & Oncology, F. C. o. G. (2015). Staging Classification for Cancer of the Ovary, Fallopian Tube, and Peritoneum: Abridged Republication of Guidelines From the International Federation of Gynecology and Obstetrics (FIGO). *Obstetrics and Gynecology*, *126*(1), 171-174. doi:10.1097/AOG.0000000000000917
- Ramalingam, P. (2016). Morphologic, Immunophenotypic, and Molecular Features of Epithelial Ovarian Cancer. *Oncology (Williston Park)*, *30*(2), 166-176. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26892153>

- Raspollini, M. R., Castiglione, F., Rossi Degl'innocenti, D., Amunni, G., Villanucci, A., Garbini, F., . . . Taddei, G. L. (2005). Tumour-infiltrating gamma/delta T-lymphocytes are correlated with a brief disease-free interval in advanced ovarian serous carcinoma. *Ann Oncol*, *16*(4), 590-596. doi:10.1093/annonc/mdi112
- Rei, M., Goncalves-Sousa, N., Lanca, T., Thompson, R. G., Mensurado, S., Balkwill, F. R., . . . Silva-Santos, B. (2014). Murine CD27(-) Vgamma6(+) gammadelta T cells producing IL-17A promote ovarian cancer growth via mobilization of protumor small peritoneal macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(34), E3562-3570. doi:10.1073/pnas.1403424111
- Reid, B. M., Permeth, J. B., & Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer biology & medicine*, *14*(1), 9-32. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084
- Rescigno, P., Cerillo, I., Ruocco, R., Condello, C., De Placido, S., & Pensabene, M. (2013). New hypothesis on pathogenesis of ovarian cancer lead to future tailored approaches. *Biomedicine Research International*, *2013*, 852839. doi:10.1155/2013/852839
- Riedel, F., Zaiss, I., Herzog, D., Gotte, K., Naim, R., & Hormann, K. (2005). Serum levels of interleukin-6 in patients with primary head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res*, *25*(4), 2761-2765. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16080523>
- Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E., & Flavell, R. A. (1997). Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med*, *185*(3), 461-469. doi:10.1084/jem.185.3.461
- Roby, K. F., Taylor, C. C., Sweetwood, J. P., Cheng, Y., Pace, J. L., Tawfik, O., . . . Terranova, P. F. (2000). Development of a syngeneic mouse model for events related to ovarian cancer. *Carcinogenesis*, *21*(4), 585-591. doi:10.1093/carcin/21.4.585
- Rodrigues, I. S. S., Martins-Filho, A., Micheli, D. C., Lima, C. A., Tavares-Murta, B. M., Murta, E. F. C., & Nomelini, R. S. (2020). IL-6 and IL-8 as Prognostic Factors in Peritoneal Fluid of Ovarian Cancer. *Immunol Invest*, *49*(5), 510-521. doi:10.1080/08820139.2019.1691222
- Rodriguez, G. M., Galpin, K. J. C., McCloskey, C. W., & Vanderhyden, B. C. (2018). The Tumor Microenvironment of Epithelial Ovarian Cancer and Its Influence on Response to Immunotherapy. *Cancers* *10*(8), 242. doi:10.3390/cancers10080242
- Roett, M. A., & Evans, P. (2009). Ovarian cancer: an overview. *American family physician*, *80*(6), 609-616. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19817326>
- Rojas, V., Hirshfield, K. M., Ganesan, S., & Rodriguez-Rodriguez, L. (2016). Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment. *International journal of molecular sciences*, *17*(12), 2113. doi:10.3390/ijms17122113
- Sangisetty, S. L., & Miner, T. J. (2012). Malignant ascites: A review of prognostic factors, pathophysiology and therapeutic measures. *World journal of gastrointestinal surgery*, *4*(4), 87-95. doi:10.4240/wjgs.v4.i4.87
- Sheikhpour, E., Noorbakhsh, P., Foroughi, E., Farahnak, S., Nasiri, R., & Neamatzadeh, H. (2018). A Survey on the Role of Interleukin-10 in Breast Cancer: A Narrative. *Rep Biochem Mol Biol*, *7*(1), 30-37. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30324115>
- Shi, J., Song, X., Traub, B., Luxenhofer, M., & Kornmann, M. (2021). Involvement of IL-4, IL-13 and Their Receptors in Pancreatic Cancer. *Int J Mol Sci*, *22*(6). doi:10.3390/ijms22062998
- Stewart, C., Ralyea, C., & Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Semin Oncol Nurs*, *35*(2), 151-156. doi:10.1016/j.soncn.2019.02.001
- Stewart, R. A., Pilie, P. G., & Yap, T. A. (2018). Development of PARP and Immune-Checkpoint Inhibitor Combinations. *Cancer research*, *78*(24), 6717-6725. doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-2652

- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*, *71*(3), 209-249. doi:10.3322/caac.21660
- Trabanelli, S., Gomez-Cadena, A., Salome, B., Michaud, K., Mavilio, D., Landis, B. N., . . . Jandus, C. (2018). Human innate lymphoid cells (ILCs): Toward a uniform immune-phenotyping. *Cytometry B, Clinical cytometry*, *94*(3), 392-399. doi:10.1002/cyto.b.21614
- Vivier, E., Artis, D., Colonna, M., Diefenbach, A., Di Santo, J. P., Eberl, G., . . . Spits, H. (2018). Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell*, *174*(5), 1054-1066. doi:10.1016/j.cell.2018.07.017
- Wakita, D., Sumida, K., Iwakura, Y., Nishikawa, H., Ohkuri, T., Chamoto, K., . . . Nishimura, T. (2010). Tumor-infiltrating IL-17-producing gammadelta T cells support the progression of tumor by promoting angiogenesis. *Eur J Immunol*, *40*(7), 1927-1937. doi:10.1002/eji.200940157
- Walsh, T., Casadei, S., Lee, M. K., Pennil, C. C., Nord, A. S., Thornton, A. M., . . . Swisher, E. M. (2011). Mutations in 12 genes for inherited ovarian, fallopian tube, and peritoneal carcinoma identified by massively parallel sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *108*(44), 18032-18037. doi:10.1073/pnas.1115052108
- Wang, H., Shen, L., Sun, X., Liu, F., Feng, W., Jiang, C., . . . Bi, Y. (2019). Adipose group 1 innate lymphoid cells promote adipose tissue fibrosis and diabetes in obesity. *Nat Commun*, *10*(1), 3254. doi:10.1038/s41467-019-11270-1
- Wei, H., Tan, K., Sun, R., Yin, L., Zhang, J., & Pu, Y. (2014). Aberrant production of Th1/Th2/Th17-related cytokines in serum of C57BL/6 mice after short-term formaldehyde exposure. *Int J Environ Res Public Health*, *11*(10), 10036-10050. doi:10.3390/ijerph111010036
- Wilkosz, S., Ireland, G., Khwaja, N., Walker, M., Butt, R., de Giorgio-Miller, A., & Herrick, S. E. (2005). A comparative study of the structure of human and murine greater omentum. *Anatomy & Embryology*, *209*(3), 251-261. doi:10.1007/s00429-004-0446-6
- Woo, J. H., Yang, Y. I., Ahn, J. H., Choi, Y. S., & Choi, J. H. (2017). Interleukin 6 secretion from alternatively activated macrophages promotes the migration of endometriotic epithelial cells. *Biol Reprod*, *97*(5), 660-670. doi:10.1093/biolre/iox118
- Wroblewski, M., Szewczyk-Golec, K., Holynska-Iwan, I., Wroblewska, J., & Wozniak, A. (2021). Characteristics of Selected Adipokines in Ascites and Blood of Ovarian Cancer Patients. *Cancers (Basel)*, *13*(18). doi:10.3390/cancers13184702
- Wu, D., Wu, P., Qiu, F., Wei, Q., & Huang, J. (2017). Human gammadeltaT-cell subsets and their involvement in tumor immunity. *Cell Mol Immunol*, *14*(3), 245-253. doi:10.1038/cmi.2016.55
- Wu, P., Wu, D., Ni, C., Ye, J., Chen, W., Hu, G., . . . Huang, J. (2014). gammadeltaT17 cells promote the accumulation and expansion of myeloid-derived suppressor cells in human colorectal cancer. *Immunity*, *40*(5), 785-800. doi:10.1016/j.immuni.2014.03.013
- Wu, Y. L., Ding, Y. P., Tanaka, Y., Shen, L. W., Wei, C. H., Minato, N., & Zhang, W. (2014). gammadelta T cells and their potential for immunotherapy. *International journal of biological sciences*, *10*(2), 119-135. doi:10.7150/ijbs.7823
- Xu, W., Lau, Z. W. X., Fulop, T., & Larbi, A. (2020). The Aging of gammadelta T Cells. *Cells*, *9*(5). doi:10.3390/cells9051181
- Yousefi, M., Bahrami, T., Salmaninejad, A., Nosrati, R., Ghaffari, P., & Ghaffari, S. H. (2017). Lung cancer-associated brain metastasis: Molecular mechanisms and therapeutic options. *Cell Oncol (Dordr)*, *40*(5), 419-441. doi:10.1007/s13402-017-0345-5
- Yousefi, M., Dehghani, S., Nosrati, R., Ghanei, M., Salmaninejad, A., Rajaie, S., . . . Pasdar, A. (2020). Current insights into the metastasis of epithelial ovarian cancer - hopes and hurdles. *Cell Oncol (Dordr)*, *43*(4), 515-538. doi:10.1007/s13402-020-00513-9

- Yu, C., Niu, X., Du, Y., Chen, Y., Liu, X., Xu, L., . . . Deng, W. (2020). IL-17A promotes fatty acid uptake through the IL-17A/IL-17RA/p-STAT3/FABP4 axis to fuel ovarian cancer growth in an adipocyte-rich microenvironment. *Cancer Immunol Immunother*, *69*(1), 115-126. doi:10.1007/s00262-019-02445-2
- Zhang, J., Jia, P. P., Liu, Q. L., Cong, M. H., Gao, Y., Shi, H. P., . . . Miao, M. Y. (2018). Low ketolytic enzyme levels in tumors predict ketogenic diet responses in cancer cell lines in vitro and in vivo. *J Lipid Res*, *59*(4), 625-634. doi:10.1194/jlr.M082040
- Zhang, S., & Xie, C. (2017). The role of OXCT1 in the pathogenesis of cancer as a rate-limiting enzyme of ketone body metabolism. *Life Sci*, *183*, 110-115. doi:10.1016/j.lfs.2017.07.003
- Zhao, Y., Niu, C., & Cui, J. (2018). Correction to: Gamma-delta (gammadelta) T cells: friend or foe in cancer development? *Journal of translational medicine*, *16*(1), 122. doi:10.1186/s12967-018-1491-x
- Zou, C., Zhao, P., Xiao, Z., Han, X., Fu, F., & Fu, L. (2017). Gammadelta T cells in cancer immunotherapy. *Oncotarget*, *8*(5), 8900-8909. Doi: 10.18632/oncotarget.13051