



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

UNIDAD ZACATENCO
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Fucosiltransferasa 4: estudio de su localización nuclear en células SKOV-3 y la participación de su sobreexpresión en mecanismos relacionados con la progresión del cáncer de ovario epitelial”

TESIS

Que presenta

M. en C. Nayely Paulina Alvear Hernández

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

Directora de Tesis:

Dra. Patricia Talamás Rohana

Ciudad de México

junio, 2022

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

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

“Fucosiltransferasa 4: estudio de su localización nuclear en células SKOV-3 y la participación de su sobreexpresión en mecanismos relacionados con la progresión del cáncer de ovario epitelial”

Agradecimientos

AL CONACyT

Por financiar mis estudios de posgrado. Tengan la certeza, que lo que ustedes han sembrado no será en vano y que en el futuro se verán los frutos de esta labor que realizan por la investigación.

A la Dra. Patricia Talamás Rohana

Quien me enseñó que solo el trabajo diario logra cumplir las metas establecidas y que todo esfuerzo siempre tendrá una recompensa. Gracias por compartir con sus estudiantes tantos años de experiencia personal y laboral. Gracias Dra por confiar en mí y darme la oportunidad de orgullosamente decir que forme parte de su gran equipo de trabajo.

A la Dra. Verónica Ivonne Hernández

Por convertirse en una guía académica, siempre admirare su gran calidad humana y su gran compromiso con sus estudiantes. Gracias por su paciencia y su disponibilidad de compartir sus conocimientos.

Al M. en C. Juan Carlos Osorio

Por ser un apoyo, amigo y guía de laboratorio. Por hacer posible cada experimento y enseñarme que siempre hay una solución para cada problema.

A mis asesores de tesis

Dra. Dolores Gallardo Rincón, Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano, Dr. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez y el Dr. José Eduardo Pérez Salazar, por su tiempo y por compartir conmigo sus conocimientos y su experiencia académica, que me brindó la oportunidad de mejorar como profesional.

Al personal administrativo del dpto. IyPM

A la Sra. Irma Miranda Orea, Clara Castelán Domínguez, María Marcela Guzmán Rodríguez, Martha Dueñas Mejía, Jessica Márquez Dueñas y Martha Gisela Aguilar Romero, quienes siempre mantuvieron disponibles con una actitud amable que siempre las caracterizara.

Al personal del Instituto Nacional de Cancerología (INCan)

A la Dra. Dolores Gallardo Rincón y a sus colaboradores, en especial al Biólogo Edgar Montes Servín la Dra. Elizabeth Montes Servín por brindarnos su apoyo en la obtención y análisis de las muestras y procesamiento de los resultados.

A mi amiga Dulce Rosario Alberto Aguilar

Gracias por dejarme crecer laboral y personalmente junto a ti, eres una gran mujer y deseo que tu brillo nunca se apague. Te convertiste en mi hermana, mi cómplice de aventuras y siempre recordare esos ataques de risa incontrolables.

A mis amigos de generación

Quienes estábamos ansiosos por compartir conocimientos, ilusiones y anhelos, logrando cumplir nuestros sueños. Fue un placer pasar años de nuestras vidas juntos.

A mis compañeros del lab 9 de inmunología

Para los egresados, gracias por su orientación y compartir conmigo sus conocimientos. Para los que aún siguen en el camino, les deseo que logren cada una de sus metas y gracias por enseñarme que nunca se deja de aprender.

A mis amigos de toda la vida

Por convertirse en mi familia por elección, siempre los amare con el corazón. Gracias por todas sus lecciones de vida y por mantenerse cerca de mí en los buenos y malos momentos.

A mi nueva familia Galindo Villanueva

Quienes me han brindado su apoyo incondicional y sobre todo por permitirme ser parte de su familia.

AL CINVESTAV

Después de años de estudio agradezco tanto por haberme permitido formarme en sus instalaciones, por brindarme la oportunidad de conocer grandes investigadores y sobre todo grandes seres humanos.

Dedicatorías

A DIOS

Por permitirme lograr una meta más en mi vida a lado de todos mis seres queridos.

A mis padres Higinio Alvear y Eugenia Hernández

Por el esfuerzo y apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi vida, por inculcarme que no existe logro pequeño ni esfuerzo suficiente para alcanzar nuestros sueños, pero sobre todo, por ser siempre un ejemplo de vida y de un matrimonio solido de amor verdadero. Por siempre un orgullo ser su hija.

A mis hermanos Alma, Eugenia, Mauro, Miguel y Eduardo

Somos como las ramas de un árbol, crecemos en diferentes direcciones, pero nuestra raíz siempre será una sola. Gracias por sus consejos y por enseñarme que la vida sin ustedes no sería la misma, llena de locuras y vivencias únicas. Los amo con el corazón.

A mis sobrinos Carmen, Victoria, Bjork, Nicole, Dasha, Nicolás, Malu y Daenerys

El saber que existen me impulsa a querer ser mejor persona día con día. Con ustedes a mi lado la vida siempre tendrá sentido. ¡Los amo pequeños!

A mi cuñado Christian Solchaga

Quien se ha convertido en un hermano más y con su sabiduría me ha guiado y aconsejado siempre con el propósito de verme feliz.

A mi esposo Luis Alfonso Galindo Villanueva

Por ser siempre mi mejor amigo y por su apoyo incondicional. Dios nos permitió encontrarnos, enamorarnos y hoy en día, compartir nuestras vidas hasta que la muerte nos separe. Espero en dios, logremos formar la familia que tanto hemos soñado.

¡Te amo!

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
1.1	GENERALIDADES DEL CÁNCER DE OVARIO	1
1.1.1	Etiología del CaOv.....	1
1.1.2	Tipos histológicos del cáncer de ovario epitelial.....	3
1.1.3	Estatificación del CaOv de acuerdo a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO).....	5
1.2	MICROAMBIENTE TUMORAL	6
1.2.1	Líquido ascítico: Formación y características.....	7
1.3	BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER	9
1.4	RELEVANCIA DE LA GLICOSILACIÓN EN CÁNCER.....	10
1.5	FUCOSILACIÓN	11
1.5.1	Fucosiltransferasas y su relación con el cáncer	13
1.5.2	Fucosiltransferasa 4.....	14
1.6	ANTECEDENTES DIRECTOS	15
2	JUSTIFICACIÓN.....	18
3	HIPÓTESIS.....	19
4	OBJETIVO GENERAL.....	20
5	OBJETIVOS PARTICULARES	21
6	ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL In vitro	22
7	ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL EN PACIENTES.....	23
8	METODOLOGÍA.....	24
9	RESULTADOS	37
10	DISCUSIÓN.....	72
11	PERSPECTIVAS	77
12	REFERENCIAS.....	78

I. LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Características clínicas de las 10 pacientes con COE de donde se obtuvieron los Las.
Tabla 2.	Características clínicas de las 13 pacientes con COE de donde se obtuvieron los sueros y LA.
Tabla 3.	Proteínas identificadas mediante IP de Fut 4 en fracciones nucleares de células SKOV -3 incubadas en LA
Tabla 4.	Análisis de correlación entre la SG y los niveles de expresión de Fut 4 en muestras de suero
Tabla 5.	Comparaciones globales
Tabla 6.	Análisis de correlación entre la SLP y los niveles de expresión de Fut 4 en muestras de suero
Tabla 7.	Comparaciones globales
Tabla 8.	Análisis de correlación entre la SG y los niveles de expresión de Fut 4 en muestras de LA
Tabla 9.	Comparaciones globales
Tabla 10.	Análisis de correlación entre la SLP y los niveles de expresión de Fut 4 en muestras de LA
Tabla 11.	Comparaciones globales

II. LISTA DE ABREVIATURAS

BRCA 1	Gen asociado al Cáncer de mama 1
BRCA 2	Gen asociado al Cáncer de mama 2
BSA	Albúmina sérica bovina
CA-125	Antígeno Cancerígeno 125
CaOv	Cáncer de ovario
COE	Cáncer de ovario epitelial
Dil	Dilución
Fut	Fucosiltransferasa
GalNAc	N-Acetilgalactosamina
GlcNAc	N-Acetilglucosamina
h	Hora
HCC	Hepatocarcinoma celular
HCl	Ácido clorhídrico
INCan	Instituto Nacional de Cancerología
kDa	Kilodaltones

LA	Líquido ascítico
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Na ₃ VO ₄	Ortovanadato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaF	Fluoruro de Sodio
NLS	Señales de localización nuclear
PCR	Reacción en cadena de la DNA polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SFB	Suero fetal bovino
SKOV-3	Línea celular de carcinoma ovárico
TBS-T	Amortiguador Tris-Salino con Tween 20
µg	Microgramos
µl	Microlitros

III. LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Tipos de cáncer de ovario de acuerdo a la estirpe celular de donde se derive.
- Figura 2.** Tipos histológicos del cáncer de ovario epitelial.
- Figura 3.** Metástasis transcelómica del cáncer de ovario
- Figura 4.** Incorporación de residuos de fucosa catalizadas por fucosiltransferasas.
- Figura 5.** Análisis de inmunofluorescencia de Fut 2, 4 y 8 dentro del núcleo de células SKOV-3 expuestas.
- Figura 6.** Validación de la presencia de la proteína Fut 4 en el núcleo celular de SKOV-3.
- Figura 7.** Fraccionamiento celular de SKOV-3 en medio y LA por 24 h.
- Figura 8.** Rendimiento de la obtención de núcleos mediante microscopía óptica 40X.
- Figura 9.** Validación de la localización nuclear de Fut 4 en células SKOV-3 incubadas en LA.
- Figura 10.** Fraccionamiento celular de SKOV-3 en medio y LA por 24 h empeladas para la IP.
- Figura 11.** Perfil de proteínas nucleares sin interacción a Fut 4 en la IP.
- Figura 12.** Inmunoprecipitación de Fut 4 en extractos nucleares de células SKOV-3 incubadas en Medio y LA.
- Figura 13.** Red de interacciones de las proteínas citoplasmáticas identificadas en los complejos formados con la proteína Fut 4.
- Figura 14.** Red de interacciones de las proteínas nucleares identificadas en los complejos formados con la proteína Fut 4.
- Figura 15.** Análisis de proliferación en células SKOV-3 incubadas individualmente con LA de 10 pacientes diferentes con COE.

- Figura 16.** Determinación del efecto de 4 LA sobre la morfología y la fucosilación de las células SKOV-3.
- Figura 17.** Análisis por WB del silenciamiento de la proteína Fut 4 mediante siRNA en células SKOV-3 bajo diferentes estímulos
- Figura 18.** Análisis por citometría de flujo de la proliferación y del ciclo celular de SKOV-3 bajo diferentes estímulos.
- Figura 19.** Ensayo de herida y cierre de células SKOV-3 incubadas bajo diferentes condiciones.
- Figura 20.** Detección de la metaloproteasa 9 (MM-9) en células SKOV-3 incubadas en medio y en dos LA diferentes.
- Figura 21.** Ensayos de invasión de células SKOV-3 incubadas bajo diferentes condiciones.
- Figura 22.** Expresión de la proteína Fut 4 en células recuperadas de LA de una paciente (PC) con COE.
- Figura 23.** Perfil proteico de muestras pareadas de líquido ascítico (L) y suero (S) de pacientes con COE.
- Figura 24.** Análisis del patrón de expresión de Fut 4 en muestras de suero y LA de pacientes con COE.
- Figura 25.** Curvas de supervivencia libre de progresión (SLP) y supervivencia global (SG).

IV. RESUMEN

El cáncer de ovario epitelial (COE) es una enfermedad difícil de detectar y generalmente las pacientes generan líquido ascítico (LA) asociado a un mal pronóstico. En los últimos años, en muestras de COE se ha reportado un incremento en el nivel de fucosilación, donde enzimas como la fucosiltransferasa 4 (Fut 4), están involucradas. Fut 4 es una proteína que se sobreexpresa en células SKOV-3 estimuladas con LA y que inusualmente se localizó dentro del núcleo de las mismas. En trabajo previo del laboratorio, se estableció una correlación positiva entre el nivel de expresión de Fut 4 con la etapa clínica de las pacientes en tejidos con COE. Por lo cual el objetivo de este trabajo se enfocó, por una parte, en el estudio de la proteína Fut 4 dentro del núcleo de células SKOV-3 y por la otra, en su posible participación en mecanismos relacionados con la progresión del COE.

Por ensayos de microscopía confocal, microscopía electrónica de transmisión, inmunoprecipitación, citometría de flujo y western blot se evaluó a Fut 4 en células SKOV-3, así como su presencia en sueros (N=13) y LA (N=13) pareados de pacientes con COE y sueros de mujeres sin diagnóstico de COE (N=6).

Nuestros resultados mostraron que la proteína Fut 4 no cuenta con una secuencia de localización nuclear (NLS), sin embargo, se encontraron asociaciones de Fut 4 con la proteína ubiquitina, histonas H2B e histona H4 en el núcleo de células SKOV-3 incubadas en LA. También reportamos, que su sobreexpresión inducida por el LA incrementó la capacidad de migración e invasión en las células SKOV-3. Así mismo, se observó sobreexpresión en células recuperadas de un LA, que presentaban una morfología similar a la mesenquimal. En las muestras de suero y LA, Fut 4 mantuvo altos niveles de expresión, comparados con los sueros de mujeres sin diagnóstico de COE.

Concluimos que la proteína Fut 4 juega un papel fundamental en procesos relacionados con la tumorigénesis, por lo que podría ser empleada como un potencial biomarcador de diagnóstico o de prevalencia, ya que se encuentra regulando mecanismos biológicos en esta enfermedad.

V. SUMMARY

Epithelial ovarian cancer (EOC) is a difficult disease to detect and patients generally produce ascitic fluid (AF) associated with a poor prognosis. In recent years, an increase in the level of fucosylation has been reported in EOC samples, where enzymes such as fucosyltransferase 4 (Fut 4) are involved. Fut 4 is a protein that is overexpressed in AF-stimulated SKOV-3 cells and was unusually localized within their nucleus. Recently, our laboratory established a positive correlation between the expression levels of Fut 4 with the clinical stage of patients in tissues with EOC. Therefore, the objective of this work focused, on the one hand, on the study of the Fut 4 protein within the nucleus of SKOV-3 cells and, on the other, on its possible participation in mechanisms related to EOC progression.

Using confocal and transmission electron microscopy, immunoprecipitation, flow cytometry and western blot assays, Fut 4 was evaluated in SKOV-3 cells, as well as in paired sera (N=13) and AF (N=13) from patients with EOC and sera from women without a diagnosis of EOC (N=6).

Our results showed that Fut 4 protein does not have a nuclear localization sequence (NLS); however, associations of Fut 4 with ubiquitin protein, and H2B and H4 histones were found in the nucleus of SKOV-3 cells incubated in AF. We also report that its overexpression induced by AF increased the capacity for migration and invasion in SKOV-3 cells. Likewise, an increase in its expression was observed in cells recovered from an AF, that had a similar morphology to one observed in mesenchymal cells. In the serum and AF samples, Fut 4 maintained high levels of expression, compared to sera from women without a diagnosis of EOC.

We conclude that the Fut 4 protein plays a fundamental role in processes related with tumorigenesis, so it could be used as a potential diagnostic or prevalence biomarker since it regulates biological mechanisms in EOC.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DEL CÁNCER DE OVARIO

El cáncer de ovario (CaOv) es una enfermedad difícil de detectar en estadios tempranos y se asocia con un mal pronóstico en etapas avanzadas (Jessmon *et al.*, 2017). De acuerdo con las estadísticas del Instituto Nacional de Cancerología, el CaOv fue la 3a causa de mortalidad hospitalaria en el 2020 (www.incan.edu.mx/). En México, la incidencia reportada por el GLOBOCAN en 2018 fue de 4,759 casos y la mortalidad alcanzó los 2,765 casos (GLOBOCAN., 2018).

Existen factores de riesgo que pueden modular la probabilidad de padecer CaOv, tales como: factores genéticos, que contribuyen del 10 al 15% de los casos de cáncer de ovario debido a mutaciones en genes involucrados en la reparación del ADN como BRCA, MSH-2, MLH-1 y PMS 1 y 2 (Prat *et al.*, 2005). En un estudio recientemente realizado en pacientes mexicanas, se detectaron mutaciones de *BRCA* en el 33% (59/179) de las pacientes analizadas; donde el 66.1% (39/59) fueron en *BRCA1*, y 33.9% (20/59) fueron en *BRCA2* (Gallardo *et al.*, 2020), y factores ambientales como la obesidad, el consumo de tabaco, menarca temprana y/o menopausia tardía, endometriosis, síndrome de ovario poliquístico y la edad (Menon *et al.*, 2011). Sin embargo, el mecanismo patogénico que explica el vínculo entre muchos de los factores de riesgo y el desarrollo del CaOv no ha sido determinado.

1.1.1 Etiología del CaOv

Existen algunas hipótesis acerca de la etiología del CaOv de las cuales, la más aceptada es la teoría de la ovulación incesante, que plantea que el reflujo menstrual a través de las trompas de Falopio, es una fuente de exposición a agentes carcinógenos en la mucosa tubárica, además de la continua

regeneración de la corteza ovárica que pudiera conducir a la acumulación de mutaciones y a la transformación maligna (Auersperg ., 2011; Erickson *et al.*, 2013; Corzo *et al.*, 2017).

Existen carcinomas originados en células germinales, y por células del estroma, sin embargo, el 90% de los tumores primarios de ovario se desarrollan a partir de células epiteliales, y a este subtipo se le conoce como COE, del cual se derivan los tipos histológicos seroso, mucinoso, endometriode, de células claras y mixtas (Auersperg *et al.*, 2001) (Fig.1).

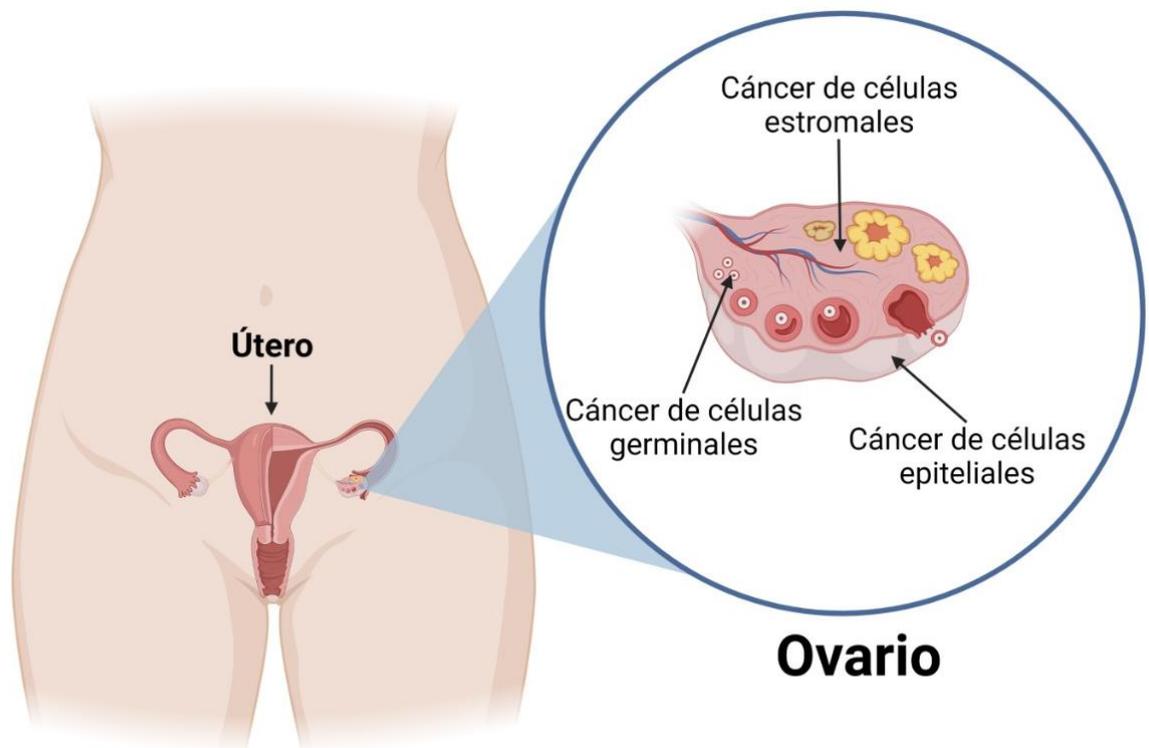


Figura 1. Tipos de cáncer de ovario de acuerdo a la estirpe celular de donde se derive. (Creado en biorender.com)

1.1.2 Tipos histológicos del cáncer de ovario epitelial

Tanto a nivel histológico como molecular, es cada vez más claro que el cáncer de ovario es una enfermedad clínicamente diversa y heterogénea (Blagden , 2015). Los subtipos histológicos del COE tienen características particulares. (Fig. 2)

Carcinomas serosos (CS): Actualmente se les divide en dos categorías. La primera categoría incluye a los tumores serosos borderline (clásico y micropapilar), los carcinomas serosos con micro-invasión y los carcinomas serosos de bajo grado (Karst et al., 2010). La segunda categoría corresponde a los carcinomas serosos de alto grado. Esta división fue realizada debido a que son dos tipos de enfermedades diferentes, con distinta evolución, tratamiento y pronóstico (Li *et al.*, 2012). Se estima que el 50 % de los tumores malignos de ovario son carcinomas serosos (Karst et al., 2010).

Carcinomas mucinosos (CM): Representan el 12 al 15% de todos los tumores ováricos. El 75% de los mismos son benignos, el 10% borderline y el 15% malignos. El criterio histológico fundamental para hacer el diagnóstico diferencial con tumor mucinoso maligno es la ausencia de invasión estromal (Ryland *et al.*, 2015). Se estima que el 10 % son carcinomas mucinosos (Karst et al., 2010).

Carcinomas de células claras (CCC): Corresponden al 5% de los carcinomas ováricos. La importancia del su diagnóstico diferencial con respecto a los carcinomas serosos radica en su diferente respuesta al platino. Tienen alta asociación con endometriosis y su génesis sería similar a los carcinomas endometrioides ováricos. Presentan numerosos patrones de crecimiento: tubuloquístico, revestido por células claras ricas en glucógeno; papilar con células en tachuela; difuso, con células planas o cuboidales. El estudio del genotipo ha demostrado mutación de los genes PTEN y K-RAS e inestabilidad de genes reparadores del ADN (Lu *et al.*, 2017). Se estima que el 5 % son carcinomas de células claras (Karst et al., 2010).

Carcinomas endometrioides (CE): Se presentan con mayor frecuencia en Estadio I. Se postula que estos tumores malignos presentarían una progresión desde endometriosis, pasando por la endometriosis atípica, los tumores borderline, llegando a los carcinomas, a través de una mutación temprana del gen K-RAS. El carcinoma endometriode suele acompañarse de un componente adenofibromatoso o endometriosis. La presencia de diferenciación escamosa apoya el diagnóstico (Eswari *et al.*, 2011). Se estima que el 25 % son carcinomas endometrioides (Karst *et al.*, 2010).

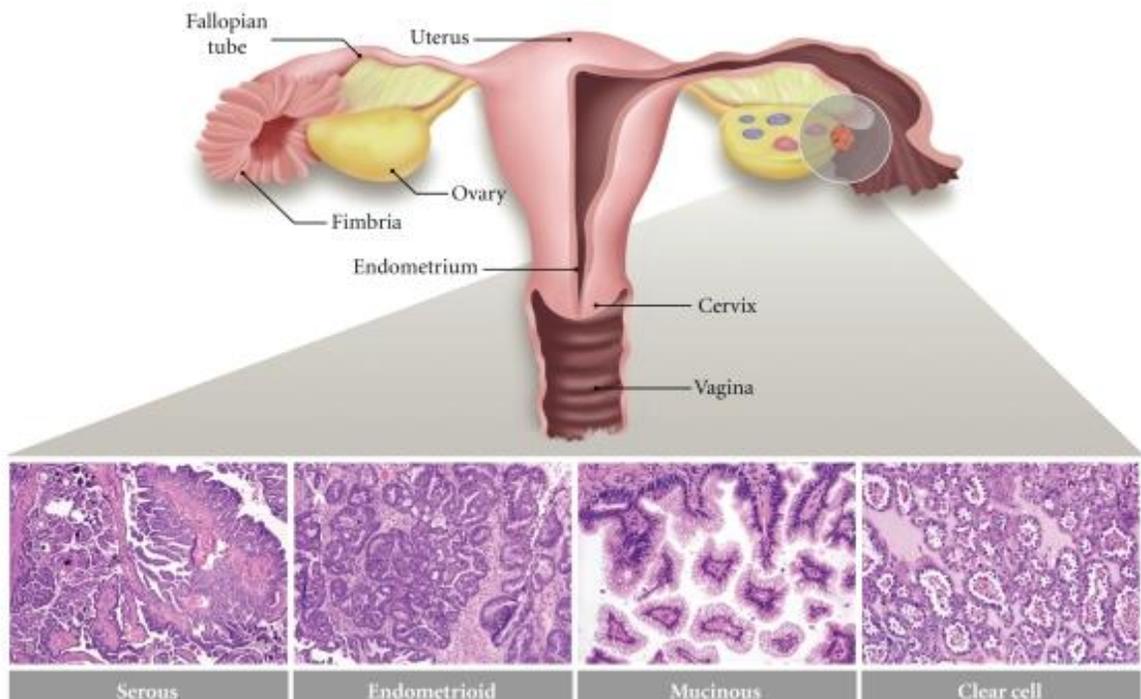


Figura 2. Tipos histológicos del cáncer de ovario epitelial (Karst , 2010).

