



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

**“Identificación de los niveles de fucosiltransferasa 4 en un modelo murino
de cáncer de ovario”**

TESIS

Que presenta

ING. EN BIOTECNOLOGÍA CAROLINA GARCIA CAMPUZANO

Para obtener el grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

Directora de tesis:

DRA. Patricia Talamás Rohana

ASESORES:

DR. Mario Alberto Rodríguez Rodríguez (DIPM)

DR. Víctor Tsutsumi Fujiyoshi (DIPM)

INDICE

Agradecimientos	4
Dedicatoria	5
Resumen.....	1
Abstract	2
Introducción	3
Cáncer de ovario	3
Epidemiología.....	3
Clasificación del cáncer de ovario	4
Diagnóstico.....	7
Biomarcadores	7
Fucosilación	11
Fucosiltransferasa 4	12
Fucosiltransferasa 4 en cáncer	14
Modelo murino de cáncer de ovario.....	15
Justificación	16
Hipótesis.....	17
Objetivo general.....	17
Objetivos particulares	17
Estrategia experimental general	18
Metodología	19
Análisis bioinformático.....	19
Línea celular ID8-Defb29 Vegf-Luc	19
Ratones C57BL/6 como modelo experimental <i>in vivo</i>	20
Cuidado y mantenimiento.....	20
Inmunofluorescencia indirecta	21
Citometría de flujo	22
Evaluación <i>in vivo</i> del desarrollo tumoral por imagenología.....	22
Análisis estadístico	25
Resultados	26
<i>Alineamiento de las secuencias de FUT4 de ratón y de humano.</i>	26
<i>Inmunofluorescencia para la localización celular de la FUT4 en la línea celular ID8 DVLuc.</i>	28

<i>Evaluación de la progresión tumoral en el modelo experimental C57BL/6 con diferentes inóculos de células ID8DVLuc.</i>	30
<i>Imagenología bioluminiscente de órganos de ratones inoculados con células ID8DVLuc.</i>	33
<i>Seguimiento de la progresión tumoral en el modelo experimental C57BL/6.</i>	35
<i>Niveles de expresión de FUT4 en células recuperadas de lavado peritoneal de ratones inoculados con células ID8DVLuc</i>	38
Discusión	44
Conclusión	53
Bibliografía	54

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que han contribuido de manera significativa en la realización de esta tesis. Su apoyo, orientación y aliento han sido fundamentales en este camino académico.

Quiero agradecer en primer lugar a las instituciones que me brindaron su apoyo, a el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para la realización de este proyecto y al Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV).

Extiendo mi agradecimiento a la Dra. Patricia Talamás Rohana, por haberme aceptado para realizar esta investigación además de su valiosa orientación y asesoramiento a lo largo de este proyecto. Su experiencia y dedicación han sido fundamentales para la calidad y dirección de este proyecto.

También quiero agradecer a mi familia por su constante apoyo y paciencia durante este proceso. Sus palabras de aliento y comprensión me han brindado la motivación necesaria para superar los desafíos que surgieron.

Agradezco sinceramente a mis amigos, compañeros de generación y de laboratorio que compartieron sus conocimientos y experiencias, enriqueciendo así mi perspectiva en este estudio.

No puedo dejar de mencionar, Dra. Verónica Ivonne Hernández Ramírez por sus valiosas aportaciones y sugerencias que contribuyeron de manera significativa a la mejora de este trabajo.

Por último, pero no menos importante, quiero agradecer a mi comité tutorial al Dr. Victor Tsutsumi, así como al Dr. Mario Alberto Rodríguez por su evaluación y comentarios constructivos que contribuyeron a dar forma a esta tesis final.

Les estoy sinceramente agradecido por su contribución a mi crecimiento académico y personal.

¡Muchas gracias a todos!

DEDICATORIA

Los libros son como compañeros de viaje en la travesía del aprendizaje. A quienes me han guiado a través de sus palabras y sus acciones, les dedico este logro académico.

RESUMEN

El cáncer de ovario es la principal causa de muerte en mujeres con cáncer ginecológico y ocupa el quinto lugar como causa de muerte más común en mujeres (PDQ, 2002). La mayoría de los casos se diagnostican en etapas avanzadas, lo que reduce significativamente la esperanza de vida (Arora et al., 2023). La falta de herramientas de diagnóstico y prevención contribuye a esta disminución en la esperanza de vida (Rein et al., 2011).

En la actualidad, existe una necesidad urgente de desarrollar nuevos métodos de diagnóstico que permitan detectar la enfermedad en etapas tempranas. Las investigaciones actuales se centran en la identificación de biomarcadores que sean útiles para el diagnóstico, pronóstico y predicción del cáncer de ovario (Programa de cáncer de Ovario del INCan, 2022).

La fucosiltransferasa 4 es una enzima asociada específicamente a tumores, ya que se ha encontrado que está sobreexpresada en varios tipos de cáncer, especialmente en distintos histotipos de cáncer de ovario epitelial. Esta sobreexpresión se ha observado estimula la proliferación celular y la progresión de los tumores (Keeley et al., 2019).

En consecuencia, los investigadores han dirigido sus esfuerzos hacia la búsqueda de nuevos modelos para el estudio de esta enfermedad y la identificación de estos biomarcadores. Uno de estos modelos es la línea celular de ratón singénico ID8-Defb29 Vegf-Luc, que ofrece ventajas, como la capacidad de realizar seguimiento *in vivo* del desarrollo del tumor mediante técnicas de imagenología.

ABSTRACT

Ovarian cancer is the leading cause of death in women with gynecologic cancer and ranks fifth as the most common cause of death in women (PDQ, 2002). Most cases are diagnosed at advanced stages, significantly reducing life expectancy (Arora et al., 2023). The lack of diagnostic and preventive tools contributes to this decrease in life expectancy (Rein et al., 2011).

Currently, there is an urgent need to develop new diagnostic methods that can detect the disease at early stages. Current research is focused on the identification of biomarkers that are useful for the diagnosis, prognosis, and prediction of ovarian cancer (Ovarian Cancer Program of INCan, 2022).

Fucosyltransferase 4 is an enzyme specifically associated with tumors, as it has been found to be overexpressed in various types of cancer, especially in different histotypes of epithelial ovarian cancer. This overexpression has been observed to stimulate cell proliferation and tumor progression (Keeley et al., 2019).

Consequently, researchers have directed their efforts towards the search for new models for the study of this disease and the identification of these biomarkers. One of these models is the syngeneic mouse cell line ID8-Defb29 Vegf-Luc, which offers advantages such as the ability to track tumor development *in vivo* through imaging techniques.

INTRODUCCIÓN

Cáncer de ovario

El cáncer de ovario (CaOv) es un padecimiento en el cual las células del ovario generalmente anormales o dañadas se dividen sin control formando tumores los cuales invaden tejidos cercanos y pueden viajar a otras partes del cuerpo por medio del líquido ascítico dando lugar a la metástasis la cual contribuye con los índices de morbilidad y mortalidad de esta enfermedad (Ford *et al.*, 2020). Debido a que el cáncer de ovario no presenta signos y síntomas al inicio de la enfermedad, su diagnóstico se dificulta, por tanto, la mayoría de las pacientes son diagnosticadas en etapas tardías lo que disminuye la tasa de supervivencia. Solo alrededor de 20% de los casos de cáncer de ovario son detectados en una etapa (estadio) temprana. Cuando esta enfermedad se encuentra en sus inicios, aproximadamente el 94% de las pacientes vivirán más de 5 años después del diagnóstico (American Cancer Society, 2018).

Epidemiología

A nivel mundial, el cáncer de ovario ocupa el quinto lugar entre las causas de fallecimiento por cáncer en mujeres (American Cancer Society, 2022). El riesgo a nivel mundial de padecer cáncer de ovario en algún momento de la vida es del 1.40-1.80%, el cual puede variar desde el 0.60% en mujeres sin antecedentes familiares de la misma enfermedad hasta el 9.4% en mujeres con antecedentes familiares (Fernández *et al.*, 2006). En México, el CaOv ocupa el 7° lugar de cáncer más frecuente entre las mujeres, según la Agencia Internacional de Investigación en

Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), así como el 7° lugar en mortalidad oncológica a nivel mundial (Cancer Topics – IARC, s. f.). De igual manera la tasa de supervivencia de las pacientes diagnosticadas en las diferentes etapas de la enfermedad disminuye de acuerdo con el avance de esta como se observa en la Tabla 1.

Etapa del CaOv	Tasa de supervivencia a 5 años
I	89%
II	71%
III	41%
IV	20%

Tabla 1. Tasa de supervivencia a 5 años de pacientes diagnosticadas con CaOv. Tomado de American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Manual, 6th Edition.

Clasificación del cáncer de ovario

Los ovarios están compuestos por diferentes tipos de células, entre ellas, las células germinales, las células estromales y las células epiteliales. El cáncer de ovario puede surgir de cualquiera de estos tipos de células; sin embargo, los carcinomas de ovario con diferenciación epitelial constituyen la mayoría de los cánceres de ovario y son responsables de la mayoría de las muertes relacionadas con esta patología. Mediante su observación en el microscopio se han identificado subtipos de carcinomas de ovario epitelial: carcinoma seroso de alto y bajo grado, carcinoma endometriode, carcinoma de células claras, carcinoma seroso de bajo grado y

cáncer mucinoso (Figura 1) (Committee on the State of the Science in Ovarian Cancer Research ., 2016).

Las observaciones clínicas y los estudios genéticos han dividido al CaOv en dos subtipos principales. Los cánceres de tipo I son carcinoma seroso de bajo grado, carcinoma endometrioide, carcinoma de células claras y cáncer mucinoso. Este grupo tiende a desarrollarse localmente, la metástasis es tardía y muestra menos síntomas. Los cánceres de tipo II se componen de carcinoma seroso de alto grado, carcinoma sarcomatoide y carcinoma indiferenciado. Estas neoplasias son malignas, altamente agresivas y generalmente se diagnostican en una etapa avanzada (Terada *et al.*, 2016).

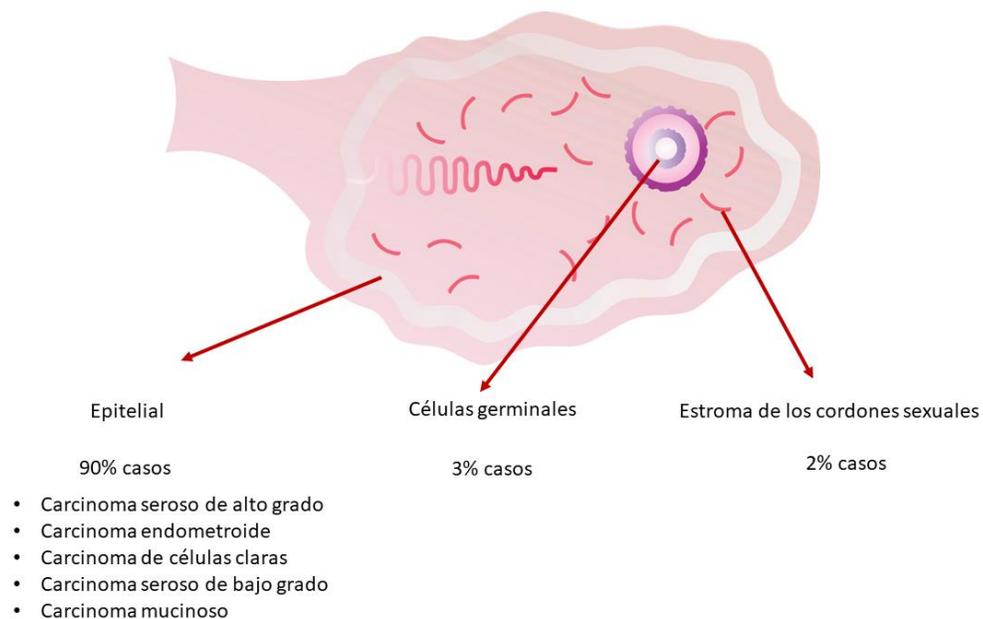


Figura 1. Clasificación del CaOv. Tipos de cáncer de acuerdo de las células donde se origina. Tomado de Martin *et al.*, 2013.

La clasificación del CaOv comúnmente se basa en el sistema FIGO, el cual utiliza la extensión, la propagación a los ganglios linfáticos y la metástasis como factores determinantes del estadio del CaOv (Figura 2). De acuerdo con el sistema FIGO, los estadios del CaOv van desde el estadio 1 al 4, y cuanto menor es el número, menor es la propagación del cáncer, mientras que un número más alto indica una mayor propagación de la enfermedad. Cada factor nos brinda más detalles para una correcta estadificación, como se puede observar en la figura 3 (American Cancer Society, 2018).

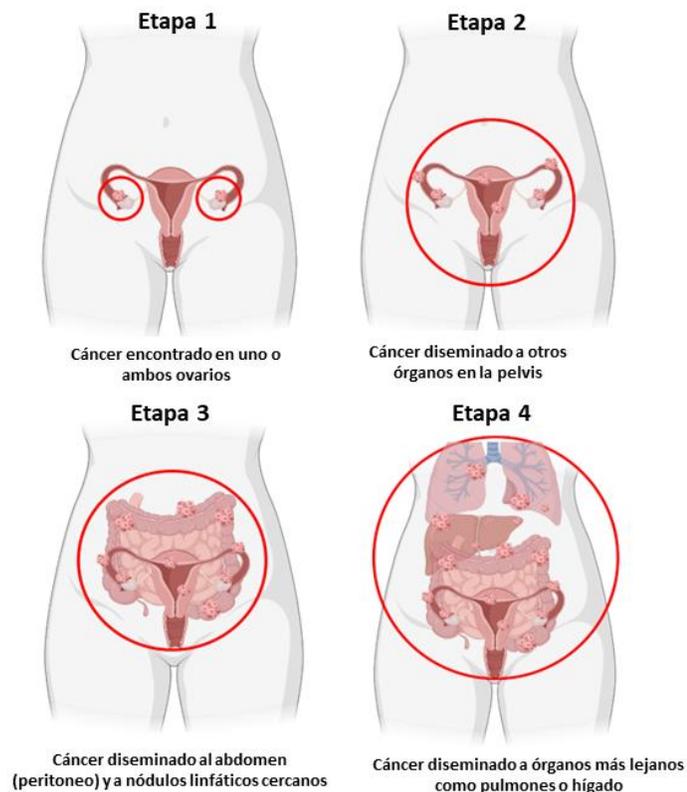


Figura 2. Etapas del CaOv. Escala FIGO para la determinación de la etapa de avance del CaOv. Etapa 1: Cáncer localizado en uno o ambos ovarios. Etapa 2: Cáncer diseminado a otros órganos en la pelvis. Etapa 3: Cáncer diseminado al abdomen y a nódulos linfáticos cercanos. Etapa 4: Cáncer diseminado a órganos más lejanos como pulmones o hígado.

Diagnóstico

El diagnóstico del CaOv es difícil debido a que los síntomas son comunes e inespecíficos, lo que podría llevar a confusiones con otras enfermedades (Stewart et al., 2019). Por lo general, las pacientes con CaOv no diagnosticado acuden a una evaluación clínica con síntomas como ascitis, cambios en los hábitos de micción o pérdida de peso. El diagnóstico generalmente se realiza después de realizar de imagen como ultrasonido o tomografía computarizada que pueden mostrar masas intraabdominales, ascitis o carcinomatosis (American Cancer Society, 2020).

