



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

*CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN  
DE SEÑAL QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE LA  
ACROGRANINA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS  
DE CÁNCER DE OVARIO*

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

ADRIANA DÍAZ ARIZAGA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

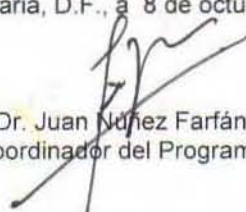
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de agosto de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **DÍAZ ARIZAGA ADRIANA** con número de cuenta **507019693** con la tesis titulada "**CARACTERIZACIÓN DE LAS VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE LA ACROGRANINA EN LÍNEAS CELULARES DERIVADAS DE CÁNCER DE OVARIO**", realizada bajo la dirección del DR. LAURA ELENA DÍAZ CUETO:

Presidente: DR. MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES  
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Secretario: DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO  
Suplente: DR. VILMA MALDONADO LAGUNAS  
Suplente: DR. MARTHA ROBLES FLORES

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 8 de octubre de 2009.

  
Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al **Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina, UNAM**, por la oportunidad otorgada, así como un amplio reconocimiento por su alto nivel de excelencia.

Agradezco al **CONACYT** por su invaluable apoyo económico brindado durante la realización de la maestría. Gracias infinitamente.

Con gratitud y profunda admiración a la **Dra. Laura E. Díaz Cueto**, mi Tutora, por la oportunidad de formar parte de su grupo, porque sin conocerme creyó en mí, por haber sido un gran ejemplo laboral y personal, por su enorme paciencia, su tiempo de calidad y por todas sus exigencias para lograr lo propuesto.

Con gran estimación y agradecimiento a la **Dra. Martha Robles Flores** y a la **Dra. Marcela Lizano Soberón**, miembros de mi Comité Tutorial, por su invaluable apoyo y comprensión.

Con mucho cariño a todos y cada uno de mis compañeros del laboratorio, en especial a **Pablo, Rocío y Erandi**, con quienes compartí gratas experiencias y que al estar a mi lado, me transmitieron aliento para seguir cuando parecía que todo era demasiado complicado.

A cada persona que estuvo a mi alrededor, siendo parte importante durante todo el tiempo que estuve en el laboratorio. Gracias con mucho cariño.

## **A MIS PADRES:**

**María Elena Arizaga S. y José G. Raymundo Díaz V.**

Con todo mi amor y profundo agradecimiento. A mi Mamá por su inmenso e incondicional amor, su total entrega, su gran paciencia y por ser ejemplo vivó de una verdadera mujer. A mi Papá por sus exigencias e incontables ejemplos de lucha con los que dice fuertemente cuánto nos ama, por su invaluable apoyo desde siempre y por todas y cada una de sus sorpresas que nos roban el corazón. A ambos por haber sido mis Padres, regalos de Dios.

Con amor a mis hermanos: **Bety, Ray, Mario y Manuel** por todo su cariño, ayuda y alegría desde mi primer día de vida, por estar siempre cuando más los he necesitado y por compartir una maravillosa familia. Gracias infinitamente.

Con mucho cariño a **Javier, Hilda, Claudia e Ivonne** por formar parte de mi maravillosa familia, donde juntos hemos vivido grandes momentos e incontables experiencias en silencio a causa de los libros.

Con mucha ternura a mis sobrinos: **Ray, Fabis, Iván, Gerardo, Mauri, Diego y Chris**, por no conocer dimensiones para ser felices y regalarme siempre una sonrisa, un abrazo, un beso, logrando así transportarme a su hermoso mundo.

Con cariño a mis verdaderos amigos que han sabido ser leales y con los que he compartido esta travesía. En especial a **Juan Carlos** quien siempre permaneció a mi lado.

Con todo cariño a mi compañero de escuela más especial y verdadero amigo, gracias por tus enseñanzas, por ser tan divertido y brindarme lo mejor. Por los innumerables y gratos momentos desde el comienzo de esta historia... Con todo mi amor a **Guillermo** mi esposo. Te amo.

Con absoluta gratitud y todo mi amor a la fuente de vida, de amor verdadero y ser omnipotente, **DIOS** a quién simplemente le agradezco todo.

## RESUMEN

El cáncer de ovario es un serio problema clínico alrededor del mundo. La mayoría de las mujeres son diagnosticadas después de que el tumor se ha diseminado en la cavidad abdominal. El cáncer de ovario avanzado se caracteriza por metástasis a nódulos linfáticos y a múltiples órganos abdominales, por eso es importante identificar los mecanismos implicados en la migración e invasión de este tipo de cáncer, así como identificar otros posibles tratamientos para esta enfermedad.

En los últimos años, varios estudios han mostrado la sobre-expresión en el cáncer epitelial de ovario de un factor de crecimiento llamado Acrogranina, también conocido como "Factor de crecimiento derivado de células PC (PCDGF), Precursor de Granulinas y Epitelinas (GEP) o Progranulina". Esta sobre-expresión de la Acrogranina en cáncer de ovario ha sido asociada con proliferación celular, invasión, quimioresistencia y una menor supervivencia de las pacientes. Sin embargo, hasta el momento se desconoce cuál o cuáles vías de transducción de señal que participan en el cáncer de ovario están involucradas en la regulación de la expresión de esta proteína. Por lo que el objetivo del presente estudio fue identificar las vías de transducción de señal que regulan la expresión de Acrogranina en dos líneas celulares de cáncer de ovario.

Se determinó la posible relación que pudieran tener las vías de transducción de señal que involucran PKC, PKA, PI3-K, ERK, p38 y Akt en la regulación de la expresión de la Acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3. Para esto, las células fueron cultivadas en presencia de suero fetal bovino (SFB) y de diferentes dosis de cada uno de los inhibidores de las vías de transducción de señal, tales como Calphostin C (PKC), H89 (PKA), LY294002 (PI3-K), Wortmanina (PI3-K), PD98059 (ERK), SB203580 (p38) y el Inhibidor de Akt. El período de incubación fue por 24 h y de 12 h solo para Wortmanina. Los controles fueron células con medio suplementado con SFB en ausencia del inhibidor y en presencia del vehículo (dimetil-sulfóxido, DMSO) utilizado como diluyente para cada inhibidor. La viabilidad celular fue determinada con el estuche CytoTox96 y la expresión de la acrogranina fue determinada por la técnica de western blot y PCR.

Los resultados mostraron que la inhibición de las vías de transducción de señal que involucran PKC y PI3-K disminuyeron las concentraciones de la proteína Acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario. En las células NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3, el Calphostin C (inhibidor de PKC), disminuyó la expresión de la Acrogranina en una forma dosis-dependiente. Sin embargo, el LY294002 (inhibidor de PI3-K) disminuyó la expresión de Acrogranina también de una manera dosis-dependiente en las células SK-Ov-3 pero no en las NIH-Ovcar-3. El Calphostin C y el LY294002 no tuvieron ningún efecto sobre la expresión del RNAm de la Acrogranina en ambas líneas celulares. La inhibición de PKA, ERK, P38 y Akt no tuvieron ningún efecto sobre la expresión de la proteína Acrogranina.

Los resultados sugieren que las vías de transducción de señal que involucran PKC y PI3-K participan en la regulación de la expresión de la proteína Acrogranina en dos diferentes líneas celulares de cáncer de ovario. La inhibición de estas vías de transducción de señal pudiera ser un blanco terapéutico por disminuir las concentraciones de Acrogranina, lo cual reduciría la proliferación e invasión producidas por esta proteína en el cáncer de ovario.

## ABSTRACT

Ovarian cancer is one of serious clinical setting in worldwide and most women are diagnosed after ovarian tumors have spread through the abdominal cavity. Advanced ovarian cancer is characterized by a high frequency of metastasis to lymph nodes and invasive growth into multiple organs due to peritoneal dissemination. Most it has been regarded as an important issue to understand the mechanism involved in ovarian cancer migration and invasion as well as other possible treatments for this disease

More recently, accumulating evidence support a role for a growth factor named Acrogranin in epithelial ovarian cancer. Acrogranin is also known as PC-cell-derived growth factor (PCDGF), Granulin-Epithelin precursor (GEP) or Progranulin. Overexpression of Acrogranin in epithelial ovarian cancer is associated specifically with proliferation, invasion, chemoresistent and poor survival. So far, there are not reports about which of the signal transduction pathways than are involve in ovarian cancer regulate Acrogranin expression; therefore, the purpose of the current study is to identify the signaling pathways that regulate Acrogranin expression in two ovarian cancer cell lines.

We studied the relation of PKC, PKA, PI3-K, ERK, p38 y Akt pathways on the modulation of Acrogranin levels expression in NIH Ovar-3 and SK-Ov-3 ovarian cancer cells lines. For that, cells lines were cultured in presence of fetal bovine serum (FBS) and different concentrations of each inhibitors such as Calphostin C (PKC), H89 (PKA), LY294002 (PI3-K), Wortmannin (PI3-K), PD98059 (ERK), SB203580 (p38) and Akt inhibitor, all drugs were diluted in dimetil-sulfóxido (DMSO). The controls were cells in medium with FBS and the equivalent DMSO levels. The incubation with the inhibitors was for 24 h and 12 h only for Wortmannin. Cellular viability was checked using the CytoTox96 kit following the manufacturer's instructions and Acrogranin protein and mRNA expression was determined by western blot technique and PCR.

The inhibition of PKC and PI3-K signal transduction pathways decreased protein levels of Acrogranin in ovarian cancer cell lines. In NIH-Ovar-3 and SK-Ov-3 cells PKC inhibitor Calphostin C, decreased Acrogranin expression in a dose-dependent manner. However, PI3-K inhibitor LY294002 in a dose-dependent manner in the SK-Ov-3 cells but not in the NIH-Ovar-3 inhibited Acrogranin protein expression. Calphostin C and LY294002 did not show effect on Acrogranin mRNA expression in both cell lines. Inhibition of PKA, P38, ERK and Akt did not have effect on Acrogranin protein expression.

These results suggest that PKC y PI3-K signal transduction pathways are involved in the regulation of Acrogranin protein expression in two different ovarian cancer cell lines. Inhibition of these intracellular signal transduction pathways may provide a future therapeutic target for hindering the cellular proliferation and invasion in ovarian cancer produced by Acrogranin.

## ÍNDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>33</b>
<b>III. OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>34</b>
<b>IV. HIPÓTESIS.....</b>	<b>34</b>
<b>V. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
<b>VI. RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
<b>VII. DISCUSIÓN.....</b>	<b>58</b>
<b>VIII. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>63</b>



# I. INTRODUCCIÓN

## A.- EL OVARIO

### 1.- Anatomía del ovario

Los ovarios son los órganos reproductores de la mujer, cuya función principal es liberar durante cada ciclo menstrual un óvulo, el cual puede ser fertilizado por el espermatozoide, dando lugar a la formación de un huevo o cigoto que culminará con el desarrollo de un nuevo ser [1].

Los ovarios tienen forma ovoide, se encuentran localizados intra-abdominalmente suspendidos entre la pared pélvica y el útero por el ligamento infundibulopélvico en sentido lateral y el ligamento útero-ovárico en sentido medial. Por debajo de la superficie hiliar de cada ovario está unido el ligamento ancho por su mesenterio (meso-ovario). Los elementos vasculonerviosos primarios llegan al ovario por el ligamento infundibulopélvico y entran por el meso-ovario. El tamaño del ovario normal varía y sus mediciones en centímetros llegan a ser de 5 X 3 X 3, sin embargo, puede haber variaciones en su dimensión como resultado de la producción endógena de hormonas, que es variable con la edad y con cada ciclo menstrual [2].

### 2.- Histología del ovario

Los ovarios se encuentran cubiertos por una sola capa de epitelio cuboidal aplanado o cilíndrico que se continúa con el peritoneo y el meso-ovario. En cortes sagitales, el ovario presenta dos zonas, una zona externa llamada corteza y una zona interna denominada médula. La corteza está cubierta por un mesotelio especializado que ocupa cerca del 1% del ovario, llamado ***Epitelio de Superficie***

**Ovárica (OSE**, por sus siglas en inglés), así como por folículos ováricos y estroma gonadal (células alargadas, fusiformes y tejido conectivo). La médula ovárica ocupa una porción pequeña de la glándula en su región hiliar y está compuesta principalmente por tejido fibromuscular y vasos sanguíneos [3, 4].

### **3.- Función del ovario**

La función del ovario está regulada principalmente por el Hipotálamo y la Hipófisis, constituyendo así el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario [5]. El Hipotálamo juega un papel importante como centro integrador de la información que es recibida tanto de la corteza cerebral como de otros centros neuronales, desde donde se regula o modula la actividad de las neuronas peptidérgicas encargadas de la síntesis y secreción del Factor Liberador de Hormonas Gonadotróficas (GnRH) [6]. Este péptido o neurohormona es transportado por el sistema porta hipotálamo-hipofisiario hasta la hipófisis, en donde se une a receptores de membrana con alta afinidad en los gonadotropos para estimular la síntesis y secreción de las hormonas gondotróficas o gondadotropinas como la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) [7, 8]. Estas hormonas glicoproteícas viajan por la circulación general y en el ovario (órgano blanco), la FSH induce la maduración y el crecimiento folicular así como la biosíntesis de estrógenos ( $E_2$ ) y progesterona ( $P_4$ ), en tanto que la LH estimula la secreción de andrógenos e induce la luteinización de los folículos ovulatorios [9]. Es así como en respuesta a las gonadotrofinas, en el ovario se producen todos los cambios que llevarán a la maduración periódica o cíclica de los ovocitos, dando lugar a la producción de óvulos maduros, células aptas para la fecundación [10].

## **B.- TRANSFORMACION MALIGNA DEL OVARIO (CANCER DE OVARIO)**

### **1.- Participación del Epitelio de Superficie Ovárica (OSE)**

El epitelio de superficie ovárica (OSE) también referido como epitelio ovárico normal o mesotelio ovárico (OM), es la parte del peritoneo pélvico que cubre el ovario. Es un tejido al cual se le han atribuido varias funciones que intervienen en la fisiología normal del ovario, pero su importancia radica en que puede ser el origen de los más comunes y más letales carcinomas de ováricos [11].

#### **a) Desarrollo Embrionario del Epitelio de la Superficie del Ovario (OSE)**

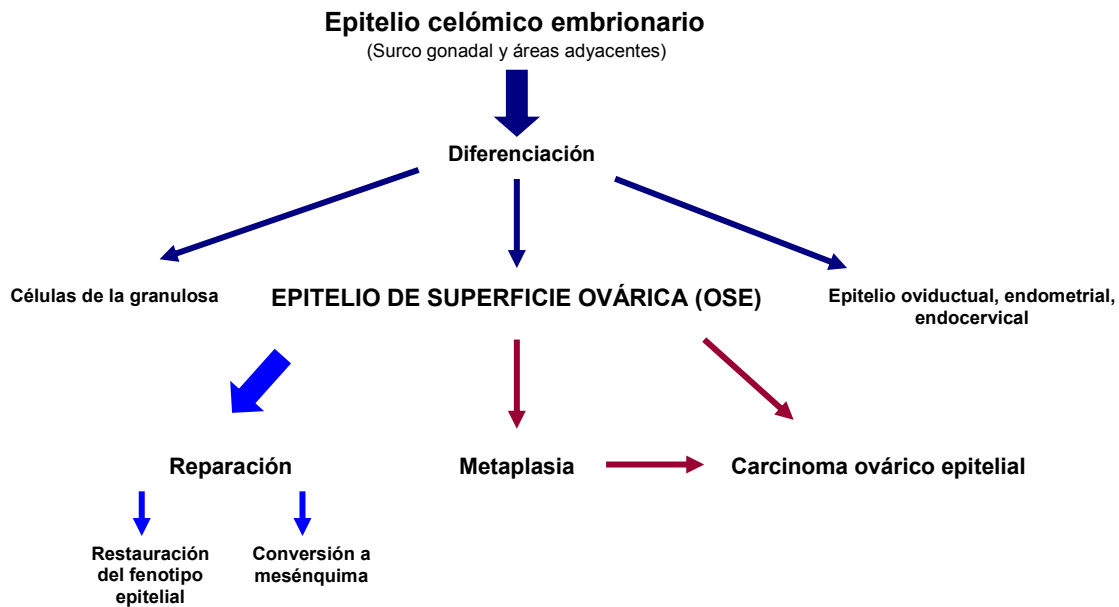
Durante el desarrollo embrionario temprano, el ESO se forma a partir del epitelio celómico, el cual se deriva del mesodermo. El epitelio celómico experimenta numerosos cambios durante el desarrollo prenatal y es considerado un epitelio pluripotencial, debido a que puede dar lugar a varios tejidos epiteliales como se muestra en la Figura 1. El epitelio celómico da lugar a las células de la granulosa y muy cerca a la gónada primitiva, se invagina y da lugar al primordio para el epitelio de los oviductos, endometrio y endocervix (ductos mullerianos o paramesonéfricos). Es así como el epitelio celómico dentro y cerca del área gonadal, representa un espacio embrionario con la capacidad de diferenciarse a través de varias vías (Figura 1) [12].

#### **b) El Epitelio de la Superficie del Ovario (OSE) en el Adulto**

El OSE en la mujer adulta, es un epitelio simple con capacidad de secreción y transporte de sustancias tales como hormonas, factores de crecimiento y citocinas, las cuales están involucradas en el crecimiento y proliferación de este mismo epitelio. Está bien establecido que el OSE debe proliferar para reparar los

defectos ocasionados por la ruptura de la ovulación en la superficie del ovario; como fue demostrado por un estudio realizado previamente en ovarios de conejo, en el cual, la actividad proliferativa del epitelio, se localizó justo en el lugar de la ruptura e inmediatamente después de haber ocurrido la ovulación. Algunas de estas funciones están relacionadas con la etapa del ciclo menstrual y por lo tanto pudieran tener influencia hormonal (Figura 1) [12, 13].