1.1.3 Estadificación del CaOv de acuerdo a la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO)

La capacidad de una mujer para sobrevivir a la enfermedad depende de muchos factores, y la etapa del cáncer en el momento del diagnóstico es la más importante (Jemal, 2010; Jessmon, 2017)

Actualmente, se utiliza una clasificación de los carcinomas diseñado e implementado por F.I.G.O. el cual divide al CaOv en estadios con base en los hallazgos encontrados durante la operación quirúrgica (Benedet *et al.*, 2000; FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2009).

Estadio I

a: Tumor limitado a un ovario, cápsula íntegra, sin crecimiento superficial, lavado peritoneal / líquido ascítico (LA) negativos.

b: Tumor en los dos ovarios, con cápsula íntegra, sin crecimiento superficial y lavado peritoneal / LA negativos.

c: Tumor Ia ó Ib con cápsula rota, o con crecimiento superficial en uno o ambos ovarios, con lavado peritoneal / LA positivos. (Benedet *et al.*, 2000; FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2009).

Estadio II

a: Extensión tumoral y/o Implantes en útero y/o trompas y lavado peritoneal / LA negativos

b: Extensión a otros tejidos pelvianos y lavado peritoneal / LA negativos

c: Tumor IIa ó IIb con LA / lavado peritoneal positivos. (Benedet *et al.*, 2000; FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2009).

En el estadio III

a: Tumor limitado a la pelvis con ganglios negativos, pero con afectación microscópica de las superficies peritoneales abdominales confirmadas.

b: Tumor limitado a la pelvis con ganglios negativos, pero con implantes abdominales que no superan los 2 cm de diámetro.

c: Tumor limitado a la pelvis, pero con implantes abdominales mayores de 2 cm de diámetro y/o con afectación ganglionar con presencia de LA. (Benedet *et al.*, 2000; FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2009).

Estadio IV:

Además de haber afectado a uno o ambo ovarios, tener implantes peritoneales, ganglios linfáticos con células tumorales y la acumulación de LA, en esta etapa también existe metástasis hacia órganos distantes. (Benedet *et al.*, 2000; FIGO Committee on Gynecologic Oncology, 2009).

A pesar de las diferencias histológicas, el tratamiento es similar y la resistencia a los agentes terapéuticos de primera línea, paclitaxel y carboplatino, es común (Earp *et al.*, 2015).

Por ello hoy en día, la biología de los tumores ya no puede ser entendida simplemente enumerando los rasgos de las células cancerosas, sino que debe abarcar las contribuciones del "Microambiente tumoral" a la tumorigénesis (Douglas and Weinberg, 2011; Scarlett UK and Conejo, 2011).

1.2 MICROAMBIENTE TUMORAL

El microambiente tumoral tiene una compleja interacción con la carcinogénesis y la progresión en CaOv, pero los mecanismos moleculares subyacentes siguen sin ser aclarados hasta el momento (Luo *et al.*, 2016). (Fig. 3)

Existe un diálogo adaptativo y continuo entre las células tumorales y su entorno, mediado por el contacto directo de las células con los componentes del estroma

(incluyendo fibroblastos, macrófagos, células T reguladoras, células supresoras derivadas de mieloides, células endoteliales, pericitos y plaquetas), la matriz extracelular (citocinas inflamatorias, quimiocinas, metaloproteinasas de matriz, integrinas y otras moléculas secretadas) y los exosomas (pequeñas vesículas extracelulares cargadas de moléculas), que en los últimos años han atraído la atención debido a su papel vital en la progresión del cáncer de ovario (Junttila and de Sauvage, 2013; Luo *et al.*, 2016).

Más del 30% de las pacientes presentan acumulación de líquido peritoneal o LA como una señal asociada con un mal pronóstico, por lo tanto, es considerado como un reservorio dinámico de factores de supervivencia que podrían promover un crecimiento acelerado de las células tumorales y una mayor resistencia a los agentes citotóxicos (Tan DS *et al.*, 2006).

1.2.1 Líquido ascítico: Formación y características

El LA representa una respuesta secundaria a un proceso patológico y se relaciona con diversas enfermedades. Existen dos tipos de ascitis, la ascitis benigna y la ascitis maligna: la maligna se genera principalmente en cáncer pancreático, gástrico, de colon y en etapas tardías del CaOv (Schmidt, 2007). Todo esto provocado por un cambio en la permeabilidad vascular inducido por diversos factores presentes en el fluido acumulado (Schmidt, 2007). El LA contiene factores como el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF), el factor básico de crecimiento de fibroblastos (FGF), los factores de crecimiento transformante alfa y beta (TGF- α y TGF- β), proteínas del complemento, lípidos bio-activos como el ácido lisofosfatídico, entre muchos otros (Puiffe *et al.*, 2007), así como la presencia de células transformadas del tumor primario, que circulan y sobreviven como una única célula o pequeños agregados celulares, llamados esferoides, que tienen la capacidad de adquirir nutrientes esenciales del medio (Schmidt, 2007; Weidle, *et al.*, 2016).

El aislamiento y la caracterización de células tumorales diseminadas, así como de componentes claves del microambiente tumoral contribuyen a la comprensión de la biología del tumor y el descubrimiento de nuevos biomarcadores.

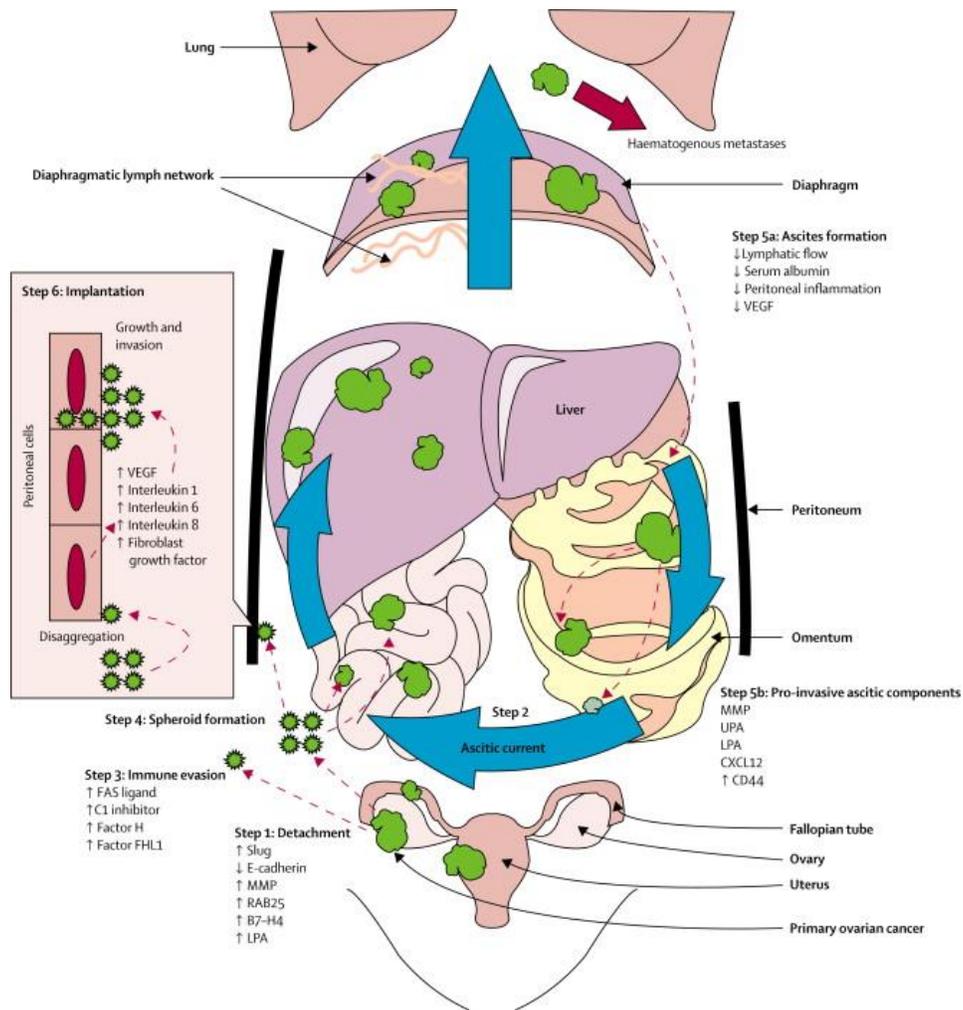


Figura 3. Metástasis transcelómica del cáncer de ovario (Tan DS., 2016).

1.3 BIOMARCADORES PARA EL DIAGNÓSTICO DEL CÁNCER

Pese al desarrollo de nuevos tratamientos y terapias, el COE sigue siendo el más letal de los cánceres ginecológicos (www.incan.edu.mx/), la presencia inespecífica de signos y síntomas, de alerta temprana, la ubicación anatómica de los ovarios en la cavidad abdominal, la carencia de biomarcadores de diagnóstico eficientes, así como métodos de detección inadecuados contribuyen al hecho de que sólo el 25% de los tumores ováricos se identifican en una etapa tratable (Pothuri *et al.*, 2010; Będkowska *et al.*, 2015).

La búsqueda de marcadores que identifiquen la transformación temprana de células malignas es de importancia crítica, por lo cual se han estudiado moléculas que pudieran servir como marcadores de diagnóstico, como el factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF), el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), la interleucina 10 (IL-10) (Lawickiet *al.*, 2012; Liu *et al.*, 2012), las metaloproteinasas (MMPs) (MMP-2, MMP- 7, MMP-9), el inhibidor tisular de la metaloproteinasa 1 (TIMP-1) (Schummer *et al.*, 2012; Gersthein *et al.*, 2011) los biomarcadores proteómicos (mesotelina, B7-H4, DcR3, spondin-2) (Anderson GL *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2006) y el marcador HE4, (Human Epididymis Protein), algunos de los cuales han mostrado, que pueden ser de utilidad en el diagnóstico de este tipo de cáncer (Bedkowska *et al.*, 2015).

Actualmente, no existe una prueba de detección temprana establecida para el COE (Rojas *et al.*, 2016). Siendo el antígeno CA125, glicoproteína de alto peso molecular (Yin BW and Lloyd, 2001) el biomarcador sérico más utilizado para detectar y monitorizar la patología en el contexto clínico. Sin embargo, este antígeno no detecta los estadios tempranos de la enfermedad, limitando así su sensibilidad. Además de observarse obstaculizado por la falta de especificidad, ya que las concentraciones elevadas de CA125 en suero se pueden encontrar no sólo en una amplia gama de enfermedades ginecológicas benignas, sino también en neoplasias de diferente origen, cánceres ginecológicos no ováricos,

otros tumores epiteliales y neoplasias malignas no epiteliales (Fawzy *et al.*, 2016).

Los biomarcadores pueden determinar el riesgo de desarrollar una enfermedad, servir como herramientas para el diagnóstico inicial y la estadificación de las enfermedades, así como para predecir el pronóstico de la enfermedad. En los últimos años, la glicómica ha estado a la vanguardia de la revolución de las ciencias biológicas y médicas (Adamczyk *et al.*, 2012). Hoy en día la mayoría de los biomarcadores de cáncer que son utilizados en la clínica son glicoproteínas o glicolípidos, y son medidos por inmunohistoquímica usando anticuerpos monoclonales (Packer *et al.*, 2008).

1.4 RELEVANCIA DE LA GLICOSILACIÓN EN CÁNCER

La glicosilación es una de las más importantes modificaciones post-traduccionales, con más del 50% de todas las proteínas humanas glicosiladas (Apweiler *et al.*, 1999; Christiansen *et al.*, 2014). Los glicanos de la superficie celular ligados a la membrana están implicados en numerosas funciones biológicas esenciales, entre ellas la proliferación, diferenciación y migración celular, el reconocimiento célula-célula, la interacción célula-matriz y huésped-patógeno, la modulación inmune y la transducción de señales (Christiansen *et al.*, 2014). Los glicanos encontrados en los seres humanos se unen predominantemente a la proteína de dos maneras: (i) Para N-glicanos se añade un residuo de N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc) al residuo de asparagina (Asn) dentro de una secuencia consenso en el péptido que contiene asparagina- X-serina o treonina (Asn-X-Ser / Thr) donde X puede ser cualquier amino ácido, excepto prolina) (ii) Para O-glicanos se añade un residuo de N-acetil-D-galactosamina (GalNAc) al grupo hidroxilo de los residuos serina (Ser) o treonina (Thr) sobre el polipéptido Potapenko *et al.*, 2010; Christiansen *et al.*, 2014. Las proteínas destinadas a la superficie celular típicamente sufren glicosilación en la vía retículo endoplásmico-Golgi donde se produce una secuencia de eventos

regulados que implican enzimas tanto catabólicas como anabólicas tales como glicosidasas y glicosiltransferasas para crear estructuras de glicanos altamente complejas pero específicas sobre las proteínas (Potapenko *et al.*, 2010; Christiansen *et al.*, 2014)

Numerosos estudios clínico-patológicos han demostrado una clara correlación entre el estado de glicosilación aberrante del tumor primario y el potencial invasivo/metastásico en cáncer humano, en donde los carbohidratos alterados actúan como moldes de adhesión reconocidos por selectinas u otras proteínas que se unen a otros carbohidratos (Hakomori, 1996; Adamczyk *et al.*, 2012). Entre los carbohidratos que se encuentran en la cadena del glicano podemos encontrar manosa, ácido siálico, galactosa y fucosa, siendo la fucosa nuestro residuo de interés.

1.5 FUCOSILACIÓN

La fucosilación es el proceso de transferencia de residuos de fucosa del sustrato donador-GDP-Fucosa al precursor oligosacárido, catalizada por las enzimas llamadas fucosiltransferasas. La L-fucosa es un monosacárido hidrófobo y un componente común de muchos N- y O- glicanos, la fucosilación desempeña un papel funcional en la regulación de la ontogenia y la diferenciación celular, por lo tanto, no es ninguna sorpresa que la fucosilación sea regulada diferencialmente en condiciones cancerosas comparadas con las no cancerosas. Se han descrito diferentes fucosiltransferasas (Fut) que son codificadas por once genes, denominados de *Fut 1* a *Fut 11* (Miyoshi *et al.*, 2008; Fernández MS., 2014; Christiansen MN *et al.*, 2014), aunque *Fut 10* y *Fut 11* se clasificaron por contener el dominio FUT conservado, sin embargo, su actividad no ha sido validada (Roos *et al.*, 2002).

Según la posición en la que se incorpora el residuo de fucosa, se conocen dos subcategorías y cuatro familias de fucosilación (Fig. 4).

Fucosilación terminal:

- ✓ $\alpha(1,2)$. Se añaden residuos de fucosa mediante enlace $\alpha(1,2)$ a la galactosa terminal de un residuo de lactosamina, catalizado por Fut 1 y Fut 2.
- ✓ $\alpha(1,3)$. Se añaden unidades de fucosa a la GlcNAc de una lactosamina tipo 1 mediante las enzimas Fut 3, Fut 4, Fut 5, Fut 6, Fut 7 y Fut 9. Que añaden unidades de fucosa a residuos terminales GlcNAc.
- ✓ $\alpha(1,4)$. Esta reacción es característica de Fut 3 y Fut 5, que son las únicas fucosiltransferasas capaces de catalizar la formación en más de un tipo de enlace, $\alpha(1,3)$ o $\alpha(1,4)$ en residuos terminales.

Fucosilación central:

- ✓ $\alpha(1,6)$. Tipo de enlace que solo puede realizar la enzima Fut 8 la cual transfiere residuos de fucosa, únicamente sobre residuos de GlcNAc más cercano a la secuencia de aminoácidos del N-glicano. (Fernández, 2014).

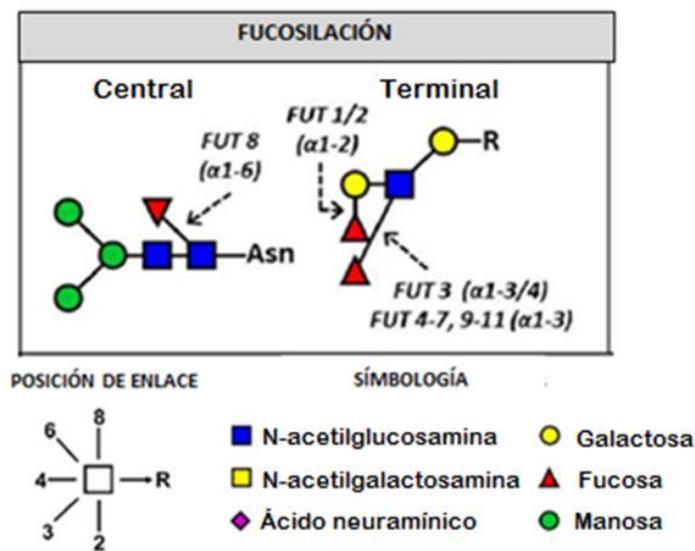


Figura 4. Incorporación de residuos de fucosa catalizadas por fucosiltransferasas. Fucosilación central, catalizada por Fut 8 y fucosilación terminal catalizada por Fut 1-7 y 11.

La función de las fucosiltransferasas es esencial para procesos biológicos normales, pero los antígenos di-fucosilados presentes en la superficie de las células incrementan su expresión en muchos tumores y pueden regular la expresión de genes y/o proteínas a través de la modificación de la fucosilación de los receptores de la superficie celular, afectando consecuentemente las vías de señalización intracelular río abajo. (Hao YY *et al.*, 2008; Sakamoto J *et al.*, 1986).

1.5.1 Fucosiltransferasas y su relación con el cáncer

Las Fut's son proteínas transmembranales de tipo 2 que consisten en un dominio amino terminal citoplásmico corto seguido por una región de tallo de dominio trans-membrana, y un gran dominio globular dispuesto hacia la cara luminal del aparato de Golgi (Breton *et al.*, 2001).

Se ha reportado que la sobreexpresión inducida del antígeno de Lewis, catalizado por las fucosiltransferasas 1 y 2, acelera la entrada de las células a la fase S de la fase G0-G1, acortando el ciclo celular y aumentando la proliferación celular (Hao *et al.*, 2008), mediante la regulación de los factores del ciclo celular con la contribución de las vías ERK / MAPK y PI3K / Akt (Liu *et al.*, 2012).

De igual forma, se ha informado que los niveles alterados de Fut 4, Fut 6 y Fut 8 son responsables de cambios en los fenotipos de resistencia a los fármacos en células BEL7402 (células de hepatocarcinoma celular humano) resistentes a los fármacos de células tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, la regulación de la expresión de Fut 4, Fut 6 o Fut 8 modula marcadamente la actividad de la ruta de señalización de fosfoinositol 3 cinasa (PI3K) / Akt y la expresión de la proteína de resistencia a múltiples drogas 1 MRP1 relacionada con la multiresistencia a drogas MDR (del inglés multidrug resistance) (Cheng *et al.*, 2013).

La sobreexpresión de Fut 1 y Fut 2 en células RMG-I derivadas de carcinoma ovárico humano promovió la proliferación celular y la resistencia contra fármacos anticancerosos, tales como 5-FU y carboplatino (Iwamori *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2008 *et al.*, 2013). Mientras que el aumento de la expresión de Fut 4 y Fut 7

promovió la proliferación de células neoplásicas y el crecimiento de células de hepatocarcinoma celular (HCC) *in vitro* (Yang X *et al.*, 2007). Fut 10 y Fut 11 se han identificado en el genoma humano ya que tienen un dominio FUT conservado, sin embargo, su actividad no ha sido validada (Roos *et al.*, 2002).

1.5.2 Fucosiltransferasa 4

El nivel de expresión de la proteína Fut 4 es baja en células normales; se expresa principalmente en linfocitos y células epiteliales somáticas y se observa incrementada en diferentes tipos de cáncer, como en carcinoma gástrico, colorrectal, pancreático y adenocarcinomas pulmonares (Yang *et al.*, 2007) y en cáncer de ovario (Tesis de maestría Alvear *et al.*, 2016)

El mecanismo subyacente de la regulación de Fut 4 no se encuentra documentado en su totalidad, sin embargo, existen reportes que argumentan que el gen *FUT 4* se encuentra bajo la regulación de varios factores de transcripción, como HSF1 y SP1, donde HSF1 responde a procesos de choque térmico y otros factores de estrés, los cuales contribuyen a la proliferación celular y desarrollo tumoral (Yang *et al.*, 2014). De igual forma, se ha correlacionado a la metilación de la isla CpG del promotor de *FUT4* con una disminución en la expresión de la proteína Fut 4 en células HaCaT (línea celular de queratinocitos inmortales aneuploides) (Hongyan *et al.*, 2015). Por otro lado, Withers y Hakomori en el 2000, describieron que la expresión del gen *FUT 4* es regulada por Elk-1, factores de transcripción relacionados a Ets en células U937.

Estudios anteriores indican que la inducción de Fut 4, cuya expresión génica está mediada por señales río abajo de la caspasa 3, aumenta la expresión de los antígenos LeX y LeY en células apoptóticas (Azuma *et al.*, 2004). El incremento en la expresión de Fut 4 juega un papel importante en la promoción de la progresión del ciclo celular y la proliferación celular mediante la sobreexpresión de LeY en la línea celular de carcinoma epidermoide humano A431 (Yang *et al.*, 2012). La inhibición de la expresión de Fut 4 puede proporcionar un nuevo

enfoque terapéutico para los cánceres epiteliales positivos a LeY (Yang *et al.*, 2007).

La transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un paso crucial en la progresión del tumor y tiene un papel importante durante la invasión y la metástasis del cáncer, en el 2013 se informó que Fut 4 tiene un papel en la TEM a través de la activación de los sistemas de señalización PI3K / Akt y NF- κ B, que inducen a los mediadores clave Snail y MMP-9 y facilitan la adquisición de un fenotipo mesenquimal (Yang *et al.*, 2013). Estos hallazgos apoyan la posibilidad de que Fut 4 sea un nuevo regulador de la TEM en las células de cáncer de mama y un objetivo prometedor para la terapia del cáncer (Yang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2012).

Realizando estudios con principios activos de plantas medicinales tradicionales de china, se encontró que el ginsenósido Rg3, inhibió la migración, invasión, TEM y metástasis mediante la regulación negativa de Fut 4 en el cáncer de pulmón humano *in vitro* e *in vivo* (Tian *et al.*, 2016). Por lo tanto, se ha sugerido que Rg3 puede ser un nuevo agente anti-metástasis para tratar el cáncer de pulmón (Tian *et al.*, 2016). Estos datos abren la posibilidad de realizar este tipo de experimentos empleando células de COE.

1.6 ANTECEDENTES DIRECTOS

La capacidad de distinguir las diferencias en los niveles de glicosilación de proteínas, en células cancerígenas vs células sanas, enfatiza la glicobiología como un campo prometedor para la identificación de biomarcadores potenciales (Adamczyk *et al.*, 2012).

Nuestro grupo de trabajo determinó la presencia de la haptoglobina fucosilada en LA provenientes de pacientes con COE, reportando que un incremento en los niveles de la proteína de fase aguda con un estado de fucosilación aberrante, se correlacionaba positivamente con las etapas avanzadas de la enfermedad

(Garibay *et al.*, 2014). Por otro lado, Villegas en el 2015 reportó que el tejido tumoral de los diferentes tipos histológicos del COE presentaba niveles incrementados de fucosilación (Villegas *et al.*, 2015).

Experimentos *in vitro* realizados durante la maestría, sugieren fuertemente que el LA recuperado de pacientes COE genera rearrreglos en el citoesqueleto de las células, induciendo extensas prolongaciones membranales que favorecen el desplazamiento de las células SKOV-3 (Tesis de maestría Alvear *et al.*, 2016).

Las modulaciones de la organización citoesquelética y el recambio de adhesión focal se correlacionan con la tumorigénesis y la TEM, este último proceso acompañado de la pérdida de marcadores epiteliales y la ganancia de marcadores mesénquimas como la vimentina (Ching *et al.*, 2014).