Se han realizado muchos esfuerzos para diagnosticar la enfermedad en una etapa temprana a través de la predicción, prevención y estudios de control (Menon et al., 2018). La detección temprana del cáncer puede reducir significativamente la mortalidad por esta enfermedad y salvar vidas. Por ello, se ha dedicado un gran esfuerzo a la exploración de nuevas tecnologías para detectar signos tempranos de la enfermedad (Wu & Qu, 2015). Los biomarcadores son herramientas cruciales capaces de predecir la progresión, la estratificación del riesgo y el beneficio terapéutico general para combatir esta enfermedad mortal (Muinao et al., 2018).

Biomarcadores

Los biomarcadores se definen como características objetivas y cuantificables de los procesos biológicos. Si bien pueden estar relacionados con la experiencia y la sensación de bienestar de un paciente, es importante destacar que existen características biológicas medibles que no necesariamente corresponden al estado clínico del paciente, o cuyas variaciones son indetectables y no tienen efecto en la

salud (Strimbu & Tavel, 2010). En el caso de los biomarcadores utilizados para detectar cáncer, éstos abarcan una amplia variedad de moléculas, como ácidos nucleicos, proteínas, azúcares, pequeños metabolitos, parámetros citogenéticos y citocinéticos, así como la presencia de células tumorales en los fluidos corporales (Wu & Qu, 2015).

Los marcadores tumorales se utilizan con diversos propósitos en la práctica clínica, como la detección de pacientes asintomáticos, la planificación del tratamiento y el control de la recurrencia de la enfermedad. Estos marcadores tienen la ventaja de ser en su mayoría económicos, no invasivos y tener tiempos de procesamiento relativamente rápidos, ya que pueden detectarse en plasma, suero, líquido peritoneal o en orina (Rein et al., 2011).

Según Urban y Drescher en el 2006, los biomarcadores se pueden clasificar en tres categorías según su comportamiento en el desarrollo del cáncer de ovario (Figura 3). Estas categorías son: marcadores de riesgo temprano (hasta la formación del cáncer), marcadores de etapa tardía y marcadores de diagnóstico clínico. Cada una de estas categorías se caracteriza de la siguiente manera: los marcadores de etapa temprana son capaces de detectar la enfermedad cuando aún se encuentra localizada; los marcadores de etapa tardía permanecen elevados alrededor del momento del diagnóstico, pero pueden ser indetectables en las etapas iniciales de la enfermedad.

Es importante tener en cuenta que la detección temprana del cáncer de ovario es fundamental para mejorar los resultados del tratamiento y la supervivencia de las pacientes. Los marcadores de riesgo temprano juegan un papel crucial en la

identificación de mujeres con alto riesgo de desarrollar la enfermedad antes de que aparezcan los síntomas. Estos biomarcadores pueden incluir anomalías genéticas, cambios en los niveles hormonales u otros indicadores que pueden ser detectados a través de pruebas de laboratorio.

Por otro lado, los marcadores de etapa tardía son útiles para confirmar el diagnóstico en pacientes con síntomas o hallazgos clínicos sospechosos de cáncer de ovario. Estos biomarcadores se caracterizan por permanecer elevados en la etapa en la que se realiza el diagnóstico, lo que ayuda a respaldar la sospecha clínica y guiar las decisiones terapéuticas. Rein et al., 2011b

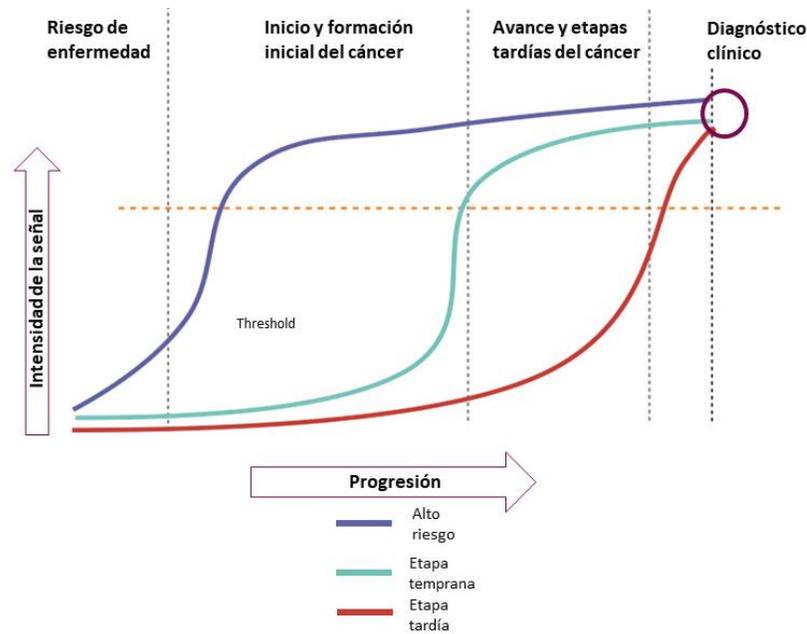


Figura 3. Clasificación de los Biomarcadores para el CaOV. Marcadores de riesgo, etapa temprana y etapa tardía. Tomado de Rein et al., 2011b.

Finalmente, los marcadores de diagnóstico clínico son utilizados para confirmar el diagnóstico de cáncer de ovario en combinación con otros métodos de evaluación, como la imagenología o la biopsia. Estos biomarcadores pueden ser específicos de la enfermedad o indicar la presencia de células tumorales en el cuerpo de la paciente.

En resumen, la clasificación de los biomarcadores en categorías según su comportamiento en el desarrollo del cáncer de ovario permite una mejor comprensión de su utilidad en diferentes etapas de la enfermedad. La combinación de marcadores de riesgo temprano, marcadores de etapa tardía y marcadores de diagnóstico clínico puede mejorar la detección temprana, el diagnóstico preciso y el tratamiento oportuno del cáncer de ovario.

Durante las últimas dos décadas, se han realizado intensos esfuerzos para encontrar nuevos marcadores séricos que permitan el diagnóstico precoz del cáncer de ovario (von Georgi et al., 2004). Sin embargo, hasta el momento no se ha aprobado ninguna prueba de laboratorio por parte de las agencias reguladoras para el diagnóstico temprano del CaOv, debido a las limitaciones de especificidad y sensibilidad de los marcadores existentes. Los resultados falsos positivos pueden llevar a realizar procedimientos y tratamientos quirúrgicos innecesarios. Por lo tanto, la especificidad de una prueba de detección es de suma importancia (Su et al., 2013).

El descubrimiento de nuevos biomarcadores o paneles de diagnóstico para la detección temprana del CaOv representa uno de los mayores desafíos en la medicina moderna. Existe una necesidad urgente de identificar biomarcadores o

conjuntos de biomarcadores que sean útiles para el diagnóstico del CaOv antes de que la enfermedad alcance etapas avanzadas.

Fucosilación

La fucosilación es uno de los tipos más importantes de glicosilación en el cáncer. En 1979, Hakomori y colaboradores presentaron el primer artículo sobre el cáncer y la fucosilación, donde compararon los niveles de fucosilación de glicolípidos en células de hepatoma y hepatocitos normales. Aunque las fucosiltransferasas involucradas difieren entre glicoproteínas y glicolípidos, su sustrato donante, GDP-fucosa, es común. La fucosa (6-desoxi-L-galactosa) es un monosacárido presente en glicoproteínas y glicolípidos en vertebrados, invertebrados, plantas y bacterias. La fucosilación implica la transferencia de un residuo de fucosa a oligosacáridos y proteínas, y está regulada por diferentes moléculas, incluidas las fucosiltransferasas, las enzimas sintetizadoras de guanosina difosfato (GDP)-fucosa y los transportadores de GDP-fucosa. La mayoría de las glicoproteínas que experimentan fucosilación son proteínas secretoras o proteínas de membrana en la superficie celular (Miyoshi et al., 2012).

La función de las fucosiltransferasas es esencial para los procesos biológicos normales. En el caso de los tumores, los antígenos fucosilados presentes en la superficie de las células aumentan su expresión, lo que afecta la regulación de genes y/o proteínas mediante modificaciones en la fucosilación de los receptores de la superficie celular, y, en consecuencia, afecta las vías de señalización intracelular aguas abajo (Hao YY et al., 2008; Sakamoto J et al., 1986).

En 2016, Villegas Pineda evaluó la fucosilación en cortes de tejido de diferentes histotipos de pacientes con Cáncer de Ovario Epitelial (COE) y encontró que en el 80% de los tumores analizados, los niveles de fucosilación eran muy elevados en comparación con el tejido de ovario sano, lo que sugiere que la fucosilación podría ser una herramienta potencial para el diagnóstico.

Fucosiltransferasa 4

La familia de FUTs se compone de cuatro subfamilias: α 1,2-, α 1,3/4-, α 1,6 y la proteína O-FUT. La subfamilia α 1,3/4-FUT consta de al menos ocho miembros: FUT3, FUT4, FUT5, FUT6, FUT7, FUT9, FUT10 y FUT11.

FUT4 es una proteína transmembranal que consta de un dominio corto citoplasmático en el extremo amino terminal, un dominio transmembranal y un dominio globular en el lado luminal del aparato de Golgi (Figura 4) (Breton et al., 2001). Además, se ha observado que está regulada al alza en diferentes tipos de cáncer, y se ha demostrado que promueve la proliferación, invasión, crecimiento tumoral y resistencia a fármacos (Keeley et al., 2019).

La función de FUT4 en la regulación del crecimiento celular se realiza mediante la modulación de la progresión del ciclo celular a través de las vías de señalización MAPK y PI3K/Akt (Mollicone et al., 1994). Sin embargo, aún no se ha documentado completamente el mecanismo subyacente de la regulación de FUT4. Se ha informado que el gen *FUT4* está sujeto a la regulación de varios factores de transcripción, como HSF1 y SP1. Se sabe que HSF1 responde a procesos de

choque térmico y otros factores de estrés, que contribuyen a la proliferación celular y al desarrollo tumoral (Yang et al., 2014).

La transición epitelio-mesenquimal (TEM) desempeña un papel crucial en la progresión del tumor, así como en la invasión y metástasis del cáncer. Se ha informado recientemente que FUT4 tiene un papel en la TEM mediante la activación de los sistemas de señalización PI3K/Akt y NF- κ B, que inducen a los mediadores Snail y MMP-9. Estos mediadores facilitan la adquisición de un fenotipo mesenquimal (Yang et al., 2013).

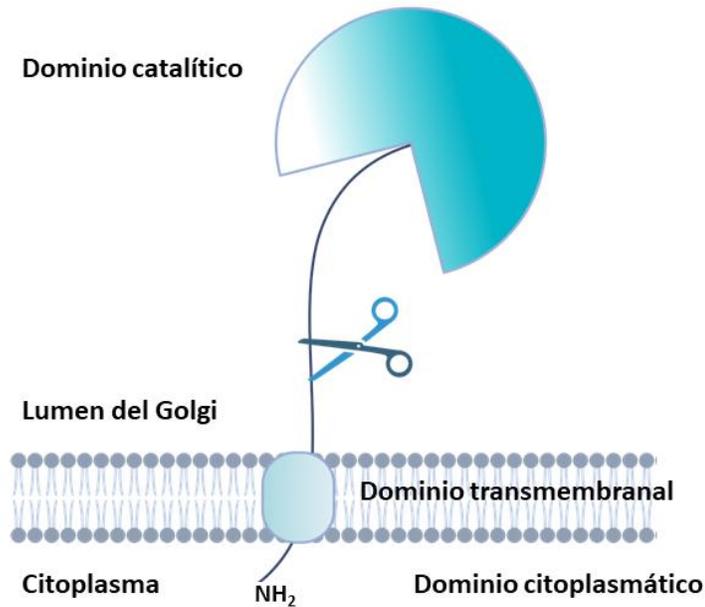


Figura 4. Características estructurales de FUT4.

Fucosiltransferasa 4 en cáncer

Las fucosiltransferasas (FUT) desempeñan un papel crucial en diversos eventos fisiopatológicos. Su elevada expresión es un indicador de malignidad en las células y contribuye a una serie de eventos anormales, como la proliferación celular descontrolada, la invasión de células tumorales, la angiogénesis, la metástasis, la evasión inmune y la resistencia a fármacos. La actividad de cada FUT generalmente es específica del tejido y depende principalmente de su nivel de expresión (Lv et al., 2023).

En particular, se ha observado que FUT4 está regulada al alza en varios tipos de cáncer y promueve la proliferación, la invasión y el crecimiento tumoral (Shan et al., 2015). Según Shan y colaboradores (2015), la pérdida de FUT4 en las células de melanoma inhibe la proliferación y el crecimiento tumoral a través de la vía de señalización de EGFR y MAPK. Por otro lado, la sobreexpresión de FUT4 aumenta la fosforilación de ERK1/2, MAPK y PI3K/Akt, activando las vías de señalización y promoviendo su interconexión. La estimulación de la proliferación celular inducida por FUT4 se correlaciona con una mayor progresión del ciclo celular al impulsar las células hacia la fase S (Yang et al., 2010). Además, se ha correlacionado la sobreexpresión de FUT4 con un peor pronóstico en el diagnóstico del cáncer de pulmón (Ogawa et al., 1996).

Alvear Hernández (2022) realizó un análisis de los patrones de expresión de FUT4 en muestras de suero y líquido ascítico de pacientes con diagnóstico de cáncer de ovario (CaOv) y encontró una expresión elevada de esta proteína en comparación con las muestras de individuos sanos. Además, llevó a cabo un análisis de cortes

de tejido tumoral en distintas etapas de la enfermedad, incluyendo etapas tempranas, y encontró una expresión diferencial entre los cortes de tejido sano y los cortes tumorales. Por lo tanto, sugiere que FUT4 podría funcionar como un posible biomarcador de etapa temprana de CaOv.

Modelo murino de cáncer de ovario

Para estudiar la fisiopatología y realizar estudios preclínicos de terapias potenciales, los investigadores han empleado modelos animales de cáncer de ovario epitelial (COE). Los modelos murinos actuales de COE implican la inoculación de células de cáncer de ovario humano o murino en la cavidad peritoneal, la cápsula ovárica, los espacios subcutáneos o bien alteraciones genéticas que conducen al desarrollo de cáncer de ovario en ratones transgénicos (Wilkinson-Ryan et al., 2019).

El desarrollo y aplicación de un modelo de metástasis como sistema para estudiar el COE metastásico permite el uso de ratones singénicos para modelar un proceso metastásico trazable y clínicamente relevante. Uno de los modelos singénicos comúnmente utilizados corresponde al uso de la línea de células tumorales murinas ID8 (Wilkinson-Ryan et al., 2018).

La línea celular ID8 deriva de una transformación espontánea maligna de células de ovario de ratón C57BL/6 *in vitro* (Janát-Amsbury et al., 2006).

En 2016, Wu et al. generaron tumores y ascitis utilizando células epiteliales de la superficie del ovario de ratón mediante el modelo de ratón C57BL/6. El seguimiento del desarrollo del tumor se realizó a través del sistema de imagenología bioluminiscente no invasiva (Hung et al., 2007)

JUSTIFICACIÓN

El cáncer de ovario representa la principal causa de muerte en cánceres ginecológicos a nivel mundial, al igual que en México, debido a un diagnóstico tardío. Por ello la identificación de biomarcadores presentes en etapas tempranas de la enfermedad permitirá establecer un diagnóstico oportuno.