El OSE normal, el cual recubre a los ovarios no ovulatorios, es un mesotelio estacionario con características de epitelio y mesénquima. A diferencia del mesotelio en otros tejidos, el OSE mantiene su capacidad para alterar su estado de diferenciación, dependiendo de la vía que lo lleva a un fenotipo estromal o un fenotipo epitelial ectópico o aberrante. En respuesta a un estímulo para iniciar una respuesta de reparación tal como es la ruptura ovulatoria *in vivo*, las células del OSE asumen características fenotípicas de células estromales. Sin embargo, alternativamente, el OSE puede adquirir características epiteliales complejas, cuando éste da lugar a una metaplasia, a una formación tumoral benigna o progresión maligna (Figura 1) [12].

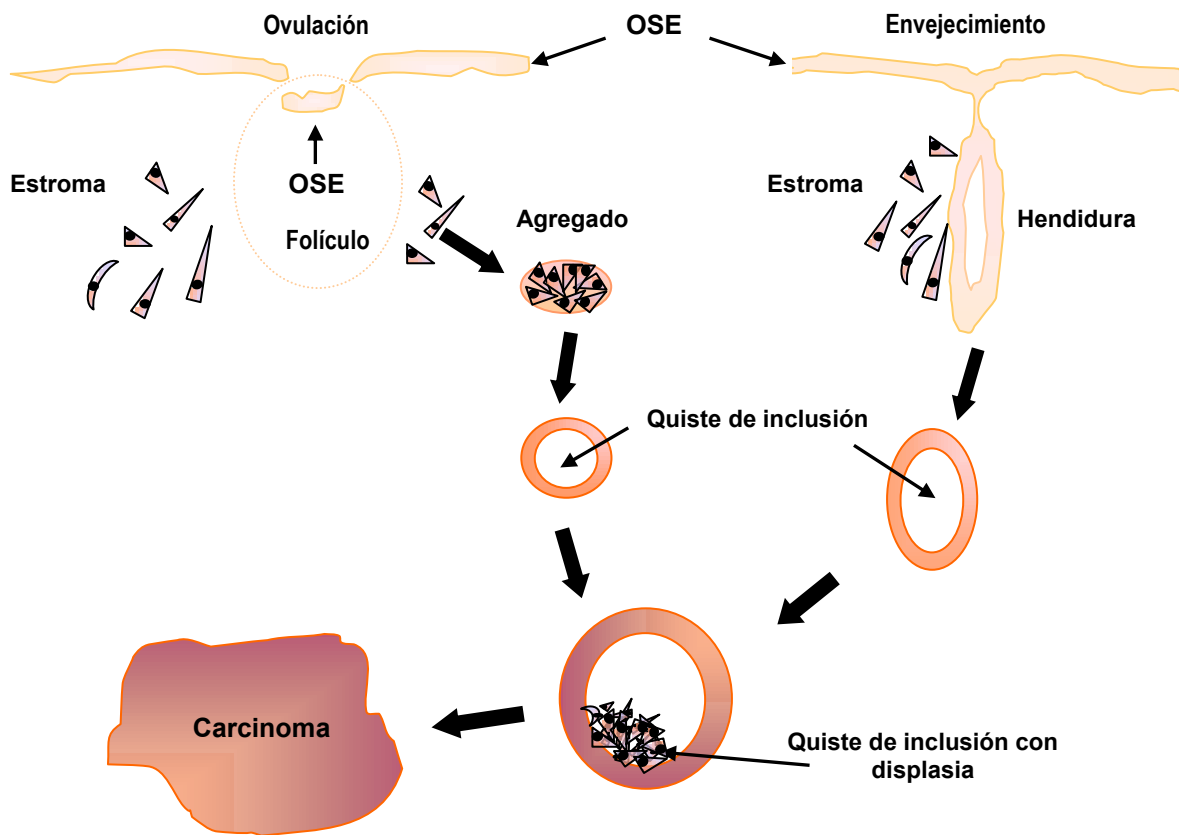


**Figura 1.** Origen y destino del Epitelio de la Superficie del Ovario (OSE). Modificado de Auersperg, N. y cols [12].

### c) El Epitelio de la Superficie del Ovario (OSE) y su Diferenciación Maligna

Con la edad, el ovario tiende a perder su forma característica y adquiere un contorno irregular, en el cual se desarrollan invaginaciones y posteriormente quistes de inclusión en su corteza, en los cuales quedan atrapadas células del OSE que se diferencian en células epitelio-mesenquimatosas (Figura 2). Este evento tiene relevancia en el desarrollo del cáncer de ovario debido a que, en estas condiciones, las células del epitelio llevan a cabo cambios metaplásicos, como la adquisición de una forma columnar y la secreción de marcadores propios de neoplasias ováricas, como es el caso de la proteína CA-125 y cadherina E. Se ha propuesto como teoría que los quistes de inclusión se desarrollan también durante los procesos de ruptura del folículo y la cicatrización que se lleva a cabo durante el proceso de ovulación (Figura 2). Debido a esta teoría, se considera que

las mujeres nulíparas y las mujeres que reciben tratamientos inductores de hiperovulación, poseen un factor de riesgo adicional para el desarrollo de cáncer de ovario. Sin embargo, aquellas mujeres con antecedentes de una paridad mayor o bien el uso de anticonceptivos durante su etapa reproductiva, presentan un menor riesgo a desarrollar cáncer de ovario [12].



**Figura 2.** Hipótesis de la conversión epitelio-mesenquimatoso de las células del OSE, el cual puede representar un mecanismo homeostático para incorporar células que hayan sido transportadas de la superficie del ovario hacia el estroma. Modificado de Auersperg, N. y cols [12].

#### **d) Regulación del Epitelio de la Superficie del Ovario (OSE) por Hormonas, Factores de Crecimiento y Citocinas**

Las células normales del OSE poseen la capacidad de secretar sustancias bioquímicas que influyen en el crecimiento y la diferenciación celular, además poseen receptores para dichas sustancias; entre ellas, se ha demostrado la presencia de receptores para ciertas hormonas como la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), Hormona Estimulante del Folículo (FSH), Hormona Luteinizante (LH) y para la Hormona Gonadotropina Coriónica Humana (hCG). La GnRH actúa como un inhibidor autócrino del desarrollo del OSE, mientras que hCG y LH estimulan su proliferación. Por otra parte, dado que la incidencia del cáncer de ovario se incrementa en etapas peri y posmenopáusicas, se considera que las altas concentraciones de FSH en estas etapas pudieran tener una participación en el desarrollo de carcinomas de ovario [14, 15].

En el OSE también se han encontrado receptores para hormonas esteroides, como progesterona, estrógenos y andrógenos, aunque los efectos que ejercen estas hormonas sobre el crecimiento y proliferación del OSE no han sido determinados con exactitud [16, 17].

Los integrantes de la familia del Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) ejercen un efecto estimulador sobre el OSE y se ha propuesto que el EGF puede estar presente en concentraciones importantes en el ovario, debido al sangrado producido durante la ruptura del folículo, ya que es liberado por las plaquetas en respuesta a la cicatrización. En consecuencia, el EGF puede contribuir a la proliferación rápida del OSE y posiblemente, a la conversión epitelio-mesénquima de las células que quedan atrapadas en el interior del folículo en cicatrización [18].

Otros factores de crecimiento de esta familia que estimulan la proliferación de las células del OSE son: El Factor de Crecimiento Básico de Fibroblastos (bFGF), Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGF) y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) [19, 20].

Otra familia de factores de crecimiento como es la familia del Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF $\beta$ ), afecta de manera inhibitoria el crecimiento del OSE. El TGF $\beta$ , por sí mismo, es considerado un factor autócrino que reduce la proliferación de las células del OSE en cultivo sin inducir la apoptosis, neutralizando el efecto estimulador del EGF. Se ha demostrado que la concentración de los subtipos de TGF $\beta$  y los receptores para éstos, aumentan en el cáncer de ovario, en comparación con las concentraciones encontradas en el OSE normal [21, 22].

Otro factor importante en el desarrollo del OSE, es el factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y su receptor MET, los cuales se producen principalmente en células de las regiones mesenquimal y estromal en el ovario. Durante el desarrollo embrionario del ratón, este factor de crecimiento es producido por el mesénquima de la región urogenital que se localiza en la proximidad del epitelio que expresa MET, por lo cual se ha sugerido que juega un papel importante como factor parácrino que influye en la diferenciación del OSE [23].



## **C.- EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER DE OVARIO**

De acuerdo a estadísticas de los Estados Unidos Americanos, el cáncer del ovario representa alrededor del 3% de todos los tumores en mujeres, ocupando el octavo lugar en frecuencia; estando en los primeros lugares el cáncer de mama con un 26%, pulmón con un 14%, colon y recto con un 10%, útero con un 6%, linfoma no Hodgking, tiroides y melanomas con un 4%. Es así como el cáncer de ovario es menos frecuente que el de mama, cuello uterino y endometrio, sin embargo, su pronóstico es el peor de todos, debido a las dificultades en el diagnóstico y en el tratamiento. Actualmente se considera al cáncer de mama como la principal causa de muerte de los cánceres ginecológicos tanto en los Estados Unidos como en Europa [24]. Por otro lado, la Sociedad Americana del Cáncer ha estimado que en el 2008 se diagnosticarían aproximadamente 21,650 nuevos casos de cáncer de ovario y se presentarían 15,520 muertes por este cáncer en los Estados Unidos [24]. En México, desafortunadamente no existen estudios que puedan esclarecer el problema real que representa el cáncer de ovario; existen algunos reportes en los que se coloca a esta entidad como el séptimo cáncer más frecuente en la mujer. Sin embargo, no se conoce con certeza su incidencia ni el número de casos nuevos por año.

El cáncer de ovario de origen epitelial representa el 90% de los casos, siendo menos frecuente el cáncer de las células de la granulosa y de las células germinales [25]. Estudios epidemiológicos previos, han reportado que el riesgo de una mujer de padecer cáncer ovárico invasivo durante el transcurso de su vida, es de aproximadamente 1 en 71 y que la probabilidad de morir es de aproximadamente 1 en 95 (estas estadísticas no incluyen los tumores ováricos de

bajo potencial maligno) [25]. El cáncer de ovario es un cáncer que se origina principalmente en mujeres de edad avanzada (posmenopáusica), ya que alrededor de dos tercios de las mujeres diagnosticadas con cáncer de ovario tienen 55 o más años de edad. Sin embargo, este cáncer cada vez más se está presentando en edades más tempranas (etapa reproductiva). Por otro lado, al parecer es más común en mujeres de raza blanca que negra [25]. Una vez establecido el diagnóstico, se ha estimado que alrededor de 3 de cada 4 mujeres con cáncer de ovario sobreviven al menos un año después del diagnóstico y que casi la mitad (45%) de las mujeres con cáncer de ovario sobreviven al menos cinco años después del diagnóstico. También se ha visto que las mujeres menores de 65 años tienen mejores tasas de supervivencia a cinco años en comparación con las mujeres de edad más avanzada [25]. Si el cáncer se detecta y se trata antes de que se haya propagado fuera del ovario (etapa temprana), la tasa de supervivencia a cinco años aumenta siendo hasta de un 92%. Sin embargo, por desgracia y debido a que no existen marcadores tempranos para el diagnóstico de esta enfermedad, sólo el 20% de todos los casos de cáncer de ovario se detectan en etapa temprana [24, 25].

## **D.- POSIBLES ETIOLOGÍAS DEL CÁNCER DE OVARIO**

Hasta el momento se desconoce con precisión la etiología del cáncer de ovario, sin embargo, se han podido identificar algunos factores de riesgo asociados a esta patología, entre los que destacan: la ovulación, las hormonas gonadotrópicas y hormonas esteroides, depleción de las células germinales, los oncogenes y genes supresores de tumores, factores de crecimiento, citocinas y agentes ambientales. Por otra parte, la historia familiar de cáncer de mama, ovario y colon representan otros importantes factores de riesgo para desarrollar cáncer ovárico. Los factores reproductivos tales como la etapa de la menopausia e infertilidad contribuyen en gran medida al riesgo de desarrollar dicha patología; mientras que el embarazo, la lactancia, la ligación tubaria y la histerectomía, reducen el riesgo de presentar esta patología, además el uso de anticonceptivos orales han mostrado funcionar como protectores en el cáncer de ovario [12, 26, 27]. Por otro lado, el fumar, la obesidad, la dieta y la exposición a ciertos agentes ambientales [polvo de talco (asbesto), pesticidas y herbicidas] son otros factores que también pudieran incrementar el riesgo de cáncer de ovario. En resumen, la marcada influencia de las hormonas y de los factores reproductivos en el cáncer de ovario, sugieren que los desórdenes hormonales pueden aumentar el riesgo para desarrollar cáncer de ovario; sin embargo, faltan estudios para demostrar esta teoría.

En 1971 Fathalla propuso a la “ovulación incesante” como causa del carcinoma ovárico, argumentado que la ovulación causa microtraumas en el epitelio de superficie ovárico, es decir, la ruptura del epitelio por la expulsión periódica (mensual) del óvulo y la reparación del mismo, ocasionan daños

estructurales que aunados a factores genéticos y/o alteraciones inflamatorias, incrementan el riesgo de cáncer ovárico epitelial como ya se mencionó anteriormente [12, 28].

Se ha estimado que la historia familiar de cáncer de mama y de ovario ésta presente en un 5 a 10% en las pacientes con cáncer ovárico epitelial, los cuales están asociados a una predisposición genética, debida a mutaciones hereditarias de los genes supresores de tumores BRCA 1 y BRCA 2. Se ha estimado que el riesgo para desarrollar cáncer de ovario es del 25% a 50% portando la mutación del gene BRCA 1 y del 25% a 40% cuando se es portador de la mutación del gene BRCA 2 [29].

Se han evidenciado otras mutaciones en este tipo de cáncer, como la del gen p53, el cual también es considerado un gene supresor de tumores. Mutaciones de este gene favorecen la progresión y el desarrollo tumoral, ya que la proteína p53 participa en la regulación del ciclo celular [30]. Así mismo, hay otros factores de transcripción que también regulan la proliferación celular y se encuentran amplificados y/o sobre-expresados en el cáncer epitelial de ovario, entre los que se encuentran los proto-oncogenes c-myc, K-ras, Akt y la proteína unidora a elementos de respuesta a cAMP (CREB), la cual está implicada en el proceso anti-apoptótico y produce proliferación celular [31, 32].

Las hormonas también juegan un papel muy importante como factores etiológicos dentro del cáncer de ovario. Estudios en varias líneas celulares de cáncer de ovario han demostrando que el GnRH, sus análogos sintéticos, así como su receptor, inhiben la proliferación de células epiteliales de ovario normales y malignas, a través de varios procesos como: la activación enzimática de

fosfatasa, las cuales inhiben las señales de transducción mitogénicas, inhibición de la actividad de telomerasas, activación del gen BAX y del sistema Fas/FasL que inducen a la apoptosis. Por otro lado, también antagoniza la señal de transducción y la actividad mitogénica que produce el Factor de Crecimiento Epidermal, e inducen a la producción de inhibidores del ciclo celular como son p53 y p21 [33].

Las gonadotropinas tales como FSH, LH y hCG, estimulan la proliferación de células epiteliales normales y malignas de ovario [34]. Al parecer FSH y hCG pueden inducir la expresión del RNAm de factores de crecimiento tales como: el factor de crecimiento de keratinocitos, factor de crecimiento de hepatocitos y el proto-oncogen c-Kit; factores que pueden estimular el crecimiento de las células epiteliales ováricas. Por otro lado, FSH también estimula la expresión de MAPK en células epiteliales neoplásicas de ovario, y por lo tanto la activación de la cascada de MAPK pudiera estar involucrada en la proliferación de éstas células [33, 35, 36].

Los estrógenos participan en el cáncer de ovario, estimulando la proliferación celular y previniendo la apoptosis, ya que en células epiteliales ováricas malignas que expresan ambos receptores de estrógenos (alfa y beta) y estimuladas con estradiol, se ha observado una sobre-expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 [33, 34]. En forma contraria, la progesterona experimenta un efecto pro-apoptótico, ya que la administración de progestinas a *Macacus Rhesus* indujo a la apoptosis del epitelio ovárico, además de mostrar cambios en la expresión de las isoformas de TGF-beta [37]. Por otro lado, la exposición de células epiteliales de ovario normales y malignas a progesterona, activó las

capasas 8 y 3 e incrementó la expresión de FasL [33, 38]. Mientras que las progestinas parecen proteger contra el cáncer de ovario, los andrógenos al igual que los estrógenos favorecen la patogénesis de esta enfermedad, ya que la testosterona y la 5- $\alpha$  dihidrotestosterona contribuyen al crecimiento de tumores ováricos epiteliales en modelos animales y de líneas celulares de cáncer de ovario [33, 39]. Los andrógenos probablemente favorecen la progresión del cáncer de ovario, en parte, por disminuir los receptores de TGF-beta, permitiendo al tumor escapar a la inhibición del crecimiento mediada por TGF-beta1 [40].