El desprendimiento de micro-vesículas es un proceso altamente regulado en varios tipos celulares, pero ocurre en mayores cantidades en células tumorales y se pueden detectar en fluidos corporales humanos, incluyendo plasma, suero, saliva, orina y ascitis, particularmente, las micropartículas conocidas como exosomas liberados de las células tumorales son capaces de transferir una variedad de moléculas, incluyendo las que son específicas del cáncer, a otras células para manipular su entorno, favoreciendo el crecimiento tumoral y la invasión (Dorayappan *et al.*, 2016). Evento que logramos observar mediante inmuno-localización, donde observamos que la proteína Fut 4 se encontraba sobreexpresada en distintos compartimentos celulares, entre ellos, dentro de pequeñas vesículas, y que el número de vesículas desprendidas, así como la expresión de la proteína Fut 4 incrementaban en las células SKOV-3 expuestas al LA. Un dato relevante de estos resultados fue observar una localización nuclear de Fut 4, evento del cual no se tenían reportes previos (Tesis de maestría Alvear *et al.*, 2016). Estrategias experimentales dirigidas a establecer la posible asociación entre material nuclear y la proteína Fut 4 podrían corroborar los hallazgos encontrados anteriormente.

Escrevente C en el 2006, midió los niveles de expresión de las fucosiltransferasas 1-11 en distintas líneas celulares de CaOv y reportó que en la línea celular SKOV-3 la mayoría de las fucosiltransferasas se expresaban (excepto Fut 7). Sin embargo, en nuestro laboratorio se demostró que cuando las células SKOV-3 se estimulan con líquido ascítico, aumentan los niveles del mRNA y de proteínas de las fucosiltransferasas 1-10, comparado con las células control (incubadas en medio McCoy) (Tesis de maestría Alvear et al., 2016).

Dentro del grupo de investigación, se compararon los niveles de expresión de las fucosiltransferasas 2, 4 y 8 en cortes de tejido tanto en ovario libre de cáncer como en los diferente tipos histológicos que componen el COE, observando que en tejido libre de COE, Fut 2 se localiza dentro de los folículos, así como alrededor de los bordes del epitelio y su expresión era mayor en comparación con la encontrada para Fut 4 y Fut 8, ya que para estas dos proteínas su expresión era casi inexistente en tejido sano. Sin embargo, al analizar las secciones de tejido transformados con COE, Fut 2 mantuvo una expresión similar a la encontrada en tejido sano, mientras que para Fut 4 y Fut 8 se reportaron altos niveles de expresión en comparación a lo detectado en el tejido libre de COE y sus niveles de expresión variaban dependiendo del tipo histológico y la etapa clínica (Tesis de maestría Alvear *et al.*, 2016).

Estos resultados sugieren fuertemente que Fut 4 podría estar jugando un papel relevante en los procesos relacionados con la progresión del COE.

2 JUSTIFICACIÓN

Durante la maestría demostramos que las células SKOV-3 incrementaron los niveles de expresión principalmente de la proteína Fut 4 como consecuencia de la incubación con LA tanto en el citoplasma como en el núcleo de células SKOV-3; sin embargo, el efecto biológico de su inhibición en células SKOV-3 incubadas en LA, no se encuentra descrito. Así mismo, no existen reportes de la presencia de Fut 4 en muestras de suero o en LA de pacientes con COE. Por lo cual determinar las asociaciones de Fut 4 con proteínas nucleares y establecer la relevancia de la expresión de Fut 4 en mecanismos relacionados con la progresión tumoral tanto *In vitro* como *In situ* podría generar información relevante para poder sugerir a la proteína Fut 4 como un biomarcador pronóstico o predictivo en el COE.

3 HIPÓTESIS

La proteína Fut 4 se encuentra asociada a proteínas nucleares y la sobreexpresión de Fut 4 regula mecanismos relacionados con procesos de tumorigénesis durante el desarrollo del COE

4 OBJETIVO GENERAL

Estudiar a la proteína Fut 4 en el núcleo de las células SKOV-3 y la posible participación de su sobreexpresión en mecanismos relacionados con la progresión del COE

5 OBJETIVOS PARTICULARES

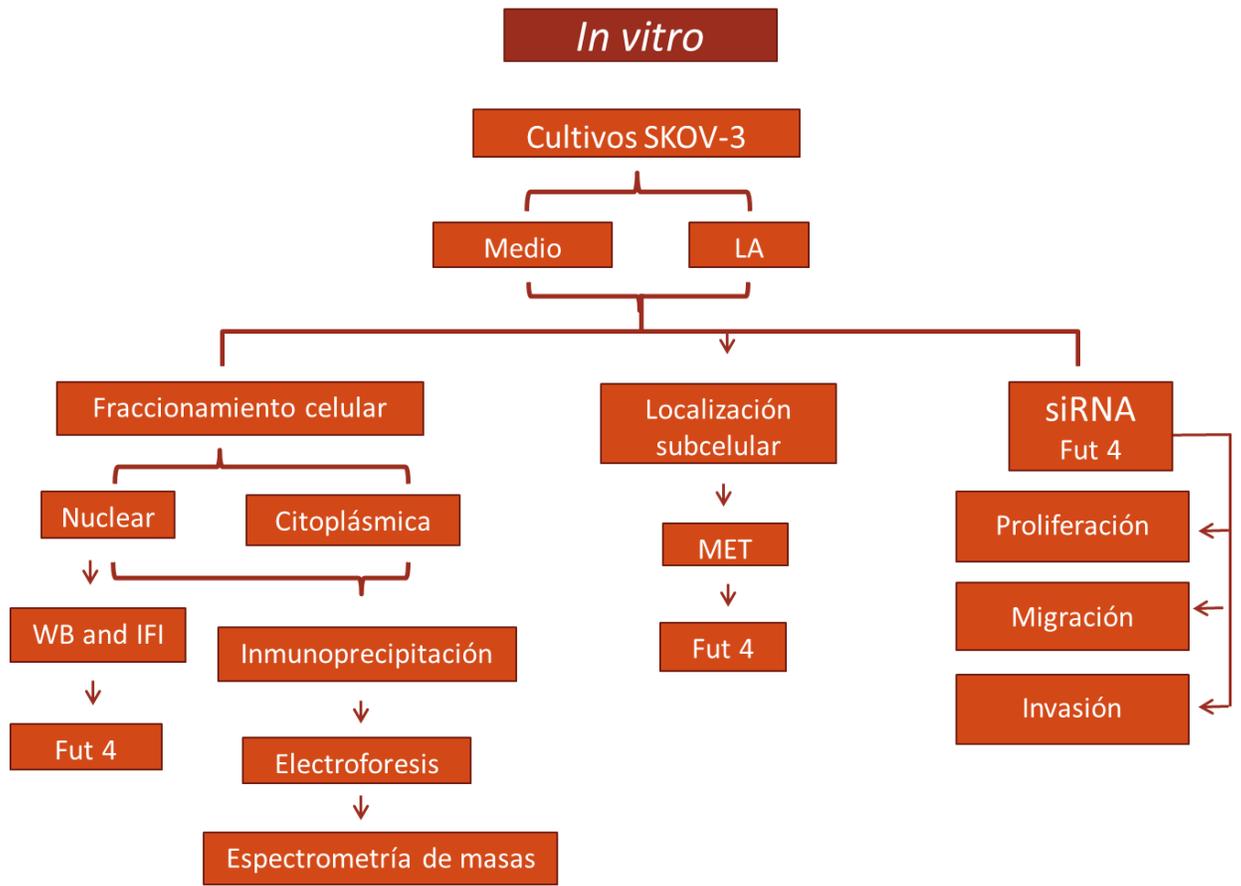
Cultivos de células SKOV-3

1. Determinar la localización subcelular de la proteína Fut 4 mediante fraccionamientos celulares.
2. Analizar la asociación de Fut 4 con otras proteínas dentro del núcleo de células expuestas a LA
3. Evaluar el efecto del silenciamiento de Fut 4 en procesos de proliferación, migración e invasión bajo el efecto del LA.

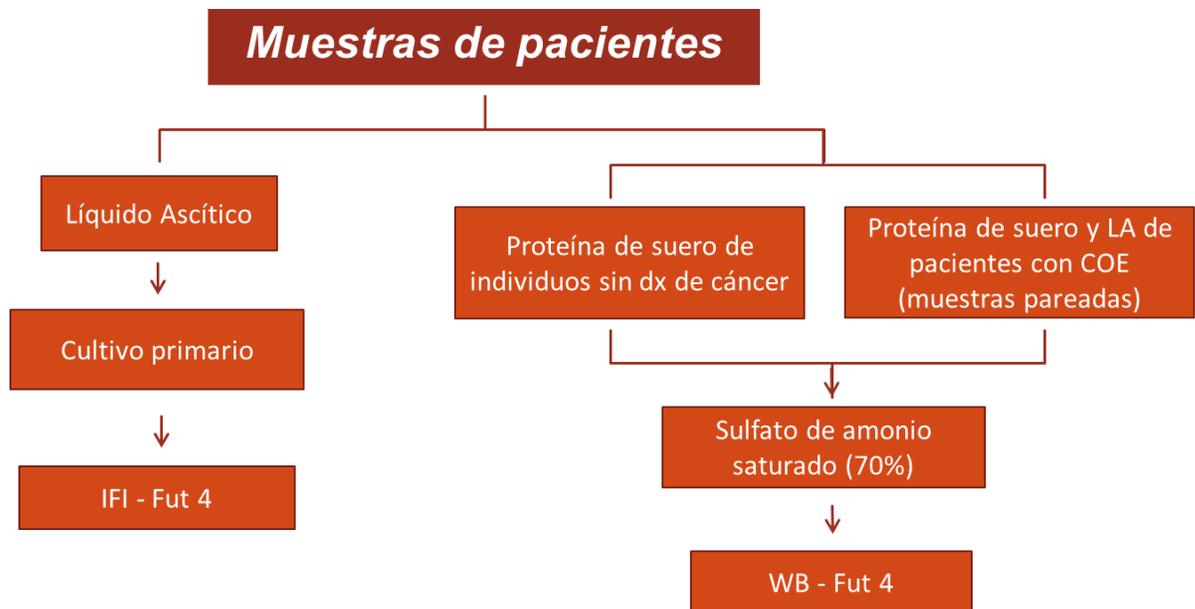
Muestras provenientes de pacientes con COE

3. Determinar la presencia de la proteína Fut 4 en cultivos primarios de células recuperadas de un LA.
4. Medir los niveles de expresión de Fut 4 en suero y LA de muestras pareadas de pacientes con COE y en sueros de mujeres sin diagnóstico de COE.
5. Correlacionar la expresión de Fut 4 con la progresión tumoral de la enfermedad, basados en el historial clínico de las pacientes.

6 ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL *In vitro*



7 ESTRATEGÍA EXPERIMENTAL EN PACIENTES



8 METODOLOGÍA

- **Material biológico.**

- **Obtención de LA.**

Las muestras de LA y suero fueron obtenidas a partir de pacientes diagnosticadas con COE adscritas al Departamento de Oncología Médica del INCan, mediante un protocolo aprobado por los Comités de Bioética de investigación del INCan, con número de expediente (No. INCAN/CC/134/09 (CB/549/09). Con carta de consentimiento informado de aprobación firmada por cada una de las pacientes. Todo bajo la asesoría de la Dra. Dolores Gallardo Rincón, oncóloga médica del INCan.

- **Procesamiento de líquido ascítico.**

Los LAs (N= 23) se obtuvieron por paracentesis en condiciones de esterilidad y se almacenaron en tubos Falcon estériles de 50 ml, los cuales se colocaron en un recipiente con hielo y se transportaron al laboratorio el mismo día de la extracción para su procesamiento inmediato. Para poder ser incluidas en el estudio las muestras de ascitis fueron claras, libres de bacterias (analizadas después de su centrifugación y observación directa al microscopio óptico) y sin sangre visible (por la coloración de la ascitis). Las muestras se centrifugaron a 1,000 x g por 10 min a 4 °C. Los LAs libres de células tumorales fueron filtrados (Corning, diámetro de poro de 0.22 µm, No. Cat. 431097), etiquetados y almacenados a -70 °C. (**Tabla 1**).

Tabla 1. Características clínicas de las 10 pacientes con COE de donde se obtuvieron los LAs

Características	% (n/N) N=10
Edad (Años)	
Media±SD	56.6±13.2
Mediana (Rango)	55.5 (54-72)
Tipo histológico	
Endometrioides	10 (1/10)
Seroso papilar de alto grado	90 (9/10)
Etapas clínicas	
IIIC	20 (2/10)
IVA	50 (5/10)
IVB	30 (3/10)
Estatus	
Vivas	70 (7/10)
Fallecidas	20 (2/10)
Perdidas	10 (1/10)

Procesamiento de cultivos primarios.

Las células de los cultivos primarios provenientes de un LA, se procesaron antes del tratamiento descrito en la parte superior. El LA se atemperó, se homogenizó y se tomó 1 ml, el cual fue colocado sobre cubreobjetos dentro de cajas T-25. Los cultivos se incubaron durante una semana a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%.

○ **Obtención de muestras de suero y LA de pacientes con y sin COE.**

En este estudio se procesaron 13 sueros y LAs pareados de pacientes con COE. Los cuales se seleccionaron bajo criterios de inclusión, que establecían que las pacientes no tenían que haber cursado bajo ningún tratamiento terapéutico previo. Los sueros se sometieron a un proceso de eliminación de proteínas abundantes como albúmina e inmunoglobulinas mediante precipitación con sulfato de amonio saturado. Las características patológicas de las pacientes con COE se encuentran descritas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Características clínicas de las 13 pacientes con COE de donde se obtuvieron los sueros y LA

Características	% (n/N) N=13
Edad (Años)	
Media±SD	49.5±13.2
Mediana (Rango)	48.5 (29-68)
Tipo histológico	
Endometrioide	30 (4/13)
Seroso papilar de alto grado	53.8 (7/13)
Mucinoso	15.3 (2/13)
Etapa clínica	
IVA	15.3 (2/13)
IVB	23 (3/13)
IC	23 (3/13)
IIIC	38.4 (5/13)
Estatus	
Fallecidas	61.5 (8/13)
Vivas	38.46 (5/13)

- **Línea celular SKOV-3**

La línea celular SKOV-3 (ATTC HTB-77) fue obtenida en 1973, a partir de líquido ascítico de una mujer caucásica de 64 años con un tumor de ovario de subtipo histológico seroso papilar. Cuenta con una morfología parecida a la epitelial y presenta actividad de quimiotaxis. *In vivo*, esta línea celular puede llegar a formar tumores primarios de ovario. Las células se cultivan a 37 °C en medio McCoy's 5ª (Corning, 10-050-CVR) con suero fetal bovino al 10% (Corning, 35-010-CV), en una atmósfera de CO₂ al 5%. Las células se procesaron con el LA bajo una confluencia del 80% de crecimiento. Como condición control se emplearon células SKOV-3 en medio convencional.

- **Inmunofluorescencia indirecta**

Partiendo de 50 mil células SKOV-3, se colocaron sobre cubreobjetos y se expusieron a diferentes condiciones, dependiendo del experimento realizado: Para los ensayos de fucosilación total, las células SKOV-3 se procesaron de acuerdo con lo descrito por Alberto *et al.*, 2019, utilizando una lectina biotinilada de *Aleuria aurantia* (AA) (Vector Laboratories, B-1395,) diluida 1:50, y un conjugado estreptavidina-FITC (Life Technologies, 4343-11,) diluido 1: 100 en PBS. Para la detección de Fut's, los anticuerpos primarios se incubaron durante toda la noche a 4 °C: anti-Fut 2 (Cat. No. sc-21964), anti-Fut 4 (Cat No. sc-292247) y anti-Fut 8 (Cat. No. sc-271244) (Santa Cruz Biotechnology, Inc.). Todos se diluyeron 1:50 en PBS. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-cabra FITC (No. Cat. A-15970), anti-conejo-TRITC (Cat. No. A-16028) y anti-ratón, ALEXA 647 (No Cat. A -214663), todos obtenidos de Thermo Fisher Scientific Inc., diluidos 1: 100 e incubados durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron tres veces con PBS 1X y se montaron sobre un portaobjetos con 7 µl de Vectashield (No. Cat. H-1000). El marcaje para las diferentes fucosiltransferasas se realizó de manera simultánea y se empleó un microscopio confocal Carl Zeiss (Carl Zeiss LMS 700) y el software de microscopio ZEN 2012 (Carl Zeiss Microscopy) para analizar todas las muestras.

Para el análisis de los ensayos de IFI del sondeo de FUT's en núcleo, se contabilizaron 67 núcleos celulares. En el caso del sondeo de Fut 4 en núcleos aislados se consideraron 25 núcleos por condición.

Nota. El término *Crop*, se refiere a la eliminación de zonas no deseadas de una imagen a través de un acercamiento óptico, en este caso, para la visualización detallada de la imagen seleccionada. El término ORTHO se refiere al análisis mostrado en cortes X, Y y Z del plano óptico.

- **Microscopía electrónica de transmisión**

El análisis ultraestructural por microscopía electrónica de transmisión (MET) se realizó con el apoyo técnico del personal del laboratorio del Dr. Adolfo Martínez Palomo y de la Dra. Bibiana Chávez Munguía, Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular (DIPM)-CINVESTAV. Las células SKOV-3 se fijaron a temperatura ambiente con glutaraldehído al 2,5% (v / v) en tampón de cacodilato de sodio 0.1 M, pH 7.2 durante 1 h a temperatura ambiente. Las muestras se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 90 y 100%) y se embebieron en resinas epoxi Polybed y se polimerizaron a 60 ° C durante 24 h. Se colocaron secciones delgadas en rejillas de níquel recubiertas con film de formvar, se bloquearon con suero fetal bovino al 5% durante 1 hora y se incubaron con el anticuerpo primario anti-Fut 4 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, sc-292247) diluido 1:10 durante 24 h en cámara húmeda a 4 ° C. Las muestras se lavaron con PBS y agua destilada antes de la incubación con un anticuerpo IgG (H + L) (AH) de cabra anti-conejo diluido en PBS 1:30 acoplado a partículas de oro de 20 nm (Ted PELLA, Inc.). Después de la incubación con el anticuerpo secundario, las muestras se lavaron con PBS, se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión JEOL-JEM-1011.

- **Lisis celular**

Las células SKOV-3 se centrifugaron a 108 x g durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y se agregó 1 ml de PBS 1X estéril a la pastilla obtenida, se homogenizó y se volvió a centrifugar a 21 255 xg durante 10 min a 4 °C. Este proceso se realizó en tres ocasiones sin homogenizar la pastilla. Se retiró el PBS y se agregaron 200 µL de amortiguador de lisis (Tris-HCL 5 mM, EDTA 2 mM, y Nonidet P-40 al 1%) con inhibidores de proteasas y fosfatasa (1 µL de Aprotinina y Leupeptina, 1 mM de PMSF, Na₃VO₄ y NaF). Se incubaron por 30 min en hielo y se sometieron a tres ciclos de vortex/hielo (1 min/3 min respectivamente). Posteriormente, las muestras se sometieron a sonicación por ciclos de 10 seg, con tiempos de 10 seg de reposo en hielo durante 1 min a una potencia de 200 W. Por último, se volvieron a centrifugar a 21 255 xg durante 15 min a 4 °C. Se colectó el sobrenadante y se guardó el precipitado a -20 °C. La concentración de proteínas se determinó utilizando el Kit DC Protein assay (Bio-Rad, 500-0114) a una absorbancia de 760 nm.

- **Western blot**

Los extractos proteicos de las células SKOV-3 de cada condición, se separaron en geles SDS-PAGE al 10% y 12.5%, según se indique. La electrotransferencia se realizó en presencia de amortiguador buffer de transferencia frío (10% amortiguador de corrida 10X, 20% de metanol, 70% de agua miliQ) a 25 V a 4 °C durante toda la noche. Las proteínas transferidas a la membrana de nitrocelulosa (MNC) se tiñeron con el colorante rojo de Ponceau durante 30 min en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó la membrana con TBS-T 20 al 0.05%. Se bloqueó la membrana con leche al 5% diluida en TBS-T por 1 h y se lavó de 4 a 5 veces, con TBS-T, 30 min cada uno. Para la detección de la enzima Fut 4 se utilizaron los anticuerpos primarios policlona (Santa Cruz Biotechnology, INC: sc-292247) (posteriormente descontinuado) en una dilución 1:2500 y un anticuerpo monoclonal anti-Fut 4 (Invitrogen, MA5-31736) dilución 1:500 en PBS leche al 2.5%, de acuerdo al ensayo realizado. Se dejó incubando

durante toda la noche a 4 °C en agitación constante. Posteriormente, se lavó con TBS-T de 5 a 7 veces durante 10 min cada uno. Para las muestras tratadas con el anticuerpo policlonal se incubó con el anticuerpo secundario α -IgG de conejo (Jackson ImmunoResearch Inc., 111-035-003) y para las muestras tratadas con el anticuerpo monoclonal, el anticuerpo secundario α -IgG de ratón (Jackson ImmunoResearch Inc., 115-035-003). Los dos anticuerpos secundarios están acoplados a peroxidasa de rábano (HRP), utilizados en una dilución 1:10 000 en TBS-T leche 2.5 %. Se incubaron durante 1 h a temperatura ambiente en agitación constante, como control de carga se utilizó un anticuerpo dirigido a GAPDH en una dilución 1:5000. Se reveló mediante quimioluminiscencia (SuperSignal West FemtoChemiluminescentSubstrate, thermoScientific, #34095).

- **Espectrometría de masas (MALDI-TOF)**

Las bandas proteicas de interés, obtenidas de un gel sometido a electroforesis en una dimensión se enviaron, para su identificación por espectrometría de masas, a la Unidad de Proteómica del CINVESTAV. Para este procedimiento se utilizó el equipo NanoAcquity Synapt G2-S1. Este análisis se realizó con el apoyo del M. en C. Emmanuel Ríos Castro, responsable del equipo. En breve, los fragmentos de gel resultantes se digirieron enzimáticamente de acuerdo con el protocolo modificado de Shevchenko A *et al.*, 2006. Posteriormente, se cargaron péptidos trípticos en la precolumna Symmetry C18 Trap V / M (Waters, Milford, MA); 180 μ m X 20 mm, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula de 5 μ m desalado utilizando como fase móvil A, ácido fórmico (AF) al 0,1% en H₂O y fase móvil B, AF al 0.1% en acetonitrilo (ACN) bajo el siguiente gradiente isocrático: 99.9% de fase móvil A y 0,1% de fase móvil B a un flujo de 5 μ l/min durante 3 min. Luego, los péptidos se cargaron y separaron en una columna HSS T3 C18 (Waters, Milford, MA); 75 μ m X 150 mm, tamaño de poro de 100 Å, tamaño de partícula de 1.8 μ m; utilizando un UPLC ACQUITY M-Class (Waters, Milford, MA) con las mismas fases móviles bajo el siguiente gradiente: 0 min 7% B, 30.37 min

40% B, 32.03-35.34 min 85% B, 37-47 min 7% B a un caudal de 400 nl/min y 45 °C. Los datos de los espectros se adquirieron en un espectrómetro de masas con ionización por electropulverización (ESI) y separación por movilidad iónica (IMS) Synapt G2-Si (Waters, Milford, MA) utilizando un enfoque de adquisición independiente de datos (DIA) a través del modo HDMSE (Waters, Milford, MA). La página de sintonía para la fuente de ionización se estableció con los siguientes parámetros: 2,75 kV en el capilar del muestreador, 30 V en el cono de muestreo, 30 V en el desplazamiento de la fuente, 70 ° C para la temperatura de la fuente, 0,5 Bar para el gas de nano flujo y 120 l/h para el flujo de gas de purga. Se adquirieron dos cromatogramas (cromatogramas de baja y alta energía) en modo positivo en un rango de m / z 50-2000 con un tiempo de barrido de 500 ms. No se aplicó energía de colisión para obtener el cromatograma de baja energía, mientras que para los cromatogramas de alta energía, los iones precursores se fragmentaron en la transferencia utilizando una rampa de energía de colisión de 19-55 V. Archivos * .raw generados que contienen espectros de MS y MS/MS se deconvolucionaron y compararon utilizando el software ProteinLynx Global SERVER (PLGS) v3.0.3 (Waters, Milford, MA) con una base de datos Homo sapiens * .fasta invertida (descargada de Uniprot, secuencias de proteínas 73099, última modificación el 27 de junio de 2018) concatenada con su base de datos invertida. Los parámetros del flujo de trabajo fueron: tripsina como enzima de corte y se permitió una escisión perdida; carbamidometilo (C) como modificación fija y amidación (término N), desamidación (N, Q), oxidación (M), fosforilo (S, T, Y) como modificaciones variables. Tolerancia automática de péptidos y fragmentos, coincidencias mínimas de iones de fragmentos por péptido: 2, coincidencias mínimas de iones de fragmentos por proteína: 5, coincidencias mínimas de péptidos por proteína: 1 y una tasa de descubrimiento falso (FDR) ≤4%. Todas las identificaciones tuvieron un porcentaje ≥95% de confiabilidad (Protein AutoCurate green). Synapt G2-Si se calibró con [Glu1] - Fibrinopéptido, [M + 2H] 2 + = 785,84261 a 1,5 ppm.