En particular, evaluar la expresión de la fucosiltransferasa 4 y su correlación con la progresión del cáncer de ovario en un modelo murino, generará información relevante para implementar el uso de esta molécula como un posible biomarcador de diagnóstico temprano.

HIPÓTESIS

El incremento en la expresión de la proteína fucosiltransferasa 4 correlaciona con la progresión de la enfermedad y es detectable en etapas tempranas en un modelo murino de cáncer de ovario.

OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de expresión de la fucosiltransferasa 4 durante el desarrollo tumoral en un modelo murino de cáncer de ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la localización celular de la proteína fucosiltransferasa 4 (Fut4) en la línea celular ID8-DVLuc en distintas condiciones.
- Evaluar el desarrollo tumoral en el modelo murino C57BL/6 por imagenología.
- Evaluar los niveles de expresión de FUT4 en células recuperadas de líquido peritoneal y ascitis en el modelo experimental C57BL/6 utilizando la línea celular ID8 DVLuc durante la progresión tumoral.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL

Fucosiltransferasa 4 (**FUT 4**)

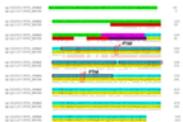
Estrategia experimental
In silico

Secuencias
Fut4 ratón y Fut4
humano

• Análisis informático

EMBL-EBI 

Clustal Omega

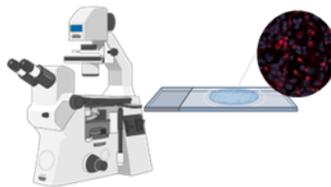


Estrategia experimental
In vitro

Línea celular
ID8 DVLuc



• Inmunofluorescencia

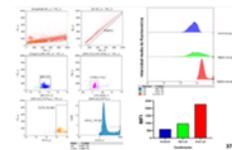
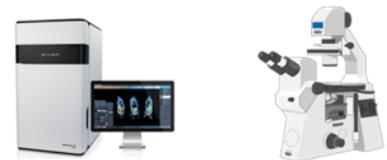


Estrategia experimental
In vivo

Modelo murino
C57BL6



• Imagenología Bioluminiscente
• Inmunofluorescencia
• Citometría de flujo



METODOLOGÍA

Análisis bioinformático

Se buscó la secuencia de las proteínas fucosiltransferasa 4 de ratón y de humano en la base de datos *NCBI protein* y se analizó la homología que existía entre ellas para averiguar la similitud y utilidad del modelo murino.

Se realizó la búsqueda de los dominios citoplasmáticos, transmembranal y luminal de ambas proteínas con la finalidad de establecer los sitios que reconoce el anticuerpo comercial utilizado para realizar los ensayos de inmunofluorescencia y de citometría.

Finalmente se buscaron los sitios de modificación postraduccional para determinar el sitio en el que se llevaba a cabo la fucosilación de esta proteína.

Línea celular ID8-Defb29 Vegf-Luc

La línea celular ID8-Defb29 Vegf (DVLuc), es una línea celular preclínica de cáncer de ovario que se obtuvo a través de la transformación de la línea celular ID8, mediante la inserción de un péptido antimicrobiano (Defb29) que induce el aumento en el crecimiento tumoral y la acumulación de LA. Así como la adición de VEGF el cual tiene un papel en el crecimiento tumoral, implicado en la patogenia de los quistes ováricos ya que es una molécula implicada en la regulación de la proliferación, migración celular, así como en la permeabilidad vascular (Coukos et al., 2008).

Por último, esta línea celular fue infectada con un retrovirus que contiene un plásmido que codifica para luciferasa, la cual permite el monitoreo del crecimiento del tumor, así como el seguimiento de los efectos de estrategias terapéuticas para el control de tumores mediante imagenología luminiscente.

La línea celular ID8-DVLuc se cultivó a 37 °C en medio DMEM alto en glucosa con suero fetal bovino al 10% (Corning, 35-010-CV), en una atmósfera de CO₂ al 5%. Cuando las células alcanzaron una confluencia del 80% de crecimiento se les aplicó un tratamiento con líquido de ascitis (LA) de ratón C57BL6 inoculado con células ID8 WT en distintos tiempos de desarrollo (15 semanas, 16 semanas y 17 semanas). Como condición control se emplearon células ID8 (Luc y WT) en medio convencional.

Los cultivos se mantuvieron con el apoyo del M. en C. Carlos Osorio-Trujillo del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular del CINVESTAV.

Ratones C57BL/6 como modelo experimental *in vivo*

Cuidado y mantenimiento

En este estudio se utilizaron ratones hembra C57BL/6 con un peso corporal de 25 ± 5 g, sexualmente maduros y con una edad de entre 6-8 semanas de edad, los cuales se alojaron a una temperatura controlada de 25 ± 1 °C, con ciclos alternos de luz/oscuridad por 12 h. Se alimentaron con dieta estándar para ratón de laboratorio (LabDiet®) y el acceso al agua de bebida fue *ad libitum*. Se mantuvieron en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL). Los animales se distribuyeron en grupos de acuerdo con el tiempo de

estudio para cada grupo. El protocolo fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (Protocolo 0288-19), según los lineamientos establecidos por el PICUAL y la NOM-062-ZOO-1999 [Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, 2001].

Inmunofluorescencia indirecta

Para la identificación de la proteína Fut 4 se partió de un cultivo de 80,000 células ID8DVLuc, se colocaron en cajas Petri con cubreobjetos 22 x 22 y se expusieron a LA de ratones C57BL/6 inoculados con la cepa ID8 WT y a medio de cultivo como control. Después de 24 h las células en LA o medio de cultivo se fijaron utilizando Paraformaldehído al 4% durante 1 h a temperatura ambiente. Los cultivos se lavaron dos veces con PBS 1x y después fueron bloqueados con albúmina sérica bovina (BSA) al 0.5% en PBS durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Se lavaron dos veces con PBS 1x. Los cultivos fueron incubados con el anticuerpo primario FucT-IV A-10 (Santa cruz, sc-393007) en una dilución 1:50 durante toda la noche a 4 °C. Las muestras fueron lavadas dos veces con PBS 1x. Los cultivos fueron incubados con el anticuerpo secundario α -Anti-mouse IgG-AF 647 (Jackson ImmunoResearch Cat. 111-605-003) en una dilución 1:100 y se incubó durante 1 h a TA alejados de la luz, se dieron dos lavados con PBS 1x. Por último, se montó en portaobjetos con Vectashield más DAPI y se selló. Las células se analizaron en un microscopio confocal Carl Zeiss (Carl Zeiss LMS 900) con el software Zen Analyse. Lo anterior se realizó de la misma manera para las células extraídas de lavado peritoneal de ratones inoculados con la línea celular ID8 DvLuc a la semana 1 y 2 post inoculación.

Citometría de flujo

Para la detección de la Fut4 y a partir de un cultivo celular de 1×10^6 , las células fueron marcadas mediante el colorante zombie (Zombie Violet™ Fixable Viability Kit, Biolegend) como identificador de viabilidad, posteriormente se centrifugaron y se eliminó el sobrenadante, después las células se incubaron con saponina, un detergente que produce poros de manera reversible en las membranas celulares, se centrifugó y se retiró el sobrenadante en seguida las células se bloquearon con BSA al 5% en PBS durante 1 h a TA. Se incubó con el anticuerpo primario FUT4 Rabbit pAb (Abclonal A16320) durante 30 min. Por último, se incubó con el anticuerpo secundario Alexa Fluor® 647 Anti-Rabbit IgG (Jackson 711-605-152) durante 30 min, se centrifugaron 5 min a 1500 rpm, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla con 500 μ L de PBS 1x. Las células se analizaron en el citómetro Sysmex del Laboratorio Nacional de Servicios Experimentales del Cinvestav (LaNSE-Cinvestav), y los resultados se analizaron con el software Kaluza Analysis Software.

Evaluación *in vivo* del desarrollo tumoral por imagenología

En modelos animales, la imagen por bioluminiscencia es una técnica bien establecida que permite la cuantificación no invasiva de la carga tumoral. Por lo general, los vectores retrovirales de integración estable se utilizan para generar líneas indicadoras estables que expresan luciferasa, que se aplican a los respectivos modelos animales para controlar el crecimiento tumoral: las células que expresan la enzima indicadora de luciérnaga generan un flujo de fotones (luz)

cuando la luciferina (el sustrato de la luciferasa) se oxida en presencia de ATP. Como consecuencia, solo las células tumorales vivas que expresan la enzima pueden monitorearse detectando los fotones emitidos, lo que convierte a la bioluminiscencia en una herramienta excelente y sensible para examinar el crecimiento tumoral en modelos de ratón.

Se realizó una estandarización de la técnica de imagenología bioluminiscente para establecer el uso correcto del equipo mediante la determinación de los tiempos de exposición de los ratones en el equipo, la cantidad de anestésico y de oxígeno necesarios para mantener a los ratones en analgesia.

También se determinó la cantidad de inóculo adecuada para infectar a los ratones, así como para establecer un punto técnico de muerte que asegurara el desarrollo de la enfermedad y que simulara las distintas etapas de la enfermedad humana.

Para el programa de estandarización se inocularon 5 ratones hembra C57BL/6 vía intraperitoneal, con diferentes cantidades de inóculo como se muestra en la tabla 2.

Ratón	Cantidad de células
1	200,000
2	500,000
3	1×10^6
4	2×10^6
5	PBS (300 μ l)

Tabla 2. Cantidad de células ID8DVLuc inoculadas por ratón.

La línea celular ID8DVLuc se inoculó mediante una inyección intraperitoneal en los ratones. Posteriormente, se registraron las medidas de circunferencia, diámetro y peso de los ratones, y se sometieron a exposición en el equipo Newton 7.0 de VILBER cada ocho días durante un periodo de siete semanas.

Para obtener las imágenes de bioluminiscencia, se inocularon intraperitonealmente 150 µg de D-luciferina en PBS en los ratones. Luego, se anestesiaron con isofluorano al 2.5% y se tomaron imágenes en tres tiempos de exposición diferentes (5, 10 y 15 min). Los resultados se reportan como la intensidad máxima en niveles de grises y se obtienen utilizando el programa de software Evolution Capt-Edge de VILBER.

Al final de este período, los ratones se sacrificaron de acuerdo con el tiempo de desarrollo tumoral y la acumulación de ascitis, tal como fue reportado previamente por Janát-Amsbury et al. (2006) para este modelo.

Para determinar el órgano principal al que migraban las células, se realizó la necropsia de dos ratones. Los órganos se extirparon sin un orden específico, colocados en cajas Petri y posteriormente se procedió a exponerlos en el equipo de imagenología durante el mismo tiempo de exposición descrito anteriormente.

Para evaluar el desarrollo de CaOv en el modelo murino se infectaron ratones por vía intraperitoneal con 1×10^6 células de ID8-Defb29-Vegf-Luc, se tomaron medias de circunferencia y diámetro, así como del peso cada semana; así mismo, los animales fueron expuestos en el equipo de bioluminiscencia de acuerdo a lo descrito anteriormente; finalmente después de la muerte técnica, se realizó una necropsia y

se expuso a los ratones nuevamente en el equipo de bioluminiscencia para observar los sitios en los que existía mayor cantidad de macro y microimplantes.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando los datos expresados como promedio de éstos, 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 aplicó la prueba de *t* de Student.

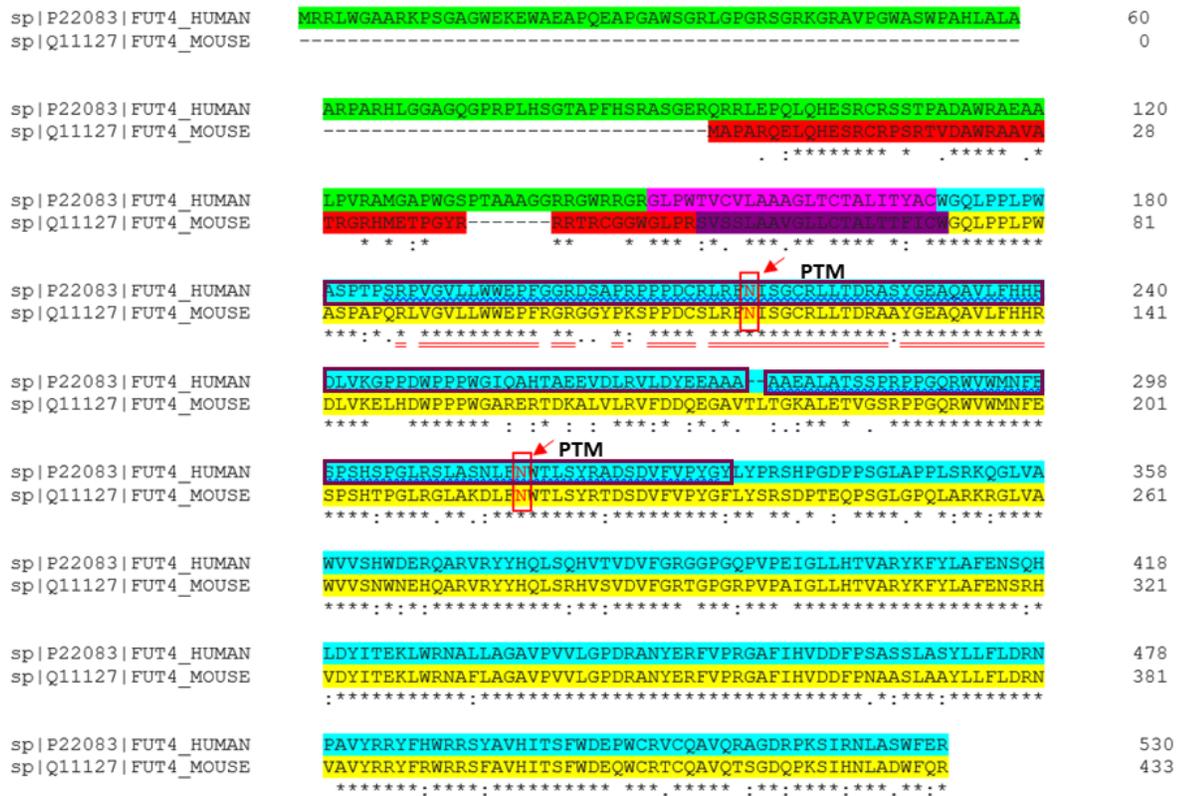
RESULTADOS

Alineamiento de las secuencias de FUT4 de ratón y de humano.

Inicialmente, llevamos a cabo el análisis de alineamiento de las secuencias de la proteína FUT4 del ratón (Q11127) y la proteína FUT4 humana (p22083) utilizando el servidor Clustal Omega. La secuencia de la proteína FUT4 humana consta de 433 aminoácidos, mientras que la proteína FUT4 del ratón consta de 530 aminoácidos, como se puede observar en la Figura 5. El grado de identidad entre ambas secuencias es del 74.2%.

Ambas proteínas están compuestas por tres dominios: un dominio luminal, un dominio transmembranal y un dominio citoplasmático. Es importante destacar que los sitios de modificación post-traducciona para ambas proteínas se encuentran en el mismo aminoácido.