Estudios previos también han evidenciado que las citocinas participan en el desarrollo del carcinoma ovárico, como las interleucinas (IL-) 1, 2, 6, 8 y 10, así como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF $\alpha$ ), las cuales estimulan el crecimiento tumoral y favorecen la adhesión e invasión [41]. Otras citocinas como el Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (mCSF) y el TGF- $\beta$  también intervienen en los procesos de crecimiento y supervivencia celular, contribuyendo a la transformación maligna en el cáncer de ovario [15]. Sin embargo, la citocina IL-4 en otros modelos de cáncer produce acciones contrarias, ya que se ha demostrado que inhibe el crecimiento tumoral e induce apoptosis [42].

También en cáncer de ovario el Factor de Crecimiento Epidermal (EGF) y sobre todo su receptor (EGFR o ErbB), juegan un papel importante en la proliferación celular, supervivencia, adhesión, motilidad, invasión y angiogénesis. Una alteración en la sobre-expresión sobre todo del receptor, puede contribuir al desarrollo de una transformación maligna en el ovario, en un peor pronóstico y en

una disminuida respuesta al tratamiento terapéutico. El EGFR y sus ligandos son considerados moléculas blanco en el tratamiento del carcinoma ovárico [43, 44].

El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR) han sido ampliamente estudiados en cáncer de ovario, ambos juegan un papel importante en la regulación de la angiogénesis de las células tumorales y normales. El VEGF se encuentra sobre-expresado en tumores epiteliales primarios de ovario y en metástasis, regulando la migración y la invasión, a través de la activación de su receptor, que regula la secreción y activación de metaloproteasas. El VEGF y sus receptores también están siendo blancos de estudio como tratamiento en el cáncer de ovario [44, 45].

El ácido lisofosfatídico (LPA) es un potente factor mitogénico que promueve el crecimiento, supervivencia, motilidad e invasión celular, así como resistencia a quimioterápicos. Se encuentra sobre-expresado en cáncer de ovario y está presente en el fluido de ascitis de pacientes con esta patología. Su actividad la experimenta a través de su unión a receptores acoplados a proteínas G (LPA1, LPA2 y LPA3), los cuales también se encuentran sobre-expresados en este tipo de cáncer, siendo los receptores LPA2 y LPA3 los que más participan en la agresividad del cáncer de ovario. Por otro lado, la activación de estos receptores también incrementa la secreción del oncogene  $\alpha$  (GRO $\alpha$ ), un miembro de la superfamilia de las quimiocinas, el cual se encuentra altamente elevado en el plasma y ascitis de pacientes con cáncer de ovario, en donde al parecer, participa en el crecimiento de las células tumorales y en su vascularización [46, 47].

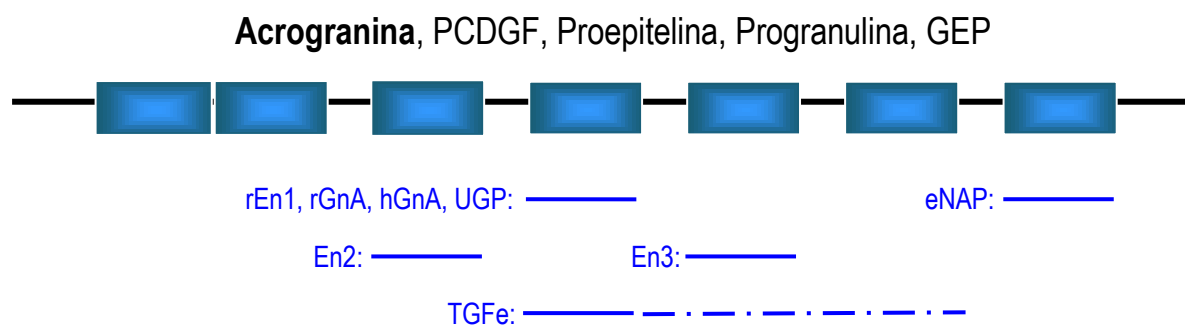
En los últimos años, se ha demostrado la participación en el cáncer de ovario de un factor de crecimiento llamado Acrogranina [conocido también como

factor derivado de células PC (PCDGF), Progranulina, Proepitelina y/o Precursor de granulinas y epitelinas (GEP)]. Esta proteína pertenece a una familia de factores de crecimiento, en donde la Acrogranina es el precursor de otros péptidos pequeños conocidos como granulinas y epitelinas.



## E.- ACROGRANINA Y SU PAPEL EN CÁNCER DE OVARIO

La Acrogranina es una glicoproteína con un peso molecular de 67,000 daltones (Da) y fue purificada de testículos de cobayo por Anakawe y Gerton en 1990 [48]. Estructuralmente esta proteína contiene varios residuos de cisteínas (15%) y un motivo que se repite siete veces a lo largo de la molécula. Por procesos proteolíticos que se llevan a cabo sobre en esta proteína, por medio de una elastasa, se producen varios productos o derivados que contienen uno o más de estos motivos, por lo que la Acrogranina es considerada el precursor de las proteínas llamadas epitelinas y granulinas (Figura 3) [49, 50]. Los dominios de las proteínas granulinas se conocen por una estructura no muy común consistente de pilas paralelas de cadena- $\beta$ , pegadas por 6 puentes disulfuros de una manera muy compacta [51, 52].



**Figura 3.** El esquema muestra los 7 dominios de la Acrogranina [Proepitelina, Factor de crecimiento derivado de células PC (PCDGF) y/o Precursor de granulinas y epitelinas (GEP)] y los derivados que hasta el momento se ha identificado, epitelinas de rata (rEp1, Ep2, Ep3), granulina A de rata (rGnA), granulina A humana (hGnA), péptido activador de neutrofilos equino (eNAP), glicopéptido urinario (UGP) y el factor de crecimiento transformante e (TGF e). Modificado de Baba, T. y cols [49].

La proteína Acrogranina se expresa en diferentes tejidos reproductivos, primeramente fue localizada en testículo, epidídimo y en el acrosoma del espermatozoide de cobayo [48], posteriormente la Acrogranina se detectó en ovocitos de ratón y en células foliculares en ovarios de rata, así como en útero y oviductos de estos roedores [53, 54]. También en la rata se ha demostrado que la Acrogranina se expresa en tejidos no reproductivos como piel, pulmón bazo, cerebro, riñón, esófago, intestino delgado, colon y en linfocitos asociados al tracto digestivo [53]. Por otro lado, también se expresa en diferentes líneas celulares tumorales y no tumorales [53, 55-58].

A la Acrogranina y sus derivados se les ha identificado como un factor de crecimiento que regula la proliferación celular, principalmente sobre células epiteliales [58-62]. En los últimos años, la Acrogranina ha ganado importancia por su participación en importantes enfermedades neurodegenerativas como son: la demencia frontotemporal hereditaria, enfermedad de Alzheimer y el síndrome corticobasal, las cuales se han asociado con una nula o disminuida expresión de la proteína Acrogranina, debido a diversas mutaciones en el gen que expresa la Acrogranina [63]. Por otra parte, también ya se ha determinado su expresión o sobre-expresión, así como su participación en la fisiopatología de diferentes tipos de cánceres como cerebral, prostático, hepático, renal, hematológico, de mama y de ovario [64-71].

Los estudios de Acrogranina sobre cáncer de ovario han mostrado que esta proteína se sobre-expresa en cáncer epitelial de ovario y en sus metástasis y que está involucrada en la proliferación celular. Por otro lado, se ha identificado una diferencia en la expresión de esta proteína entre los tumores de bajo potencial

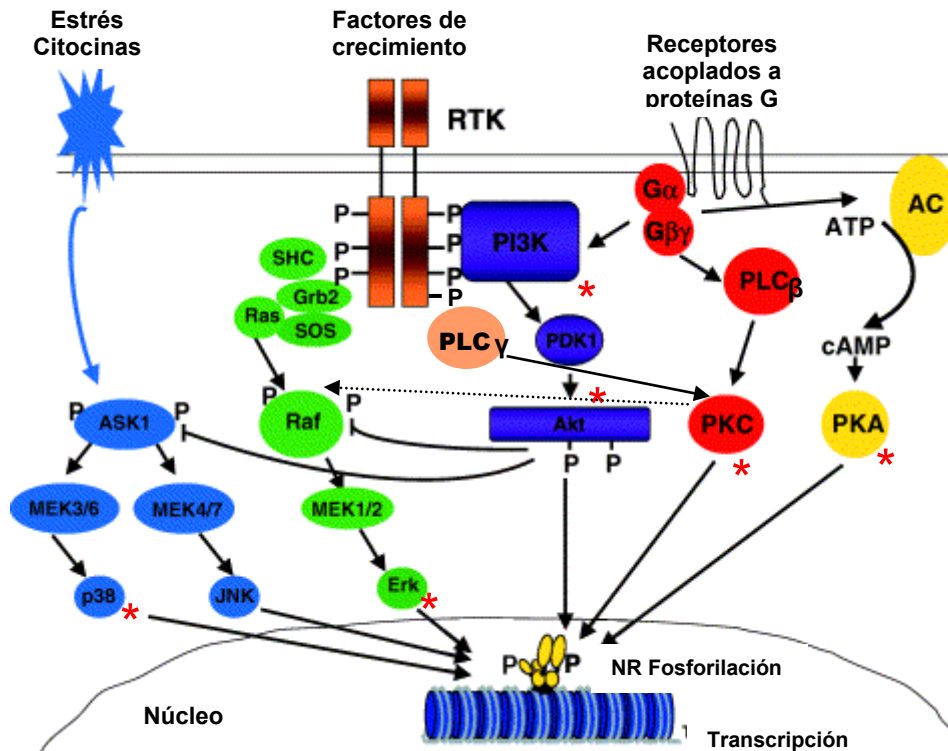
maligno y los tumores invasivos, lo que demuestra que Acrogranina está asociada con progresión maligna. Asimismo, la expresión de Acrogranina en el estroma ovárico se ha asociado con una pobre respuesta clínica y menor sobrevida de las pacientes [70-72]. Además una asociación entre la sobre-expresión de Acrogranina y malignidad se ha documentado en células de cáncer de ovario tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo* [73, 74]. En resumen, en cáncer de ovario la sobre-expresión de Acrogranina se ha asociado con proliferación, invasividad, sobrevida y quimioresistencia; acciones que experimenta a través de la estimulación de las vías de las MAPK, PI3-K y FAK cinasa [75-77].

Hasta el momento se han descrito sólo dos factores que pudieran estar regulando la expresión o sobre-expresión de la Acrogranina en cáncer, uno de ellos son los estrógenos, los cuales ejercen un regulación positiva sobre la Acrogranina en células de cáncer de mama [78] y por otro lado, LPA en células de cáncer de ovario, el cual también regula la expresión de esta proteína en una forma positiva [79]. Sin embargo, en la actualidad no se ha descrito cuál o cuáles son las vías de señalización que regulan la expresión de la Acrogranina en células de cáncer de ovario o en otros sistemas.

## F.- VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL EN CÁNCER DE OVARIO

La célula eucariota es una entidad altamente regulada, capaz de responder a los estímulos generados en su entorno, ya que posee mecanismos a través de los cuales, los estímulos externos son procesados y enviados al núcleo mediante una serie de cambios bioquímicos que genéricamente se conocen como “*señales de activación intracelulares*” o “*transducción de señales*”, las cuales son capaces de producir respuestas específicas en las células. La alteración en los mecanismos normales que regulan los sistemas de señalización celular o de transducción de señales, dan lugar a la aparición de enfermedades humanas entre ellas el cáncer. En el proceso de la carcinogénesis existe un desbalance entre los mecanismos que regulan la división y el crecimiento celular (proliferación celular), así como aquellos que regulan la muerte celular programada (apoptosis). Es así como en este delicado desbalance las proteínas y las vías de señalización juegan un papel muy importante, regulando el crecimiento, diferenciación y desarrollo celular mediante cambios que producirán oncogénesis [80].

Tanto en condiciones fisiológicas o fisiopatológicas como en el cáncer, las vías de señalización pueden operar en una forma independiente, en una forma paralela y/o a través de interconexiones (cross-talks) como se muestra en la figura 4. Por otro lado, los sistemas de señalización, frecuentemente implican la activación, condicional o constitutiva de receptores específicos, los cuales disparan múltiples cinasas citoplasmáticas, entre las que se encuentran la proteína PKC, PKA, PI3-K, Akt, p38 y ERK, como se muestra en la figura 4 y se encuentran marcadas con un asterisco rojo.



**Figura 4.** Modelo que muestra las más importantes vías de señal de transducción. Las flechas indican algunas de las rutas mayores de transmisión de la señal. La cascada de fosforilación de proteínas iniciada por varios estímulos resulta en una expresión de genes. Modificado de Faivre, S. y cols [81].

Con el paso de los años se ha identificado a los sistemas de señalización celular como importantes participantes en la iniciación y propagación de diversos tipos de cáncer, indicando que la expresión de diversos genes implicados en este tipo de patologías, está sujeta a la regulación por diversas vías de señalización intracelular. Algunas de las vías de señalización más importantes implicadas en el cáncer de ovario son las vías de fosfatidil inositol 3 cinasa/Akt (PI3-K/Akt), la vía que involucra a la proteína cinasa C (PKC) y las vías que involucran a las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), vías que se muestran en la figura 4 [81-83].

## **1.- Vía de señalización de la Proteína Cinasa C (PKC) y su participación en Cáncer**

Las proteínas cinasas C (PKCs) forman parte de una familia de proteínas serina/treonina cinasas cuya función está involucrada en múltiples procesos celulares, tales como: proliferación, diferenciación, supervivencia, apoptosis, motilidad celular, transducción de señal, expresión de genes, acción hormonal, angiogénesis y senescencia [84]. Las diferentes isoformas o isoenzimas de PKC, han sido clasificadas en tres grupos de acuerdo a las características de su estructura y de su activación y son las siguientes: Las PKC clásicas o convencionales (cPKC), las cuales incluyen a la *alfa* ( $\alpha$ ), *beta* ( $\beta I$  y  $\beta II$ ) y *gama* ( $\gamma$ ). Las PKC nuevas (nPKC), que incluyen a *mu* ( $\mu$ ), *epsilon* ( $\epsilon$ ), *delta* ( $\delta$ ), *teta* ( $\zeta$ ) y *eta* ( $\epsilon$ ) y finalmente las PKC atípicas (aPKC) que son la *iota* ( $\eta$ ), *zeta* ( $\delta$ ) y *lambda* ( $\lambda$ ) [85].

Esta familia de PKCs de serina/treonina cinasas, requieren para su activación de fosfatidilserina y de acuerdo a su clasificación previamente establecida, su modo de activación por segundos mensajeros es diferente. Las cPKCs son activadas por diacilglicerol (DAG) y por  $Ca^{2+}$ . Las nPKCs son activadas por DAG pero no por  $Ca^{2+}$ , ya que su dominio C2 no une este catión. Las aPKCs tienen incompleto su dominio C1 y por esto no son sensibles a DAG; su regulación ocurre en parte a través del dominio PB1 del extremo  $NH_2$ -terminal. En condiciones fisiológicas, la activación de PKC ocurre en respuesta a varios factores de crecimiento, los cuales median la activación de la fosfolipasa  $C_\gamma$  ( $PLC_\gamma$ ), o por ligandos que se unen a receptores acoplados a proteínas G que activan  $PLC_\beta$ . Una vez que se presenta este estímulo externo, la PLC genera DAG

e inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) a partir del fosfolípido de membrana plasmática, el fosfatidilinositol 4,5 bifosfato. Posteriormente al difundirse el IP<sub>3</sub> al espacio citoplásmico y al unirse a receptores específicos localizados en el retículo endoplásmico, promueve la liberación de iones de Ca<sup>2+</sup> activando a las PKCs nuevas y convencionales [84, 85].

El papel de las diferentes isoformas de PKC en carcinogénesis ha sido estudiado por décadas. Por lo que se sabe, existen cambios de expresión de isoformas de PKC entre el estado normal y el maligno, y una vez que las diferentes PKCs se activan, desencadenan señales de transducción que pueden regular la expresión de diferentes proteínas y que la sobre-estimulación de PKC pudiera contribuir a la expresión errónea de varios genes, incluyendo aquellos que participan en la proliferación celular y la invasión [86].

Diversos estudios han demostrado que las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ II,  $\epsilon$ ,  $\eta$  y  $\xi$ , son proto-oncogenes en varios tipos de cáncer entre ellos el carcinoma ovárico. Por otro lado, las isoformas que más comúnmente presentan alteraciones en su expresión en diversos tipos de cánceres son la *alfa*, la *beta* y la *delta*, aunque también otras isoformas pueden presentar una expresión anormal. Por ejemplo, la expresión de *PKC $\delta$* , *épsilon* y *lambda*, se encuentra disminuida en cáncer pancreático, *PKC $\epsilon$*  se encuentra incrementada en cáncer renal y *PKC $\lambda$*  se encuentra incrementada en cáncer de ovario, así como la *PKC $\eta$*  la cual se ha considerado como un biomarcador y un potencial oncogen con valor pronóstico en este carcinoma ovárico [87-89].

Finalmente, las isoformas de PKC que ya han sido ampliamente estudiadas en diversos tipos celulares y sobre todo en células cancerígenas donde participan

en la progresión tumoral, continúan siendo objeto de estudio como blancos de tratamiento para los diversos tipos de cánceres [90, 91].

## ***2.- Vía de señalización de la Proteína Cinasa dependiente de AMPc (PKA) y su participación en Cáncer***

La proteína PKA es una proteína serina-treonina cinasa, la cual funciona como el principal blanco intracelular de la señalización de la adenosina-3',5'-monofosfato cíclico (AMPc) en mamíferos, constituyendo la vía de señalización AMPc/PKA involucrada en la regulación de un amplio número de procesos celulares tales como: metabolismo, regulación genética, crecimiento y división celular, diferenciación celular y conductividad de canales iónicos [92].