- **Silenciamiento de la proteína Fut 4**

Para llevar a cabo el silenciamiento de la proteína Fut 4, se emplearon RNA pequeños interferentes (siRNA, Santa Cruz Biotechnology, SC-40585), diluidos como lo indica el fabricante. Para todos los ensayos funcionales se partió de 300 000 mil células SKOV-3, crecidas por 24 h en medio McCoy 5A y SFB al 10%. Transcurrido ese tiempo, se retiró el medio y se adicionó 1 ml de LA por 24 h. Posteriormente se retiró el LA y se realizaron tres lavados con medio sin SFB para eliminar remanentes del SFB. Simultáneamente, en un volumen de 300 μ l de medio McCoy sin SFB, se preparó una mezcla con siRNAs-Fut 4 y 2 μ l de turbofect (Thermo Fisher Scientific, R0532), para cada condición. La reacción se resuspendió y se dejó reposar 20 min. Se retiró el medio sin SFB de cada condición y se agregó cuidadosamente la mezcla con el siRNA previamente preparada y se incubó durante 16 h. Una vez efectuado el silenciamiento, se retiró la mezcla y se adicionó nuevamente medio con SFB al 10% o LA por 24 h. Se probaron tres concentraciones del siRNA interferente. 20, 40 y 60 pmol (LA/siRNA Fut 4) sobre las células SKOV-3. Como condición control se empleó un siRNA no relacionado (Santa Cruz Biotechnology, SC-36869) (LA/siRNA CTL) en una concentración de 20 pmol, sugerido por el fabricante. El silenciamiento de Fut 4 se corroboró mediante ensayos de WB. Las condiciones empleadas en los ensayos funcionales fueron las siguientes, células SKOV-3 en: Medio (control negativo), LA (control positivo) LA/siRNA Fut 4 (condición problema) y LA/siRNA CTL (condición control de siRNA)

- **Análisis de ciclo celular y proliferación mediante citometría de flujo**

Para los ensayos de proliferación, todas las condiciones establecidas fueron tratadas de forma igualitaria.

EdU (5-etinil-2'-desoxiuridina) diluido en DMSO a 10 mM, suministrado con el kit de ensayo de citometría de flujo Click-iT EdU Alexa Fluor 488 (Thermo-Fisher Scientific, C10425) y se trabajó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se añadió a cultivos de SKOV-3 incubados en las diferentes condiciones empleadas,

2 h antes del terminar el tiempo de incubación (24 h). Las células se separaron con tripsina-EDTA y se procesaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, las células se fijaron durante 2 min con 200 μ l de paraformaldehído al 4% en PBS frío, se permeabilizaron con 100 μ l de saponina y se mantuvieron en hielo durante 10 min. Adicionalmente, para analizar el ciclo celular, las células se incubaron con 20 μ L de yoduro de propidio (1 mg / mL) (Thermo Fisher Scientific, P3566) durante 1 h a 37 °C en la oscuridad para marcar el DNA. La detección de ADN-EdU se realizó en un citómetro de flujo LSR Fortessa y los datos se analizaron utilizando el software Flowjo (versión 10.6). Las células expuestas a DMSO (disolvente) y medio de control sirvieron como controles. Los experimentos se realizaron por duplicado.

- **Ensayos de cierre de “Herida”**

Las células SKOV-3 se cultivaron y se procesaron en placas de 24 pozos para los ensayos de migración. Las condiciones empleadas se establecieron previamente: Medio, LA, LA/siRNA Fut 4, LA/ siRNA CTL. Posterior al silenciamiento las células se trataron con mitomicina C a una concentración de 0.02 mg / ml (M4827 Sigma-Aldrich) durante 2 h a 37 °C para detener la proliferación celular. Se descartó la mitomicina y se llevó a cabo la herida sobre la monocapa celular, bajo una confluencia del 90%. Empleando una punta blanca para una pipeta estándar de 20 μ l, la herida se realizó en forma de cruz para darle un mejor seguimiento al experimento. Se realizaron tres lavados a cada condición con PBS 1X para eliminar los remanentes de las células desprendidas por el rapado. Se colocó 1 ml de medio o de LA, según el caso requerido. El seguimiento del cierre de la herida se realizó a los tiempos 0, 4, 6, 8 y 10 h y las mediciones cuantitativas se representaron en cm, tomando de referencia las distancias entre los dos bordes realizados de la herida. El proceso se documentó mediante registros fotográficos, empleando un microscopio invertido Nikon Corp mod. Diaphot con una cámara Canon. Los experimentos se realizaron por triplicado.

- **Análisis de Invasión**

Partiendo de 1300 000 mil células cultivadas en placas de 24 pozos, donde se realizó el silenciamiento, la invasión de células SKOV-3 se determinó usando cámaras Transwell con un tamaño del poro de 8 μm en una placa de 6 pozos (Corning, 3428). Las células SKOV-3 silvestres o *knock-down*, se despegaron con 3 μl de tripsina (Corning, 25-053-CI) y se contabilizaron empelando una cámara de Neubauer. Se colocaron nuevamente 300 000 mil células SKOV-3 sobre la cámara superior del Transwell, previamente cubierta con Matrigel. El matrigel, previamente fue preparado en frío 1 h antes de la resiembra, se colocaron 600 μl de matrigel en una dilución 1:3 con medio McCoy sin SFB, posteriormente se dejó gelificar a 37 °C durante 1 h; de acuerdo a cada condición, se agregó medio suplementado o LA según el caso y se dejó incubar hasta lograr la adherencia celular. Posteriormente se desechó el suero o LA previamente colocado y a todas las condiciones se le agregó medio sin SFB. A la par, en la cámara inferior de la placa se colocó (para la condición de medio) medio McCoy suplementado con 20 % de SFB y para el resto de las condiciones se adicionó LA. La placa se incubó a 37 °C durante 24 h. Finalizado este tiempo se retiraron los Transwell y se realizó un raspado cuidadoso empleando un hisopo sobre la parte inferior interna del Transwell, se realizaron tres lavados con PBS 1X estéril y finalmente se tiñó la parte externa inferior del Transwell con 15 ml de azul de metileno. El análisis de los resultados se llevó a cabo mediante un microscopio invertido Nikon Corp mod. Diaphot, con una cámara Canon, donde se realizó la captura fotográfica de 20 campos por condición y se contabilizaron únicamente las células que lograron atravesar la barrera del matrigel. Los experimentos se realizaron por triplicado.

- **Inmunoprecipitación**

Cultivos celulares SKOV-3 incubados en LA se lisaron utilizando tampón de lisis no desnaturante enfriado con hielo (PBS, pH 7.4, Triton X-100 al 1 %, NaCl 150 mM, glicerol al 5 % y cóctel de inhibidores de proteasa) con el kit de co-IP

Thermo Scientific Pierce (26149) y las fracciones citoplásmica y nuclear se recuperaron siguiendo el protocolo del fabricante. Brevemente, se incubaron 10 µg de anticuerpo policlonal anti-Fut 4 (Invitrogen, MA5-31736) en una columna de resina de acoplamiento AminoLink Plusin durante 2 h. A continuación, la resina con el anticuerpo unido se lavó y se incubó con las fracciones celulares (citoplasmática y nuclear) durante la noche. Después de la incubación, la resina se lavó nuevamente (PBS, pH 7.4, NaCl 150 mM, glicerol al 5 %) y las proteínas se eluyeron con tampón de elución (HEPES 50 mM, pH 5.0).

- **Extractos nucleares**

Los extractos nucleares de SKOV-3 (40 µg) se obtuvieron de acuerdo con el protocolo de aislamiento rápido de núcleos de Cold Spring Harbor como se describe en Arash *et al.*, 2015. Se usó anti-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Inc, 2595) dilución 1:5000 como control del citoplasma, anti-H2A.X histona (Cell Signaling Technology, Inc,) dil 1:1000 como control de núcleo y anti-Fut 4 (Invitrogen, MA5-31736) dil 1:1500. Se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con HRP a una dilución 1:5000 en leche TBS-T al 2.5% durante 1 h a temperatura ambiente: IgG anti-conejo (Cat. No. 111-035-003) e IgG anti-ratón (Cat. No. 115-035-003) (de Jackson ImmunoResearch Inc.). La reacción positiva se desarrolló por quimioluminiscencia (SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity, Cat. No. 34095, Thermo Fisher Scientific).

- **Análisis estadístico**

El análisis estadístico se realizó utilizando los datos expresados como promedio \pm DE, mediante el software GraphPad Prism 8. La significancia estadística entre las diferentes condiciones empleadas en los ensayos funcionales se realizó mediante ANOVA de dos vías aplicando la prueba de comparaciones múltiples Dunnett's o Tukey. Para los ensayos donde se compararon dos condiciones, se evaluó utilizando la prueba de *t student*. Para realizar las asociaciones entre la expresión de la proteína Fut 4 y la SG y SLP de las pacientes, se empleó el

método de Kaplan Meier. Las diferencias significativas que se muestran sobre las gráficas corresponden a * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

9 RESULTADOS

Localización nuclear de la proteína Fut 4 en células SKOV-3 expuestas a LA

La figura 5A presenta células SKOV-3 incubadas en LA, analizadas mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) donde se analizó la localización subcelular y el nivel de expresión de las proteínas Fut 2, Fut 4 y Fut 8 en el núcleo celular. Nuestros resultados confirmaron lo observado durante el desarrollo del trabajo experimental de maestría (Alvear y col., 2016), mostrando que la proteína Fut 4 se localiza en ambos compartimientos; sin embargo, se observa una presencia mayor, estadísticamente significativa de Fut 4 ($p < 0,0001$) en el núcleo de las células SKOV-3, mientras que la localización de las enzimas Fut 2 y Fut 8 fue típicamente citoplásmica (Fig. 5B). Posteriormente, se realizó un análisis, de la inmunolocalización de la proteína Fut 4 de una célula seleccionada (recuadro blanco), dentro de los tres planos ópticos, confirmando la colocalización entre el marcador de ácido nucleico (DAPI) y la proteína Fut 4 (TRITC), dentro del núcleo de la célula SKOV-3 expuesta durante 24 h en LA de pacientes con COE (Fig. 5C y D), dicha búsqueda no fue realizada en medio de cultivo debido a la baja expresión que presentan las Futs en esta condición. La localización nuclear de Fut 4 se comprobó al realizar un análisis por microscopía electrónica de transmisión, donde se confirmó que Fut 4 es una proteína que se ubica tanto en citoplasma como en el núcleo de las células SKOV-3 y que su mayor presencia e intensidad de expresión se observa a las 24 h de incubación con el LA. En este experimento se agregó adicionalmente un tiempo de 48 h de incubación con LA y observamos que incluso cuando su expresión disminuye ligeramente a las 48 h, la presencia de la proteína Fut 4 en el núcleo sigue siendo mayor en comparación con la condición control (Fig. 6).

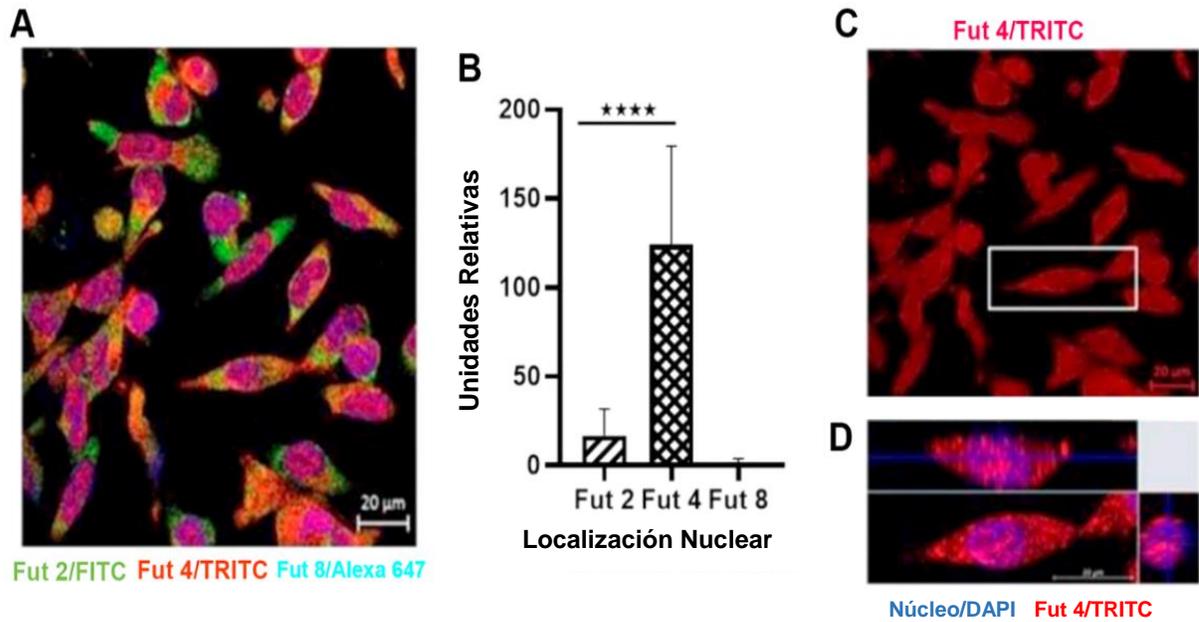


Figura 5. Análisis de inmunofluorescencia de Fut 2, 4 y 8 dentro del núcleo de células SKOV-3 expuestas a LA. A y B) Campos representativos de 67 núcleos celulares analizados para Fut 2, Fut 4 y Fut 8, con un aumento de 40X. Núcleo-DAPI, Fut 2-FITC, Fut 4-TRITC y Fut 8-ALEXA 647. C) Análisis de la intensidad de fluorescencia en unidades de píxel. D) Plano óptico (Crop) de una célula expuesta durante 24 horas (h) (caja blanca) en LA, analizada en el núcleo celular solo con los canales para Núcleo-DAPI y Fut 4-TRITC.

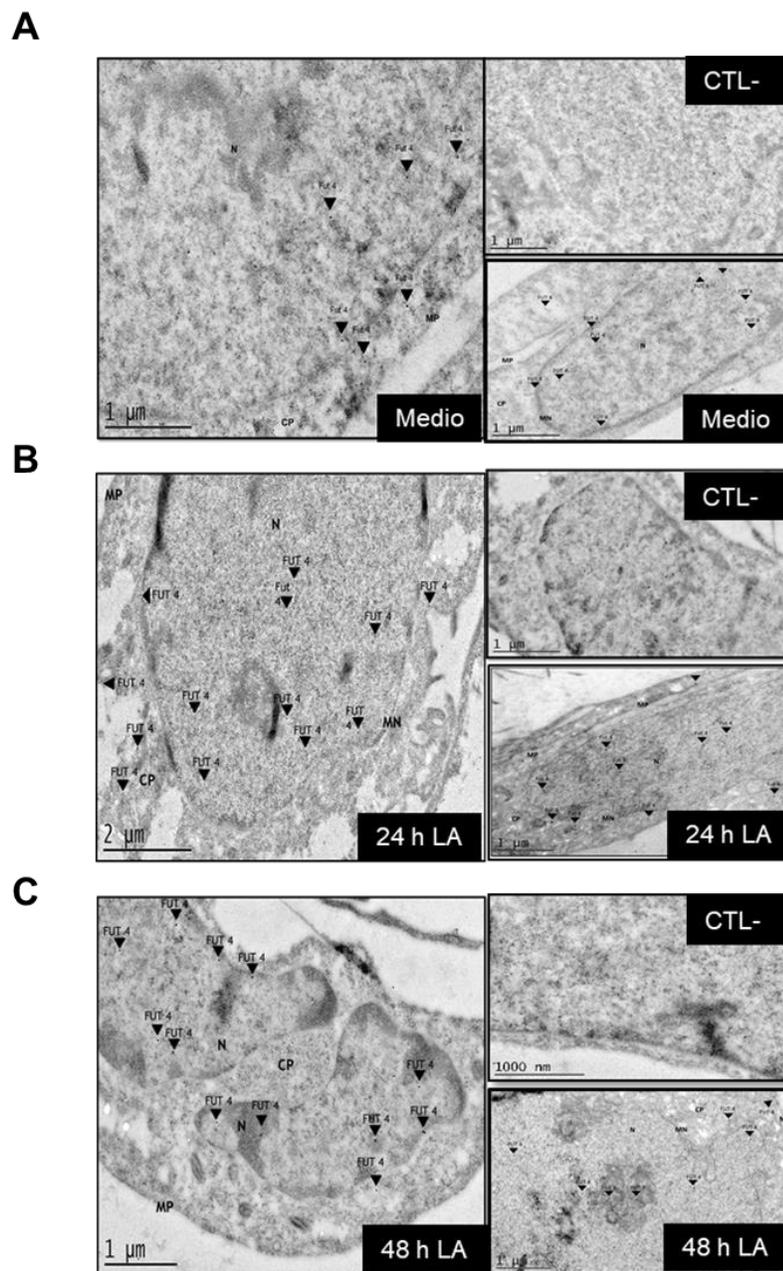


Figura 6. Validación de la presencia de la proteína Fut 4 en el núcleo celular de SKOV-3. Imágenes representativas de diferentes campos analizados mediante microscopía electrónica de transmisión (MET) de células SKOV-3 incubadas en A) medio McCoy's 5A (control), B) 24 h en LA y C) 48 h en LA. Membrana plasmática (MP), Citoplasma (C), Membrana nuclear (MN), Núcleo (N), Fut 4 (punta de flecha negra).

Para continuar con los experimentos de localización nuclear y tomando en cuenta que a las 24 h de incubación con ascitis era el tiempo donde se observa una mayor presencia de la proteína Fut 4, se continuó con los experimentos solo con este tiempo de interacción con el LA.

Se procedió a realizar un fraccionamiento celular de SKOV-3 expuestas por 24 h en medio y LA, donde los resultados mostraron un alto rendimiento en la obtención de fracciones totales (1), citoplasmáticas (2) y nucleares (3). Se observaron claras diferencias tanto en concentración como en número de bandas proteicas entre las tres fracciones de las dos condiciones (Fig. 7). Se analizó la integridad de los núcleos obtenidos del fraccionamiento celular por microscopía óptica (Fig. 8A) e IFI (Fig. 8B), donde los núcleos fueron teñidos con DAPI. Observamos un alto rendimiento y una purificación limpia, libre de restos citoplasmáticos.

Para corroborar la localización nuclear de la proteína Fut 4 en células SKOV-3, se analizó su presencia en fracciones enriquecidas con los extractos nucleares previamente descritos. Se analizaron 25 núcleos por condición mediante IFI (Fig. 9A). Nuestros resultados mostraron que la incubación con LA aumenta la presencia de la proteína Fut 4 en el compartimento nuclear, con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) en comparación con la expresión encontrada para la proteína Fut 4 en los núcleos aislados de células incubadas en medio (Fig. 9B). Estos resultados son similares a los encontrados en los extractos nucleares analizados por WB (Fig. 9C), obtuvimos resultados similares, donde nuevamente observamos una mayor presencia de la proteína Fut 4 en los núcleos de células expuestas a LA durante 24 h ($p < 0.01$) respecto a lo encontrado en los núcleos de las células expuestas al medio (Fig. 9D).

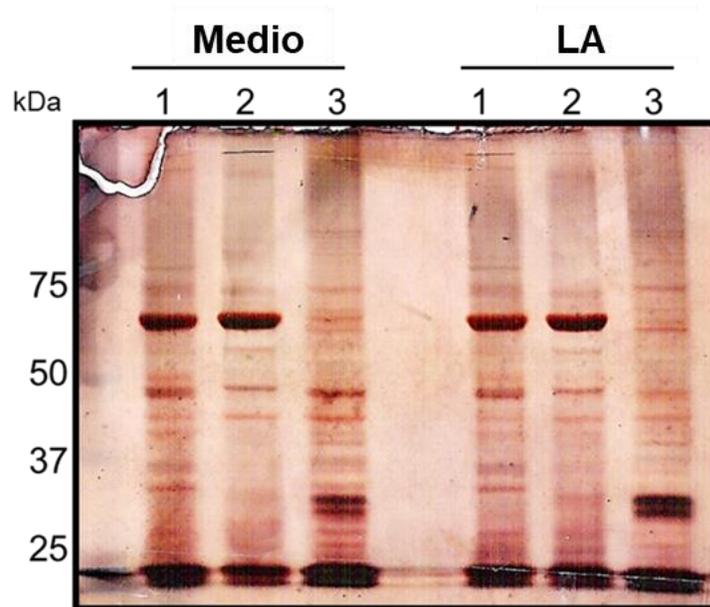


Figura 7. Fraccionamiento celular de SKOV-3 en medio y LA por 24 h. A) Tinción con plata de SDS-PAGE 10% con 20 μ g de proteína de cada fracción (1: Total, 2: citoplasma, 3: nuclear), en la condición de medios (M) y líquido ascítico (LA).

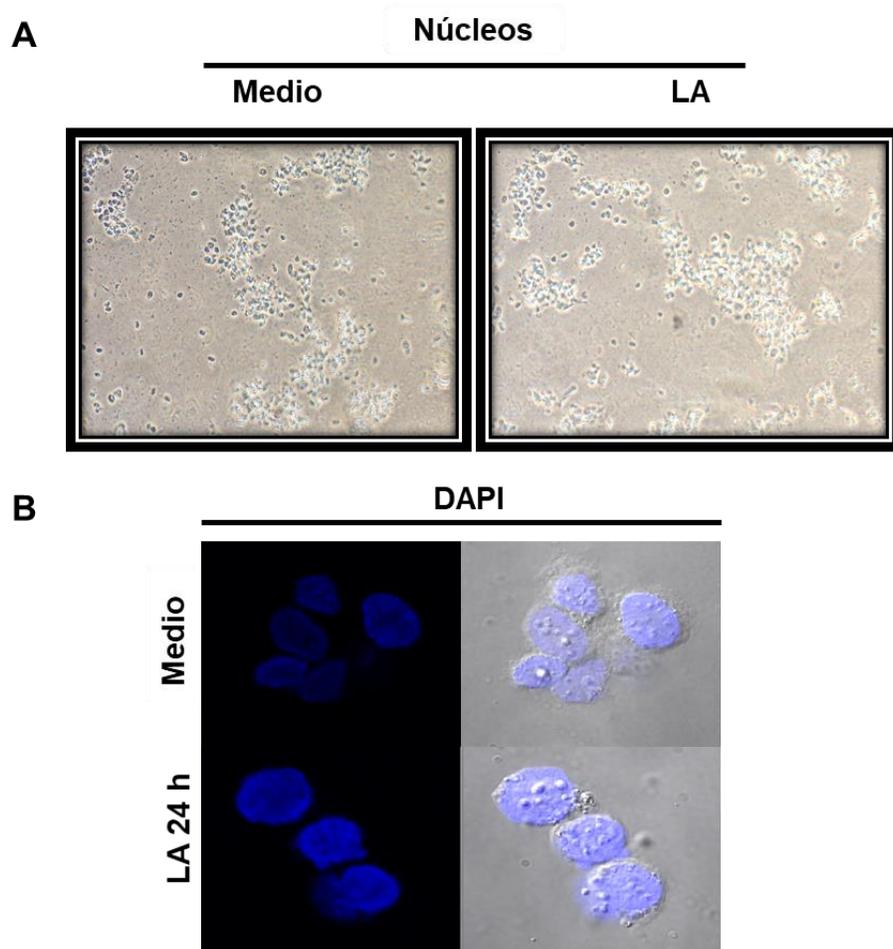


Figura 8. Rendimiento de la obtención de núcleos mediante microscopía óptica 40X. Campos representativos de la integridad de los núcleos obtenidos de ambas condiciones analizados mediante A) microscopía óptica y B) microscopía confocal, donde los núcleos fueron teñidos con DAPI.