Además, se investigó el sitio de reconocimiento del anticuerpo utilizado en los experimentos, el FUT4 Rabbit pAb (A16320). Este anticuerpo policlonal está dirigido específicamente a la proteína FUT4 humana, sin embargo, también tiene la capacidad de reconocer la proteína FUT4 de ratón y rata. Por lo tanto, se utilizó en el desarrollo de este proyecto.



Grado de identidad: 74.2%

Fut4 Ratón: 433 aa
Fut4 Humano: 530 aa

 Humano	Dominio citoplásmico	 FUT4 antibody	Sitios de modificación post-traduccional (glicosilación)
 Ratón	Dominio trans membranal		
 Humano	Dominio luminal		
 Ratón			* Coincidencia
 Humano			: Conservación fuerte
 Ratón			. Conservación débil
			Sin coincidencia

Figura 5. Alineamiento de las secuencias de FUT4 de ratón y de humano. Cada color indica los dominios citoplásmico, transmembranal y luminal de ambas proteínas, así como el lugar de reconocimiento del anticuerpo comercial FUT4 Rabbit pAb; los sitios de modificación post traduccional se indican con un recuadro rojo.

Inmunofluorescencia para la localización celular de la FUT4 en la línea celular ID8 DVLuc.

En este ensayo, se analizaron diferentes condiciones de estimulación utilizando LA de ratón y cultivos primarios de células extraídas del LA de ratón C57BL/6 inoculado con células ID8DVLuc.

Al examinar las células cultivadas en medio, se observó una señal débil de la proteína FUT4 en comparación con las células estimuladas con LA y las células obtenidas de ratones. Sin embargo, al utilizar LA como estímulo, se observó una expresión más pronunciada de la proteína. En las células estimuladas con LA, la proteína FUT4 se presentó en forma de vesículas, indicando una posible acumulación intracelular. Por otro lado, en las células obtenidas del LA de ratón, se observó una localización preferente de la proteína cerca de la membrana celular (Figura 6).

Estas observaciones sugieren que la estimulación con LA de ratón potencia la expresión y la distribución de la proteína FUT4 en las células ID8DVLuc.

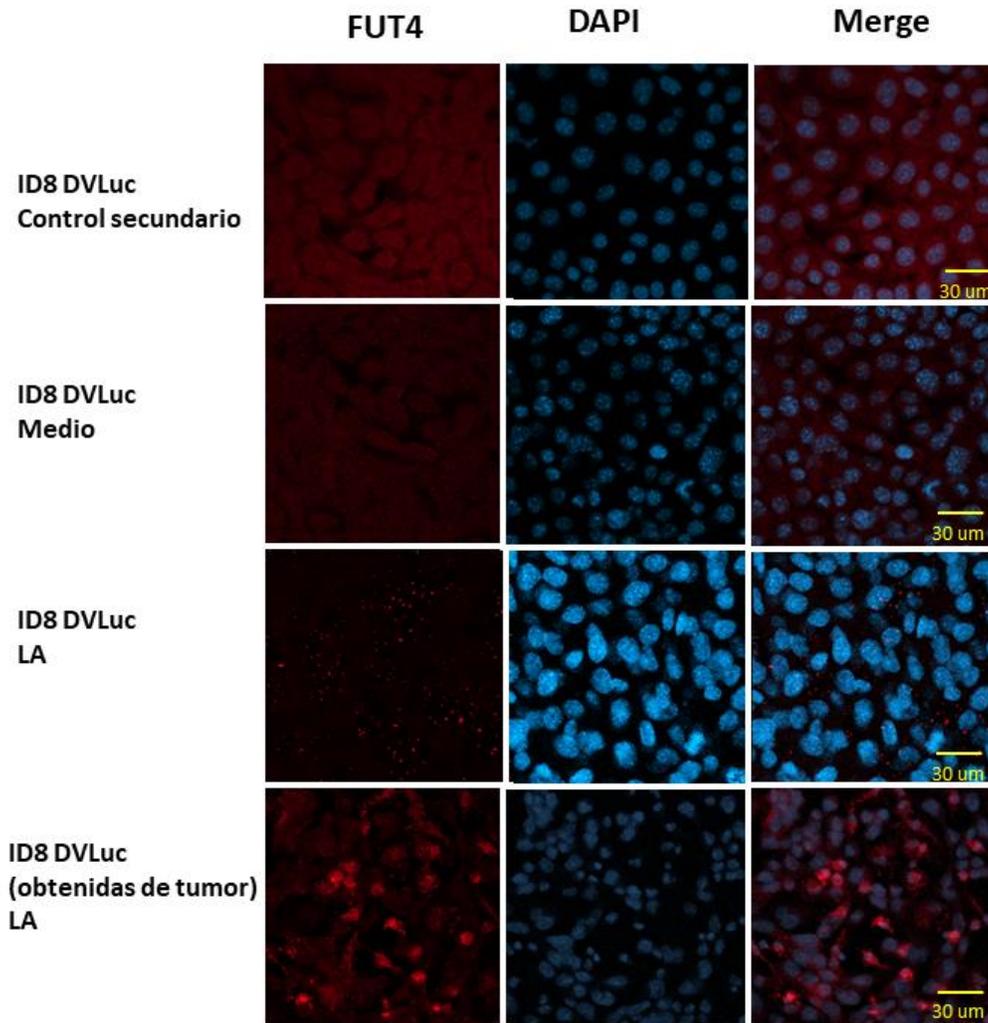


Figura 6. Inmunofluorescencia para la localización celular de la FUT4 en la línea celular ID8 DVLuc. Imagen representativa de la localización celular de la FUT4 en células en medio, estimuladas con LA durante 24 h, los núcleos se marcaron con DAPI y la FUT4 con Alexa flúor 647. Magnificación 40X.

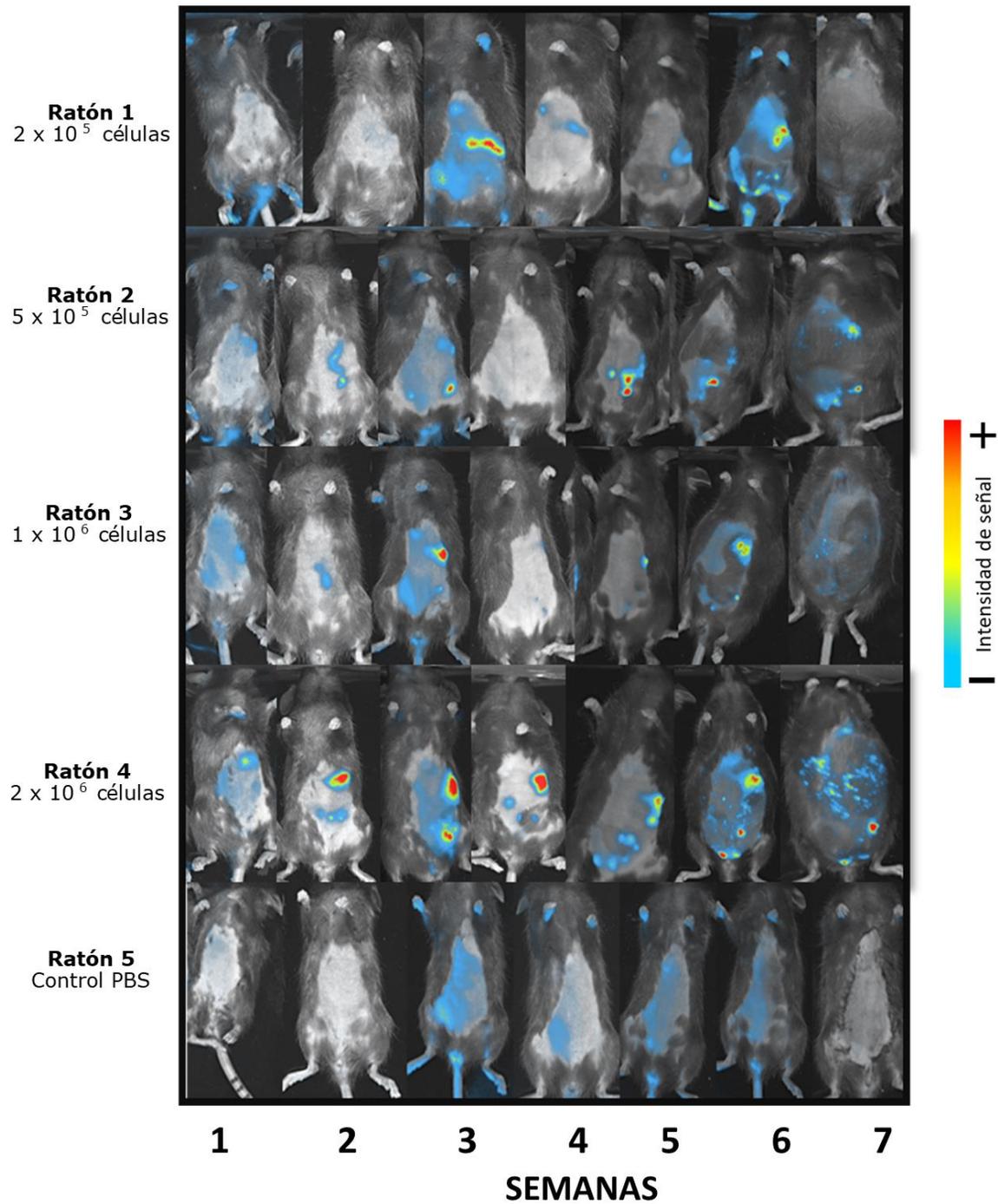
Evaluación de la progresión tumoral en el modelo experimental C57BL/6 con diferentes inóculos de células ID8DVLuc.

Se realizó un estudio para evaluar el impacto de diferentes cantidades de inóculo en el desarrollo de la enfermedad. Se observó que, aunque todas las cantidades de inóculo produjeron una enfermedad similar, hubo diferencias en el tiempo de aparición y progresión. Los ratones inoculados con 200,000 y 500,000 células experimentaron un retraso en el desarrollo de la enfermedad, mientras que aquellos inoculados con 1,000,000 y 2,000,000 de células mostraron una progresión más rápida. Un hallazgo importante fue la acumulación de líquido ascítico, una característica distintiva de la enfermedad en pacientes con este diagnóstico, que se observó a partir de la quinta semana en los ratones inoculados con mayores cantidades de células. Esto sugiere una correlación entre la cantidad de inóculo y la gravedad de la enfermedad.

Para monitorear visualmente el desarrollo tumoral, se utilizaron imágenes obtenidas con el equipo de imagenología bioluminiscente Newton 7.0 (VILBER). Además, se realizaron mediciones periódicas de peso, circunferencia y diámetro en los ratones para complementar la evaluación visual. Estos parámetros fueron cruciales para establecer los ajustes técnicos del equipo, como determinar la cantidad precisa de sustrato de luciferina para cada ratón, el tiempo de exposición adecuado en el equipo de imagenología bioluminiscente, así como la cantidad óptima de anestesia y oxígeno para mantener a los ratones en condiciones ideales durante las mediciones.

Este enfoque integral permitió una evaluación precisa del desarrollo tumoral en los ratones y proporcionó información valiosa para comprender la relación entre la cantidad de inóculo y la progresión de la enfermedad.

A



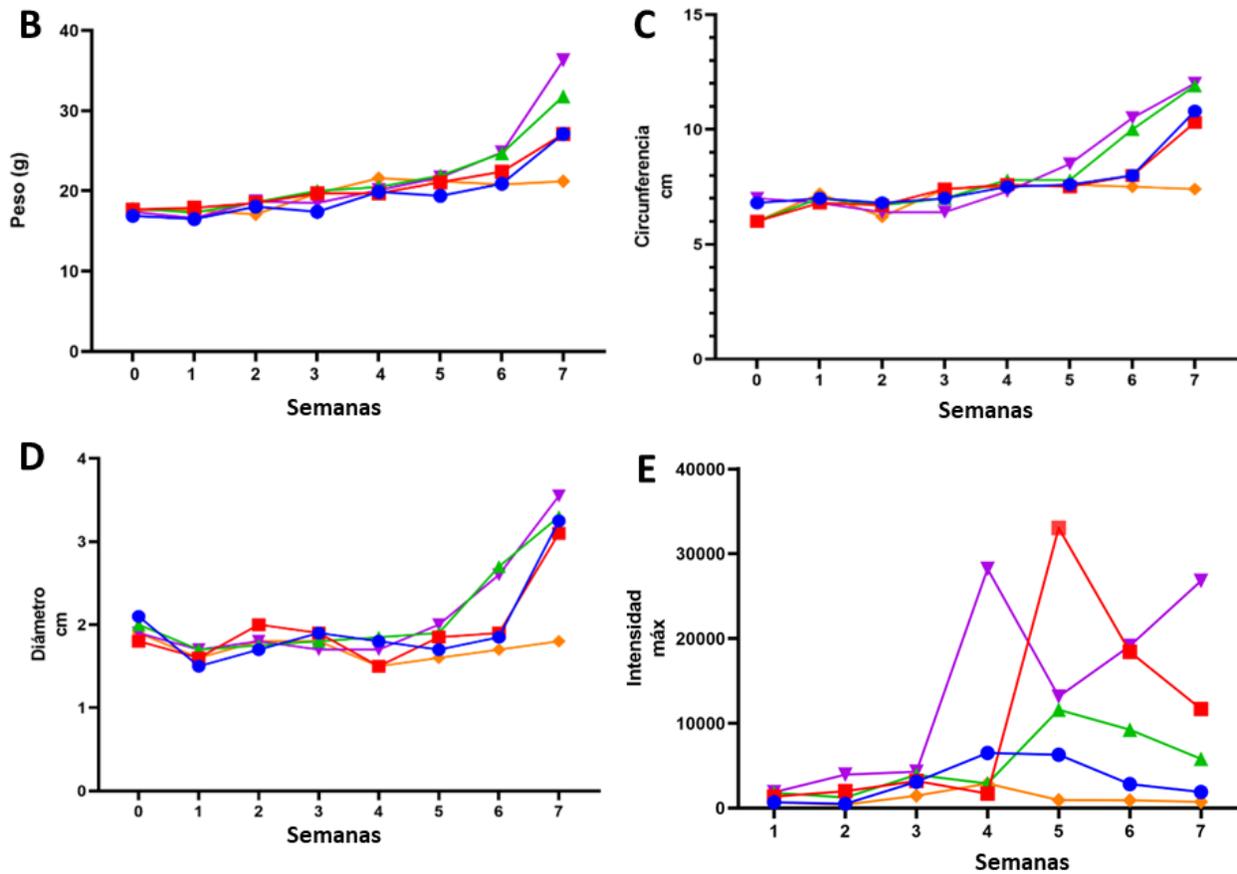


Figura 7. Evaluación de la progresión tumoral en el modelo experimental C57BL/6 con diferentes inóculos de células ID8DVLuc. A) Imagenología bioluminiscente de ratones inoculados con células ID8 DVLuc. B) Peso de los ratones durante el desarrollo tumoral. C) Circunferencia de los ratones durante el desarrollo tumoral. D) Diámetro de los ratones durante el desarrollo tumoral. E) Intensidad máxima de la señal obtenida de la imagenología bioluminiscente de los ratones durante el desarrollo tumoral.