Estructuralmente, la PKA es una holoenzima tetramérica conformada por dos subunidades diméricas regulatorias (R) y dos subunidades catalíticas (C), la unión de cuatro moléculas del segundo mensajero AMPc a las subunidades R, conduce a la liberación de las subunidades C activas, las cuales fosforilan una amplia variedad de blancos celulares. Existen dos isoformas de PKA, la PKA-I y la PKA-II, las cuales actúan como reguladores del crecimiento celular en forma positiva y negativa respectivamente. Estudios previos han demostrado que PKA-I está transitoriamente sobre-expresada en las células normales en respuesta a estímulos fisiológicos que producen proliferación celular; sin embargo, en células cancerígenas su sobre-expresión es constitutiva y está asociada a un mal pronóstico en diferentes tipos de cánceres humanos. Por otra parte, la alteración en el balance de producción de las dos isoformas de PKA está fuertemente asociado con tumorigénesis y crecimiento del tumor [93].



Específicamente, en cáncer de ovario, la sobre-expresión de PKA-I en una línea celular de cáncer de ovario fue capaz de inducir una proliferación y crecimiento celular descontrolado, mientras que la sobre-expresión de PKA-II produjo una dramática inhibición del crecimiento celular [94]. Por estudios de microarreglos, se pudo observar que la sobre-expresión de PKA-I indujo la expresión de un perfil de genes asociado a proliferación celular, de una forma muy similar a la observada cuando las células son expuestas a suero solamente. Por otro lado, PKA-I aumentó la expresión del gen RAB25, el cual está asociado con metástasis avanzada en cáncer epitelial de ovario y disminuyó la expresión del gen TUSC3, que cuya baja expresión en cáncer de ovario correlaciona con la severidad de la enfermedad [94].

Por otro lado, ya se sabe que FSH y LH en las células SK-Ov-3 de cáncer de ovario son capaces de activar la vía de señalización que involucra a PKA produciendo invasión celular [95]. Además, en líneas celulares epiteliales de ovario normal y de cáncer, parece ser que hay una asociación entre los efectos de LH y PKA. La LH afecta la sobrevivencia de las células a través de la inhibición de la proteína Fas, un inductor de apoptosis, efecto que puede ser mimetizado con el uso de un análogo de cAMP o bien revertido con el uso de un inhibidor de PKA, sugiriendo que LH experimenta su efecto anti-apoptótico a través de la activación de PKA [96].

Finalmente, PKA pudiera estar participando en el cáncer de ovario al fosforilar a Claudina-3, esta proteína se encuentra sobre-expresada y frecuentemente activada en cáncer de ovario, y cuya fosforilación provoca una

alteración en la estructura de las uniones celulares estrechas, contribuyendo así a la invasión y a una mayor sobrevivencia de la célula [97].

### **3.- Vía de señalización del Fosfatidilinositol 3 Cinasa/Akt (PI3-K/Akt) y su participación en Cáncer**

Las proteínas PI3-K comprenden una extensa y compleja familia de cinasas implicadas en un amplio rango de vías de señalización asociadas a la proliferación celular, supervivencia, síntesis de proteínas, angiogénesis y crecimiento tumoral. De acuerdo a su estructura y a sus sustratos específicos, las proteínas PI3-K se han clasificado en tres clases denominadas: I, II y III y éstas a su vez, en múltiples subunidades e isoformas [98].

Las proteínas clase I son activadas por receptores de superficie celular y consisten de dos subfamilias: la Clase IA y la Clase IB, basadas en sus adaptadores asociados. La Clase IA son heterodímeros que consisten de una subunidad catalítica (p110) y una subunidad regulatoria (p85). A su vez existen diferentes isoformas de la subunidad catalítica p110: p110 $\alpha$ , p110 $\beta$  y p110 $\delta$ , que son codificadas por los genes *PIK3CA*, *PIK3CB* y *PIK3CD*, respectivamente. Con lo que respecta a la subunidad regulatoria p85 también tiene tres isoformas: p85 $\alpha$ , p85 $\beta$  y p85 $\gamma$ , que son codificados por los genes *PIK3R1*, *PIK3R2* y *PIK3R3*, respectivamente. Estas proteínas pueden ser activadas por receptores que poseen actividad de tirosina cinasa (RTKs) o receptores acoplados a proteínas tirosina cinasa tipo-Src. La Clase IB está compuesta de heterodímeros de una subunidad regulatoria p101 y una subunidad catalítica p110 $\gamma$  y son activados por receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) [99, 100].

Las PI3-K Clase II consisten de las siguientes isoformas: PIK3C2 $\alpha$  y PIK3C2 $\beta$  y la PIK3C2 $\gamma$  la cual es específica de hígado. Todas ellas se caracterizan por presentar un dominio C2 en el extremo carboxilo terminal, pero carecen de subunidades adaptadoras y pueden ser activadas por los RTKs [101].

Las PI3-K Clase III son enzimas heterodímeros formadas por la subunidad catalítica (Vps34, 100kDa) y la subunidad adaptadora (p150). Bajo estímulos de estrés, estas enzimas participan en el control del crecimiento y supervivencia celular, al regular la activación del blanco de rapamicina en mamíferos (mTOR) y el proceso de autofagia [102].

Las PI3-K de la Clase I han sido más estudiadas y especialmente la Clase IA, la cual está asociada con un amplio número de funciones celulares, incluyendo el crecimiento, proliferación y supervivencia celular. Asimismo, las alteraciones de estas cinasas, se encuentran implicadas en diversas enfermedades humanas, incluyendo el cáncer [103]. Estudios realizados en líneas celulares de cáncer de ovario y en tumores primarios, han demostrado que el gene *PI3KCA* que codifica para la subunidad PI3-K $\alpha$  se encuentra mutado y amplificado, sugiriéndose que funciona como un oncogene en esta patología [104, 105].

En la vía de señalización de PI3-K, una de las proteínas blanco es la proteína cinasa B (PKB) o bien conocida como Akt. La Akt es una cinasa de serina-treonina y cuya familia en humanos consta de tres miembros: Akt1, Akt2 y Akt3. Los genes que los codifican se encuentran localizados en diferentes cromosomas. Estructuralmente, Akt presenta un extremo amino, que contiene un dominio homólogo a plecstrina (PH) que une fosfolípidos, un dominio cinasa central y un sitio regulatorio de fosforilación a serinas en el extremo carboxilo.

Como ya se mencionó anteriormente, la actividad de Akt está regulada por PI3-K, ya que el producto de PI3-K el fosfatidilinositol trifosfato, recluta a Akt a la membrana celular, permitiendo su activación por PDK1 [106-108].

La Akt modula la función de numerosos sustratos involucrados en la regulación de la supervivencia, proliferación, crecimiento, metabolismo y migración celular. Así, una vez que Akt está activa, fosforila a las proteínas BAD y caspasa 9, inhibiendo su actividad apoptótica y promoviendo por tanto, la supervivencia celular. Por otro lado, fosforila a dos factores de transcripción que regulan la expresión de genes con actividad antiapoptótica como es: CREB y la cinasa I $\kappa$ B (IKK), la cual actúa como un regulador positivo de NF- $\kappa$ B [107, 108].

Diversos estudios han mostrado que la expresión de Akt varía en los diferentes tejidos. En cáncer de ovario la expresión de Akt se encuentra aumentada en un 15 y 20%, con una activación constante de Akt1 o Akt2. Además, tanto en líneas celulares como en el cáncer de ovario, la vía de señalización PI3-K/Akt se encuentra activada y desregulada [109, 110]. Es importante señalar que el control del balance de esta vía reside primeramente en la activación de la fosfatasa y homólogo de tensina conocido como PTEN y cuyo gene también denominado *PTEN* es considerado un gene supresor de tumores, que en condiciones fisiológicamente normales, regula negativamente la vía PI3-K-Akt. Por lo tanto, PTEN suprime el crecimiento celular tumoral ejerciendo un efecto antagonista al de las proteínas tirosina cinasa; regulando la invasión y la metástasis de las células tumorales a través de las interacciones con las proteínas de adhesión focal. La mutación de PTEN también ha sido asociada con ciertos tipos de cánceres, entre ellos el cáncer de ovario [111].

La importancia de la vía de Akt también reside en que promueve la angiogénesis a través de la activación de la sintasa de óxido nítrico endotelial (eNOS) y por la producción de VEGF. Por otro lado, promueve la invasividad inhibiendo anoikis y estimulando la secreción de metaloproteasas [112, 113]. También se sabe, que la vía PI3-K/Akt interviene en la resistencia a los agentes quimioterapéuticos, por lo que en modelos tanto *in vitro* como *in vivo* de cáncer de ovario, la inhibición de esta vía de transducción de señal, incrementa la eficacia a medicamentos tales como el paclitaxel [113, 114]. Además, los estudios continúan para demostrar que la combinación de la inhibición de la vía de señalización PI3-K/Akt más la quimioterapia convencional, son una alternativa efectiva de tratamiento ya que se inhibe el crecimiento tumoral y la producción de ascitis en modelos de cáncer de ovario, mostrando efectos secundarios aceptables [115-117].

#### ***4.- Vía de señalización de las Proteínas Cinasas Activadas por Mitógenos (MAPKs) y su participación en cáncer***

La vía MAP cinasa (MAPK), es una ruta de señalización involucrada en la regulación de múltiples procesos celulares, entre los que se encuentran el crecimiento, proliferación, diferenciación, migración y apoptosis y cuyo desequilibrio participa en un amplio número de enfermedades, incluyendo inflamación crónica y cáncer [118]. En mamíferos estas proteínas cinasas de serina-treonina (MAPKs) se han agrupado en tres subfamilias diferentes y cada una presenta varias isoformas. En el primer grupo se encuentran a las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs), p44 MAPK1 (ERK1) y p42 MAPK

(ERK2). En el segundo grupo se encuentran las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPKs), denominadas también como cinasas de la región amino terminal del factor de transcripción c-jun (JNKs), las cuales incluyen a JNK2 (p54 SAPK $\alpha/\beta/\gamma$ ) y JNK1 (p45 SAPK). En términos generales, se denotan como: JNK/SAPK. Finalmente en el grupo tres se encuentran las MAPKs p38 que comprenden las isoformas *alfa*, *beta*, *gama* y *delta* y son llamadas p38 debido a su peso molecular, aunque también se les conoce como vías de estrés MAPK. La activación de estas MAPKs es regulada por una cascada de proteínas cinasas independientes [119, 120].

De los miembros de la familia MAPK más ampliamente estudiados en mamíferos, se encuentra ERK1/2. Estas cinasas son esencialmente activadas por una variedad de receptores involucrados en el crecimiento y diferenciación celular, incluyendo los RTKs, integrinas, canales iónicos, citocinas y proto-oncogenes. Las proteínas JNK son activadas principalmente por citocinas, radiaciones UV, algunos factores de crecimiento, agentes dañinos al DNA, ciertos GPCRs y suero. En tanto que p38 es fuertemente activada por ambientes de estrés y citocinas inflamatorias [121-123].

Cada grupo de MAPKs pueden ser activadas por estímulos específicos que activan receptores del tipo RTKs y GPCRs (para factores de crecimiento y hormonas). Una vez activadas pueden fosforilar un amplio número de proteínas citoplasmáticas y nucleares, ejerciendo una función específica. De esta manera las proteínas miembros de la vía de señalización de las MAPKs, pueden regular de manera fisiológica diversos procesos celulares; sin embargo, el descontrol en

estos sistemas de señalización puede contribuir de una manera fisiopatológica en procesos tales como la oncogénesis [82, 124, 125] .

Estudios previos han demostrado que la alteración en los niveles de expresión o activación constante de ERK se encuentran asociados al desarrollo y progresión de diversos tipos de cáncer, incluyendo el carcinoma epitelial de ovario, ya que la inhibición de ERK (con el inhibidor PD98059) en líneas celulares epiteliales de ovario normal, preneoplásico y neoplásico estimuladas con FSH, disminuyó la proliferación celular tanto de las células normales como de las tumorales [36].

Las MAPKs p38 regulan la expresión de varias citocinas, por lo tanto, están asociadas a enfermedades con un componente inflamatorio (como asma y autoinmunidad) [126]. La proteína p38 ha sido considerada como un supresor de tumores, ya que se ha visto la conexión entre alteraciones en la regulación de la vía MAPKs p38 y tumorigénesis, por lo tanto, una reducción en la actividad de p38 es considerada pro-carcinogénica [127]. La proteína p38 frena la progresión del ciclo celular, ya sea por una directa fosforilación de Cdc25, quien juega un papel activo en la regulación y coordinación del ciclo de división celular, o bien por la regulación transcripcional de genes blanco, involucrados en el ciclo celular tales como ciclinas. Por otro lado, se ha demostrado que p38 induce muerte celular a través de la fosforilación de la proteína supresora de tumores p53, confiriendo a la célula tumoral cierta quimiosensibilidad [128-130].

La vía de las cinasas JNK/SAPK es muy compleja, tienen una importante participación en el control de la muerte celular programada. Hay varios estudios que demuestran que JNK participa como mediador de apoptosis y no como un

inductor directo de ésta, por lo tanto, JNK parece contribuir a la inducción de apoptosis al activar componentes de la vía intrínseca de la apoptosis, los cuales funcionan a nivel de la mitocondria activando proteínas pro-apoptóticas e induciendo la liberación del citocromo C [129]. Además, hay evidencias de que JNK puede regular la progresión del ciclo celular por la activación de ciertos reguladores de este ciclo. Estos datos apoyan que en la inhibición del crecimiento tumoral inducida por quimioterapia, existe un incremento en la activación de las cinasas JNKs [126, 131],

Son varias las vías de señalización intracelular que de alguna manera se encuentran implicadas en cáncer de ovario. En la presente tesis, nuestro interés está en determinar cuáles son algunas de las vías de señalización que están implicadas en cáncer de ovario, que pudieran estar regulando la expresión de Acrogranina en este tipo de cáncer, usando como modelo líneas celulares de cáncer de ovario y la inhibición de las vías con compuestos químicos específicos para cada una de las vías de transducción de señal propuestas.



## **II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

En México, el cáncer de ovario ocupa el séptimo lugar de cáncer en mujeres; en el Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 del IMSS este tipo de cáncer corresponde al 15% de todos los cánceres ginecológicos, con un promedio de 90 casos por año. En la actualidad la etiología y los eventos tempranos que se presentan durante la progresión del carcinoma de ovario son poco entendibles. Recientemente, se ha demostrado que la Acrogranina juega un papel importante en este cáncer, por lo que tomando en cuenta la expresión y la actividad de la Acrogranina en la progresión y malignidad de las células de ovario cancerígenas, actuando como un factor autócrino y/o parácrino, se plantea la siguiente pregunta a responder en el presente anteproyecto: ¿Cuál o cuáles son las vías de señal de transducción que regulan la expresión de la Acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario? El conocer cómo se lleva a cabo la regulación de la expresión de la Acrogranina en esta patología, sería de gran utilidad para el establecimiento de nuevas estrategias de tratamiento en el cáncer de ovario.

### **III. OBJETIVO GENERAL**

Establecer y caracterizar las vías de transducción de señales que regulan la expresión de la Acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario.

#### **Objetivos Específicos**

1. Determinar el efecto de inhibidores de PKC, PKA, PI3-K, ERK, p38 y Akt en la expresión del RNAm de la Acrogranina en líneas celulares provenientes de tumor sólido y líquido de ascitis de cáncer de ovario.
2. Conocer la acción que ejercen los inhibidores de PKC, PKA, PI3-K, ERK, p38 y Akt en la síntesis de la Acrogranina en líneas celulares provenientes de tumor sólido y líquido de ascitis de cáncer de ovario.

### **IV. HIPÓTESIS**

La expresión de la Acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario, es regulada preferencialmente por una de las vías de señalización estudiadas.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### A) Tipo de Estudio

Se trata de un estudio experimental con células.

### B) Material

#### a) Líneas Celulares

Para la realización de este proyecto de utilizaron las líneas celulares NIH-Ovcar-3 y la SK-Ov-3 (ATCC, NIH). La línea celular NIH-Ovcar-3 que proviene de un carcinoma epitelial de ovario, está constituida de células capaces de crecer en medio agar y tiene un cariotipo anormal. Son resistentes a medicamentos utilizados en quimioterapia como la adriamicina, melfalan y cisplastina a las dosis estándar utilizadas. Por otro lado, cuentan con receptores positivos para estrógenos, progesterona y andrógenos. Por su parte, la línea celular SK-Ov-3 que proviene de ascitis de un adenocarcinoma de ovario, son células resistentes al factor de necrosis tumoral y a varias drogas citotóxicas como la toxina de la difteria, cis-platinum y la adriamicina. En ratones incapaces de producir una respuesta inmune, el inóculo de estas células es capaz de formar un adenocarcinoma de estirpe ovárico bien diferenciado.

#### b) Inhibidores de las señales de transducción utilizados

**Calfostin C.** Fue obtenido de la compañía Calbiochem. Es un inhibidor altamente específico de la proteína cinasa C, compite por el dominio regulatorio de esta

cinasa C. La Dosis Efectiva al 50% ( $ED_{50}$ ) es igual a 50 nM. Las dosis utilizadas en este proyecto fueron de 75, 150, 300, 600 y 1200 nM.

**H89.** Este compuesto fue obtenido de la compañía Calbiochem. Es un potente y selectivo inhibidor de la PKA, al unirse al sitio de unión del ATP. Tiene una  $ED_{50}$  de aproximadamente 48 nM. Las dosis utilizadas en este proyecto fueron de 5, 10, 20 y 40  $\mu$ M.