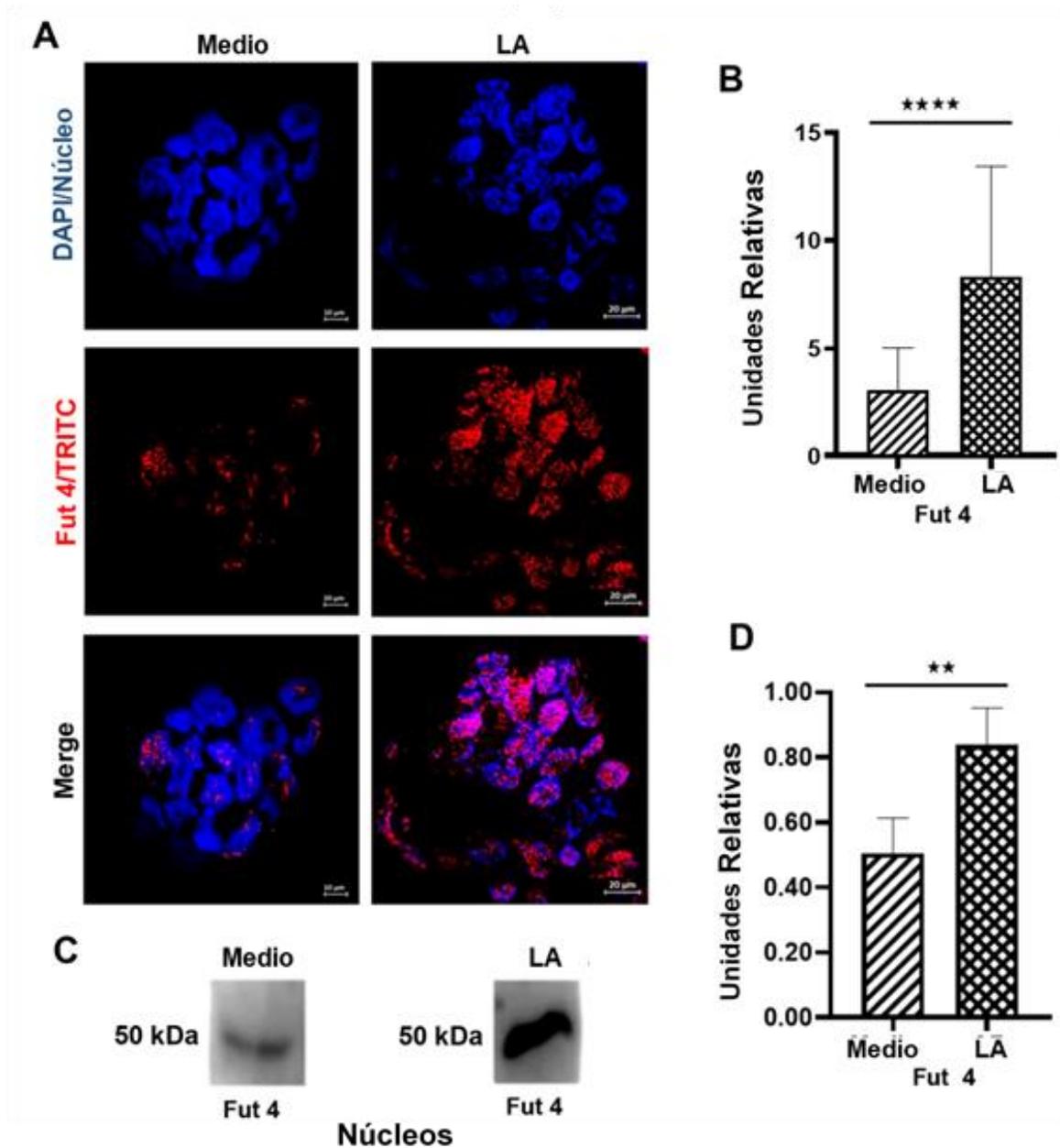


Figura 9. Validación de la localización nuclear de Fut 4 en células SKOV-3 incubadas en LA. A) Análisis por IFI de fracciones nucleares de células SKOV-3 en medio y en LA. Núcleo-DAPI y Fut 4 / TRITC, analizados con un aumento de 40X. B) Análisis de la intensidad de la fluorescencia representado en unidades relativas. C) WB de fracciones nucleares de células SKOV-3 en Medio y LA. D) Análisis densitométrico representado en unidades relativas del WB. Para determinar la significación estadística, se realizó un análisis t-Student de tres experimentos independientes.

Interacción entre la proteína Fut 4 y proteínas nucleares en células SKOV-3 expuestas a LA

Una vez confirmada la localización nuclear de la proteína Fut 4 en células incubadas con LA, y con el fin de lograr una mejor comprensión de su proceso de translocación nuclear, así como su posible función dentro del núcleo de células SKOV-3, se realizó una inmunoprecipitación (IP) empleado un anticuerpo dirigido a la proteína humana Fut 4. Para este experimento solo se emplearon las fracciones nucleares, de células SKOV-3 previamente expuestas a Medio y LA durante 24 h. En la figura 10 se muestra el perfil proteico del fraccionamiento celular de SKOV-3 empleado para la IP (Fig. 10). La figura 11A muestra las proteínas de los extractos nucleicos que no se unieron a la proteína de interés (Fut 4), observando una concentración mayor de proteínas en la condición de LA en comparación con la condición de medio. Sin embargo, las muestras correspondientes a los 6 lavados (L) realizados a cada condición, no mostraron una diferencia considerable en la concentración de proteínas que se iban liberando (Fig. 11B). Finalmente, se analizaron 20 μ g del IP por electroforesis en gel, el cual se tiñó con azul de Coomassie (Fig. 12), y 20 μ g se utilizaron para el procesamiento por espectrometría de masas. Para la identificación de proteínas unidas directa o indirectamente a la proteína Fut 4, solo se procesaron muestras de citoplasma y núcleo de células SKOV-3 incubadas en LA. Las proteínas identificadas en cada condición se muestran en la **Tabla 3**. Los resultados del análisis por espectrometría de masas mostraron 11 proteínas en total, donde 5 fueron identificadas en el citoplasma y 6 en el núcleo, siendo solo la proteína histona H4 la encontrada en ambas condiciones.

Posterior a la identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas obtenidas de la IP se realizó un interactoma empleando la página String. Los resultados arrojaron que no se ha reportado, hasta la fecha, ningún tipo de comunicación reportada entre las proteínas identificadas con la proteína Fut 4 (Fig 13 y 14). Sin embargo, estas evidencias abren grandes caminos de estudio para dilucidar y establecer, el mecanismo fisiológico de esta enzima en el núcleo, durante la interfase entre la célula cancerosa y el microambiente tumoral.

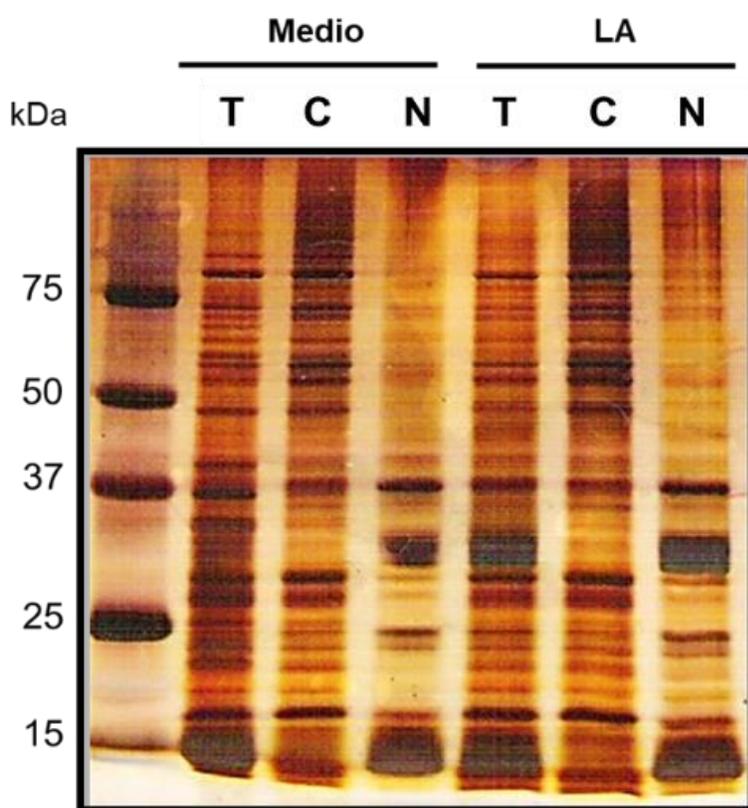


Figura 10. Fraccionamiento celular de SKOV-3 en medio y LA por 24 h empleadas para la IP. A) Tinción con plata de un SDS-PAGE 10% con 40 µg de proteína de cada fracción: Total (T), citoplasma (C) y nuclear (N), en la condición de medio y líquido ascítico.

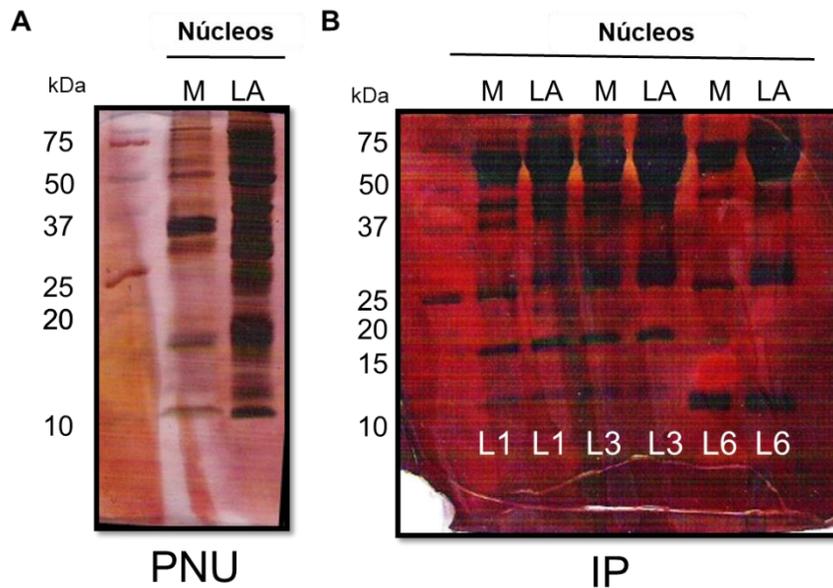


Figura 11. Perfil de proteínas nucleares sin interacción a Fut 4 en la IP. Tinción con plata de proteínas separadas por SDS-PAGE al 12%. A) Proteínas no unidas (PNU) con la proteína Fut 4. B) Patrón electroforético de proteínas obtenidas de los lavados 1 (L1), 3 (L3) y 6 (L6) de la IP de fracciones nucleares de células interaccionadas con medio (M) y líquido ascítico (LA).

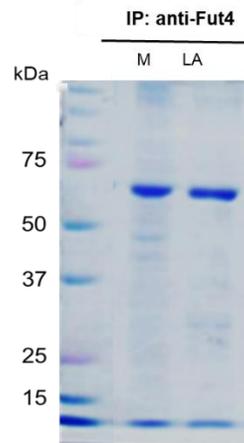


Figura 12. Inmunoprecipitación de la proteína Fut 4 de extractos nucleares de células SKOV-3 incubadas en Medio y LA. 20 μ g de las proteínas obtenidas por IP

con el anticuerpo anti Fut 4 fueron analizadas por SDS-PAGE 10%. Tinción con azul de Coomassie.

Tabla 3. Proteínas identificadas mediante IP de Fut 4 en fracciones nucleares de células SKOV -3 incubadas en LA			
N° de acceso	Citoplasma	N° de acceso	Núcleo
P62805	Histona H4	M0R1V7	Ubiquitina-60S ribosomal proteína L40 (Fragmento)
B0YJC4	Vimentina variante 3	P62805	Histona H4
P04264	Queratina tipo II citoesquelético 1	P04264	Queratina tipo II citoesquelético 1
P35908	Queratina tipo II citoesquelético 2 epidermal	P13645	Queratina tipo I citoesquelético 10
F8W0P7	ATP sintetasa subunidad beta_ mitocondrial (Fragmento)	P08670	Vimentina
		Q93079	Histona H2B tipo 1-H

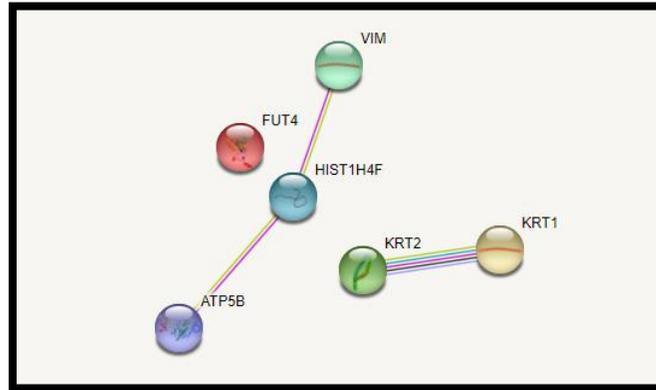


Figura 13. Red de interacciones de las proteínas citoplásmicas identificadas en los complejos formados con la proteína Fut 4. Experimento realizado con las proteínas identificadas mediante la inmunoprecipitación con anti-Fut 4 de la fracción citoplásmica de células SKOV-3 incubadas en LA.

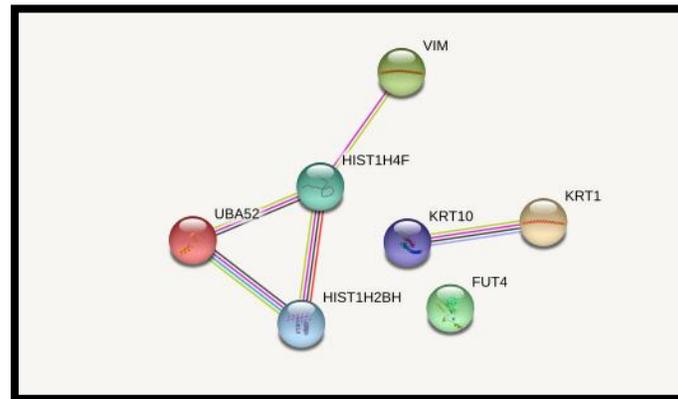


Figura 14. Red de interacciones de las proteínas nucleares identificadas en los complejos formados con la proteína Fut 4. Experimento realizado con las proteínas identificadas mediante la inmunoprecipitación con anti-Fut 4 de la fracción nuclear de células SKOV-3 incubadas en LA.

Fut 4 interviene en procesos asociados con la progresión del COE en células SKOV-3 expuestas a LA.

Para definir el impacto del LA en procesos biológicos relevantes en el desarrollo del COE, se evaluó el efecto de 10 LA diferentes sobre la proliferación de células SKOV-3 realizando un marcado con EdU. Los resultados indican que las células SKOV-3 incubadas de forma independiente, con 10 LA diferentes, presentaron un mayor porcentaje de incorporación de EdU ($21.89 \pm 0.91\%$), (Fig. 15A) frente al porcentaje obtenido en las células SKOV-3 incubadas en medio $12,94 \pm 0,43\%$ (Fig. 15A), con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (Fig. 15B). Aunque el porcentaje de proliferación aumentó con los 10 LA analizados, en comparación con lo encontrado en la condición control, hubo variaciones en el porcentaje de proliferación observado entre las 10 LA diferentes. Se realizaron dos experimentos independientes y se representó el promedio resultante de ambos ensayos (Fig. 11B). Una vez que se estableció que los 10 LA favorecían la proliferación en las células SKOV-3, se seleccionaron cuatro LAs que presentaron un porcentaje de aumento de la proliferación dentro de la media. Posteriormente, se analizó el efecto de estos 4 LA sobre la morfología y fucosilación de las células SKOV-3. Los resultados mostraron que la incubación con los diferentes LA generó cambios morfológicos similares, es decir: contenido citoplasmático alargado con contactos célula-célula a través de sus extensas prolongaciones de membrana y la formación de protuberancias, similares a invadopodios, lamelipodios y filopodios (Fig. 16 A, B). Cambios que no se observaron en la condición de medio. Al evaluar el nivel de fucosilación, los resultados mostraron que las cuatro LA indujeron un aumento en el nivel de fucosilación, en comparación con el encontrado en el medio control (Fig. 16B). Se estableció que las cuatro LA producían cambios similares tanto en la morfología como en el nivel de fucosilación en las células SKOV-3. Por lo tanto, se decidió elegir un solo LA para continuar con los siguientes experimentos, este LA seleccionado se indica en el gráfico de proliferación con un recuadro negro (Fig. 15B)

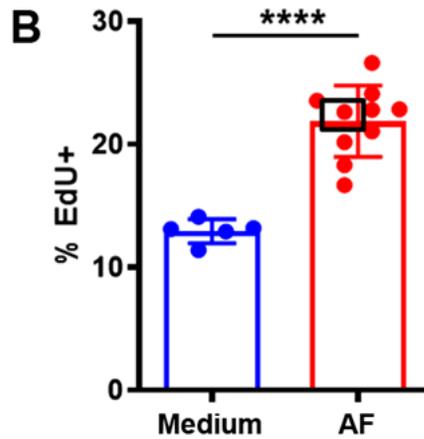
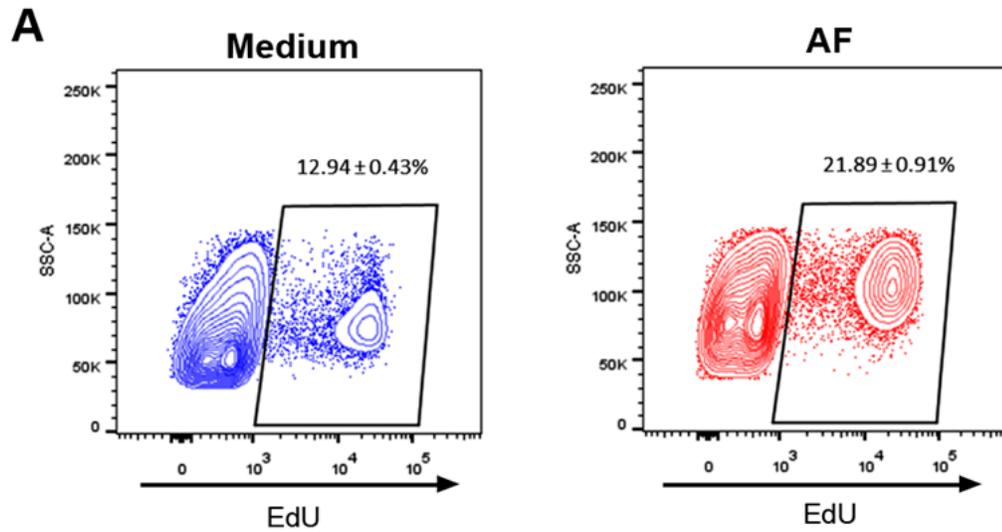


Figura 15. Análisis de proliferación en células SKOV-3 incubadas individualmente con LA de 10 pacientes diferentes con COE. A) Imagen representativa del desplazamiento de células SKOV-3 que incorporaron EdU con LA y sin LA. B) Gráfico del porcentaje de incorporación de EdU de dos experimentos independientes. Los puntos representan los promedios de los porcentajes de proliferación inducidos por las condiciones utilizadas. El cuadro negro representa el LA utilizado para experimentos posteriores. Para determinar la significancia estadística de la incorporación de EdU, se realizó un análisis t-Student de dos experimentos independientes.

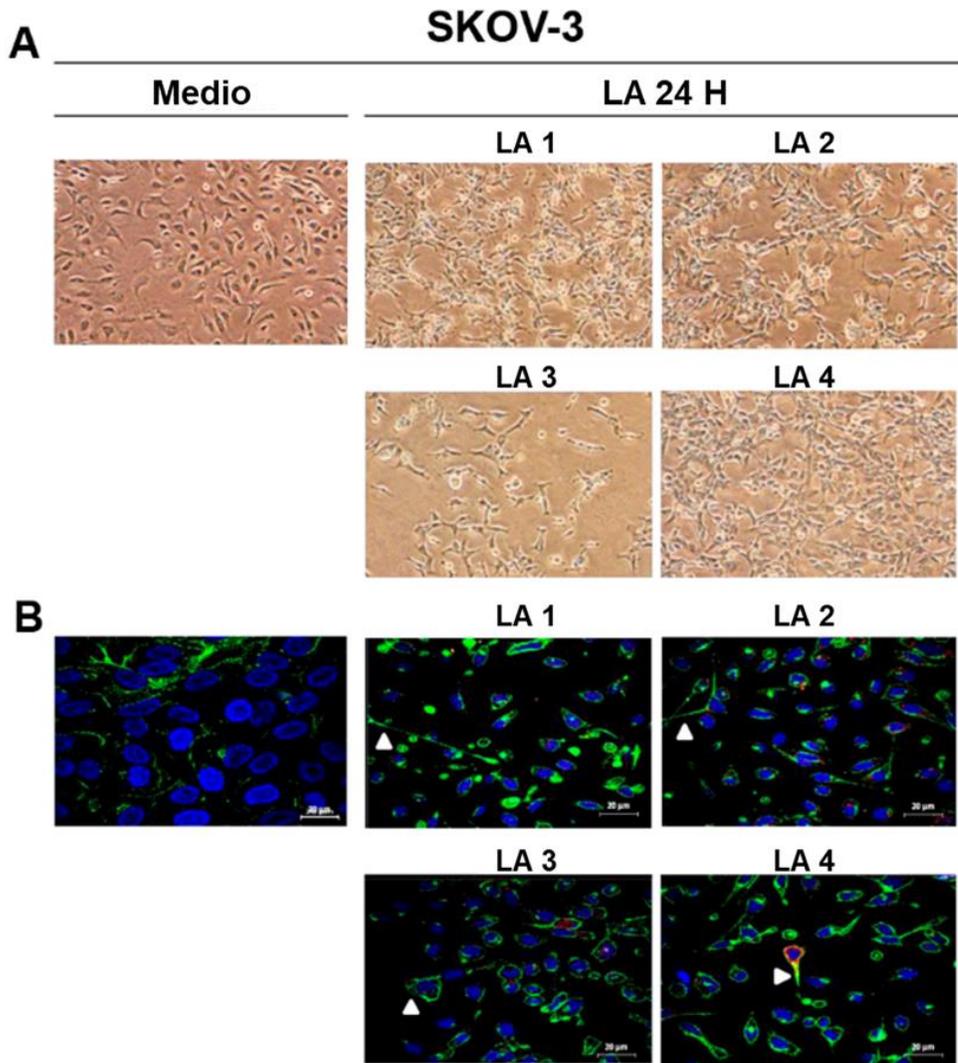


Figura 16. Efecto de 4 LA sobre la morfología y la fucosilación de las células SKOV-3. (A) Imágenes representativas de la morfología celular analizadas por microscopía óptica. Las cabezas de flecha señalan las prolongaciones membranales generadas en las células SKOV-3 por la exposición a los 4 LAs. (B) Análisis de fucosilación de las células incubadas en medio o en los cuatro LAs mediante microscopía confocal, donde los núcleos se marcaron con DAPI y las proteínas fucosiladas se marcaron con la lectina *Aleuria aurantia* unida a biotina, visualizadas con estreptavidina-FITC. (Objetivo 10X). (Bar 20 μ m).

Antecedentes previos mencionan una relación entre el nivel de expresión de la proteína Fut 4 con procesos funcionales que favorecen la progresión tumoral en diferentes tipos de cáncer Alvear *et al.*, 2016. Para establecer la relevancia de la sobreexpresión de la proteína Fut 4 en las células SKOV-3 de COE, se realizó un ensayo de interferencia empleando siRNAs comerciales para evaluar la ausencia de la proteína Fut 4 en procesos funcionales. Para ello, se utilizó el siRNA a 60 pmolar y para verificar el knock-down de Fut 4 se realizaron ensayos de WB (Fig 17A) y densitometría (Fig. 17B), utilizando como control de carga el reconocimiento de GAPDH. Los resultados obtenidos mediante densitometría mostraron una clara diferencia en la disminución de la expresión de Fut 4 en la condición de silenciamiento con el siRNA en células con LA (LA/siRNA Fut 4), comparado con LA y con el siRNA control con LA (LA/siRNA CTL) ($p < 0.001$). (Fig. 17B).