Imagenología bioluminiscente de órganos de ratones inoculados con células ID8DVLuc.

Después de realizar el sacrificio de los ratones inoculados con 1 y 2×10^6 células, se procedió a realizar la extracción de los órganos para su análisis. Durante esta etapa, se observó un patrón de migración de las células ID8DVLuc hacia diferentes órganos, los cuales se identificaron en función de la intensidad de la señal. Estos órganos, clasificados de mayor a menor intensidad de señal, fueron el epiplón, el intestino grueso, el bazo, el intestino delgado, el hígado y el estómago, como se detalla en la Tabla 2.

Resultó evidente una clara diferencia entre los ratones inoculados con diferentes cantidades de células. Específicamente, en el ratón inoculado con la mayor cantidad de células, se observó una intensidad de señal más pronunciada en el órgano correspondiente. En cuanto al tamaño de los órganos, no se detectaron cambios significativos entre ambos ratones, como se puede apreciar en la Figura 7-A.

Estas observaciones proporcionan una visión más detallada y descriptiva de la migración de las células ID8DVLuc en relación con los diferentes órganos y su intensidad de señal. Dichos resultados contribuyen a un mejor entendimiento de los patrones de metástasis y distribución de las células en este modelo experimental.

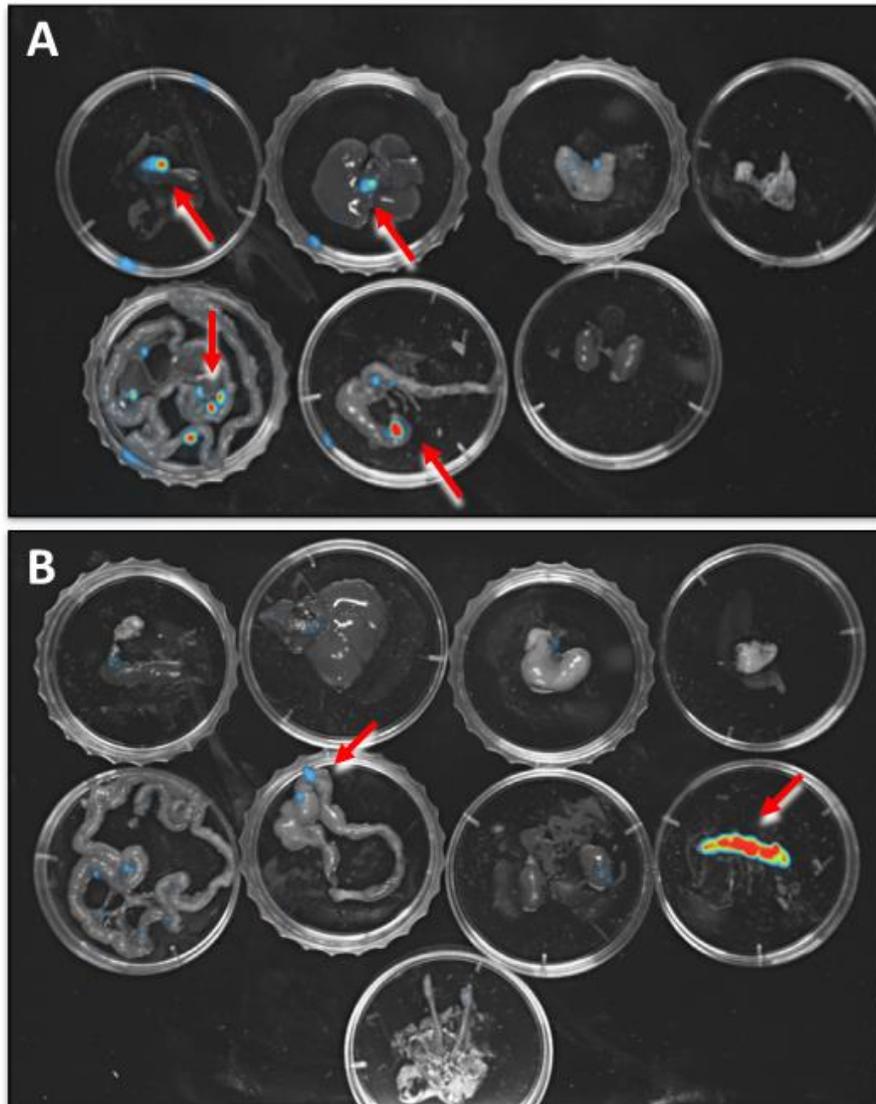


Figura 8. Imagenología bioluminiscente de órganos de ratones inoculados con células ID8DVLuc. A) De izquierda derecha, bazo, hígado, estómago, ovarios, intestino delgado, intestino grueso, riñones del ratón 3 inoculado con 1×10^6 de células. B) Bazo, hígado, estómago, intestino delgado, intestino grueso, riñones, epiplón, ovarios/trompas de falopio del ratón inoculado con 2×10^6 de células.

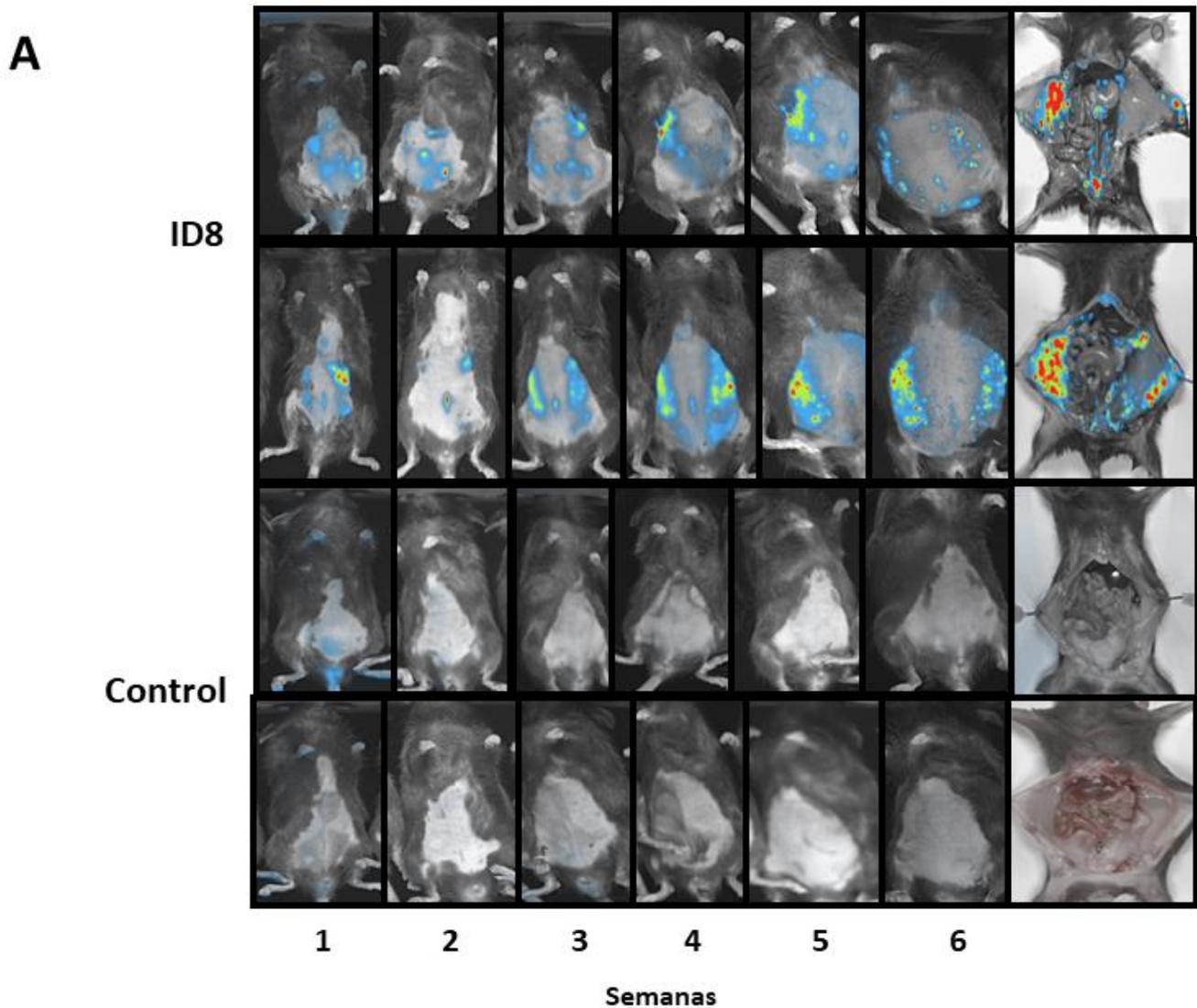
Seguimiento de la progresión tumoral en el modelo experimental C57BL/6.

La metodología propuesta permitió llevar a cabo un seguimiento detallado del desarrollo tumoral *in vivo*, brindándonos un valioso patrón de imágenes y datos medibles que reflejaban la progresión del tumor a lo largo del tiempo. Durante las primeras dos semanas, se observó un comportamiento similar en los ratones, sin cambios significativos en los parámetros evaluados ni en la intensidad de la señal obtenida mediante imagenología (Figura 8).

A partir de la tercera semana, se produjo un cambio notable en los resultados. Los grupos de ratones inoculados con ID8DVLuc mostraron aumentos significativos en las mediciones realizadas, esto en comparación con los grupos control los cuales siguieron un comportamiento sin aumentos significativos en ninguna de las semanas. Estos resultados fueron respaldados por análisis estadísticos rigurosos y correlacionaron directamente con los hallazgos obtenidos a través de la imagenología bioluminiscente (Figura 9). Conforme la enfermedad avanzaba, se observaba un aumento progresivo en la intensidad máxima de la señal, lo que indicaba un crecimiento tumoral más pronunciado.

Además, al examinar el interior de los ratones mediante imagenología bioluminiscente, se detectó una abundante presencia de microimplantes en la cavidad peritoneal y los órganos internos. El peritoneo, en particular, se destacó como el lugar donde se encontraba la mayor concentración de estos microimplantes, lo que evidenciaba la tendencia del tumor a extenderse y colonizar dicho tejido (Figura 9).

Estas observaciones detalladas y descriptivas resaltan la efectividad de la metodología propuesta para realizar un seguimiento exhaustivo de la progresión tumoral *in vivo*. Los datos cuantificables obtenidos, junto con los patrones de imagen, nos brindan una comprensión más profunda de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo y la expansión del tumor.



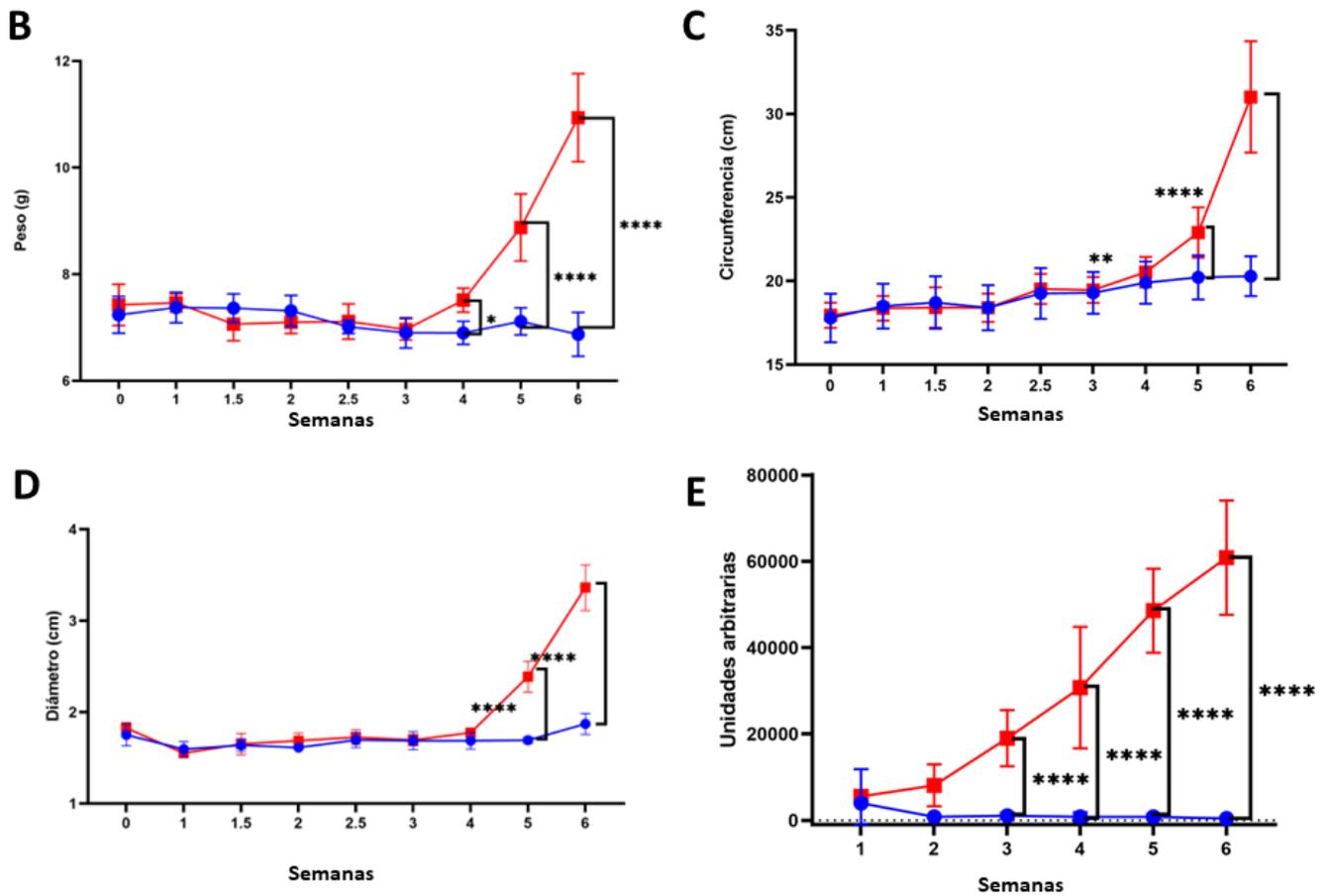


Figura 9. Seguimiento de la progresión tumoral en el modelo experimental C57BL/6. Se inocularon ratones hembra de la cepa C57BL6 (n=8) con células ID8DVLuc y los controles con PBS, sacrificados a las 6 semanas post inoculación. A) Imágenes representativas de ratones inoculados con la línea celular ID8DVLuc, en distintos tiempos del desarrollo tumoral. B) Gráfico de la variación de peso. C) Gráfico de la circunferencia. D) Gráfico del diámetro. E) Gráfico de la intensidad máxima de la señal obtenida de la imagenología bioluminiscente.

Niveles de expresión de FUT4 en células recuperadas de lavado peritoneal de ratones inoculados con células ID8DVLuc.