**LY294002.** Este compuesto fue obtenido de Calbiochem. Es un inhibidor celular permeable, altamente selectivo de PI3-K, el cual actúa como un antagonista competitivo por el sitio de unión de ATP de la subunidad p110 de PI3-K. Con una  $ED_{50}$  reportada de 1 a 50  $\mu$ M. Las dosis utilizadas en este proyecto fueron de 1.25, 2.5, 5, 10 y 20  $\mu$ M.

**Wortmanina.** Obtenido de Calbiochem. Es un inhibidor celular permeable, selectivo de PI3-K, compite por el sitio de unión de ATP de la subunidad catalítica (p110) de PI3-K. La  $ED_{50}$  es de 5 nM. Las dosis utilizadas en este proyecto fueron de 100, 200, 400, 800 y 1600 nM.

**PD98059.** Obtenido de Calbiochem. Inhibe la activación de las MAPK: ERK1/2, compitiendo por el sitio de unión del ATP en la MAPKK. Tiene una  $ED_{50}$  de 2-10  $\mu$ M. Las dosis utilizadas en este proyecto fueron de 12.5, 25, 50 y 100  $\mu$ M.

**SB203580.** Obtenido de Calbiochem. Es un inhibidor celular permeable, es altamente selectivo de las p38-MAPKs (p38 $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\beta$ 2). Actúa como un inhibidor

competitivo en el sitio de unión de ATP de la cinasa. Se ha reportado una ED<sub>50</sub> de 21 nM a 1 μM. Las dosis utilizadas en este proyecto fueron de 5, 10, 20 y 40 μM.

**Inhibidor de Akt.** Obtenido de Calbiochem. Es un compuesto que inhibe la activación de Akt al unirse al sitio de unión del ATP. Este compuesto actúa como un inhibidor competitivo en el sitio de unión de ATP de la cinasas. Se ha reportado una ED<sub>50</sub> de 1-10 μM. Las dosis utilizadas en este proyecto fueron de 6.25, 12.5, 25 y 50 μM.

### **C) Métodos**

**a) Cultivo Celular e Inhibidores.** Las líneas celulares de cáncer de ovario fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (NIH-Ovcar-3) y DMEM (SK-Ov-3) (Gibco/Invitrogen Cor. CA, USA) conteniendo 2mM de L-Glutamina, 4.5 g/L de glucosa, 10 mM de HEPES, 1.0mM de piruvato de sodio, 1.5 g/L de bicarbonato de sodio y suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB). Las células fueron cultivadas en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C. Después de 24 h las células fueron cultivadas en presencia de las diferentes dosis de cada uno de los inhibidores de las vías de señal [Calfostin C (PKC), H89 (PKA), PD98059 (ERK), SB203580 (p38), LY294002 (PI3-K), Wortmanina (PI3-K) y el Inhibidor de Akt (Akt)]. El período de incubación fue por 24 h y solamente con Wortmanina el período fue de 12 h. Estas condiciones de cultivo y las dosis utilizadas de los diferentes inhibidores fueron previamente estandarizadas con base en la literatura y a la ED<sub>50</sub> de cada inhibidor. En cada uno de los experimentos, los controles fueron células con medio suplementado con SFB, en

ausencia del inhibidor y en presencia del vehículo (dimetil sulfoxido, DMSO) utilizado como diluyente para cada inhibidor.

**b) Cuantificación de Proteínas.** Una vez concluidos los cultivos, las células fueron lisadas con el buffer de lisis conteniendo 1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 10 M Na<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub>, 1 mM PMSF, 10 µg/ml leupeptina, 1% aprotinina. El lisado fue centrifugado a 12,000 g por 15 min a 4 °C; se guardó el sobrenadante y las proteínas fueron cuantificadas utilizando el método de Ácido Bicinconínico (BCA) (protein assay, Pierce). Las muestras obtenidas se guardaron a -80°C hasta su futuro análisis por western blot.

**c) Ensayo de Viabilidad.** Para la prueba de viabilidad se usó el Kit CytoTox 96 Non-Radioactive (Promega). Esta técnica se basa en evaluar la citotoxicidad del inhibidor, al valorar la liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) al medio, en relación con la viabilidad celular. Las líneas celulares fueron cultivadas en placas de 96 pozos, bajo las mismas condiciones que los cultivos celulares con cada inhibidor. En cada uno de los experimentos los controles fueron células con medio suplementado con SFB, en ausencia del inhibidor y con el vehículo utilizado. Una vez concluidos los cultivos, la placa de 96 pozos se centrifugó a 3,000 rpm durante 5 min. A temperatura ambiente, se tomó la mitad del medio (50 µl), el cual se transfirió a un pozo nuevo. Posteriormente las células fueron lisadas agregando 5 µl de una solución de lisis 10X conteniendo 9% de

Tritón X-100 (v/v) en agua e incubadas durante 45 min, en una atmósfera húmeda con 5% CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C. Transcurrido este tiempo a cada uno de los pozos se les adicionó 50 µl de una solución conteniendo 0.2g/L KCl, 8.0g/L NaCl, 0.2g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.15g/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 1% de albúmina sérica bovina (BSA), que al interaccionar con el medio de cultivo, reaccionó produciendo un cambio de coloración del mismo, y al llegar a un color salmón, a cada pozo de cultivo se le adicionó 50 µl de una solución para detener la reacción la cual contenía ácido acético 1M. Finalmente, la placa de cultivo fue leída en un lector a una absorbancia de 490nm.

**d) Técnica de Western Blot.** El inmunoblot se realizó como ha sido descrito previamente por Díaz-Cueto y cols. 2000 [54]. Cinco y Diez µg de proteínas totales fueron separados por electroforesis en SDS-poliacrilamida utilizando un gel al 10% y posteriormente transferidos a una membrana de PVDF. La membrana fue bloqueada con buffer salino-Tris (TBS) conteniendo 5% de leche y 0.1% tween-20. Posteriormente para la detección de la Acrogranina, la membrana fue incubada en presencia del anticuerpo policlonal (Proporcionado por el Dr. George Gerton, Universidad de Pennsylvania, EUA) a una dilución de 1:2000 y para la detección de actina, el anticuerpo se utilizó a una dilución de 1:2000 (proporcionado por el Dr. José Manuel Hernández Hernández, Departamento de Biología Celular, CINVESTAV, México). Ambos anticuerpos fueron diluidos en TBS-con leche y la incubación se realizó durante toda la noche a 4°C. Después la membrana fue lavada con TBS-Tween 0.1% y se añadió el

segundo anticuerpo, una IgG anti-conejo para la detección de Acrogranina y una IgG anti-ratón para la detección de actina, ambas conjugadas con horseradish-peroxidasa a una dilución de 1:5000, incubando por 90 min a temperatura ambiente. Posteriormente la membrana fue sometida a varios lavados con TBS-Tween 0.1% y las proteínas fueron detectadas por medio del sistema SuperSignal Femto Chemiluminescent Substrate (Pierce). Como controles se utilizaron lisados de tejidos con cáncer de ovario en los cuales previamente se detectó la presencia de la proteína.

**e) Extracción del RNA.** Para la obtención del RNA aproximadamente  $1 \times 10^6$  células fueron homogenizadas en 1 ml de Trizol (Invitrogen) siguiendo las indicaciones del fabricante. Una vez aislado el RNA, éste se cuantificó y 1  $\mu$ g se utilizó para la realización de la transcripción reversa (RT).

**f) Transcripción Reversa (RT).** El DNA complementario (DNAc) se generó usando la enzima SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Invitrogen). La mezcla de la reacción para realizar la transcripción reversa (RT) consistió de SuperScript RTase buffer, 10 mM dNTPs, 0.5  $\mu$ g oligo-dT, 200 U SuperScript RTase, y 1  $\mu$ g del RNA total purificado en un volumen de 20  $\mu$ l. La mezcla de reacción fue incubada a 42°C por 50 min y 70°C por 15 min. El DNA complementario (DNAc) obtenido fue diluido en H<sub>2</sub>O-DEPC (1  $\mu$ g de DNAc en 200  $\mu$ l de volumen) y se procedió a la realización del PCR.



**g) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** Para la valoración semicuantitativa de la expresión del RNAm de la Acrogranina se empleó la técnica PCR, utilizando los siguientes oligonucleótidos: 1) 5' CGG GCA TTC GAA CTG ACT ATC 3' y 2) 5' GTC TCA GGG ACT TCC AGT TGC T 3'. Como control se amplificó el gen  $\beta$ -actina empleando los siguientes oligonucleótidos: 1) 5' TCT AGA CTT CGA GCA GGA GAT GG 3' y 2) 5' TCG TTG CCA ATA GTG ATG ACT TG 3'. Para la reacción del PCR se utilizó PCR mix (Invitrogen), 300 nM de cada uno de los oligonucleotido (2  $\mu$ l) y 10  $\mu$ l del DNAc generado en la RT en un volumen final de 50  $\mu$ l. El PCR se realizó utilizando un termociclador Eppendorf (mastercycler gradient) bajo las siguientes condiciones: un ciclo inicial a 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos de 95°C por 15 seg, y 60°C por 60 seg.

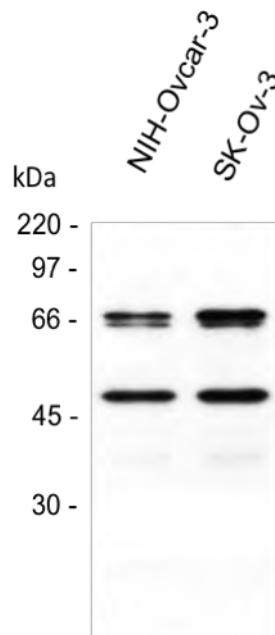
#### **D) Análisis Estadístico de los Datos**

Las diferentes bandas de Acrogranina detectadas en los western blot y plasmadas en las placas radiográficas fueron analizadas por densitometría utilizando el programa NIH ImageJ, con la finalidad de obtener un valor semicuantitativo. El mismo procedimiento fue realizado para las bandas de RNAm obtenidas en las fotografías de los geles de agarosa. Para valorar si existían diferencias estadísticamente significativas tanto para el RNAm como para la proteína de Acrogranina, se realizó el análisis estadístico de 4 experimentos para cada inhibidor utilizando un ANOVA no paramétrico, con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Como estadística descriptiva se utilizó el promedio y el error estándar.

## VI. RESULTADOS

### ***Expresión de la Acrogranina en las líneas celulares NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3 en presencia de Suero Fetal Bovino.***

En los extractos celulares de ambas líneas de cáncer de ovario, por medio de la técnica de western blot, la Acrogranina fue detectada como dos bandas, en concordancia con lo reportado previamente [72]. Una de las bandas con un peso molecular de 67 kDa y la otra con una peso molecular de aproximadamente 50 kDa (Figura 4).

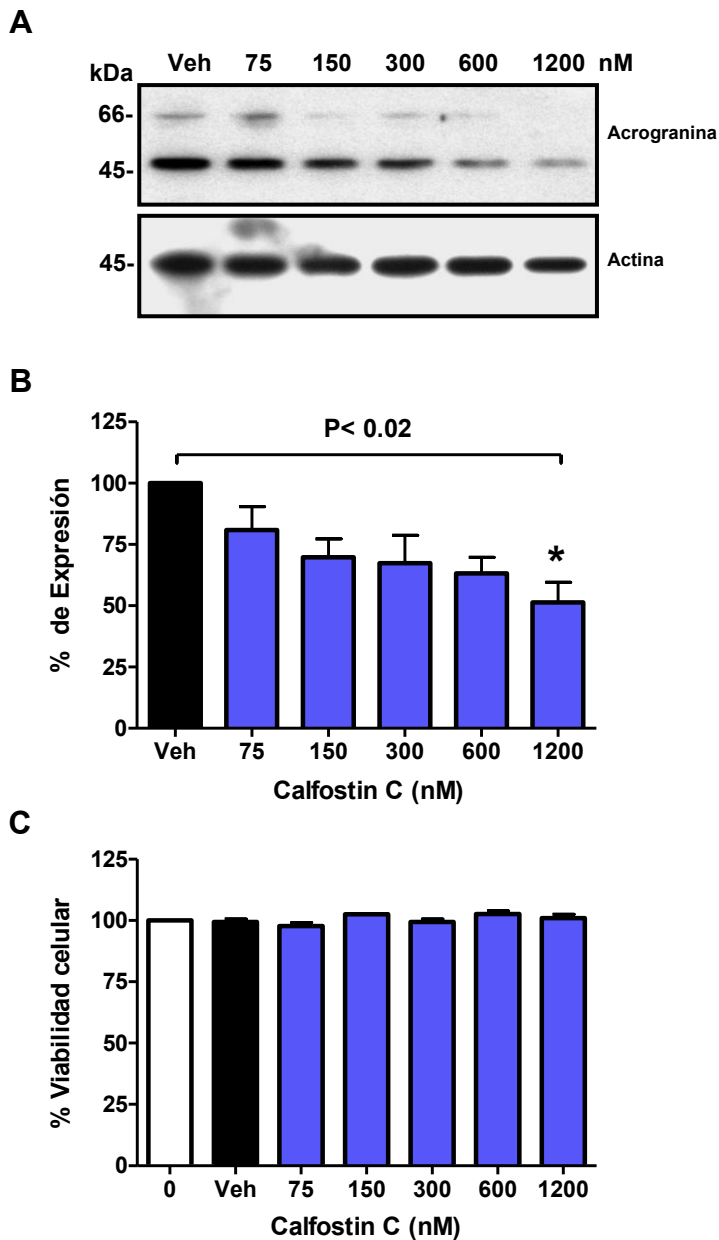


**Figura 4.** Expresión de la Acrogranina determinada por la técnica de western blot en extractos celulares de las líneas NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3 de cáncer de ovario. La Acrogranina se detectó como dos bandas, una de 67 kDa y la otra de aproximadamente 50 kDa en ambas líneas celulares.

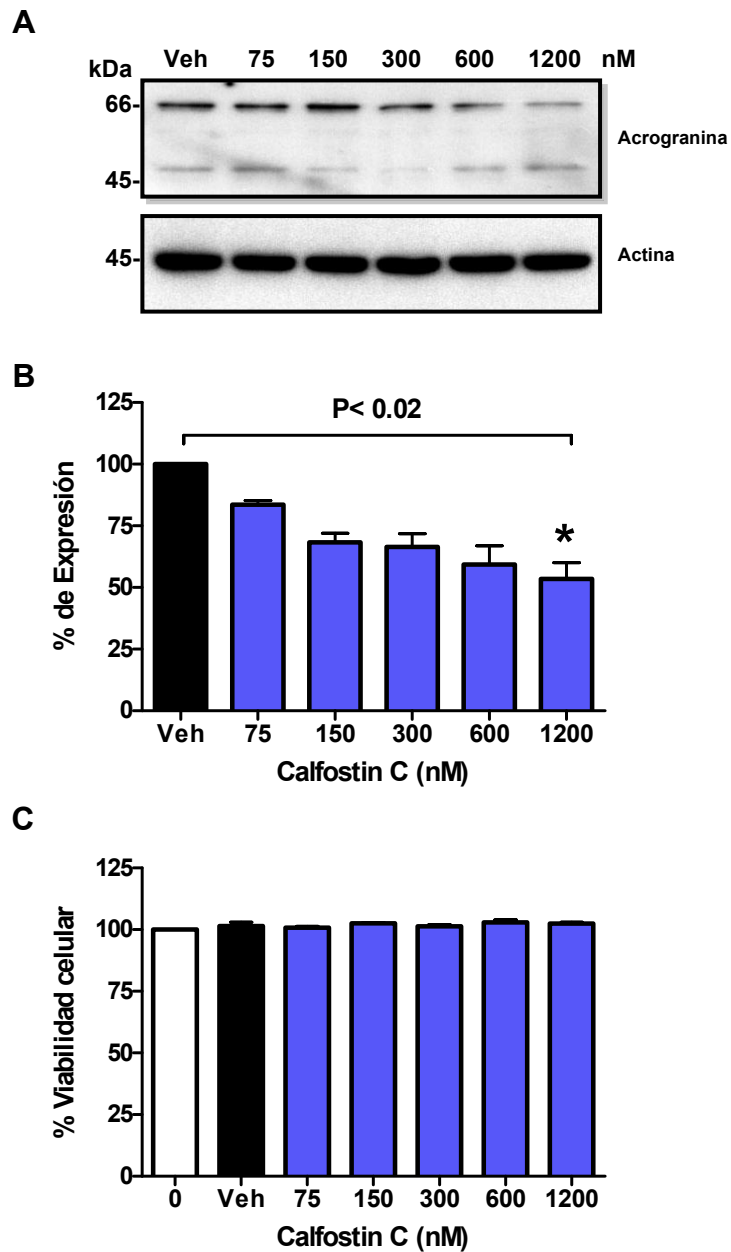
***La inhibición de la actividad de PKC disminuyó la expresión de la proteína Acrogranina en las células NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3.***

Para valorar la participación de la actividad de PKC en la regulación de la expresión de Acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario, se utilizó, el inhibidor general de PKC, Calphostin C. Una vez realizados los ensayos celulares de las líneas NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3 en presencia de diferentes concentraciones (75, 150, 300, 600 y 1200 nM) de Calphostin C durante 24 h, se determinó la expresión de Acrogranina por la técnica de western blot. Los resultados mostraron que en ambas líneas celulares NIH-Ovcar-3 (Figura 5A y B) y SK-Ov-3 (Figura 6A y B), el Calphostin C disminuyó la expresión de la proteína Acrogranina de una manera dosis-dependiente. Además, con la concentración más alta utilizada (1200 nM) la disminución fue estadísticamente significativa ( $p < 0.02$ ) al compararse con el control.