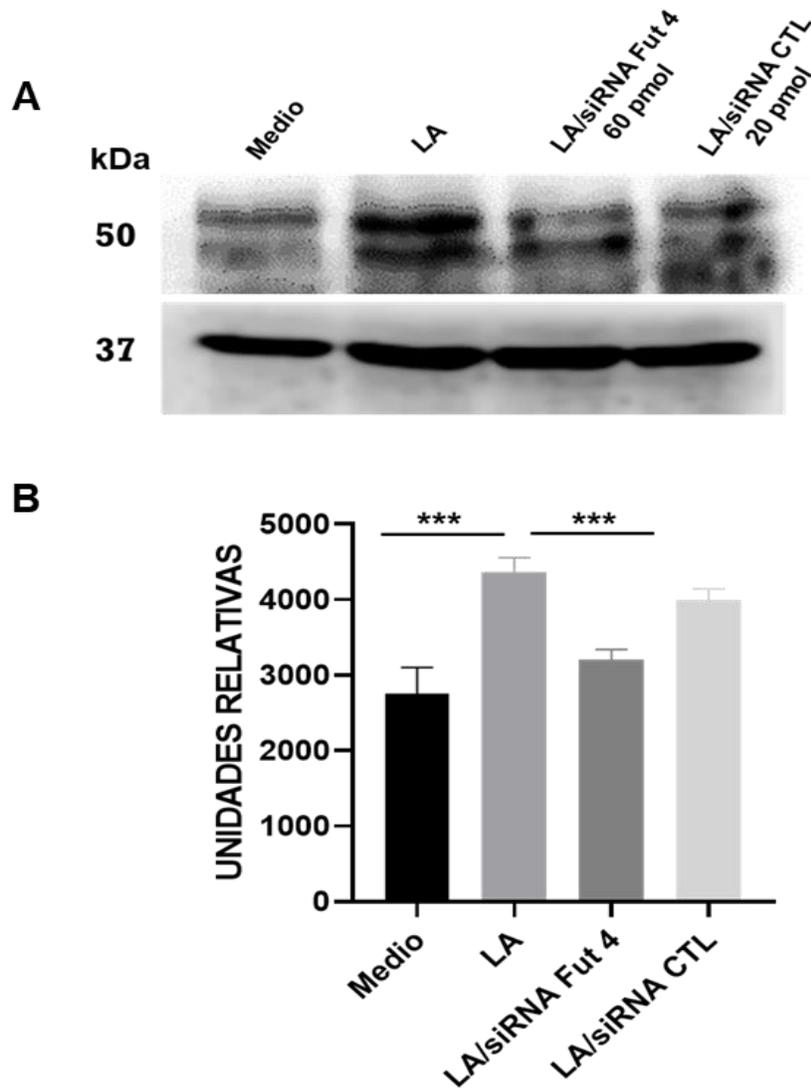


Figura 17. Análisis por WB del silenciamiento de la proteína Fut 4 mediante siRNA en células SKOV-3 bajo diferentes estímulos. A) Extractos proteicos de células SKOV-3 bajo la condición de medio (control negativo), LA (control positivo) LA/siRNA Fut 4 (condición problema) con 60 pmol del siRNA interferente dirigido a Fut 4 y LA/siRNA CTL (condición control de siRNA), se sometieron a ensayos de WB, empelando a GAPDH como control interno de carga. B) Densitometría del WB representada en unidades relativas.

Una vez establecida la concentración con la cual se logró reducir significativamente la expresión de la proteína Fut 4, nuevamente se realizaron ensayos de proliferación mediante citometría de flujo, pero esta vez, empujando las cuatro condiciones previamente establecidas; Medio (control negativo), LA (control positivo) LA/siRNA Fut 4 (condición problema) y LA/siRNA CTL (condición control de siRNA). Los resultados demostraron que existe una mayor incorporación de EDU+ estadísticamente significativa en las células SKOV-3 que fueron incubada con LA en comparación con la condición control ($p < 0.0001$) (Fig. 18A). Sin embargo, no se encontraron diferencias con significancia estadística en la proliferación al inhibir la proteína Fut 4 (Fig. 18A), lo que sugiere que la proteína Fut 4 no es indispensable para llevar a cabo procesos de proliferación en células SKOV-3. Al analizar el ciclo celular de SKOV-3, observamos que las células incubadas en medio mostraron un mayor porcentaje de células en la fase G (G0-G1) (Fig. 18B). En contraste, la mayoría de las células incubadas en el LA se mantenían en la fase de síntesis (S) (Fig. 18C), lo cual concuerda con el porcentaje de células que se encontraban incorporando EDU+ (Fig. 18A), Ninguna de las cuatro condiciones analizadas mostró diferencias durante la fase G2-M (Fig. 18D).

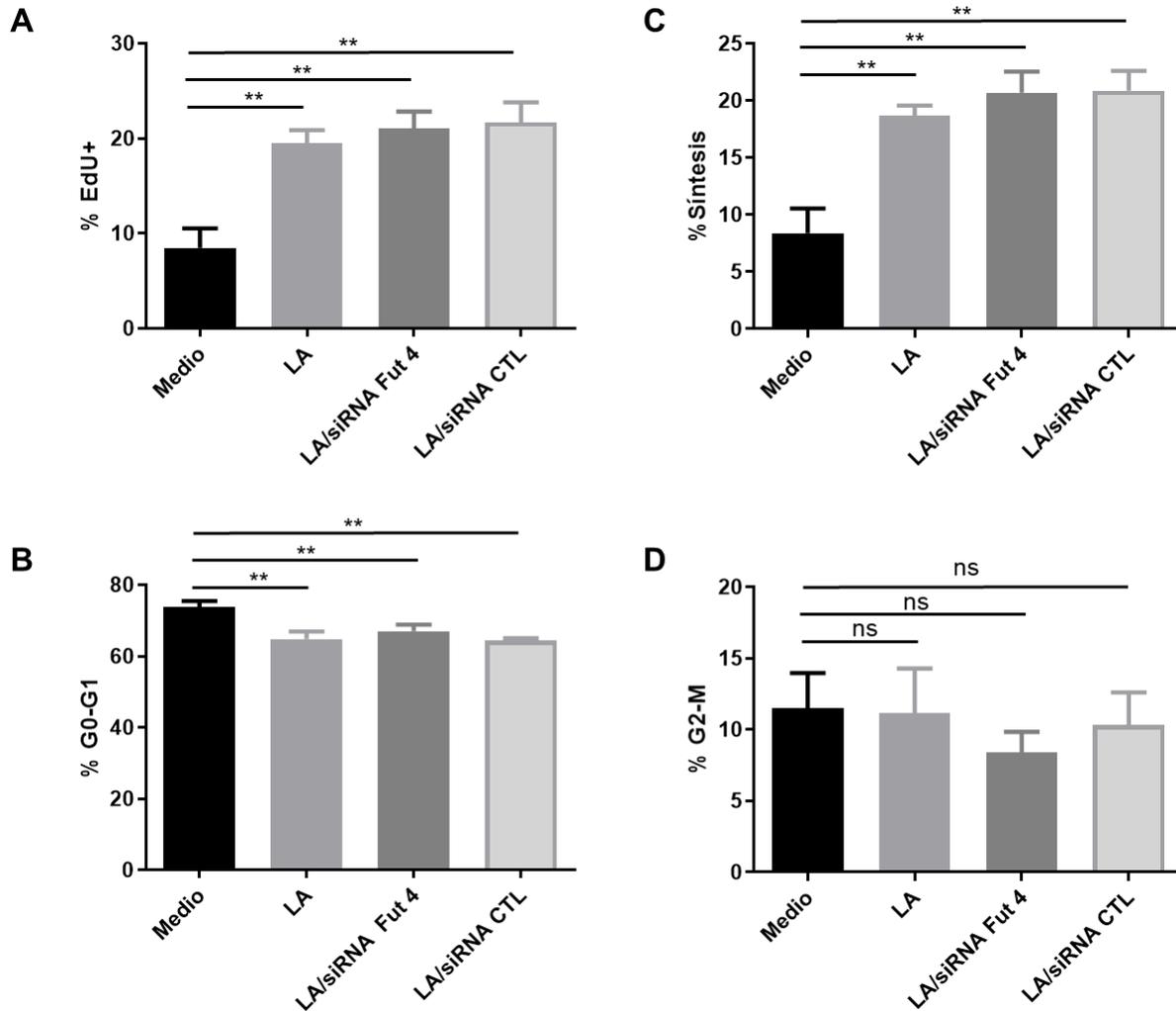


Figura 18. Análisis por citometría de flujo de la proliferación y del ciclo celular de SKOV-3 bajo diferentes estímulos. A) Porcentaje de la incorporación de EDU+ (proliferación). B) Porcentaje de células en fase G0-G1. C) Porcentaje de células en fase de síntesis. D) Porcentaje de células en fase G2-M.

Posteriormente, se realizó un ensayo para conocer la relevancia de la disminución de la proteína Fut 4 sobre la migración celular. Los resultados demostraron que el bloqueo de la proteína Fut 4 disminuye la movilidad celular y por lo tanto el proceso de migración de SKOV-3, lo que terminó dificultando el cierre de la herida sobre la monocapa (Fig. 19A). A las 4 h posterior a la herida, disminución de la proteína Fut 4 parece favorecer el cierre de la misma ($p < .05$). Sin embargo, transcurridas las 6 h la migración de las células hacia el centro de la herida, en las condiciones donde no se inhibió a la proteína Fut 4, fue muy evidente mostrando cambios significativos (LA ($p < 001$), LA/siRNA Fut4 ($p < 001$)) tanto que al cumplir las 8 horas ya mostraban una diferencia más evidente (LA ($p < 0001$), LA/siRNA Fut4 ($p < 0001$)) comparada con la condición de medio y *knockdown* de Fut 4 (LA/siRNA Fut4). A las 10 h, las condiciones que mantenían la sobre expresión de Fut 4 (LA y LA/siRNA CTL), cerraron por completo la herida, sin embargo, la condición de *knockdown* de la proteína Fut 4 mantuvo el tamaño de herida casi al 50% de la herida inicial (Fig 19B). Nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de la proteína Fut 4 es necesaria para llevar a cabo procesos de migración en las células SKOV-3 incubadas con LA.

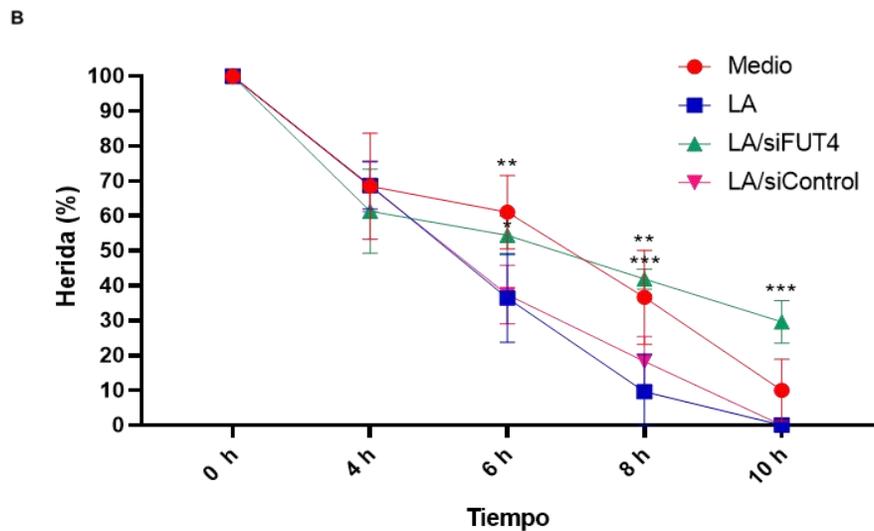
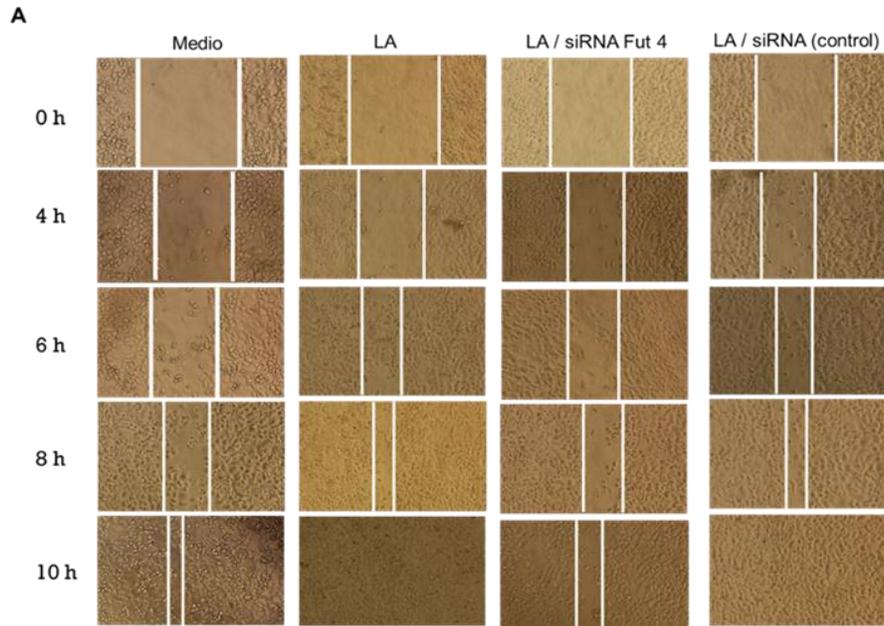


Figura 19. Ensayo de herida y cierre de células SKOV-3 incubadas bajo diferentes condiciones. A) Imágenes representativas de tres experimentos independientes bajo los estímulos de medio (control negativo), LA (control positivo) LA/siRNA Fut 4 (condición problema) y LA/siRNA CTL (condición control de siRNA) durante 0, 2, 4, 6, 8, y 10 h. B) Gráfica en porcentaje del tamaño de la herida (inicio 100%) y el cierre en tres experimentos independientes. (T=6 h ** LA vs Medio; T=8 h **LA vs Medio ***LA vs LA/siFUT4; T=10 h LA vs LA/siFUT4).

MMP-9 es un miembro de la familia de metaloproteinasas de matriz implicada en la invasión y la metástasis tumoral. A través de la degradación de la matriz extracelular, acelera la infiltración de células cancerosas en los tejidos circundantes. Se ha reportado que MMP-9 desempeña un papel importante en la aparición y el desarrollo del COE y se encuentra estrechamente relacionada con el pronóstico (Li *et al.*, 2021). Como experimento previo a los ensayos de invasión, se realizó un análisis mediante IFI para evaluar la expresión de la proteína MM-9 en células SKOV-3 bajo el efecto de dos LA y en la condición de medio. Los resultados mostraron que los componentes de ambos LA, indujeron un incremento en los niveles proteicos de la MM-9, la cual prácticamente estaba ausente en la condición de células SKOV-3 en medio. La presencia de esta proteína podría favorecer la degradación de la membrana de matrigel en el Transwell, dato fundamental para realizar procesos de invasión (Fig. 20).

Para concluir con los ensayos funcionales, se evaluó la capacidad de invasión de las células SKOV-3 en ausencia o presencia de la proteína Fut 4. Empleando nuevamente las cuatro condiciones previamente descritas, las células se sembraron en matrigel sobre una cámara Transwell y su capacidad invasiva se analizó 24 h después del estímulo con medio o LA. Los resultados sugieren fuertemente que la presencia de la proteína Fut 4 no solo les confiere a las células SKOV-3 una alta capacidad invasiva, sino que también favorece la capacidad de adhesión a la parte inferior del Transwell (Fig. 21A), posterior a la degradación del matrigel. La diferencia entre las células que expresaban la proteína Fut 4 lograron degradar la membrana de matrigel con diferencias estadísticamente significativas (LA ($p < 0.01$) y LA/siRNA CTL ($p < 0.01$)) vs las células silenciadas para Fut4 (Fig. 21B). En la condición del siRNA de la proteína Fut 4, las células presentaban ciertos problemas para atravesar la membrana, un evento parecido al observado en la condición de medio, sin embargo, las condiciones que expresaban a la proteína Fut 4 (LA .01) y LA/siRNA CTL) presentaron un mayor número de células que atravesaron la membrana de matrigel ($p < 0.01$).. P, por lo

cual concluimos que la expresión de proteína Fut 4 es necesaria para llevar a cabo procesos de invasión y adhesión de las células SKOV-3 expuestas a LA (Fig. 21).

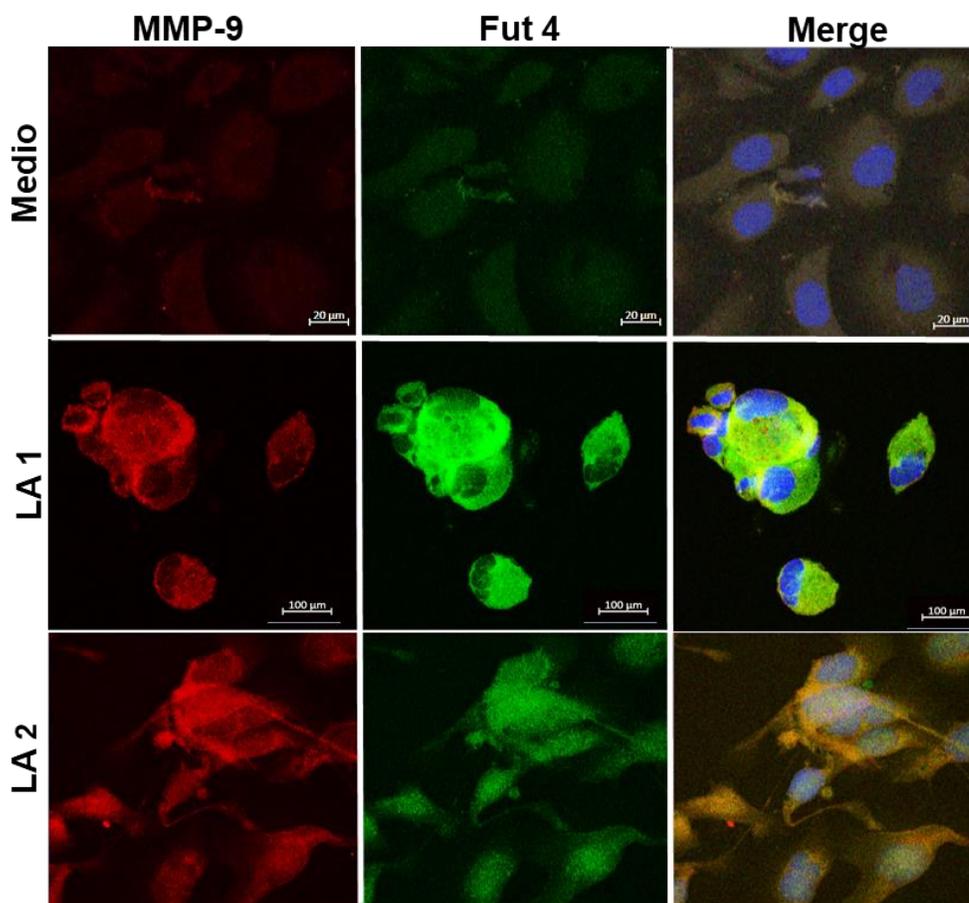


Figura 20. Detección de la metaloproteasa 9 (MM-9) en células SKOV-3 incubadas en medio y en dos LA diferentes. Imágenes representativas de tres experimentos independientes bajo los estímulos de medio y LA.

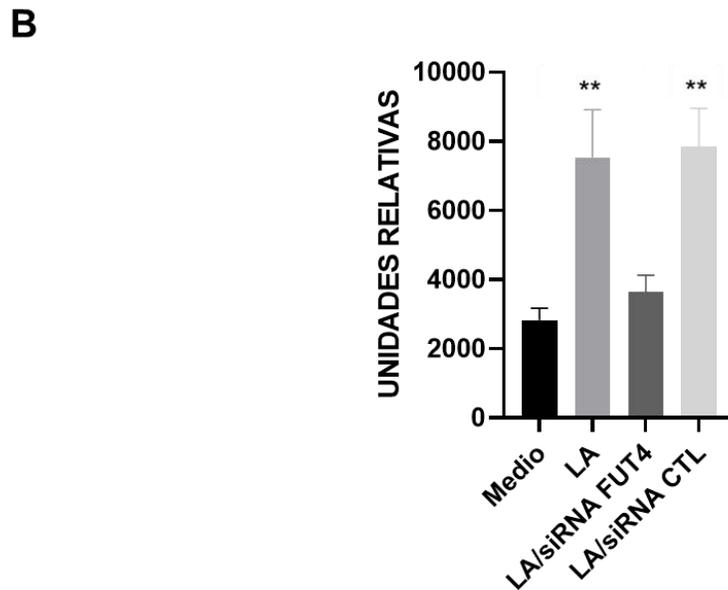
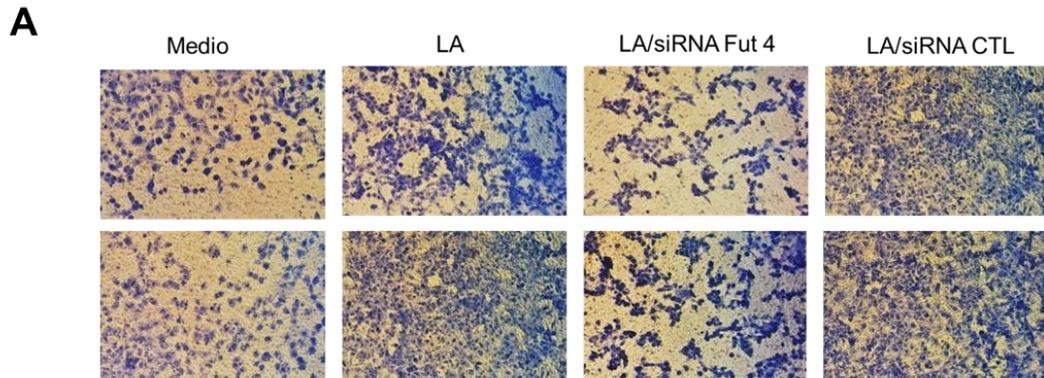


Figura 21. Ensayos de invasión de células SKOV-3 incubadas bajo diferentes condiciones. A) Imágenes representativas de tres experimentos independientes bajo los estímulos de medio (control negativo), LA (control positivo) LA/siRNA Fut 4 (condición problema) y LA/siRNA CTL (condición control de siRNA) durante 24 h. B) Gráfica del conteo celular representado en unidades relativas.

La expresión de la proteína Fut 4 se encuentra incrementada en muestras de pacientes con COE

Con la finalidad de conocer cuáles eran los niveles de expresión de la proteína Fut 4 en muestras de pacientes con COE, se realizó un análisis mediante IFI en células recuperadas de un LA proveniente de una paciente (PC) con COE en estadio clínico IV (cultivos primarios). Como punto de comparación se emplearon células SKOV-3 incubadas en medio McCoy y como control negativo se emplearon células de pacientes sin anticuerpo primario (Fig. 22A). Los resultados mostraron un claro nivel de expresión de la proteína Fut 4 en las células aisladas de un LA (Fig.22B). Este evento fue más marcado en células que tenían características morfológicas similares a las descritas en el proceso de TEM (Fig. 22C), proceso que se encuentra altamente relacionado con progresión tumoral. Las células aisladas de LA tenían extensas prolongaciones de membrana, estructuras descritas como filopodios e invadipodios, e incluso, la proteína Fut 4 se logró ver en pequeñas vesículas dentro del citoplasma celular (Fig.22C). Con base en resultados previos encontrados durante la maestría, se esperaba encontrar la expresión de la proteína Fut 4 en células inmersas en el LA, ya que se había establecido una relación positiva directamente proporcional entre el nivel de expresión de la proteína Fut 4 con la etapa clínica de las pacientes en muestras de tejido de pacientes con COE. Por lo cual sugerimos que la proteína Fut 4 podría estar ejerciendo un papel importante en procesos funcionales *in vivo* (migración e invasión), tal como lo establecimos en experimentos *in vitro*.