La proteína FUT4 desempeña un papel crucial en las células ID8DVLuc, y su presencia se ha investigado durante el desarrollo de la enfermedad. Durante la primera semana de progresión tumoral en ratones, se realizó un análisis por citometría de flujo el cual reveló, a partir de la primer semana de inoculación, aproximadamente 690 unidades de intensidad de fluorescencia (IMF) de células positivas para FUT4. En la segunda semana, esta cifra aumentó significativamente a 1600 IMF, indicando un incremento en la expresión de la proteína a medida que la enfermedad avanzaba; estos resultados alcanzaron su mayor pico en la semana tres con 2500 IMF, mientras que en la cuarta y quinta semanas esta expresión mostró una cifra promedio de 2000 IMF, que aunque disminuyó, se mantuvo durante estas dos semanas, semejando un comportamiento estacional una vez que la enfermedad se encuentra establecida (Figura 10 A). Estos datos fueron corroborados con el análisis porcentual de la IMF. Los resultados de acuerdo a la semana de progresión fueron los siguientes: Semana 1: 31.1 %, semana 2 : 28.9 %, semana 3: 50%, semana 4: 59.7 % y semana 5: 48.7 %. A pesar de las diferencias en el porcentaje de IMF, los cambios detectados en la expresión de la FUT4 no mostraron una diferencia estadísticamente significativa (Figura 10 B).

Ahora bien los resultados de la técnica de inmunofluorescencia aplicada a las células obtenidas del lavado peritoneal durante la primera semana brindaron información valiosa sobre las características morfológicas. En la primer semana de progresión de la enfermedad todas las células observadas fueron positivas para

GFP. Las células estimuladas con LA presentaron una forma alargada, la presencia de FUT4 en las células estimuladas con LA se observó de manera perinuclear, mientras que en las células estimuladas con medio se observó su presencia en forma de vesículas intracelulares, lo que sugiere una posible actividad de secreción, (Figura 11). En la segunda semana las células presentaron un compartimiento similar al de la primera semana, sin embargo la presencia de FUT4 se observó en mayor intensidad en la membrana, esto en ambas condiciones (Medio y LA). No hubo mayor diferencia entre la forma de las células de esta semana y la forma fue similar (Figura 12). A partir de la tercera semana se observó un cambio morfológico de las células, ya que presentaron una forma estrellada. La presencia de FUT4 fue observada en vesículas nuevamente (Figura 13). En cuanto a los núcleos su forma se mantuvo igual en todas las semanas de estudio. La semana cuatro presentó adicionalmente células más pequeñas las observadas anteriormente, la diferencia es fácilmente identificable, estas células también fueron positivas para GFP, así como para la presencia de la FUT4, la intensidad de señal fue menor pero aún visible. La presencia de la FUT4 en células estimuladas con medio fue en toda la extensión de la célula mientras que en LA se volvió a observar en forma de vesículas localizadas principalmente en la membrana de la célula (Figura 14). La quinta semana de desarrollo de la enfermedad presentó características distintas a las semanas anteriores, comenzando por que se observaron células que no fueron positivas para GFP, sin embargo la forma de estas no fue distinta a las de las semanas anteriores, la presencia de la FUT4 fue evidente en ambas condiciones siendo las células estimuladas con medio las que presentaron a esta proteína en forma de vesículas mientras que las células estimuladas con LA se observaron con

una acumulación de la proteína de manera perinuclear (Figura 15). Estos resultados correlacionaron con la IMF del basal celular el cual fue tomado de la expresión total de FUT4 en las células ID8DVLuc el cual alcanzo un promedio de 450 IMF.

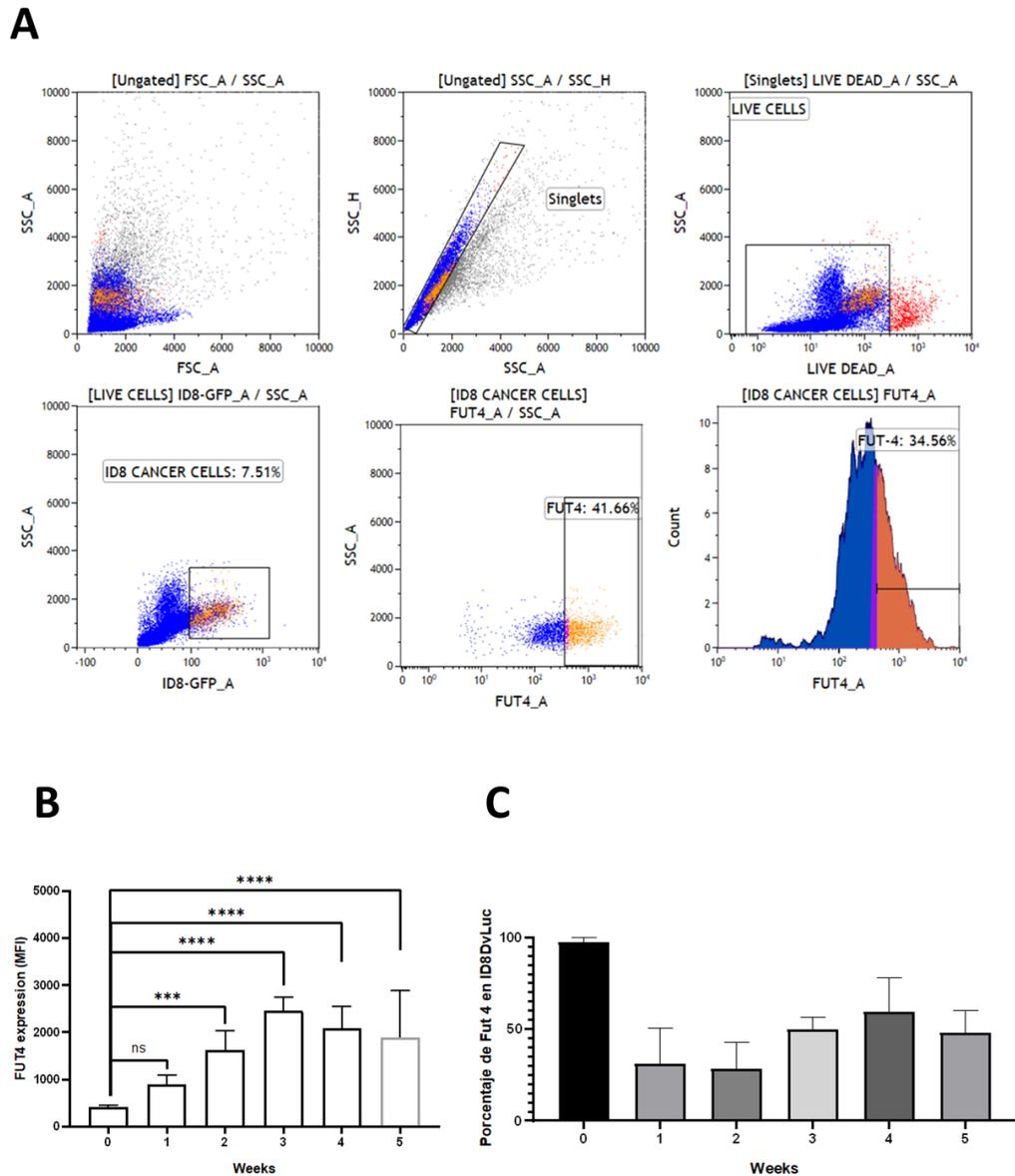


Figura 10. Niveles de expresión de FUT4 en células recuperadas de lavado peritoneal de ratones inoculados con células ID8DVLuc. Se inocularon ratones hembra de la cepa C57BL6 (n=3) con células ID8DVLuc y los controles con PBS, sacrificados 1, 2, 3, 4 y 5 semanas post inoculación. A) Gráfico de citometría de flujo representativo de FUT4 en células extraídas de lavado peritoneal. B) Gráfico de la intensidad media de fluorescencia de la primera a la quinta semanas del desarrollo tumoral.

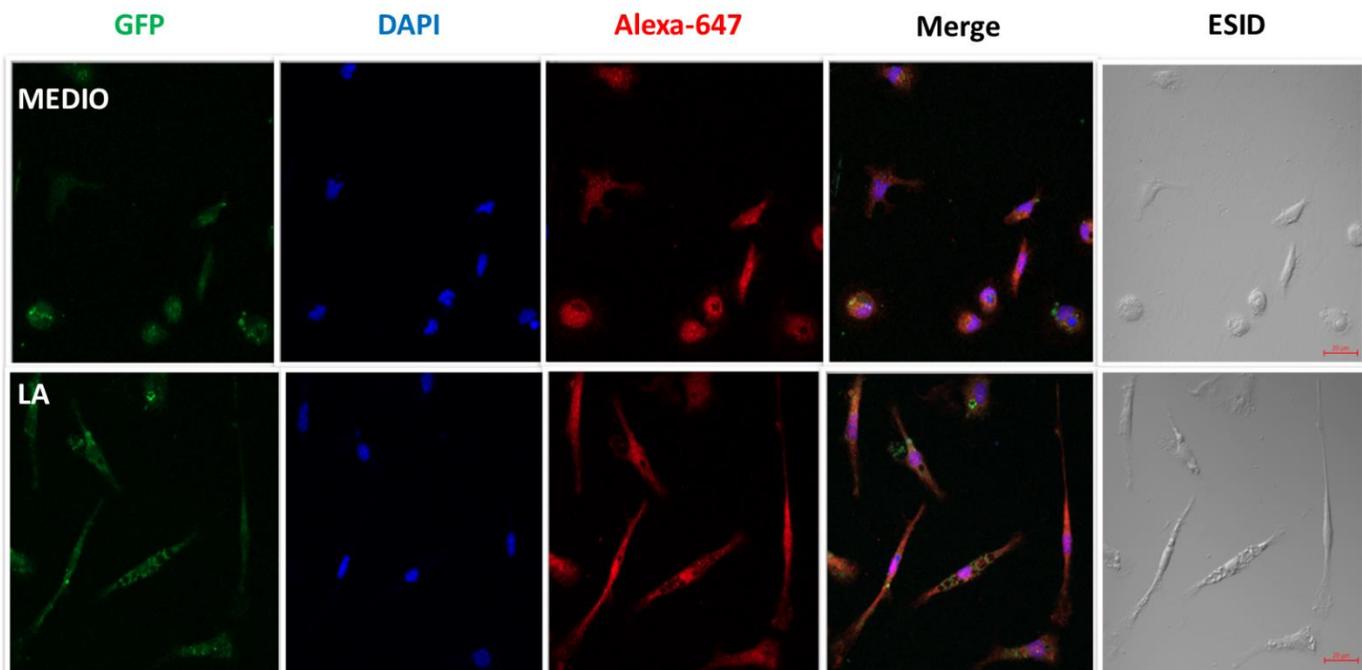


Figura 11. Inmunofluorescencia de células recuperadas de lavado peritoneal en la semana 1 de desarrollo del CaOv. Cultivadas en medio y LA durante 24 h.

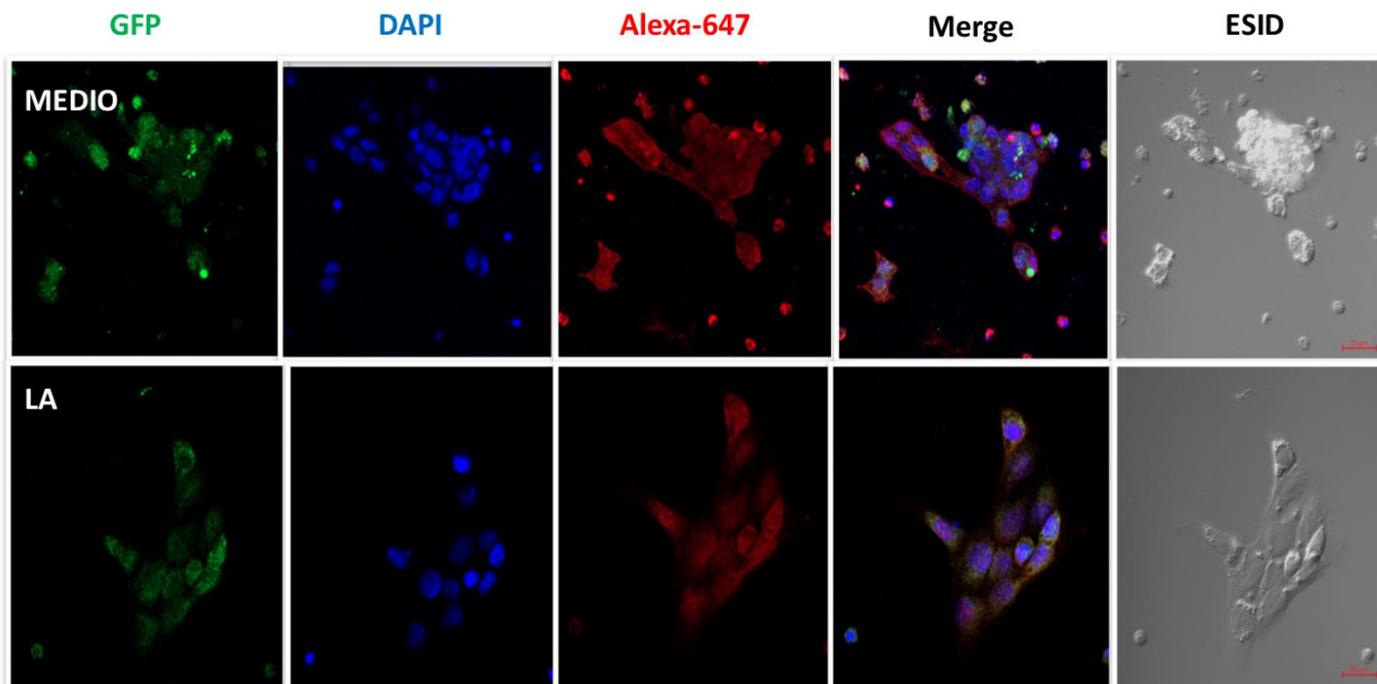


Figura 12. Inmunofluorescencia de células recuperadas de lavado peritoneal en la semana 2 de desarrollo del CaOv. Cultivadas en medio y LA durante 24 h.

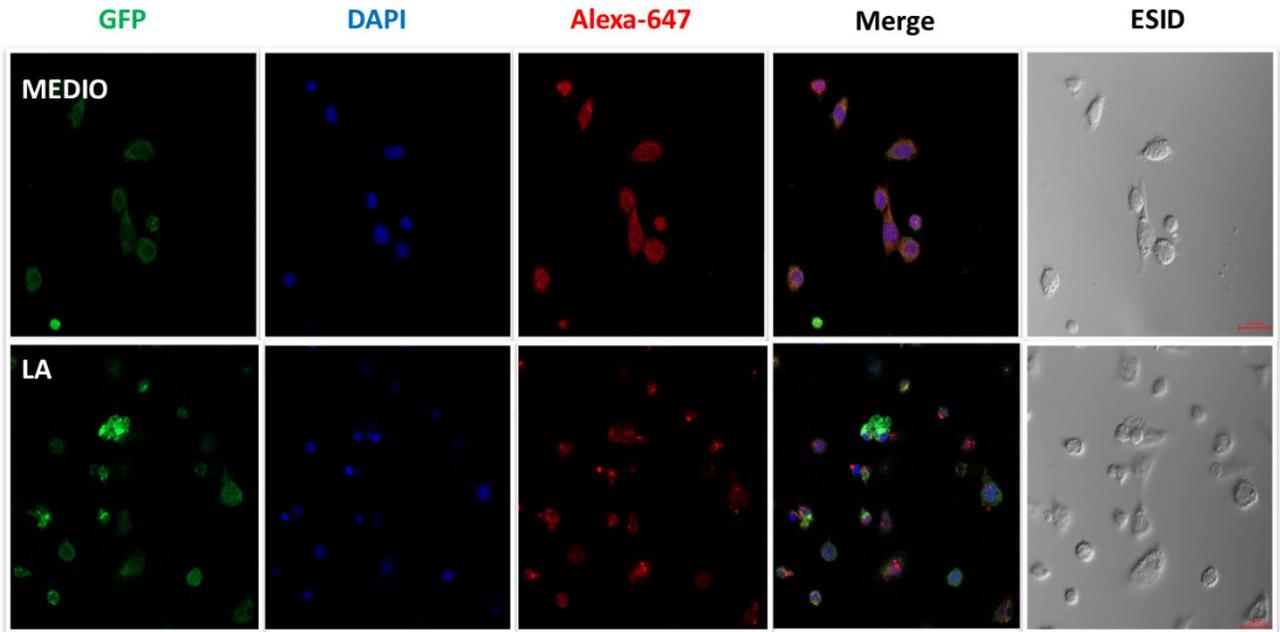


Figura 13. Inmunofluorescencia de células recuperadas de lavado peritoneal en la semana 3 de desarrollo del CaOv. Cultivadas en medio y LA durante 24 h.