Por otra parte, la elevada concentración de Calphostin C (1200 nM) no afectó la viabilidad celular determinada con el Kit CytoTox96 en ambas líneas celulares (Figura 5C y 6C). Estos resultados sugirieron que la vía de PKC está involucrada en la regulación de la expresión Acrogranina en ambas líneas celulares.



**Figura 5.** Expresión de Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de Calfostin C por 24 h en la línea celular NIH-Ovcar-3. A) Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó a la actina. B) Representación gráfica del análisis de cuatro experimentos en donde se observa la disminución de la expresión de la Acrogranina de una manera dosis-dependiente en presencia de Calfostin C. Una diferencia significativa ( $p < 0.02$ ) fue observada con la dosis mayor (1200 nM) con respecto al control (vehículo). C) Representación gráfica de la prueba de viabilidad celular, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

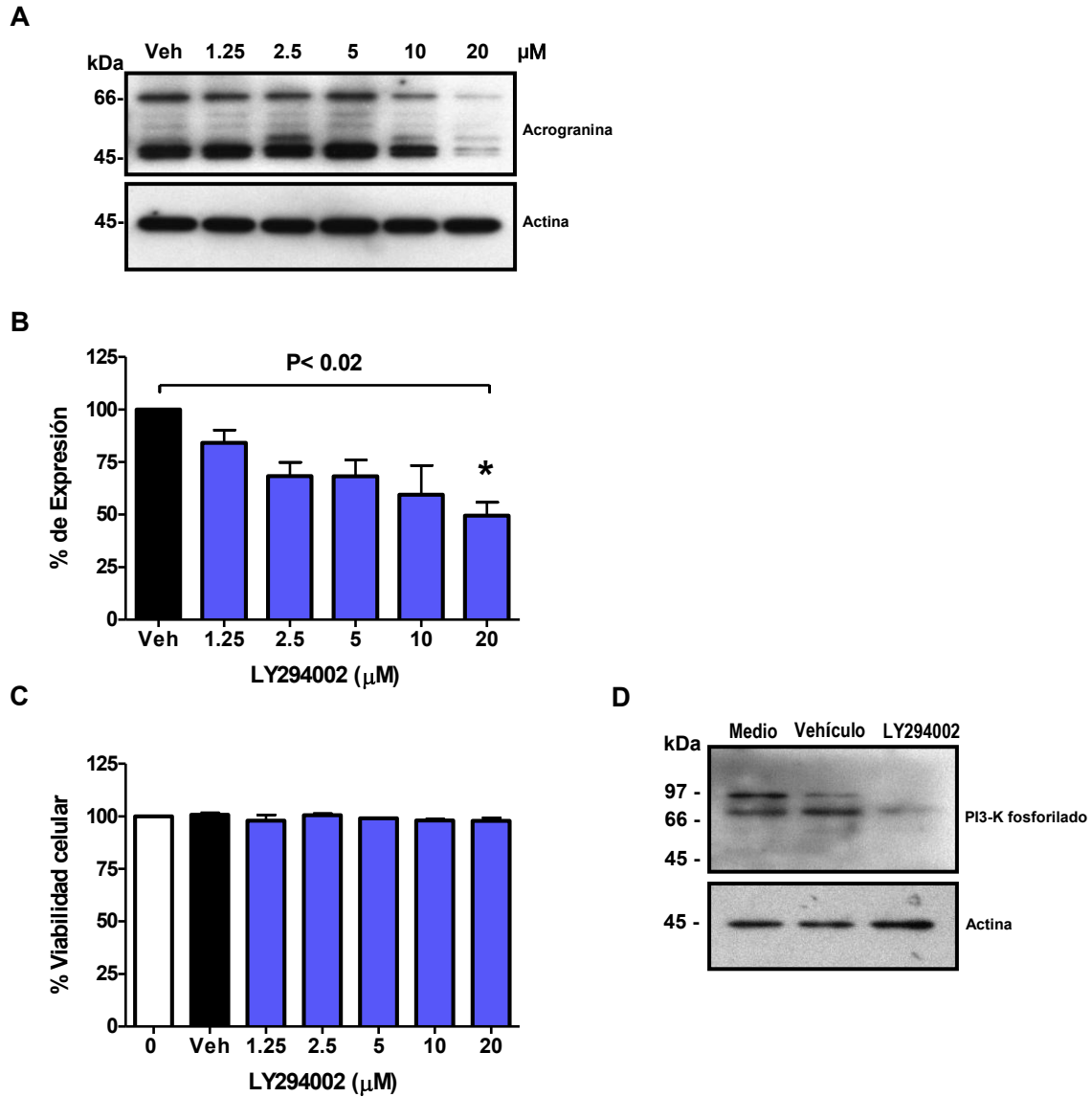


**Figura 6.** Expresión de Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de Calfostin C por 24 h en la línea celular SK-Ov-3. A) Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó a la actina. B) Representación gráfica del análisis de cuatro experimentos en donde se observa la disminución de la expresión de la Acrogranina de una manera dosis-dependiente en presencia de calfostin C. Una diferencia significativa ( $p < 0.02$ ) fue observada con la dosis mayor (1200nM) con respecto al control (vehículo). C) Representación gráfica de la prueba de viabilidad celular, no se observaron diferencias estadísticamente significativas.

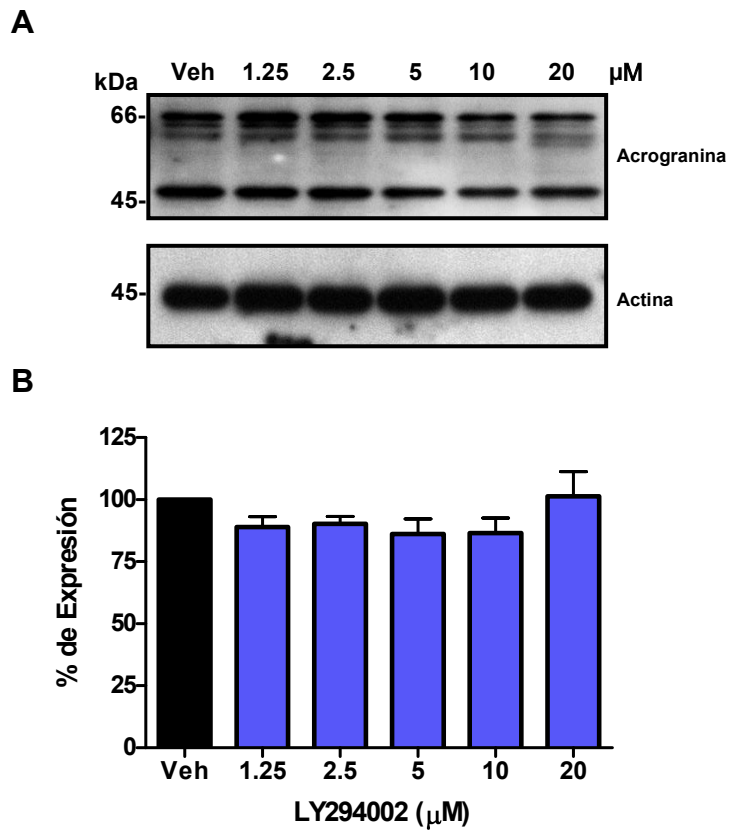
***La inhibición de la actividad de PI3-K disminuyó la expresión de la proteína Acrogranina en las células SK-Ov-3 pero no en las células NIH-Ovcar-3.***

La participación de PI3-K en la regulación de la expresión de Acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario, se valoró utilizando el compuesto LY294002, un inhibidor de PI3-K. Una vez realizados los ensayos celulares de las líneas NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3 en presencia de diferentes concentraciones (1.25, 2.5, 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ ) de LY294002 durante 24 h, se determinó la expresión de Acrogranina por la técnica de western blot. En las células SK-Ov-3 (Figura 7A y B) el LY294002 disminuyó la expresión de la proteína Acrogranina de una manera dosis-dependiente, y además con la concentración más alta utilizada (20  $\mu\text{M}$ ) la disminución fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) al compararse con la producción de esta proteína en presencia del vehículo pero en ausencia de LY294002. Asimismo, la elevada concentración de LY294002 (20  $\mu\text{M}$ ) no afectó la viabilidad celular determinada con el Kit CytoTox96 (Figura 7C). También se pudo confirmar una disminución de la PI3-K fosforilada con la dosis mayor de LY294002 utilizada (Figura 7D).

En las células NIH-Ovcar-3, con la máxima concentración (20  $\mu\text{M}$ ) de LY294002 no se observó ninguna disminución en la expresión de la Acrogranina (Figura 8A y B). Por lo que estos resultados sugieren que sólo en las células SK-Ov-3 la vía de transducción de señal que involucra a PI3-K, también está involucrada en la regulación de la expresión de la Acrogranina.



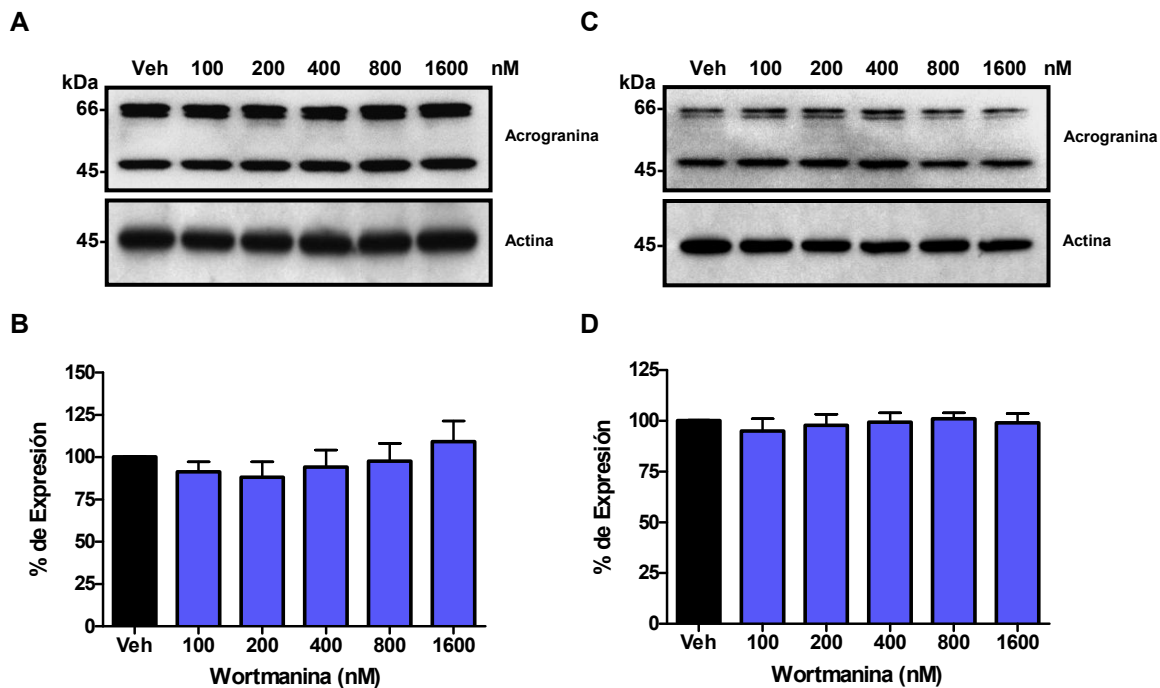
**Figura 7.** Expresión de Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de LY294002 (inhibidor de PI3-K) por 24 h en la línea celular SK-Ov-3. A) Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó la actina. B) Gráfica que muestra el análisis de cuatro experimentos en donde se observa la disminución de la expresión de la Acrogranina de una manera dosis dependiente en presencia del LY294002. Una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.02$ ) fue observada con la dosis mayor (20  $\mu\text{M}$ ) con respecto al control (vehículo). C) Representación gráfica de la prueba de viabilidad celular, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. D) Disminución de PI3-K fosforilado en presencia de la concentración mayor de LY294002 (20  $\mu\text{M}$ ).



**Figura 8.** Expresión de Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de LY294002 (inhibidor de PI3-K) por 24 h en la línea celular NIH-Ovcar-3. A) Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó la actina. B) Gráfica que muestra el análisis de cuatro experimentos en donde no se observa ninguna disminución de la expresión de la Acrogranina en forma significativa con las diferentes concentraciones de LY294002.

A pesar de que el compuesto Wortmanina es también un inhibidor de PI3-K, no se observó ningún efecto sobre la expresión de Acrogranina tanto en las células SK-Ov-3 (Figura 9A y B) como en las NIH-Ov-3 (Figura 9C y D), después de 12 h de exposición con diferentes concentraciones de este inhibidor.



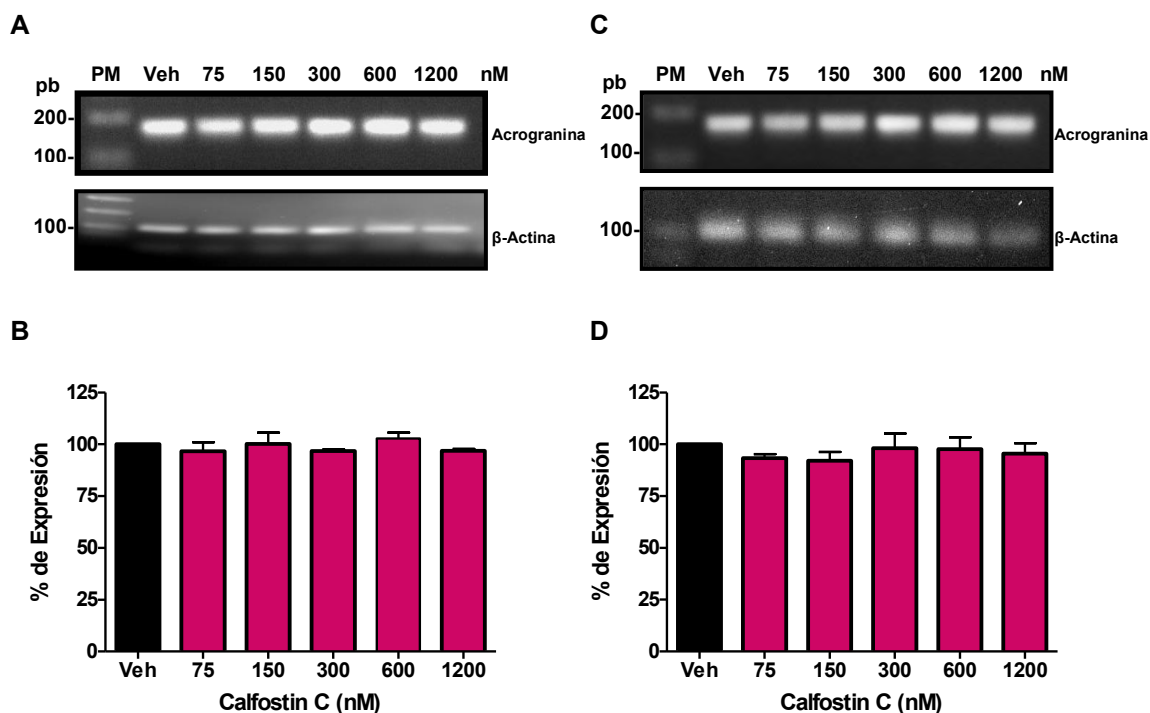


**Figura 9.** Expresión de Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de Wortmanina (inhibidor de PI3-K) por 12 h en las líneas celulares de cáncer de ovario. A y C) Western blot representativo de cuatro experimentos independientes A) Células NIH-Ovcar-3, C) Células SK-Ov-3. Como control de carga se detectó la actina. B y D) Gráficas que muestran el análisis de cuatro experimentos en donde no se observó ninguna disminución de la expresión de la Acrogranina en forma significativa con las diferentes concentraciones de Wortmanina en las células NIH-Ovcar-3 y células SK-Ov-3 respectivamente.

***La inhibición de la actividad de PKC no disminuyó la expresión del ARNm de Acrogranina en las células NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3.***

Una vez que se encontró la disminución de la expresión de la proteína Acrogranina en las células NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3 al ser cultivadas en presencia del inhibidor de PKC (Calfostin C), se valoró si esta reducción de la expresión de la proteína Acrogranina era a expensas de una disminución de su RNAm. Para ello, se valoró la expresión del RNAm de la Acrogranina por medio de la técnica de RT-PCR. Como se puede observar en la figura 10, ni aún con la dosis más alta de Calfostin C utilizada (1200 nM) se disminuyó la expresión del RNAm de la

Acrogranina tanto en las células NIH-Ovcar-3 (Figura 10A y B) como en las células SK-Ov-3 (Figura 10C y D). Lo que sugiere que la vía de señalización de PKC está regulando la expresión de la Acrogranina a nivel de la estabilidad de la proteína pero no de su RNAm en ambas líneas celulares.