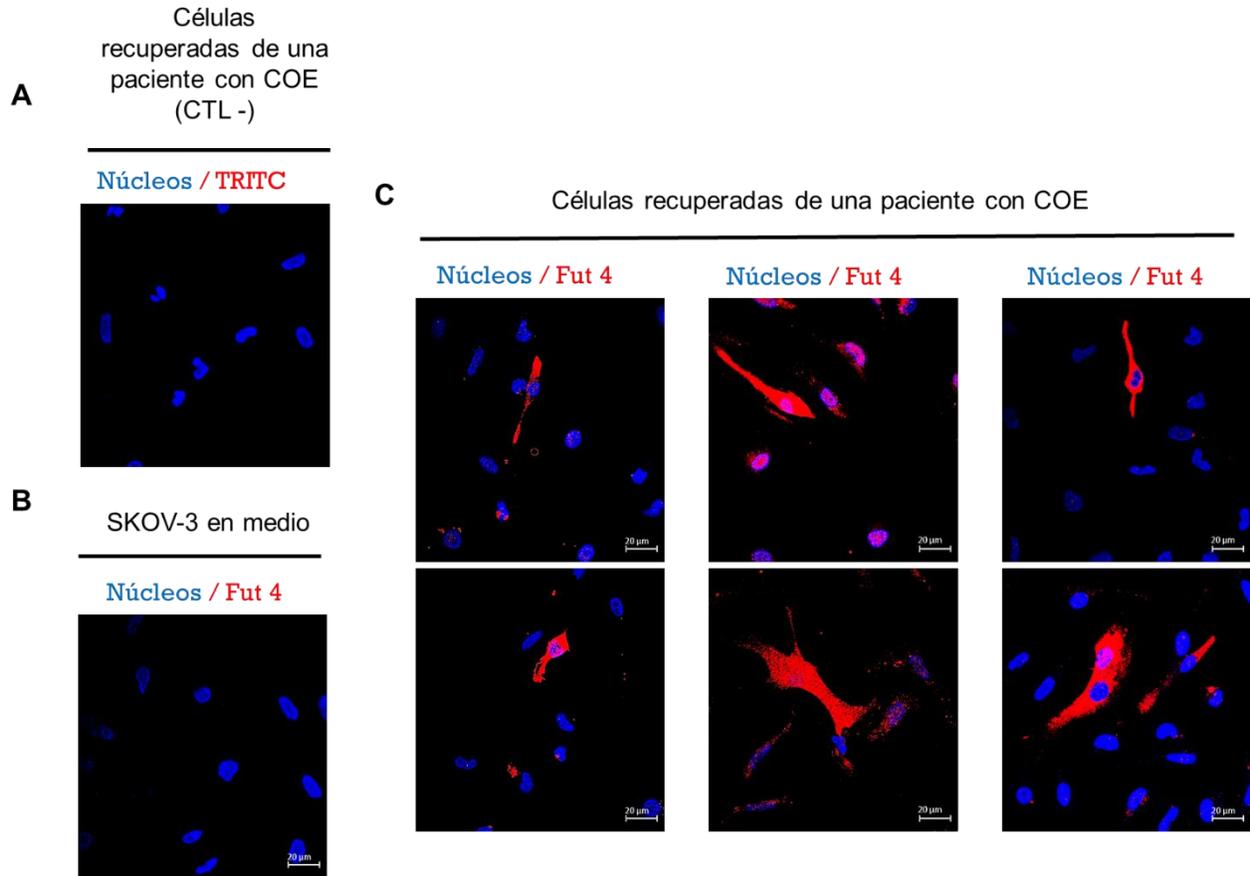


Figura 22. Expresión de la proteína Fut 4 en células recuperadas de LA de una paciente (PC) con COE. A) Células recuperadas de LA sin anticuerpo primario (control negativo). B) Células SKOV-3 incubadas en medio de cultivo convencional. C) Cultivos primarios de células recuperadas de LA. Imágenes representativas obtenidas mediante microscopía confocal a 40X. Núcleos-DAPI y Fut 4-TRITC. Barra de escala = 20 µm.

Uno de los mayores retos de la medicina actual es intentar predecir el riesgo de sufrir un evento patológico en una persona sana. Sin embargo, aún no se cuenta con las herramientas o parámetros con dicha capacidad para el COE. La glicosilación alterada en el cáncer se ha convertido en un objetivo prometedor para la búsqueda de biomarcadores o terapias. Entre los requisitos para poder sugerir a una molécula como biomarcador biológico, es justamente que su detección no requiera una técnica invasiva y que preferentemente sea detectado en sangre (Rangel M *et al.*, 2018).

Previamente, en COE se estableció una corrección positiva directamente proporcional entre el nivel de expresión de la proteína Fut 4 y la etapa clínica de las pacientes, es decir, entre más avanzada sea la etapa clínica mayor será el nivel de expresión de la proteína Fut 4 (Alvear *et al.*, 2016).

Para analizar si la proteína Fut 4 se encontraba en muestras pareadas de suero (S) y líquido ascítico (LA) de pacientes (PC) con COE y conocer sus niveles de expresión, se realizó un análisis mediante WB.

En la figura 23, se muestra un panel representativo de las 13 muestras de S así como de LA pareadas empleadas en el experimento. Los resultados muestran un patrón proteico similar en la mayoría de las muestras entre el S y el LA de la misma paciente; sin embargo, en algunos casos se encontraron diferencias entre el bandeo proteico a pesar de tratarse de muestras de la misma paciente (Fig. 23).

Los resultados del WB sugieren fuertemente que la proteína Fut 4 está jugando un papel relevante en procesos relacionados con la progresión del COE, esto debido a que su expresión se encuentra incrementada solo en muestras de pacientes con COE y no así en muestras de suero de mujeres sin diagnóstico de COE (SS) (Fig. 24 A y B). El hecho de encontrar niveles de expresión de la proteína Fut 4 similares tanto en suero como en el LA, facilita la obtención del material biológico para la detección de dicha proteína mediante un método menos

invasivo, comparado con el método empleado para la obtención del LA, el cual se recolecta mediante una paracentesis.

Al realizar el análisis de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) por el método de Kaplan Meier de los diferentes grupos de expresión de la proteína Fut 4 (baja, alta), obtenidos mediante ensayos de western blot, reportamos que no existe una relación entre la sobreexpresión de la proteína y la mediana de supervivencia de las pacientes. Se encontró que la mediana de la SG fue de 30.52 (2.54 años), con un intervalo de confianza del 95% tanto en suero (**Tablas 4 y 5**) como en LA (**Tablas 8 y 9**), donde se suscitaron 8 decesos y 5 casos censurados (no presentaron el evento de muerte), y una mediana para la SLP de 8.3 meses, con un intervalo de confianza del 95% tanto en suero (**Tablas 6 y 7**) como en LA (**Tablas 10 y 11**), donde 8 pacientes presentaron recurrencia de la enfermedad y 5 casos censurados (no presentaron el evento de progresión).

Sugerimos que, con un estudio, donde se incremente la N, muy probablemente se logren establecer asociaciones con diferencia estadística significativa entre el nivel de Fut 4 y la mediana de SG y SLP de las pacientes con COE.

La proteína Fut 4 cumple con algunos requisitos establecidos para postularla como un biomarcador molecular. Además, en antecedentes previos se estableció una correlación positiva directamente proporcional entre el nivel de expresión de la proteína Fut 4 y la etapa clínica de las pacientes en cortes de tejido tumoral de COE, es decir entre mayor sea la etapa clínica de las pacientes mayor será el nivel de expresión de la proteína Fut 4. Por lo cual la proteína Fut 4 puede ser analizada en muestras de suero y su expresión mostró especificidad entre pacientes con COE y pacientes sin diagnóstico de COE.

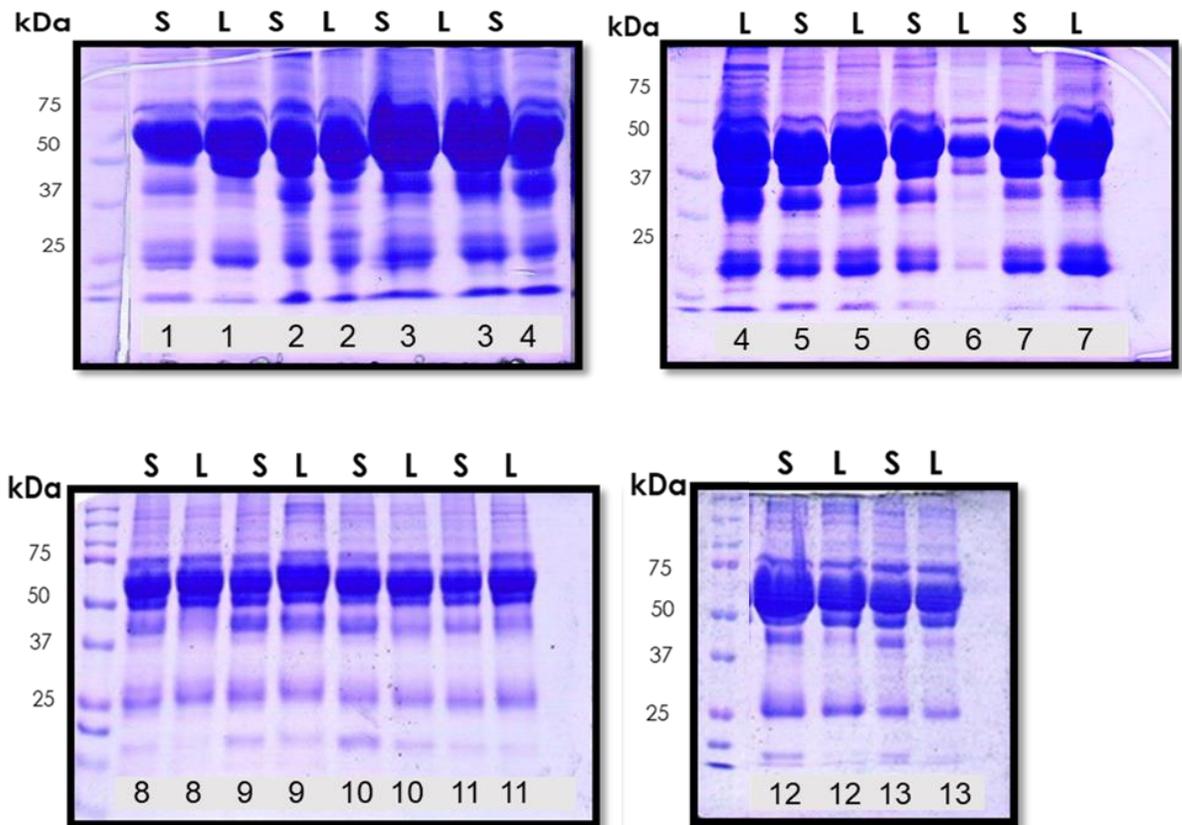


Figura 23. Perfil proteico de muestras pareadas de líquido ascítico (L) y suero (S) de pacientes (PC) con COE. Imágenes representativas de muestras de pacientes con COE corridas en un SDS-PAGE 10% con 40 µg de proteína por carril. Tinción con azul de Coomasie.

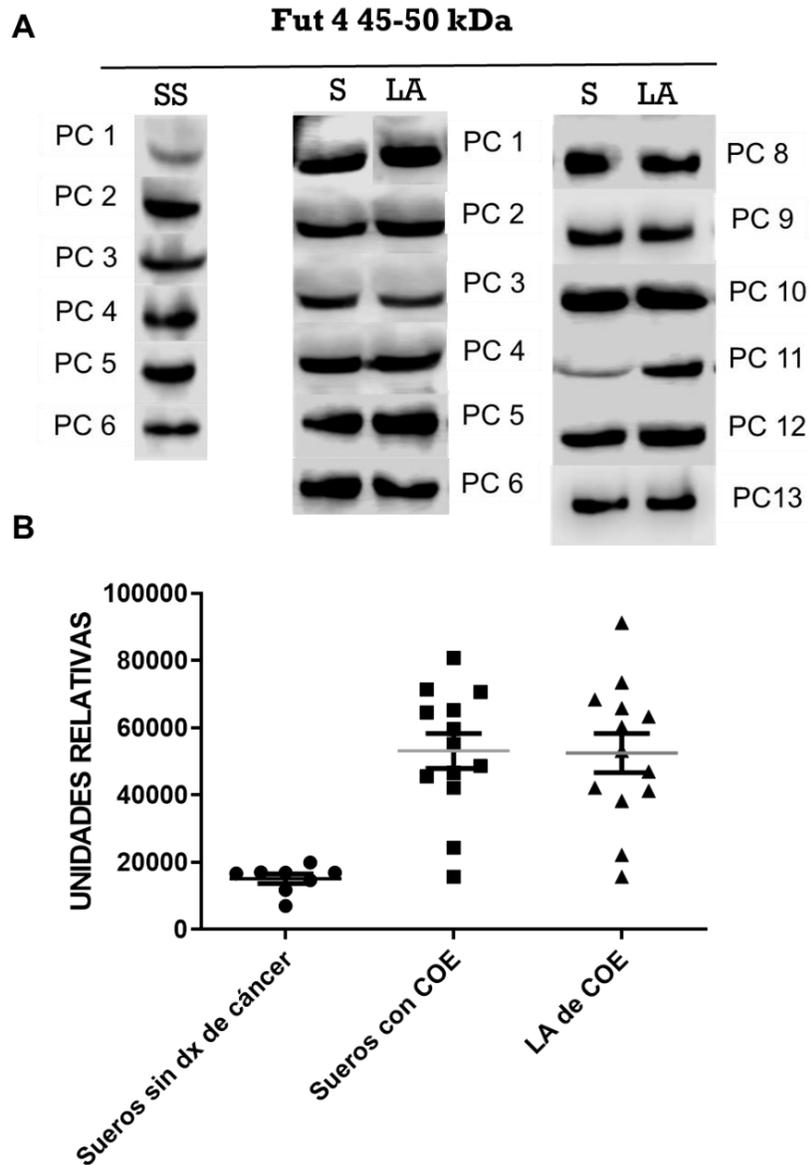


Figura 24. Análisis del patrón de expresión de la proteína Fut 4 en muestras de suero y LA de pacientes (PC) con COE. A) WB de 13 muestras de suero (S) y líquido ascítico (LA) pareadas de pacientes con COE y 6 sueros sin diagnóstico de cáncer (SS). B) Análisis densitométrico del WB representado en unidades relativas.

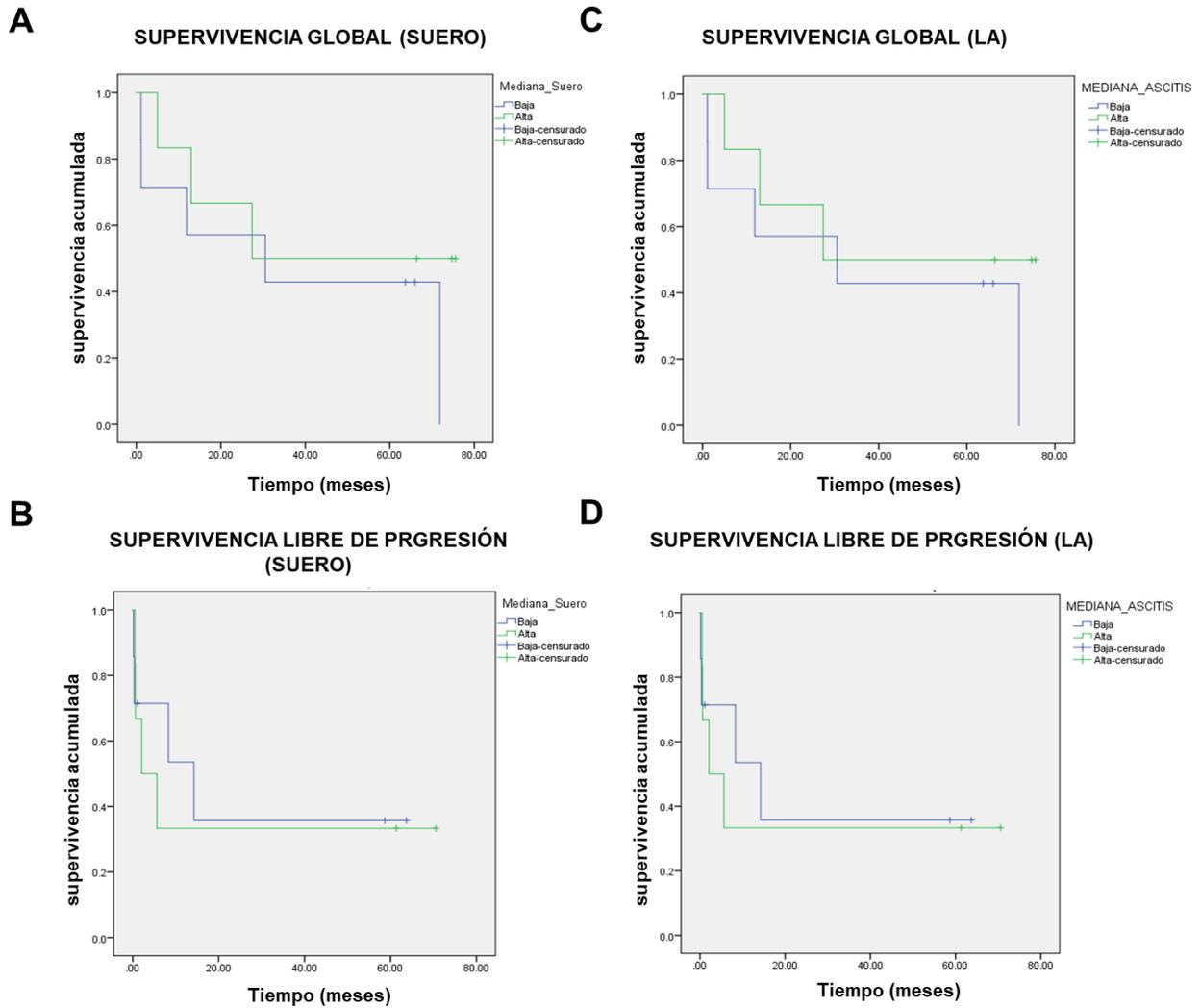


Figura 25. Curvas de supervivencia global (SG) y supervivencia libre de progresión (SLP) en pacientes con COE. A y C) Graficas de supervivencia global en suero y LA. B y D) Graficas de supervivencia libre de progresión en suero y LA. Ambas condiciones fueron asociadas a la expresión de la proteína Fut 4. Los grupos se definieron en expresión baja y alta de acuerdo a los valores de la mediana obtenidos de Fut 4.

Tabla 4. Análisis de correlación entre la SG y los niveles de expresión de Fut 4 en muestras de suero

Mediana_Suero	Mediana			
	Estimación	Error estándar	Intervalo de confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
Baja (7pts)	30.522	24.433	.000	78.411
Alta (6 pts)	27.368	.	.	.
Global	30.522	26.456	.000	82.375

- a. La estimación esta limitada al tiempo de supervivencia mas largo, si esta censurado_suero.
- b. Censurado: Pacientes que no presentan el evento analizado

Tabla 5. Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.684	1	.408
Breslow (Generalized Wilcoxon)	.443	1	.506

- a. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de Mediana_suero

Tabla 6. Análisis de correlación entre la SLP y los niveles de expresión de Fut 4 en muestras de suero

Mediana_Suero	Mediana			
	Estimación	Error estándar	Intervalo de confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
Baja (7 pts)	14.226	7.702	.000	29.322
Alta (6 pts)	2.103	3.078	.000	8.136
Global	8.312	5.130	.000	18.366

- a. La estimación esta limitada al tiempo de supervivencia mas largo, si esta censurado_suero.
- b. Censurado: Pacientes que no presentan el evento analizado

Tabla 7. Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.056	1	.813
Breslow (Generalized Wilcoxon)	.023	1	.880

- a. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de Mediana_suero

Tabla 8. Análisis de correlación entre la SG y los niveles de expresión de Fut 4 en muestras de LA

Mediana LA	Mediana			
	Estimación	Error estándar	Intervalo de confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
Baja (7 pts)	30.522	24.433	.000	78.411
Alta (6 pts)	27.368	.	.	.
Global	30.522	26.456	.000	82.375

- a. La estimación esta limitada al tiempo de supervivencia mas largo, si esta censurado_LA.
- b. Censurado: Pacientes que no presentan el evento analizado

Tabla 9. Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.684	1	.408
Breslow (Generalized Wilcoxon)	.443	1	.506

- a. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de Mediana_ LA

Tabla 10. Análisis de correlación entre la SLP y los niveles de expresión de Fut 4 en muestras de LA

Mediana LA	Mediana			
	Estimación	Error estándar	Intervalo de confianza de 95 %	
			Límite inferior	Límite superior
Baja (7 pts)	14.226	7.702	.000	29.322
Alta (6 pts)	2.103	3.078	.000	8.136
Global	8.312	5.130	.000	18.366

- a. La estimación esta limitada al tiempo de supervivencia mas largo, si esta censurado_LA.
- b. Censurado: Pacientes que no presentan el evento analizado

Tabla 11. Comparaciones globales

	Chi-cuadrado	gl	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	.056	1	.813
Breslow (Generalized Wilcoxon)	.023	1	.880

- a. Prueba de igualdad de distribuciones de supervivencia para los distintos niveles de Mediana_ LA

10 DISCUSIÓN

Actualmente no se cuenta con una prueba diagnóstica capaz de detectar a la enfermedad del COE en etapas tempranas, por ello los diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de realizar una búsqueda en diferentes tipos de fluidos de pacientes o en experimentos *in vitro*, de proteínas capaces de generar una diferencia en el nivel de su expresión comparando condiciones cancerígenas con condiciones libres de cáncer.

El siguiente trabajo se enfocó en el estudio de la proteína Fut 4 dentro del núcleo de células SKOV-3 y su posible participación en mecanismos relacionados con la progresión del COE

Dentro de los resultados obtenidos, vale la pena resaltar la localización inusual de la Fut 4 al interior del núcleo, lo que permite sugerir que la sobreexpresión de la proteína Fut 4 en el núcleo de las células estimuladas con LA podría participar en otras funciones, aparte de su función enzimática. Esto si se llegará a comprobar la presencia de un transportador de GDP-Fucosa anclado a la membrana nuclear, transportador sumamente importante para llevar acabo procesos de fucosilación. Estos resultados, son el primer reporte en señalar una localización nuclear de una fucosiltransferasa. El hecho de identificar mediante espectrometría de masas a la proteína Fut 4 unida a proteínas como las histonas H₂B y H₄ en los ensayos de inmunoprecipitación, sugiere una posible regulación directa o indirecta entre una proteína y otra; sin embargo, se necesitan más experimentos para confirmar dichas asociaciones. Las proteínas que se unen al ADN y a las histonas influyen en la dinámica y las funciones de la cromatina y han surgido como actores clave en la remodelación de la misma, regulando dos procesos opuestos como la activación y la represión transcripcional (Sadakierka *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2018), por ejemplo, la O- GlcNAcilación en la histona H₂B Ser-112 por OGT estimula la ubiquitinación de H₂B Lys-120, que activa aún más la transcripción de genes como la proteína del dedo anular 20 (Fujiki *et al.*,

2011; Nakamura *et al.*, 2011). Así mismo, la metilación del aminoácido (aa) K5, residuo de la proteína H2B, se ha identificado recientemente y se especula que juega un papel en el proceso neoplásico (Van Aller *et al.*, 2012). En el caso del receptor de factor de crecimiento epidermal nuclear (nEGFR) regula a la alza, la acetilación de H4-K5 y esto contribuye a la regulación epigenética de la transcripción (Chou R *et al.*, 2014).

También es importante mencionar que la proteína Fut 4 interacciona con la proteína vimentina, la cual se encuentra altamente asociada a procesos de TEM. En los experimentos realizados *in vitro* y cultivos primarios de células de pacientes con COE, se observó una asociación entre el nivel de expresión de la proteína Fut 4 con células que presentaban características morfológicas mesénquimas. Reportes previos establecieron una asociación estrecha entre la sobre expresión inducida de la proteína Fut 4 con la regulación de la TEM. Estos reportes podrían postular a la proteína Fut 4 como un nuevo regulador de TEM en COE como se sugirió para el cáncer de mama (Yang X *et al.*, 2013; Yang XS *et al.*, 2012). Las proteínas son las unidades fundamentales en la regulación de las funciones celulares, y la ubiquitinación es la segunda modificación postraduccional (PTM) más común para las proteínas, solo detrás de la fosforilación. Otra proteína unida a Fut 4 identificada abundantemente en el núcleo de células SKOV-3 incubadas en LA fue la proteína Ubiquitina-60S ribosomal proteína L40 (Fragmento), la ubiquitinación aberrante también puede conducir al desarrollo y progresión de la enfermedad, especialmente al cáncer (Lu *et al.*, 2020). Aun cuando no se conoce con exactitud el mecanismo de regulación entre Fut 4 y las proteínas con las que interactúa en el núcleo, estos resultados indican que Fut 4 podría ejercer una función relevante en la regulación de algunos genes.

El hecho de encontrar que los componentes del LA generaban un incremento en la proliferación de células SKOV-3, nos condujo a suponer que el silenciamiento de la proteína Fut 4 podría tener un impacto en la disminución de la proliferación,

esto debido a que existían reportes en células A431, que al incrementar la expresión de la proteína Fut 4, incrementaba el porcentaje de proliferación (Yang X *et al.*, 2007). Sin embargo, nuestros resultados indicaron que la inhibición de la proteína Fut 4 no ejerce ningún efecto en la regulación del proceso de proliferación. Por lo anterior, sugerimos que la presencia de la proteína Fut 4 en las células SKOV-3, pudiera ejercer mayor efecto sobre otros procesos biológicos. Tal es el caso de los ensayos de migración, donde la ausencia de la proteína Fut 4 si impactó en el retraso de la migración celular de SKOV-3, lo cual concuerda con lo reportado por Escrevente C *et al.*, en el 2006 quien reportó altos niveles de proteínas fucosiladas y una alta concentración del antígeno de Lewis X, el cual solo es sintetizado por la proteína Fut 4, alrededor de células de ovario altamente migrantes. Por lo cual sugerimos que la proteína Fut 4 realiza la glicosilación de proteínas o antígenos sumamente importantes relacionados con la migración celular. Así mismo, observamos que al inhibir la expresión de la proteína Fut 4, la capacidad invasiva de las células SKOV-3 también se vio disminuida, comparada con la condición donde la expresión de la proteína Fut 4 se encuentra presente y sobre expresada por efecto del LA. Previamente, en células de cáncer de mama se había reportado una mayor secreción de metaloproteasas asociado con un cambio fenotípico de TEM (Yang X *et al.*, 2013). En este trabajo reportamos que el LA genera una mayor expresión de la MM-9 y una mayor capacidad de invasión y de adhesión en las células que expresaban a la proteína Fut 4, y actualmente se trabaja en dilucidar la vía de señalización por la cual se llevan a cabo estos procesos bajo el estímulo del LA en las células SKOV-3.