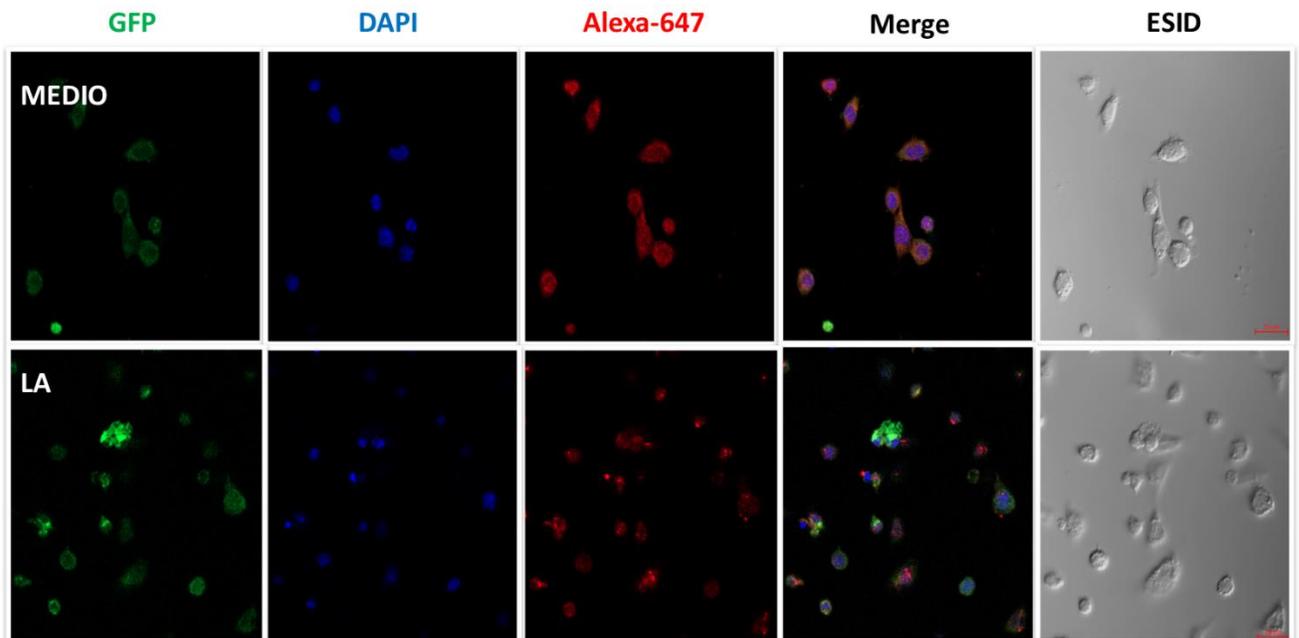


Figura 14. Inmunofluorescencia de células recuperadas de lavado peritoneal en la semana 4 de desarrollo del CaOv. Cultivadas en medio y LA durante 24 h.

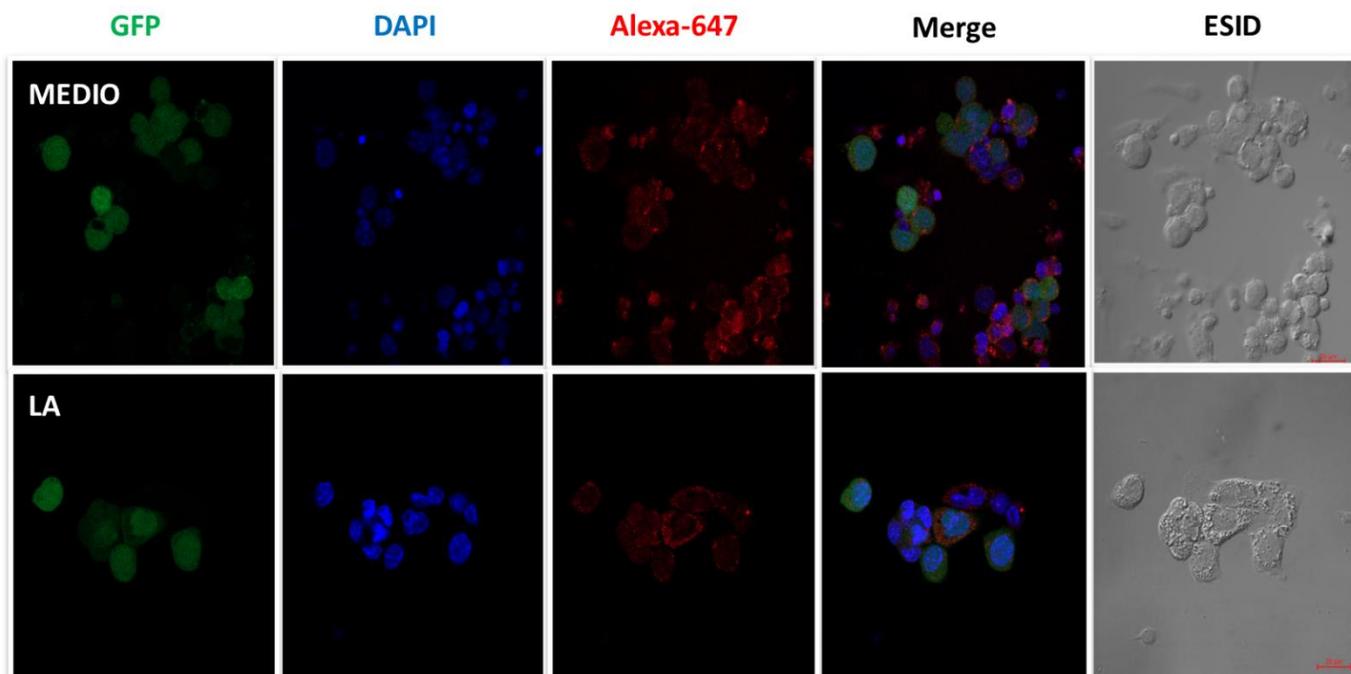


Figura 15. Inmunofluorescencia de células recuperadas de lavado peritoneal en la semana 5 de desarrollo del CaOv. Cultivadas en medio y LA durante 24 h.

DISCUSIÓN

La fucosiltransferasa 4 (FUT4) es una enzima que pertenece a la familia de las fucosiltransferasas, que juegan un papel crucial en la modificación de glicoproteínas y glicolípidos mediante la adición de residuos de fucosa (Biosynthesis of Complex Mucin-Type O-Glycans, 2010). La FUT4 se encuentra ampliamente distribuida en diversos tejidos y células, y desempeña un papel fundamental en la síntesis de oligosacáridos fucosilados (Lu et al., 2020).

Un aspecto relevante de la FUT4 es su participación en la síntesis del antígeno Lewis X (LeX), un determinante estructural importante en la superficie de células y moléculas que está involucrado en una variedad de procesos biológicos, incluyendo la adhesión celular y las interacciones entre células y su entorno (Aziz et al., 2022). La FUT4 cataliza la transferencia de un residuo de fucosa al antígeno precursor, generando así el LeX (Zhang et al., 2008).

El análisis de alineamiento de las secuencias de la proteína FUT4 del ratón y la proteína FUT4 humana reveló un grado de identidad del 74.2%. Esto indica que hay una considerable similitud en la composición de aminoácidos entre ambas proteínas. Sin embargo, también hay diferencias, ya que la proteína FUT4 humana consta de 433 aminoácidos, mientras que la proteína FUT4 del ratón consta de 530 aminoácidos (Figura 5). Esta diferencia en la longitud de la proteína puede implicar variaciones en su estructura y función.

Ambas proteínas comparten una organización similar en términos de su dominio estructural, que incluye un dominio luminal, un dominio transmembranal y un

dominio citoplasmático. Esta similitud en la organización de dominios sugiere que las proteínas FUT4 en ratones y humanos pueden tener funciones conservadas y desempeñar funciones similares en los procesos biológicos.

Un hallazgo importante es que los sitios de modificación post-traducciona para ambas proteínas se encuentran en el mismo aminoácido. Esto indica que los mecanismos de regulación y procesamiento de las proteínas FUT4 pueden ser similares en ratones y humanos. Estos sitios de modificación post-traducciona pueden ser cruciales para la función y la actividad de la FUT4 en ambos organismos.

En cuanto al anticuerpo utilizado en los experimentos, el FUT4 Rabbit pAb (A16320), se encontró que este anticuerpo policlona está dirigido específicamente a la proteína FUT4 humana. Sin embargo, se observó que también tiene la capacidad de reconocer la proteína FUT4 de ratón y rata. Esto implica que existen regiones conservadas en la estructura de la FUT4 entre estas especies, lo que permite que el anticuerpo reconozca la proteína FUT4 de ratón de manera efectiva.

En cuanto a los resultados de la inmunofluorescencia éstos revelaron diferencias en la expresión y la distribución de la proteína FUT4 en las células ID8DVLuc bajo diferentes condiciones de estimulación. Se observó que las células cultivadas en medio mostraron una señal débil de FUT4 en comparación con las células estimuladas con líquido ascítico y las células obtenidas de ratones.

Cuando se utilizó LA como estímulo, se observó una expresión más pronunciada de la proteína FUT4. Además, la FUT4 se presentó en forma de vesículas en las células estimuladas, lo que sugiere una posible acumulación intracelular. Por otro lado, en

las células obtenidas del líquido ascítico de ratón, se observó una localización preferente de la proteína cerca de la membrana celular.

Estos hallazgos indican que la estimulación con LA de ratón tiene un impacto significativo en la expresión y la distribución de la proteína FUT4 en las células ID8DVLuc. Es posible que los componentes presentes en el líquido ascítico actúen como factores de señalización (Matte et al., 2014), que promueven la expresión y la localización de la FUT4 en las células.

La acumulación intracelular de la proteína FUT4 en forma de vesículas observada en las células estimuladas sugiere la existencia de mecanismos de transporte y procesamiento intracelular específicos para la FUT4 en respuesta al estímulo del LA. Estos mecanismos podrían estar involucrados en la regulación de la actividad de la FUT4 y su función en la síntesis de proteínas fucosiladas (Alberto-Aguilar et al., 2019).

La localización preferente de la FUT4 cerca de la membrana celular en las células obtenidas del LA de ratón puede indicar un papel crucial de la FUT4 en la interacción de las células con su entorno extracelular. Esto sugiere que la FUT4 puede desempeñar un papel en la adhesión celular, la comunicación celular y otros procesos que implican la interacción de las células con su microambiente.

Los resultados del estudio demostraron que la cantidad de inóculo de células ID8DVLuc tuvo un impacto significativo en el desarrollo y la progresión de la enfermedad en el modelo experimental. Aunque todas las cantidades de inóculo

produjeron una enfermedad similar, se observaron diferencias en el tiempo de aparición y la velocidad de progresión.

Los ratones inoculados con 2 y 5×10^5 células experimentaron un periodo de latencia en el desarrollo de la enfermedad, lo que indica el requerimiento de un inóculo mínimo para lograr un desarrollo tumoral adecuado en comparación con los ratones inoculados con 1 y 2×10^6 células, que mostraron una progresión más rápida de la enfermedad. Estos hallazgos sugieren una correlación entre la cantidad de inóculo y la gravedad de la enfermedad en este modelo experimental.

Un hallazgo relevante del estudio fue la observación de la acumulación de líquido ascítico, una característica distintiva de la enfermedad en pacientes con diagnóstico similar, que se observó a partir de la quinta semana en los ratones inoculados con mayores cantidades de células. Esta observación refuerza la similitud entre el modelo experimental y la enfermedad humana, lo que aumenta la relevancia clínica de los resultados obtenidos.

El uso de imágenes obtenidas con el equipo de imagenología bioluminiscente, permitió el monitoreo visual del desarrollo tumoral en los ratones. Además, las mediciones periódicas de peso, circunferencia y diámetro proporcionaron datos cuantitativos complementarios a la evaluación visual. Estos parámetros fueron cruciales para establecer los ajustes técnicos del equipo así como determinar la cantidad precisa de sustrato de luciferina, el tiempo de exposición adecuado, la cantidad óptima de anestesia y oxígeno para mantener a los ratones en condiciones ideales durante la toma de las imágenes.

El estudio de imagenología bioluminiscente reveló un patrón de migración de las células ID8DVLuc hacia diferentes órganos en los ratones inoculados. Los órganos se identificaron en función de la intensidad de la señal, y se observó un orden de mayor a menor intensidad de señal en el epiplón, el intestino grueso, el bazo, el intestino delgado, el hígado y el estómago. La diferencia en la intensidad de señal entre los ratones inoculados con diferentes cantidades de células fue evidente. Específicamente, el ratón inoculado con la mayor cantidad de células presentó una intensidad de señal más pronunciada en el epiplón, el cual se sabe es un órgano por el cual existe una mayor afinidad de las células tumorales. Lo anterior debido a que las células de cáncer de ovario metastatizan por vía hematológica al epiplón y es que el eje ErbB3-neuregulina1 (NRG1) es una vía dominante responsable de la metástasis epiplón hematológica (Pradeep et al., 2014). Los niveles elevados de ErbB3 en las células de cáncer de ovario y de NRG1 en el epiplón permitieron la localización y el crecimiento de células tumorales (Pradeep et al., 2014). Esto indica que la migración y la acumulación de células ID8DVLuc en los órganos están influenciadas por la cantidad de células inyectadas y los receptores que estas células tienen.

Aunque no se observaron cambios significativos en el tamaño de los órganos entre los ratones, es importante tener en cuenta que el tamaño del órgano puede no reflejar necesariamente la carga tumoral. La intensidad de señal detectada por la imagenología bioluminiscente proporciona una medida más precisa de la presencia y distribución de las células ID8DVLuc en los órganos.