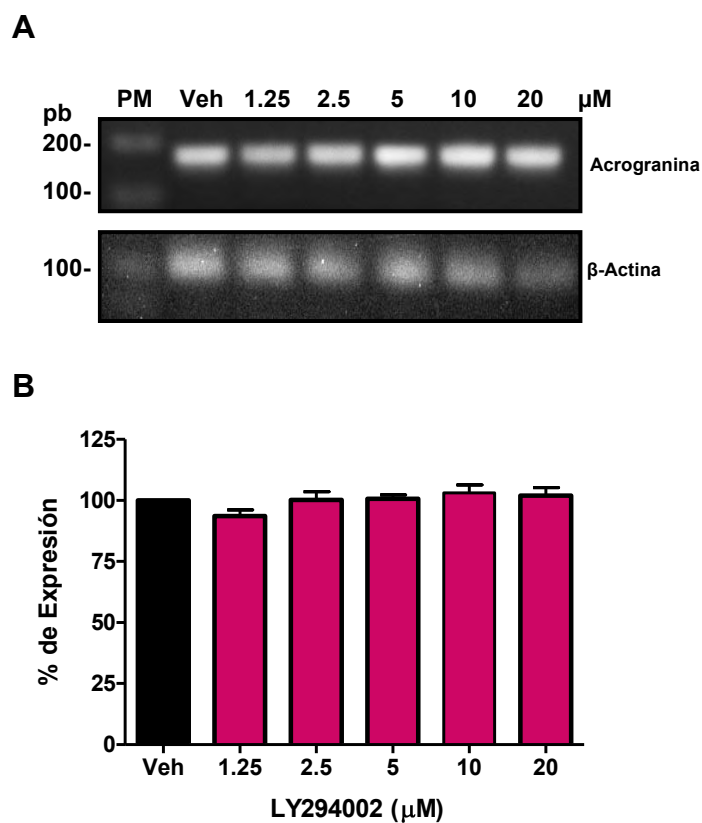


**Figura 10.** Expresión del RNAm de la Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de Calfostin C por 24 h en las líneas celulares de cáncer de ovario. Geles representativos de tres experimentos de las células NIH-Ovcar-3 (A) y SK-Ov-3 (C). Como control se determinó el RNAm de la  $\beta$ -actina. B y D) Representación gráfica del análisis de tres experimentos en donde no se observa ninguna disminución del RNAm de la Acrogranina en forma significativa tanto en las células NIH-Ovcar-3 como en las SK-Ov-3 respectivamente.

***La inhibición de la actividad de PI3-K no disminuyó la expresión del ARNm de Acrogranina en las células SK-Ov-3.***

Una vez valorada la reducción de la expresión de la proteína Acrogranina en las células SK-Ov-3 en presencia del inhibidor de PI3-K el LY294002, se

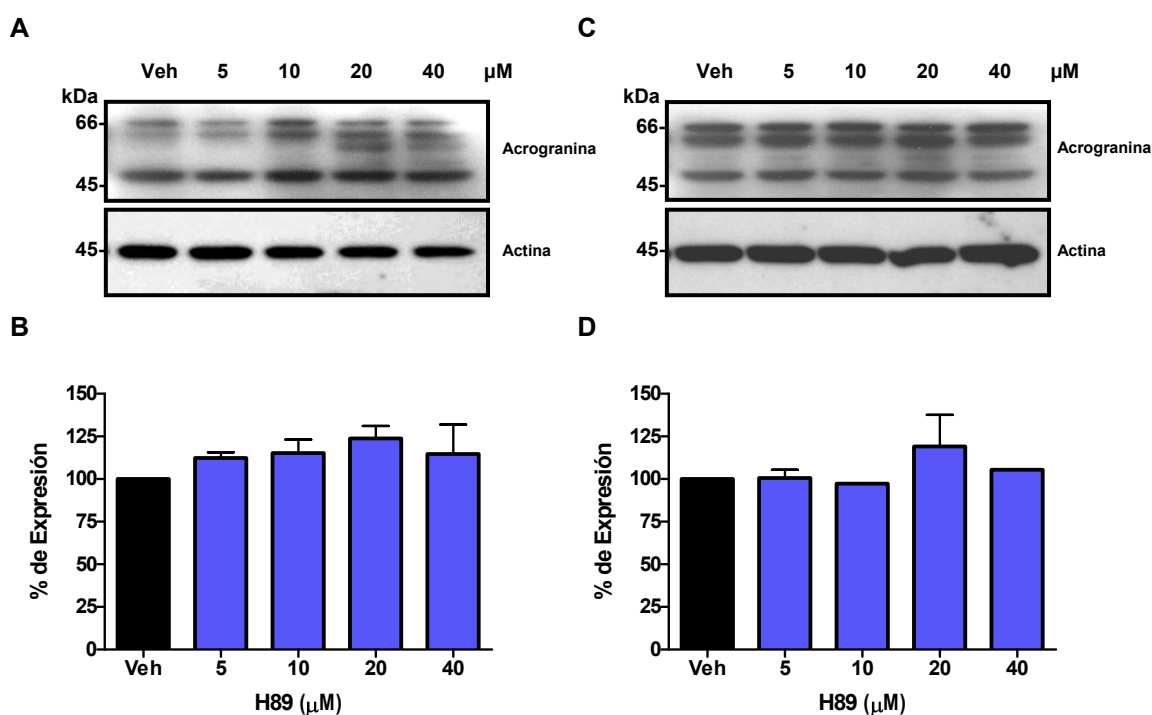
determinó si esta disminución de la expresión de la proteína Acrogranina era debida a una disminución de su RNAm. En nuevos ensayos celulares se determinó la expresión del RNAm de la Acrogranina por medio de la técnica de RT-PCR. Los resultados mostraron que el inhibidor de LY294002 aún en la más alta concentración (20 $\mu$ M), no disminuyó la expresión del RNAm de la Acrogranina en las células SK-Ov-3 (Figura 11). Por lo tanto, estos datos sugieren que en las células SK-Ov-3, la vía de señalización de PI3-K regula la expresión de la proteína Acrogranina pero no de la expresión de su RNAm.



**Figura 11.** Expresión del RNAm de la Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de LY294002 por 24 h en las células SK-Ov-3. A) Gel representativo de tres experimentos. Como control se utilizó el RNAm de la  $\beta$ -actina. B) Representación gráfica del análisis de tres experimentos en donde no se observa ninguna disminución del ARNm de la Acrogranina en forma significativa.

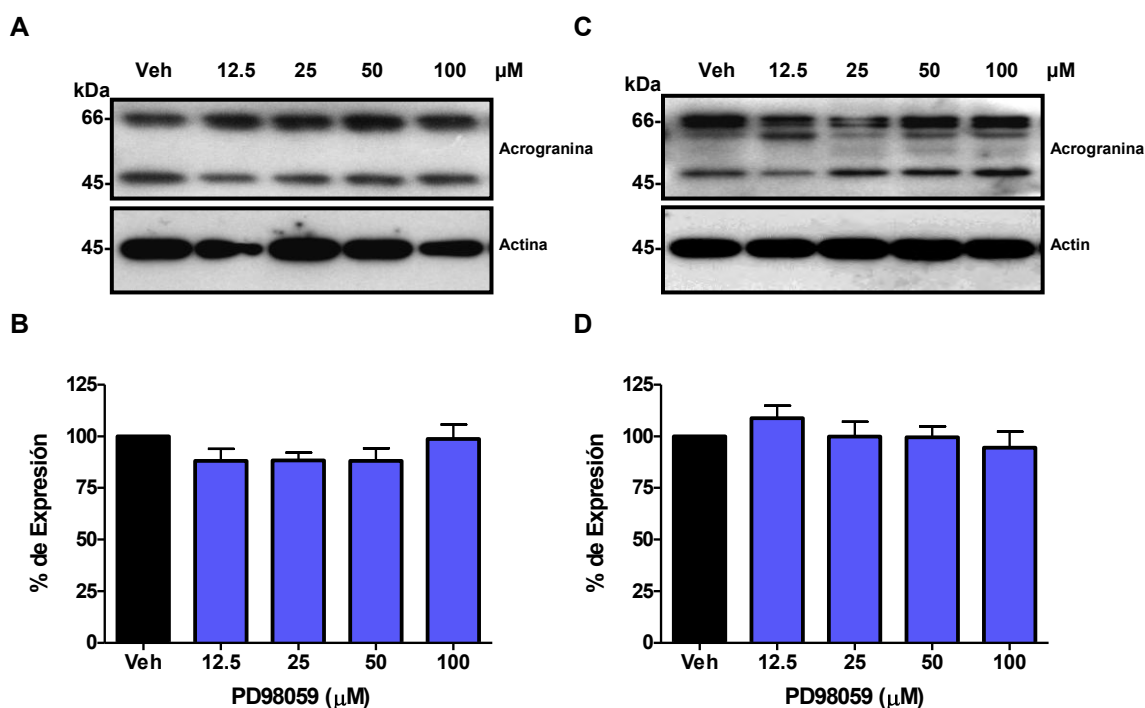
**La expresión de la proteína Acrogranina no se afectó en las células NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3 al inhibir la actividad de PKA, p38, ERK y Akt.**

Para determinar si las proteínas involucradas en vías de señalización como PKA, p38, ERK y Akt participan en la regulación de la expresión de la proteína Acrogranina en las líneas celulares NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3, se llevaron a cabo los ensayos celulares utilizando los inhibidores correspondientes y valorando la expresión de la Acrogranina mediante la técnica de western blot. En los resultados pudimos observar que ninguno de los compuestos, disminuyó la expresión de la Acrogranina en ambas líneas celulares, como son el H-89, inhibidor de PKA (Figura 12), el PD98059, inhibidor de ERK (Figura 13).

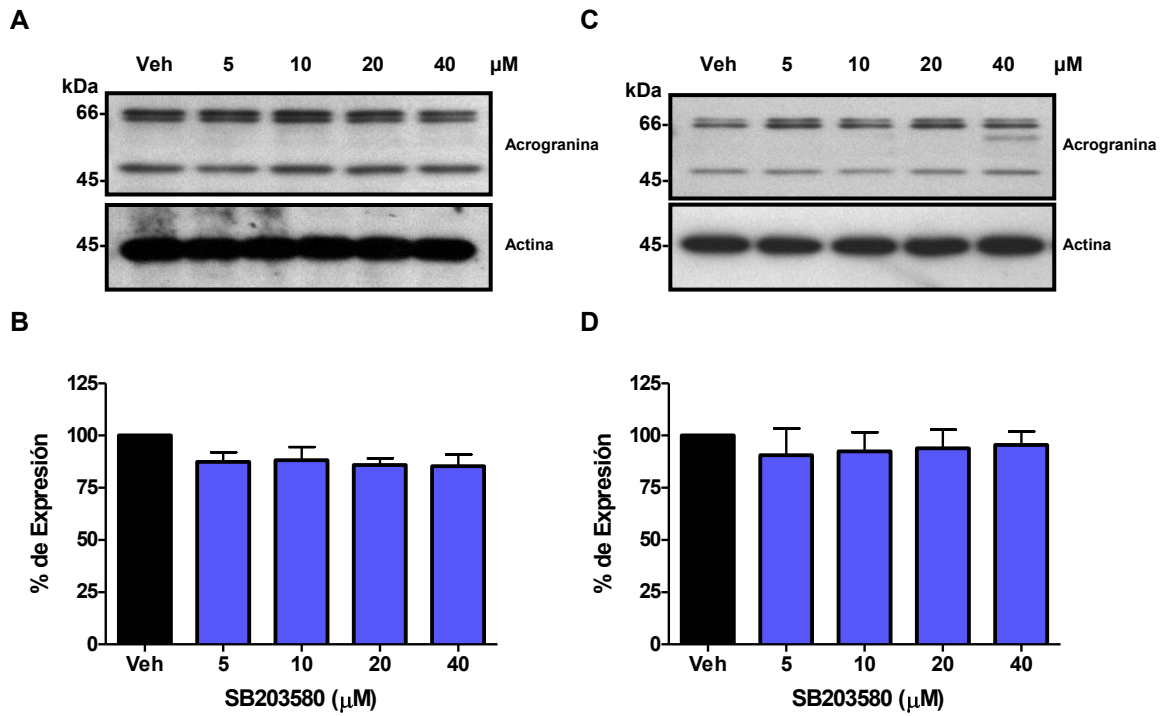


**Figura 12.** Expresión de Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de H89 (inhibidor de PKA) por 24 h en las líneas celulares NIH-Ovcar-3 (A y B) y SK-Ov-3 (C y D). A y C) Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó la actina. B y D) Gráficas que muestran el análisis de cuatro experimentos en donde no se observa ninguna disminución de la expresión de la Acrogranina en forma significativa con las diferentes concentraciones de H89 en las células NIH-Ovcar-3 y en las SK-Ov-3 respectivamente.

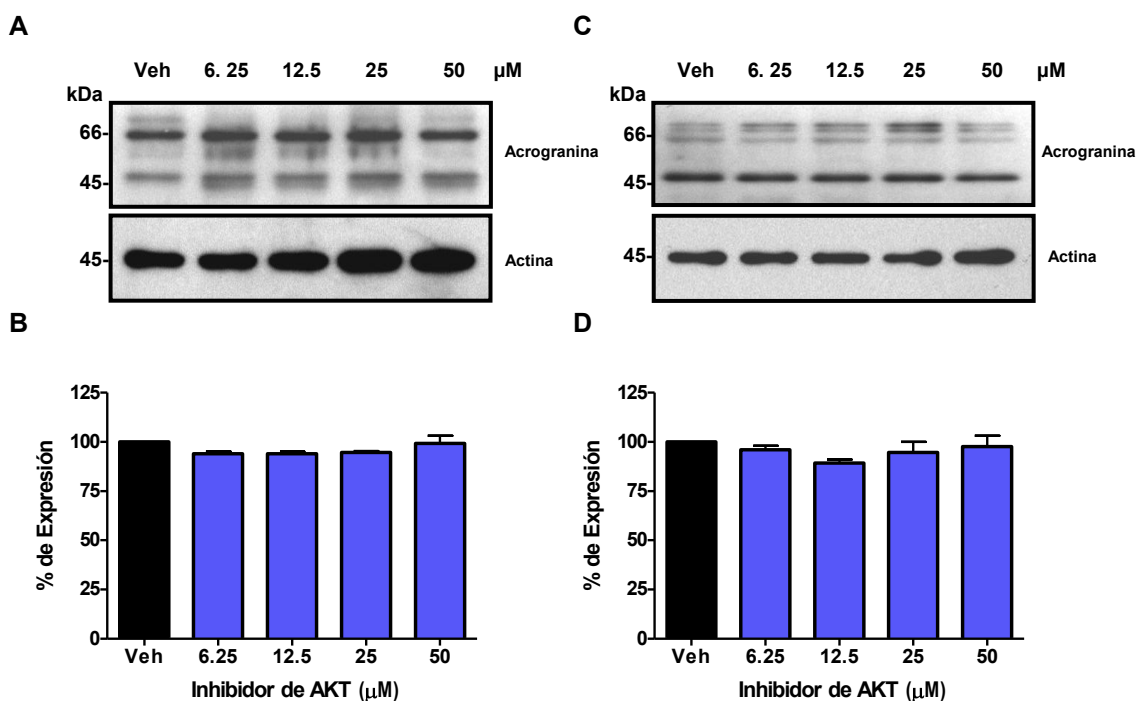
Asimismo, el SB203580, inhibidor de p38 (Figura 14) y el inhibidor de Akt (Figura 15), han demostrado que las proteínas como PKA, p38, ERK y Akt no tienen ninguna participación en la regulación de la expresión de la Acrogranina en estas líneas celulares.



**Figura 13.** Expresión de Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de PD98059 (inhibidor de ERK) por 24 h en las líneas celulares NIH-Ovcar-3 (A y B) y SK-Ov-3 (C y D). A y C) Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó la actina. B y D) Gráficas que muestran el análisis de cuatro experimentos en donde no se observa ninguna disminución de la expresión de la Acrogranina en forma significativa con las diferentes concentraciones de PD98059 en las células NIH-Ovcar-3 y en las SK-Ov-3 respectivamente.



**Figura 14.** Expresión de Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis de SB203580 (inhibidor de p38) por 24 h en las líneas celulares NIH-Ovcar-3 (A y B) y SK-Ov-3 (C y D). A y C) Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó la actina. B y D) Gráficas que muestran el análisis de cuatro experimentos en donde no se observa ninguna disminución de la expresión de la Acrogranina en forma significativa con las diferentes concentraciones de SB203580 en las células NIH-Ovcar-3 y en las SK-Ov-3 respectivamente.



**Figura 15.** Expresión de Acrogranina en respuesta al tratamiento con diferentes dosis del inhibidor de Akt por 24 h en las líneas celulares NIH-Ovcar-3 (A y B) y SK-Ov-3 (C y D). A y C) Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó la actina. B y D) Gráficas que muestran el análisis de cuatro experimentos en donde no se observa ninguna disminución de la expresión de la Acrogranina en forma significativa con las diferentes concentraciones del inhibidor de Akt en las células NIH-Ovcar-3 y en las SK-Ov-3 respectivamente.