El hecho de encontrar que la sobre expresión de la proteína Fut 4 favorece procesos funcionales como son la migración y la invasión, mismos que se ven abatidos cuando se silencia la proteína Fut 4, permite sugerir que la proteína Fut 4 se encuentra participando en procesos altamente relacionados con progresión tumoral. Esta sugerencia cobra mayor peso cuando se encontraron células de pacientes de cultivos primarios que sobre expresaban a la proteína Fut 4. Dichas

células presentaban características fenotípicas similares a las que presentan células de la TEM, evento altamente relacionado con una mayor agresión tumoral. Estos datos concuerdan con lo reportado por nuestro equipo de trabajo (Alvear Hernández *et al.*, 2016) donde, mediante el análisis en cortes de tejido transformado, se logró establecer una correlación de Spearman positiva directamente proporcional, que establecía que entre más avanzada era la etapa clínica en pacientes con COE, mayor era la expresión de la proteína Fut 4.

Xiaomei Y *et al.*, 2015, sugirieron a la proteína Fut 4 como un posible biomarcador para la detección del cáncer de mama. En nuestro caso sugerimos también a la proteína Fut 4 como un posible biomarcador de pronóstico o predictivo en el CEO. Esto debido a que el nivel de expresión de la proteína Fut 4 en suero mostró concentraciones similares a las encontradas en la secreción de LA de pacientes con COE y fue significativamente mayor comparado con los niveles encontrados en sueros de individuos sin diagnóstico de cáncer. Pese a no haber encontrado una diferencia significativa en relación con la expresión de Fut 4 y la mediana de la SG y SLP de las pacientes, la tendencia encontrada en el comportamiento de expresión Fut 4 nos indica fuertemente que está ejerciendo un papel relevante en la regulación de mecanismos relacionados con la progresión, por lo cual sugerimos que de incrementar la N podríamos observar una diferencia en las asociaciones trabajadas.

Con esto demostrábamos que la proteína Fut 4 se puede sondear de un fluido (suero), que se puede obtener a través de un procedimiento no invasivo y que su presencia es diferencial entre salud y enfermedad, características requerida para postular a una molécula como candidata a ser un biomarcador (Rangel M *et a.*, 2018).

Otro de los requisitos sugeridos para postular una molécula como biomarcador es justamente que sea estable tanto *in vitro* como *in vivo* (Rangel M *et a.*, 2018),

requisito que también se cumplió al demostrar que la sobreexpresión de la proteína Fut 4 se mantuvo en todos los experimentos realizados donde se emplearon muestras de pacientes como células *in vitro* (SKOV-3 y cultivos primarios, suero y LA, todo derivado de pacientes con COE).

LA es un fluido que tiene un alto impacto sobre la proliferación celular, la secreción de metaloproteasas, la regulación de la fucosilación y sobre todo la regulación de la proteína Fut 4 en células SKOV-3. Por otra parte, también sugerimos que la sobreexpresión de la proteína Fut 4 en muestras de pacientes con COE juega un papel relevante en la progresión de la enfermedad, ya que regula mecanismos esenciales para la tumorigénesis tales como la migración y la invasión.

Nosotros concluimos que la proteína Fut podría ser un potencial biomarcador de diagnóstico o prevalencia de esta enfermedad. Finalmente, en nuestro modelo experimental, la peculiar localización nuclear de la proteína Fut 4, tendrá que ser analizada a profundidad, con la finalidad de comprender el papel de esta enzima en la regulación de los diversos procesos biológicos durante el proceso de formación de tumores durante el cáncer de ovario epitelial.

11 PERSPECTIVAS

- Incrementar el número de muestras de pacientes para validar la relevancia de Fut 4 como biomarcador en el COE y relacionar los niveles encontrados de la proteína con el historial clínico de las pacientes.
- Realizar ensayos de inmunohistoquímica en biopsias de pacientes con COE para corroborar su localización y analizar su nivel de expresión.
- Dilucidar el mecanismo que favorece la sobreexpresión de la proteína Fut 4 en el núcleo de células SKOV-3.
- Confirmar las interacciones de la proteína Fut 4 con proteínas nucleares de acuerdo con los resultados obtenidos mediante espectrometría de masas y conocer las vías de señalización involucradas.

12 REFERENCIAS

- www.incan.edu.mx/.
- Adamczyk B, Tharmalingam T, Rudd PM. 2012. **Glycans as cancer biomarkers**. *Biochim Biophys Acta*. 1820 1347–1353.
- Alvear HN. 2016. **Determinación de los niveles de expresión de las fucosiltransferasas en tejido tumoral de pacientes con cáncer epitelial de ovario y en la línea celular SKOV-3 expuestas a líquido ascítico**.
- Alberto AD, Hernández RV, Osorio TJ, Gallardo RD, Toledo LA, Talamás R P. 2019. **Ascites from ovarian cancer induces novel fucosylated proteins**. *Cancer microenviron*. 12(2-3): 181-195.
- Anderson GL, McInthos M, Wu L, Goodman G, Thorpe JD, Bergan L, Thornquist MD, Scholler N, Kim N, O'Briant K, Drescher C, Urban N. 2010. **Assessing lead time of selected ovarian cancer biomarkers: a nested case–control study**. *J Natl Cancer Inst*. 6;102(1):26-38.
- Apweiler R, Hermjakob H, Sharon N. 1999. **On the frequency of protein glycosylation, as deduced from analysis of the SWISS-PROT database**. *Biochim Biophys Acta*. 6;1473(1):4-8.
- Arash, N., & Karl, R. 2015. **Rapid Isolation of Nuclei from Cells In Vitro** <https://doi.org/10.1101/pdb.prot083733>
- Auersperg N. 2011. **The origin of ovarian carcinomas: a unifying hypothesis**. *Int J Gynecol Pathol*. 30(1):12-21.
- Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. 2001. **Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology**. *Endocr Rev* 22: 255-288.
- Azuma Y, Ito M, Taniguchi A, Matsumoto K. 2004. **Expression of cell surface Lewis X and Y antigens and FUT4 mRNA is increased in Jurkat cells undergoing apoptosis**. *Biochim Biophys Acta*. 1672(3):157-63.
- Bedkowska GE, Lawicki S, Gacuta E, Pawłowski P, Szmitkowski M. 2015. **M-CSF in a new biomarker panel with HE4 and CA 125 in the diagnostics of**

epithelial ovarian cancer patients. J Ovarian Res. 10.1186/s13048-015-0153-3.

- Bernardi C, Soffientini U, Piacente F, Tonetti MG. 2013. **Effects of MicroRNAs on Fucosyltransferase 8 (FUT8) Expression in Hepatocarcinoma Cells.** PLoS ONE. 8(10): e76540.
- Benedet L, Bender H, III HJ, Ngan HY, Pecorelli S. 2000. **FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology.** Int J Gynaecol Obstet. 70:209–262.
- Blagden, SP. 2015. **Harnessing Pandemonium: The clinical implications of tumor heterogeneity in ovarian cancer.** Front. Oncol. 2015, 5, 149.
- Breton C, Mucha J, Jeanneau C. 2001. **Structural and functional features of glycosyltransferases.** Biochimie. 83(8):713-8.
- Corzo C, Iniesta MD, Patrono MG, Lu KH, Ramirez PT. 2017. **Role of Fallopian Tubes in the Development of Ovarian Cancer.** J Minim Invasive Gynecol. 24(2):230-234.
- Cheng L, Luo S, Jin C, Ma H, Zhou H, Jia L. 2013. **FUT family mediates the multidrug resistance of human hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt signaling pathway.** Cell Death Dis. 14;4:e923.
- Ching L, His L, Ming T and Yang W. 2014. **Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation.** Oncotarget 6(18): 15966–15983.
- Chou R, Wang Y, Hsieh Y, Li L, Xia W, Chang W, Chang L, Cheng C *et al.*, 2014. **EGFR Modulates DNA Synthesis and Repair through Tyr Phosphorylation of Histone H4.** Dev Cell. 28; 30(2): 224–237.
- Christiansen MN, Chik J, Lee L, Anugraham M, Jodie L, Abrahams JL, Packer NH. 2014. **Cell surface protein glycosylation in cancer.** Proteomics. 14, 525–546.
- Dorayappan KD, Wallbillich JJ, Cohn DE, Selvendiran K. 2016. **The biological significance and clinical applications of exosomes in ovarian cancer.** Gynecologic Oncology 142 199–205.

- Douglas H, Weinberg RA. 2011. **Hallmarks of Cancer: The Next Generation**. Cell. 4;144(5):646-74.
- Earp MA, Cunningham JM. 2015. **DNA methylation changes in epithelial ovarian cancer histotypes**. Genomics. 106(6): 311–321.
- Erickson BK, Conner MG, Landen Jr CN. 2013. **The role of the fallopian tube in the origin of ovarian cancer**. Am J Obstet Gynecol. 209(5):409-14.
- Escrevente C, Machado E, Brito C, Reis CA, Stoeck A, Runz S, Marmé A, Altevogt P, Costa J. 2006. **Different expression levels of α -3/4 fucosyltransferases and Lewis determinants in ovarian carcinoma tissues and cell lines**. International Journal of Oncology. 29: 557-566.
- Eswari V, Geetha Prakash, Irfan AA, Bhanumathy V., Gomathi Palvannanathan. 2011. **Endometrioid carcinoma of the ovary and uterus—synchronous primaries or metastasis: A case report**. Journal of Clinical and Diagnostic Research. Vol-5(4): 875-879.
- Fawzy A, Mohamed MR, Ali MA, Abd El-Magied MH, Helal AM. 2016. **Tissue CA125 and HE4 gene expression levels offer superior accuracy in discriminating benign from malignant pelvic masses**. Asian Pac J Cancer Prev. 17(1):323-33.
- Fernández MS. 2014. **Estudio de expresión de proteínas α (1,6) fucosiladas implicadas en la malignización del cáncer colorrectal**. Tesis de Maestría, Universidad de Coruña, España.
- FIGO Committee on Gynecologic Oncology. 2009. **Current FIGO staging for cancer of the vagina, fallopian tube, ovary, and gestational trophoblastic neoplasia**. Int J Gynaecol Obstet 105 (1): 3-4.
- Fujii H, Shinzaki S, Iijima H, Wakamatsu K, Iwamoto C, Sobajima T, Kuwahara R, Hiyama S, Hayashi Y, Takamatsu S, Uozumi N, Kamada Y, Tsujii M, Taniguchi N, Takehara T, Miyoshi E. 2016. **Core fucosylation on T cells, required for activation of T-cell receptor signaling and induction of colitis in mice, is increased in patients with inflammatory bowel disease**. Gastroenterology. 150(7):1620-32.

- Fujiki R, Hashiba W, Sekine H, Yokoyama A, Chikanishi T, Ito S, Imai Y, Kim J, He HH, Igarashi K, Kanno J, Ohtake F, Kitagawa H, Roeder RG, Brown M. y col. 2011. **GlcNAcylation de histona H2B facilita su monoubiquitination.** *Nature* 480, 557–560
- Gallardo R, Álvarez G, Montes S, Toledo L, Michel T, Alamilla G, Bahena G, Hernández N, Fragoso O, Espinosa R, Cetina P. 2020. **Clinical Evaluation of BRCA1/2 Mutation in Mexican Ovarian Cancer Patients.** *Translational oncology*, 13(2), 212–220.
- Garibay C OL, Hernández R VI, Osorio T JC, Hernández O M, Gallardo R D, Cantú D D, Encarnación G S, Villegas P JC, Talamás R P. 2014. **Proteomic identification of fucosylated haptoglobin alpha isoforms in ascitic fluids and its localization in ovarian carcinoma tissues from Mexican patients.** *J Ovarian Res.*10.1186/1757-2215-7-27.
- Gersthein ES, Kushlinsky DN, Levkina NV, Tereshkina IV, Nosov VB, Laktionov KP, Adamyan LV. 2011. **Relationship between the expression of VEGF signal components and matrix metalloproteinases in ovarian tumors.** *Bull Exp Biol Med.* 151:449–53.
- GLOBOCAN. 2018. **Estimated cancer incidence and prevalence worldwide in 2018.** <https://gco.iarc.fr/>
- Hakomori S. 1996. **Tumor Malignancy Defined by Aberrant Glycosylation and Sphingo (glyco) lipid Metabolism.** *Cancer Res.* 56(23):5309-18.
- Hao YY, Lin B, Zhao Y, Zhang YH, Li FF, Diao B, Ou YL, Zhang SL. 2008. **α 1,2-Fucosyltransferase gene transfection influences on biological behavior of ovarian carcinoma-derived RMG-1 cells.** *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao.* 41, 435–442.
- Hongyan L, Shaoming T, Qiu Y. 2015. **Correlation between FUT4 expression and its promoter methylation in HaCaT cells.** *Yi Chuan.* 37(1):48-54.
- Iwamori M, Tanaka K, Kubushiro K. 2005. **Alterations in the glycolipid composition and cellular properties of ovarian carcinoma-derived RMG-1**

cells on transfection of the α 1, 2-fucosyltransferase gene. *Cancer Sci.* **96**:26–30.

- Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. 2010. **Cancer statistics 2010**. *CA Cancer J Clin.* 60(5):277-300.
- Jessmon P., Boulanger T., Zhou W., Patwardhan P. 2017. **Epidemiology and treatment patterns of epithelial ovarian cancer**. *Expert Review of Anticancer Therapy*; 17(5), 427-437
- Junttila MR, de Sauvage FJ. 2013. **Influence of tumour micro-environment heterogeneity on therapeutic response**. *Nature.* 501(7467):346-54.
- **Karst A, Drapkin R. 2010. Ovarian Cancer Pathogenesis: A Model in Evolution.** *Journal of Oncology.* 932371, 13.
- Lawicki S, Gacuta-Szumarska E, Będkowska GE, Szmitkowski M. 2012. **Hematopoietic cytokines as tumor markers in gynecological malignancies. A multivariate analysis in epithelial ovarian cancer patients.** *Growth Factors.* 2;30:357–66. Li Wenjing, Zhumei Cui, Yan Kong, ¹Xiangyu Liu and Xiangyu Wang: 2021. **Serum Levels of S100A11 and MMP-9 in Patients with Epithelial Ovarian Cancer and Their Clinical Significance.** *Biomed Res Int.* 2021: 7341247
- Liu CZ, Zhang L, Chang XH, Cheng YX, Cheng HY, Ye X, Fu TY, Chen J, Cui H. 2012. **Overexpression and immunosuppressive functions of transforming growth factor 1, vascular endothelial growth factor and interleukin-10 in epithelial ovarian cancer.** *Chin J Cancer Res.* 24:130–7.
- Liu D, Liu J, Lin B, Liu S, Hou R, Hao Y, Liu Q, Zhang S, Iwamori M. 2012. **Lewis y Regulate Cell Cycle Related Factors in Ovarian Carcinoma Cell RMG-I In Vitro via ERK and Akt Signaling Pathways.** *Int J Mol Sci.* 13, 828-839.
- Li J, Fadare O, Xiang L, Kong B, Zheng W. 2012. **Ovarian serous carcinoma: recent concepts on its origin and carcinogenesis.** *J Hematol Oncol.* 10.1186/1756-8722-5-8.
- Lin H, Wang D, Wu T, Dong C, Shen N, Sun Y, Xie H, Wang N, Shan L. 2011. **Blocking core fucosylation of TGF-beta1 receptors downregulates their**

functions and attenuates the epithelial-mesenchymal transition of renal tubular cells. *Am J Physiol Renal Physiol.* 300(4):F1017-25.

- Lin YW, Lin CY, Lai HC, Chiou JY, Chang CC, Yu MH, Chu TY. 2006. **Plasma proteomic pattern as biomarkers for ovarian cancer.** *Int J Gynecol Cancer.* 16:139–46.
- Lu D, Tong M, Lei C, Wenyi W and Ping W. 2020. The role of ubiquitination in tumorigenesis and targeted drug discovery. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5: 11.
- Lu J, Tao X, Zhou J, Lu Y, Wang Z, Liu H, Xu C. 2017. **Improved clinical outcomes of patients with ovarian carcinoma arising in endometriosis.** *Oncotarget.* 5843-5852.
- Luo Z, Wang Q, Lau WB, Lau B, Xu L, Zhao L, Yang H, Feng M, Xuan Y, Yang Y, Lei L, Wang C, Yi T, Zhao X, Wei Y, Zhou S. 2016. **Tumor microenvironment: The culprit for ovarian cancer metastasis?** *Cancer Lett.* 28;377(2):174-82.
- Menon U, Gentry M, Jacobs I. 2011. **Ovarian Cancer Screening and Mortality.** *JAMA.* 12;306(14):1544.
- Miyoshi E, Moriwaki K, Nakagawa T. 2008. **Biological function of fucosylation in cancer biology.** *J. Biochem.* 143, 725–729
- Nakamura K., Kato A., Kobayashi J., Yanagihara H., Sakamoto S., Oliveira DV, Shimada M., Tauchi H., Suzuki H., Tashiro S., Zou L. y Komatsu K. 2011. **Regulación de la recombinación homóloga por ubiquitinación de H2B dependiente de RNF20.** *Mol. Celda* 41, 515–528
- Packer NH, von der Lieth CW, Aoki-Kinoshita KF, Lebrilla CB, Paulson JC, Raman R, Rudd P, Sasisekharan R, Taniguchi N, York WS. 2008. **Frontiers in glycomics: Bioinformatics and biomarkers in disease An NIH White Paper prepared from discussions by the focus groups at a workshop on the NIH campus, Bethesda MD (September 11–13, 2006).** *Proteomics.* 8;8(1):8-20.
- Potapenko IO, Haakensen VD, Lüders T, Helland A, Bukholm I, Sørliie T, Kristensen VN, Lingjaerde OC, Børresen-Dale AL. 2010. **Glycan gene**

expression signatures in normal and malignant breast tissue; possible role in diagnosis and progression. Mol. Oncol. 4, 98–118.

- Pothuri B, Leitao MM, Levine DA, Viale A, Olshen AB, Arroyo C, Bogomolny F, Olvera N, Lin O, Soslow RA, Robson ME, Offit K, Barakat RR, Boyd J. 2010. **Genetic analysis of the early natural history of epithelial ovarian carcinoma.** PLoSOne. 5:e10358.
- Puiffe ML, Filali MA, Zietarska M, Ouellet V. 2007. **Characterization of ovarian cancer ascites on cell invasion, proliferation, spheroid formation, and gene expression in an in vitro model of epithelial ovarian cancer.** Neoplasia. 9 (10): 820-829.
- Prat J, Ribé A, Gallardo A. 2005. **Hereditary ovarian cancer.** Hum Pathol. 36 (8):861-70.
- Rojas V, Hirshfield KM, Ganesan S, Rodriguez RL. 2016. **Molecular Characterization of Epithelial Ovarian Cancer: Implications for Diagnosis and Treatment.** Int J Mol Sci. 15;17(12).
- Roos C, Kolmer M, Mattila P, Renkonen R. 2002. **Composition of *Drosophila melanogaster* proteome involved in fucosylated glycan metabolism.** J Biol Chem. 277: 3168-3175.
- Ryland GL, Hunter SM, Doyle MA. 2015. **Mutational landscape of mucinous ovarian carcinoma and its neoplastic precursors.** Genome Med. 2015 Aug 7;7(1):87.
- Sadakierska Chudy Anna y Filip Małgorzata. 2014. **A Comprehensive View of the Epigenetic Landscape. Part II: Histone Post-translational Modification, Nucleosome Level, and Chromatin Regulation by ncRNAs.** Nerotox Res. 27:172–197.
- Sakamoto J, Furukawa K, Cordon C, Yin BW, Rettig WJ, Oettgen HF, Old LJ, Lloyd KO. 1986. **Expression of Lewis^a, Lewis^b, X, and Y blood group antigens in human colonic tumors and normal tissue and in human tumor-derived cell lines.** Cancer Res. 46, 1553–1561.

- Scarlett UK, Conejo JR. 2011. **Modulating the tumor immune microenvironment as an ovarian cancer treatment strategy**. *Expert Rev Obstet Gynecol*. 1;7(5):413-419.
- Schmidt G. 2007. **Ecografía de la imagen al diagnóstico**. Editorial Médica Panamericana; p: 448.
- Schummer M, Drescher C, Forrest R, Gough S, Thorpe J, Hellström I, Hellström KE, Urban N. 2012. **Evaluation of ovarian cancer remission markers HE4, MMP7 and mesothelin by comparison to the established marker CA125**. *Gynecol Oncol*. 2;125:65–9.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). **In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes**. *Nature protocols*; 1(6), 2856–2860.
- Tan DS, Agarwal R, Kaye SB. 2006. **Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer**. *Lancet Oncol* 2006.
- Tian L, Shen D, Li X, Shan X, Wang X, Yan Q, Liu J. 2016. **Ginsenoside Rg3 inhibits epithelial-mesenchymal transition (EMT) and invasion of lung cancer by down-regulating FUT4**. *Oncotarget*. 12;7(2):1619-32.
- Villegas P JC, Garibay C OL, Hernández R VI, Gallardo R D, Cantú D D, Pérez-Montiel G MD, Talamás R P. 2015. **Integrins and haptoglobin: molecules overexpressed in ovarian cancer**. *Pathology Research & Practice*; 211: 973–981
- Wang H, Wang Q, Zhan Y, Shen Z, Chen H. 2007. α 1,3 Fucosyltransferase-VII modifies the susceptibility of apoptosis induced by ultraviolet and retinoic acid in human hepatocarcinoma cells. *Glycoconjugate Journal*. 24:207–220.
- Wang Y, Fukuda T, Isaji T, Lu J, Gu W, Lee HH, Ohkubo Y, Kamada Y, Taniguchi N, Miyoshi E, Gu J. 2015. **Loss of α 1,6-fucosyltransferase suppressed liver regeneration: implication of core fucose in the regulation of growth factor receptor-mediated cellular signaling**. *Sci Rep*. 5;5:8264.

- Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G, Rueger R. 2016. **Mechanisms and Targets Involved in Dissemination of Ovarian Cancer**. *Cancer Genomics Proteomics*. 12;13(6):407-423.
- Withers DA, Hakomori SI. 2000. **Human alpha (1, 3)-fucosyltransferase IV (FUTIV) gene expression is regulated by elk-1 in the U937 cell line**. *J Biol Chem*. 275 (2000) 40588 – 40593.
- Yang Q, Yang Y, Zhou N, Tang K, Bond Lau B, Wei W, Xu L, Yang Z, Huang S, Wang X, Yi T, Zhao X, Wei Y, Wang H, Zhao L y Zhou S. 2018. **Epigenetics in ovarian cancer: premise, properties, and perspectives**. *Mol Cancer*. 17:109
- Yang XS, Liu SA, Liu JW, Yan Q. 2012. **Fucosyltransferase IV Enhances Expression of MMP-12 Stimulated by EGF via the ERK1/2, p38 and NF-kB Pathways in A431Cells**. *Asian Pac J Cancer Prev* 2;13(4):1657-62.
- Yang X, Wang J, Liu S, Yan Q. 2014. **HSF1 and SP1 are involved in the regulation of FUT4 gene expression and cell proliferation in breast cancer cells**. *J Cell Biochem*. 115, 168–178.
- Yang X, Zhang Z, Jia S, Liu Y, Wang X, Yan Q. 2007. **Overexpression of fucosyltransferase IV in A431 cell line increases cell proliferation**. *Int J Biochem Cell Biol*. 7;39(9):1722-30.
- Yang X, Liu S, Yan Q. 2013. **Role of fucosyltransferase IV in epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells**. *Cell Death Dis*. 25;4:e735.
- Yin BW, Lloyd KO. 2001. **Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen: identification as a new mucin, MUC16**. *J Biol Chem*. 276:27371-27375.
- Van Aller GS, Reynoird N, Barbash O, Huddleston M, Liu S, Zmoos AF, McDevitt P, Sinnamon R, Le B, Mas G, Annan R, Sage J, Garcia BA, Tummino PJ, Gozani O, Kruger RG. 2012. **Smyd3 regula los fenotipos de las células cancerosas y cataliza la metilación de la lisina 5 de la histona H4**. *Epigenética*. 7 (4): 340-3.
- Zhao Y, Lin B, Hao YY. 2008. **The effects of Lewis (y) antigen content on drug resistance to carboplatin in ovarian cancer line RMG-I**. *Prog Biochem Biophys*. 35:1175–1182.