Estos hallazgos proporcionan una visión más detallada y descriptiva de la migración de las células ID8DVLuc en relación con diferentes órganos y su intensidad de señal. La capacidad de las células tumorales para migrar y establecerse en órganos específicos es un proceso crucial en la formación de metástasis y la progresión del cáncer y es que este proceso se compone de una serie de eventos secuenciales que deben completarse para que la célula tumoral haga metástasis con éxito, la llamada cascada metastásica, proceso que contribuye con la complejidad del cáncer como enfermedad múltiple. Durante la cascada metastásica, los cambios en la adhesión célula-célula y célula-matriz son de suma importancia (Martin et al., 2013). Comprender estos patrones de migración y distribución de las células en este modelo experimental puede ayudar a mejorar la comprensión de los mecanismos de metástasis y abrir nuevas vías para el desarrollo de enfoques terapéuticos dirigidos a órganos específicos.

La metodología empleada en este estudio permitió un seguimiento detallado y en tiempo real del desarrollo tumoral *in vivo*, proporcionando patrones de imágenes y datos medibles que reflejaban la progresión del tumor a lo largo del tiempo. Durante las primeras dos semanas, no se observaron cambios significativos en los parámetros evaluados ni en la intensidad de la señal obtenida.

Sin embargo, a partir de la tercera semana, se produjo un cambio notable en los resultados. Tanto los grupos de ratones inoculados con ID8DVLuc como los grupos de control mostraron aumentos significativos en las mediciones realizadas. Estos resultados fueron respaldados por análisis estadísticos y se correlacionaron directamente con los hallazgos obtenidos a través de la imagenología

bioluminiscente. A medida que la enfermedad avanzaba, se observó un aumento progresivo en la intensidad máxima de la señal, lo que indica un crecimiento tumoral más pronunciado.

Al examinar el interior de los ratones mediante imagenología bioluminiscente, se detectó una abundante presencia de microimplantes en la cavidad peritoneal y los órganos internos. Se observó que el peritoneo era el lugar con la mayor concentración de estos microimplantes, lo que evidenciaba la tendencia del tumor a extenderse y colonizar dicho tejido. Estas observaciones detalladas y descriptivas demuestran la efectividad de la metodología propuesta para realizar un seguimiento exhaustivo de la progresión tumoral *in vivo*. Los datos cuantificables obtenidos, junto con los patrones de imagen reveladores, brindan una comprensión más profunda de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo y la expansión del tumor.

El seguimiento continuo y en tiempo real de la progresión tumoral en el modelo experimental C57BL/6 permite obtener información clave sobre la dinámica del tumor y su comportamiento en el contexto del organismo vivo. Estos resultados proporcionan una base sólida para futuras investigaciones y contribuyen al desarrollo de estrategias de diagnóstico y tratamiento más efectivas en el ámbito de la oncología.

Respecto a la proteína FUT4, se analizó el patrón de expresión en las células ID8DVLuc durante el desarrollo de la enfermedad. Fue posible detectar a la FUT4 desde la primera semana post-inoculación; sin embargo, se observó un aumento significativo en los niveles de expresión de FUT4 a medida que la enfermedad avanzaba. Durante la primera semana de progresión tumoral en ratones, se detectó

una presencia de aproximadamente 690 unidades de intensidad de fluorescencia (IMF) de células positivas para FUT4. Sin embargo, en la segunda semana, esta cifra aumentó significativamente a 2260 IMF (Intensidad Media de Fluorescencia), lo que indica un incremento en la expresión de la proteína a medida que la enfermedad progresa.

Estos hallazgos detallados y descriptivos nos proporcionan una visión más clara de la dinámica de expresión de la proteína FUT4 durante el desarrollo tumoral.

Los resultados de la técnica de inmunofluorescencia aplicada a las células obtenidas del lavado peritoneal durante la primera semana proporcionaron información valiosa sobre las características morfológicas de estas células. Se observó una forma alargada de las células, lo que sugiere que éstas han sufrido el proceso de la transición epitelio-mesenquimal, así como la presencia de vesículas intracelulares, sugiriendo una posible actividad de secreción. Sin embargo este proceso y los mecanismos involucrados aún no se describen. Además, se detectó una intensa señal de FUT4 en estas células, indicando una alta concentración de la proteína en la superficie celular. Por otro lado, las células cultivadas en medio de cultivo mostraron una señal más débil pero aún presente de FUT4, lo que indica una expresión continua de la proteína.

En la segunda semana después de la inoculación, se observaron cambios morfológicos distintivos en las células recuperadas del lavado peritoneal. A diferencia de la primera semana, estas células se observaron más pequeñas y con una forma más redondeada. Sin embargo, a pesar de estas diferencias en la morfología, se pudo detectar una señal positiva para FUT4 en estas células, lo que

sugiere que la expresión de la proteína se mantiene a lo largo de la progresión de la enfermedad. Estos hallazgos detallados y descriptivos proporcionan una visión más clara de la dinámica de expresión de la proteína FUT4 durante el desarrollo tumoral en las células ID8DVLuc. Además, sugieren posibles implicaciones funcionales de FUT4 en estas células. La alta concentración de FUT4 en las dos primeras semanas de desarrollo tumoral de la proteína indican un posible papel crucial de FUT4 en los procesos biológicos relacionados con la enfermedad y la actividad de las células tumorales.

Estos resultados contribuyen al conocimiento actual sobre la regulación de la expresión de FUT4 en células tumorales y pueden tener implicaciones importantes en la comprensión de los mecanismos de progresión tumoral y la identificación de posibles objetivos terapéuticos en el futuro.

CONCLUSION

Los resultados obtenidos en nuestros estudios permiten concluir que la proteína FUT4 se expresa a lo largo del desarrollo tumoral, lo que permite sugerir su uso potencial como biomarcador para etapas tempranas. Su localización subcelular se observó principalmente en vesículas en la línea celular ID8DVLuc. Además, observamos que FUT4 es detectable en las células de ratones con CaOv desde la primera semana de progresión de la enfermedad y su expresión va en aumento a medida que avanza la enfermedad. Es interesante destacar que se encontró una correlación directa entre el incremento en la expresión de FUT4 y la intensidad de la señal de bioluminiscencia. Estos hallazgos sugieren fuertemente que FUT4 podría desempeñar un papel como biomarcador de diagnóstico en etapas tempranas y también en la progresión de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

- Alberto-Aguilar, D. R., Hernández-Ramírez, V. I., Osorio-Trujillo, J. C., Gallardo-Rincón, D., Toledo-Leyva, A., & Talamás-Rohana, P. (2019). Ascites from Ovarian Cancer Induces Novel Fucosylated Proteins. *Cancer Microenvironment*, 12(2), 181-195. <https://doi.org/10.1007/s12307-019-00227-z>
- American cancer society. (s. f.). *What is Ovarian Cancer | Ovarian Tumors and Cysts*. Recuperado 14 de noviembre de 2022, de <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/what-is-ovarian-cancer.html>
- Arora, T., Mullangi, S., & Lekkala, M. R. (2023). Ovarian Cancer. En *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567760/>
- Aziz, F., Khan, I., Shukla, S., Dey, D. K., Yan, Q., Chakraborty, A., Yoshitomi, H., Hwang, S. K., Sonwal, S., Lee, H., Haldorai, Y., Xiao, J., Huh, Y. S., Bajpai, V. K., & Han, Y. K. (2022). Partners in crime: The Lewis Y antigen and fucosyltransferase IV in Helicobacter pylori-induced gastric cancer. *Pharmacology and Therapeutics*, 232(107994). <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2021.107994>
- Biosynthesis of Complex Mucin-Type O-Glycans*. (2010). 315-350. <https://doi.org/10.1016/B978-008045382-8.00643-2>
- Cabasag, C. J., Fagan, P. J., Ferlay, J., Vignat, J., Laversanne, M., Liu, L., van der Aa, M. A., Bray, F., & Soerjomataram, I. (2022). Ovarian cancer today and tomorrow: A global assessment by world region and Human Development

Index using GLOBOCAN 2020. *International Journal of Cancer*, 151(9), 1535-1541. <https://doi.org/10.1002/ijc.34002>

Cho, S., Sun, Y., Soisson, A. P., Dodson, M. K., Peterson, C. M., Jarboe, E. A., Kennedy, A. M., & Janát-Amsbury, M. M. (2013). Characterization and Evaluation of Pre-clinical Suitability of a Syngeneic Orthotopic Mouse Ovarian Cancer Model. *Anticancer Research*, 33(4), 1317-1324.

Clark, R., Krishnan, V., Schoof, M., Rodriguez, I., Theriault, B., Chekmareva, M., & Rinker-Schaeffer, C. (2013). Milky Spots Promote Ovarian Cancer Metastatic Colonization of Peritoneal Adipose in Experimental Models. *The American Journal of Pathology*, 183(2), 576-591. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.04.023>

Committee on the State of the Science in Ovarian Cancer Research, Board on Health Care Services, Institute of Medicine, & National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. (2016). *Ovarian Cancers: Evolving Paradigms in Research and Care*. National Academies Press (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK367618/>

Coukos, G., Berchuck, A., & Ozols, R. F. (2008). *Ovarian cancer state of the art and future directions in translational research*. Springer.

de Vries, T., Knegtel, R. M., Holmes, E. H., & Macher, B. A. (2001).

Fucosyltransferases: Structure/function studies. *Glycobiology*, 11(10), 119R-128R. <https://doi.org/10.1093/glycob/11.10.119r>

Ford, C. E., Werner, B., Hacker, N. F., & Warton, K. (2020). The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. *British Journal of Cancer*, 123(1), 9-16. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0875-x>

- Hakomori, S. (2002). Glycosylation defining cancer malignancy: New wine in an old bottle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(16), 10231-10233.
<https://doi.org/10.1073/pnas.172380699>
- Hao, Y. Y., Lin, B., Zhao, Y., Zhang, Y. H., Li, F. F., Diao, B., Ou, Y. L., & Zhang, S. L. (2008). [Alpha1,2-fucosyltransferase gene transfection influences on biological behavior of ovarian carcinoma-derived RMG-I cells]. *Fen Zi Xi Bao Sheng Wu Xue Bao = Journal of Molecular Cell Biology*, 41(6), 435-442.
- Lu, H.-H., Lin, S.-Y., Weng, R. R., Juan, Y.-H., Chen, Y.-W., Hou, H.-H., Hung, Z.-C., Oswita, G. A., Huang, Y.-J., Guu, S.-Y., Khoo, K.-H., Shih, J.-Y., Yu, C.-J., & Tsai, H.-C. (2020). Fucosyltransferase 4 shapes oncogenic glycoproteome to drive metastasis of lung adenocarcinoma. *EBioMedicine*, 57, 102846. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2020.102846>
- Lv, Y., Zhang, Z., Tian, S., Wang, W., & Li, H. (2023). Therapeutic potential of fucosyltransferases in cancer and recent development of targeted inhibitors. *Drug Discovery Today*, 28(1), 103394.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.103394>
- Martin, T. A., Ye, L., Sanders, A. J., Lane, J., & Jiang, W. G. (2013). Cancer Invasion and Metastasis: Molecular and Cellular Perspective. En *Madame Curie Bioscience Database [Internet]*. Landes Bioscience.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK164700/>

- Matte, I., Lane, D., Bachvarov, D., Rancourt, C., & Piché, A. (2014). Role of malignant ascites on human mesothelial cells and their gene expression profiles. *BMC Cancer*, *14*, 288. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-14-288>
- Minton, K. (2004). Guess who. *Nature Reviews Immunology*, *4*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nri1468>
- Modugno, F., & Edwards, R. P. (2012). Ovarian Cancer: Prevention, Detection and Treatment of the Disease and Its Recurrence. Molecular Mechanisms and Personalized Medicine Meeting Report. *International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society*, *22*(8), S45-S57. <https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31826bd1f2>
- Muinao, T., Deka Boruah, H. P., & Pal, M. (2018). Diagnostic and Prognostic Biomarkers in ovarian cancer and the potential roles of cancer stem cells—An updated review. *Experimental Cell Research*, *362*(1), 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.10.018>
- Ovarian Cancer Stages | Staging for Ovarian Cancer*. (2018). <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/detection-diagnosis-staging/staging.html>
- PDQ Adult Treatment Editorial Board. (2002). Ovarian Epithelial, Fallopian Tube, and Primary Peritoneal Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. En *PDQ Cancer Information Summaries*. National Cancer Institute (US). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK66007/>
- Pradeep, S., Kim, S. W., Wu, S. Y., Nishimura, M., Chaluvally-Raghavan, P., Miyake, T., Pecot, C. V., Kim, S.-J., Choi, H. J., Bischoff, F. Z., Mayer, J. A.,

- Huang, L., Nick, A. M., Hall, C. S., Rodriguez-Aguayo, C., Zand, B., Dalton, H. J., Arumugam, T., Jeong, L. H., ... Sood, A. K. (2014). Hematogenous metastasis of ovarian cancer: Rethinking mode of spread. *Cancer cell*, 26(1), 77-91. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.002>
- Rein, B. J. D., Gupta, S., Dada, R., Safi, J., Michener, C., & Agarwal, A. (2011a). Potential Markers for Detection and Monitoring of Ovarian Cancer. *Journal of Oncology*, 2011, e475983. <https://doi.org/10.1155/2011/475983>
- Rein, B. J. D., Gupta, S., Dada, R., Safi, J., Michener, C., & Agarwal, A. (2011b). Potential Markers for Detection and Monitoring of Ovarian Cancer. *Journal of Oncology*, 2011, e475983. <https://doi.org/10.1155/2011/475983>
- Sánchez-Barriga, J. J. (2018). Tendencias de mortalidad y años potenciales de vida perdidos por cáncer de ovario en México, 2000-2014. *Gaceta Medica De Mexico*, 154(4), 438-447. <https://doi.org/10.24875/GMM.18003606>
- Tan, D. S., Agarwal, R., & Kaye, S. B. (2006). Mechanisms of transcoelomic metastasis in ovarian cancer. *The Lancet Oncology*, 7(11), 925-934. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(06\)70939-1](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(06)70939-1)
- Terada, K. Y., Ahn, H. J., & Kessel, B. (2016). Differences in risk for type 1 and type 2 ovarian cancer in a large cancer screening trial. *Journal of Gynecologic Oncology*, 27(3), e25. <https://doi.org/10.3802/jgo.2016.27.e25>
- Urban, N., & Drescher, C. (2006). Current and future developments in screening for ovarian cancer. *Women's Health (London, England)*, 2(5), 733-742. <https://doi.org/10.2217/17455057.2.5.733>
- Villegas-Pineda, J. C. (2016). *Importancia de las integrinas, la haptoglobina y la fucosilación en el cáncer epitelial de ovario*. CENTRO DE INVESTIGACIÓN

Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL.

Yang, X., Liu, S., & Yan, Q. (2013). Role of fucosyltransferase IV in epithelial–mesenchymal transition in breast cancer cells. *Cell Death & Disease*, 4(7), e735. <https://doi.org/10.1038/cddis.2013.241>

Zhang, Z., Sun, P., Liu, J., Fu, L., Yan, J., Liu, Y., Yu, L., Wang, X., & Yan, Q. (2008). Suppression of FUT1/FUT4 expression by siRNA inhibits tumor growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1783(2), 287-296. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.10.007>

Rivas-Corchado LM, González-Geroniz M, Hernández-Herrera RJ. Perfil epidemiológico del cáncer de ovario. *Ginecol Obstet Mex*. 2011;79(09):562-568.

Fernández Mojón Sara. 2014. Estudio de expresión de proteínas $\alpha(1,6)$ fucosiladas implicadas en la malignización del cáncer colorrectal. Tesis de Maestría, Universidad de Coruña, España.