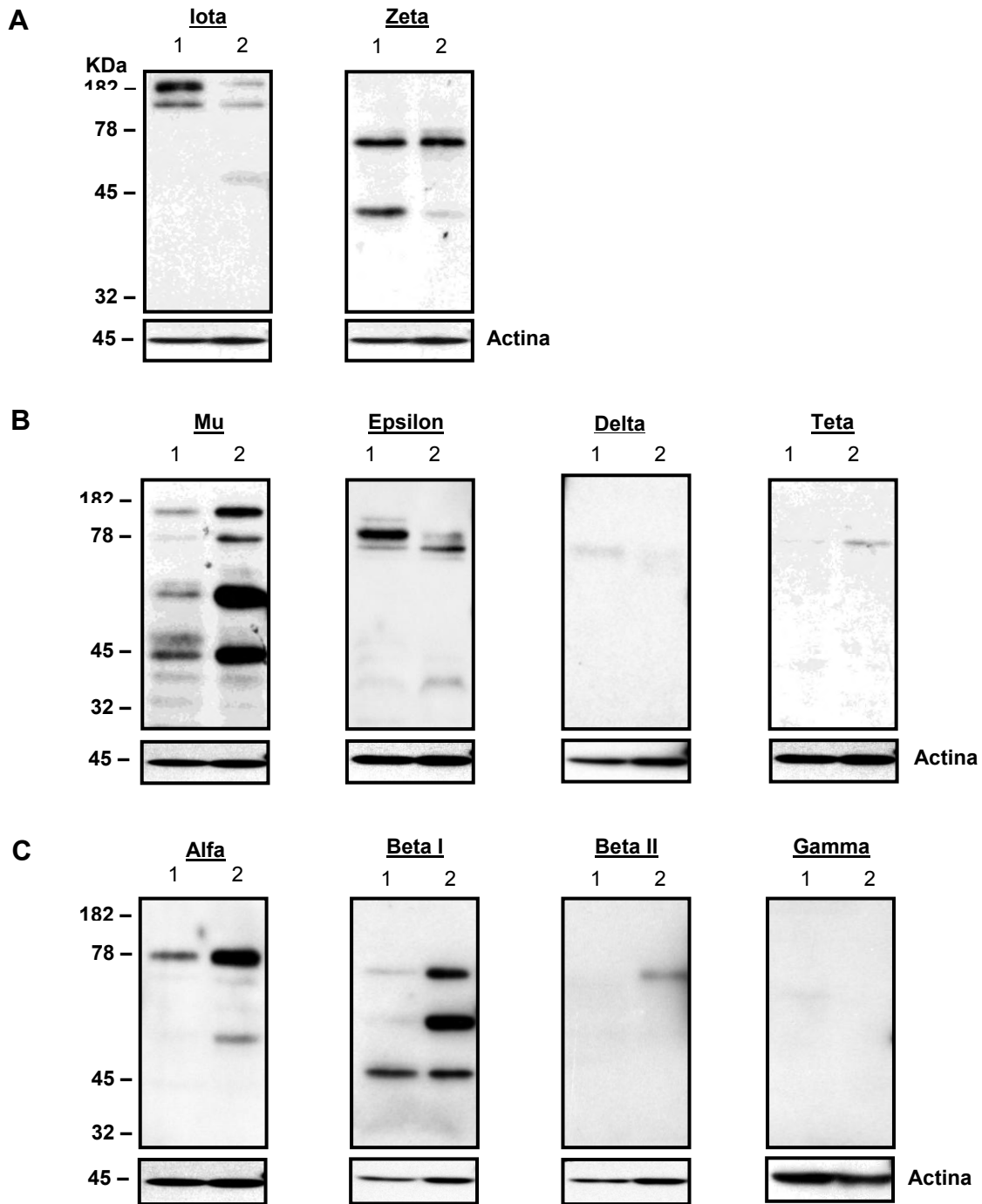
### **Expresión de las diferentes isoformas de PKC en las líneas celulares NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3.**

De acuerdo a los datos obtenidos de que PKC es una de las vías de señalización que regulan la expresión de Acrogranina, en las dos líneas celulares de cáncer de ovario (NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3) estudiadas en esta tesis, finalmente, se analizó la expresión de las diferentes isoformas de PKC, así como su abundancia relativa en cada una de las líneas celulares estudiadas. La expresión de las isoformas de PCK fue valorada por medio de la técnica de western blot y los datos encontrados muestran que las diferentes isoformas de PKC se expresan de una manera muy desigual en cada una de las líneas celulares (Figura 16). Al

analizar la expresión de acuerdo a la clasificación existente de estas isoformas de PKC, tenemos que de las aPKC la expresión de la isoforma *iota* es más intensa en las células NIH-Ovcar-3 que en las SK-Ov-3 y la expresión de la isoforma *zeta* es más o menos igual en ambas líneas celulares (Figura 16A). Con lo que respecta a las nPKC, en la figura 16B se puede observar que la expresión de las isoformas *delta* y *teta* es mínima en ambas líneas celulares en comparación con las otras nPKC isoformas. La isoforma *mu* se expresa mayormente en las SK-Ov-3 que en las NIH-Ovcar-3, sin embargo la isoforma *epsilon* se expresa más en las NIH-Ovcar-3 que en las SK-Ov-3. En lo que se refiere a las cPKC, tanto las isoformas *alfa*, *beta I* y *beta II* se expresan más en las SK-Ov-3 que en las NIH-Ovcar-3 y la isoforma *gamma* no se expresó en ninguna de las dos líneas celulares (Figura 16C).

Faltaría determinar cuál o cuáles isoforma(s) de PKC son responsables de la regulación de la expresión de la Acrogranina en cada línea celular, lo cual es motivo de otro estudio.





**Figura 16.** Expresión de las diferentes isoformas de PKC en las células NIH-Ovcar-3 (1) y SK-Ov-3 (2) separadas de acuerdo a la clasificación en A) PKC atípicas, B) PKC nuevas y C) PKC clásicas o convencionales. Se puede observar que existe una expresión muy desigual de las isoformas que se están presentes tanto en las células NIH-Ovcar-3 (1) como en las células SK-Ov-3 (2).

## VII. DISCUSIÓN

La Acrogranina es un factor de crecimiento con diversas funciones en varios tejidos y órganos [53, 54, 132]. Esta proteína está presente en el cáncer epitelial de ovario [70, 71] y se ha observado que tanto el RNAm como la proteína de la Acrogranina se sobre-expresan en tumores malignos de ovario al compararse con tumores benignos y tejidos normales de ovario [72]. Además, la sobre-expresión de Acrogranina en cáncer de ovario se ha asociado con proliferación, progresión maligna y resistencia de las células a la quimioterapia, así como con menor supervivencia de las pacientes [72-74]. Por lo tanto, es importante entender cómo se lleva a cabo la regulación de la expresión de la Acrogranina a través de las vías de transducción de señal que están involucradas en el cáncer de ovario y que contribuyen a la progresión y mortalidad de esta enfermedad.

En este estudio, demostramos que en las líneas celulares de cáncer de ovario NIH-Ovcar-3 y SK-Ov-3, la expresión de Acrogranina es regulada por PKC, ya que los experimentos realizados en presencia del Calphostin C, el cual es un inhibidor selectivo de PKC, mostraron claramente que las concentraciones de la proteína Acrogranina disminuyeron significativamente y de manera dosis-dependiente después de 24 h de exposición. Este efecto no fue dependiente de los cambios en la expresión de su RNAm, por lo tanto, la regulación de la expresión de la Acrogranina en estas células fue a nivel post-traducciona [133]. Estudios previos ya han demostrado que la vía de transducción de señal que involucra PKC, esta asociada con proliferación y progresión maligna de las células en diferentes tipos de cáncer y ha sido identificada como un regulador de diversas

proteínas como VEGF [134, 135]. Además, la PKCi por su sobre-expresión y actividad en cáncer de ovario ha sido considerada como un oncogene y un biomarcador del grado de agresividad de esta patología. Por lo tanto, la sobre-expresión de la Acrogranina en este tipo de cáncer pudiera ser una consecuencia de la sobre-expresión de la PKCi [89]. Sin embargo, se requerirá de la realización de más experimentos para determinar si la PKCi es la isoforma de PKC que está regulando la expresión de Acrogranina en el cáncer de ovario.

Aunque faltaría por definir el mecanismo post-traducciona l por el cual se está dando esta regulación de la expresión de la Acrogranina por la PKC, los resultados sugieren que PKC pudiera estar fosforilando a la Acrogranina y por lo tanto esta fosforilación pudiera estar impidiendo su degradación, lo que hace que su concentración aumente en forma independiente de la concentración de su RNAm. Este mecanismo ya ha sido previamente descrito en la regulación tanto de la expresión como de la función de las proteínas reparadoras del DNA conocidas como MMR (por sus siglas en inglés) en una líneas celular de leucemia. Estas células al ser estimuladas con activadores de PKC mostraron un aumento en la concentración de estas proteínas MMR e inversamente, la incubación con inhibidores de PKC disminuyeron su concentración [136]. Así pues, la fosforilación de Acrogranina por PKC probablemente contribuya a mantener la estabilidad de la proteína y por lo tanto las elevadas concentraciones de la Acrogranina en las pacientes con cáncer de ovario y de esta manera contribuir en la proliferación y progresión maligna de las células en este tipo de cáncer. Además, también faltaría realizar los estudios correspondientes para investigar si la posible fosforilación de la Acrogranina por PKC, está impidiendo su degradación por medio de la vía de

ubiquitin-proteosoma, mecanismo que también ya ha sido descrito en la regulación de la expresión de las proteínas MMR (hMutS $\alpha$ ) en donde la isoforma zeta de PKC es la que está involucrada [137].

Por otro lado, también encontramos que el tratamiento de las células por 24 h con un inhibidor selectivo de PI3-K como es el LY294002, disminuyó significativamente las concentraciones de la proteína Acrogranina y de manera dosis- dependiente, pero este efecto sólo se observó en las células SK,Ov-3 y no en las en las NIH-Ovcar-3. La disminución de la concentración de la proteína Acrogranina fue independiente de cambios en la expresión del RNAm. Esta vía de transducción de señal que involucra PI3-K ha sido implicada con la migración e invasión de las células en el cáncer de ovario y otro tipo de cánceres [82, 107]. En la línea celular SK-Ov-3 de cáncer de ovario, la vía de PI3-K/Akt es capaz de regular el balance entre las proteínas que promueven la migración celular [138]. Es así como, proteínas que estén activando esta vía de transducción de señal en el cáncer de ovario probablemente pudieran estar contribuyendo a la sobre-expresión de la Acrogranina en esta patología, pero las proteínas exactas que regulan la expresión de la Acrogranina a través de esta vía de señalización, deberán ser determinadas en un futuro.

La diferencia observada en respuesta al inhibidor de PI3-K (LY294002) por las líneas celulares estudiadas pudiera estar asociada con el origen de las mismas [139], dado que las células NIH-Ovcar-3 son derivadas de un adenocarcinoma de ovario y las células SK-Ov-3 son derivadas de la ascitis formada en forma secundaria a un adenocarcinoma de ovario, la cual es considerada como un sitio metastático.

Por otro lado, con la Wortmanina, otro inhibidor de PI3-K no logramos obtener el mismo efecto observado con el uso del LY294002 sobre las células SK-Ov-3. La razón de esto hasta el momento la desconocemos, sin embargo a pesar de que ambos son inhibidores de PI3-K sus mecanismos de acción y su potencia son diferentes [140]. La Wortmanina originalmente fue purificada de *Penicillium wortmannin* y de una manera irreversible inactiva a PI3-K al reaccionar covalentemente con un residuo de lisina en el sitio de unión del ATP de la subunidad catalítica de la PI3-K [141]. El LY294002 es un compuesto sintético derivado de un inhibidor de cinasas con un amplio espectro (el Quercetin), el cual inhibe a PI3-K de una manera reversible, ya que compite con el ATP por el sitio activo de la subunidad catalítica de PI3-K [142]. A pesar de que la potencia de la Wortmanina es mayor que la del LY294002, este último tiene una mayor especificidad por la PI3-K y es un compuesto mucho más estable que la Wortmanina [143]. La inestabilidad que presenta la Wortmanina en el medio de cultivo ya ha sido descrita previamente así como la disminución de su efecto después de 5 h de incubación [144]; en nuestro estudio, para valorar el efecto de Wortmanina sobre la expresión de la Acrogranina se requirió incubar a las células en presencia de este inhibidor por un periodo de 12 y 24 h, tiempo en cual la Wortmanina pudo haberse inactivado y no producir ningún efecto sobre la Acrogranina. Además, también habría que considerar la especificidad que tienen los inhibidores, especialmente cuando los efectos de éstos son determinados por períodos prolongados de incubación.

Las vías de señal de transducción que involucran a PKA, P38, ERK y Akt tienen alguna implicación en cáncer de ovario. Por ejemplo, la sobre-expresión de

Akt ha sido asociada con la proliferación y progresión neoplásica de las células ováricas [109, 110], ERK y PKA están relacionadas con la supervivencia y resistencia a tratamiento quimioterapéutico de las células ováricas cancerígenas [145, 146] y p38 es activada por algunos factores de crecimiento en esta patología [147, 148]. Sin embargo, a pesar de la importante actividad de estas proteínas en el cáncer de ovario, en nuestro estudio no encontramos participación de ninguna de ellas en la regulación de la expresión de la Acrogranina en las líneas celulares estudiadas, porque el tratamiento de ambas líneas celulares con los inhibidores específicos de cada una de estas proteínas no mostró ninguna modificación en las concentraciones de Acrogranina después de varias horas de incubación.

En resumen, nosotros podríamos decir que las vías de señal de transducción que involucran a PKC y PI3-K regulan la expresión de la Acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario NIH-Ovcar-3 y SK Ov-3. En la actualidad la inhibición de estas dos vías de señalización están siendo consideradas como blancos terapéuticos para varios tipos de cáncer [88, 149-153]. Los datos presentados en la presente tesis sugieren que en el cáncer de ovario la inhibición de PKC y PI3-K pudieran disminuir las concentraciones de Acrogranina. Esta disminución en las concentraciones de Acrogranina podría contribuir a la inhibición del crecimiento tumoral y de la progresión de la enfermedad, como ha sido demostrado en forma experimental al ser inhibida la función de la Acrogranina por la adición de un anticuerpo específico [154]. En ambas formas de tratamiento se disminuirían o se bloquearían las importantes funciones que tiene la Acrogranina en el cáncer de ovario y en otro tipo de tumores malignos.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Díaz-Cueto, L., *Fisiología ovárica y endometrial*, in *Fundamentos de endocrinología ginecológica y reproductiva*, S. Carranza-Lira, Editor. 2003, Masson-Doyma: México. p. 21-40.
2. Healy, J.C., *Ovaries*, in *Gray's Anatomy. The Anatomical Basis of Clinical Practice*, S. Sandring, Editor. 2005, Elsevier Ltd: España. p. 1321-1326.
3. Ross, M.H., Reith, E.J., *Aparato genital femenino*, in *Histología. Texto y Atlas Color*, M.H. Ross, Reith, E.J., Editor. 1992, Editorial Médica Panamericana: México. p. 623-678.
4. Yeh, J., Adashi, E.Y., *The ovarian life cycle*, in *Reproductive Endocrinology*, S.S.C. Yen, Editor. 1999, WB Saunders Company: EUA. p. 153-190.
5. Ulloa-Aguirre, A., Timossi, C., Díaz Cueto, L., *Regulación neuroendocrina del eje reproductor de la mujer*, in *Fundamentos de endocrinología ginecológica y reproductiva*, S. Carranza-Lira, Editor. 2003, Masson-Doyma: México. p. 1-19.
6. Anthony, E.L., J.C. King, and E.G. Stopa, *Immunocytochemical localization of LHRH in the median eminence, infundibular stalk, and neurohypophysis. Evidence for multiple sites of releasing hormone secretion in humans and other mammals*. *Cell Tissue Res*, 1984. 236(1): p. 5-14.
7. Ulloa-Aguirre, A., Conn, P.M., *G protein-coupled receptors and the G protein family*, in *Handbook of Physiology: Molecular and Cellular Endocrinology*, P.M. Conn, Editor. 1999, Oxford University Press: New York. p. 87-124.
8. Ulloa-Aguirre, A. and C. Timossi, *Biochemical and functional aspects of gonadotrophin-releasing hormone and gonadotrophins*. *Reprod Biomed Online*, 2000. 1(2): p. 48-62.
9. Hillier, S.G., *Current concepts of the roles of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone in folliculogenesis*. *Hum Reprod*, 1994. 9(2): p. 188-91.
10. Hillier, S.G., *Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development*. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. 179(1-2): p. 39-46.
11. Auersperg, N., Woo, M.M., *Development and differentiation of ovarian surface epithelium: cues for the basis of the malignant potential*, in *The Ovary*, L.P.a.A. EY, Editor. 2004, Elsevier Inc: San Diego, CA. p. 579-590.
12. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. *Endocr Rev*, 2001. 22(2): p. 255-88.
13. Murdoch, W.J. and A.C. McDonnell, *Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis*. *Reproduction*, 2002. 123(6): p. 743-50.
14. Choi, J.H., et al., *Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor activates oncogenic pathways in preneoplastic ovarian surface epithelial cells*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2004. 89(11): p. 5508-16.
15. Wong, A.S. and P.C. Leung, *Role of endocrine and growth factors on the ovarian surface epithelium*. *J Obstet Gynaecol Res*, 2007. 33(1): p. 3-16.

16. Ho, S.M., *Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer*. *Reprod Biol Endocrinol*, 2003. 1: p. 73.
17. Li, A.J., R.L. Baldwin, and B.Y. Karlan, *Estrogen and progesterone receptor subtype expression in normal and malignant ovarian epithelial cell cultures*. *Am J Obstet Gynecol*, 2003. 189(1): p. 22-7.
18. Ahmed, N., et al., *Molecular pathways regulating EGF-induced epithelio-mesenchymal transition in human ovarian surface epithelium*. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006. 290(6): p. C1532-42.
19. Conti, M., et al., *Role of the epidermal growth factor network in ovarian follicles*. *Mol Endocrinol*, 2006. 20(4): p. 715-23.
20. Szlosarek, P.W., et al., *Expression and regulation of tumor necrosis factor alpha in normal and malignant ovarian epithelium*. *Mol Cancer Ther*, 2006. 5(2): p. 382-90.
21. Sonmezer, M., et al., *Prognostic significance of tumor angiogenesis in epithelial ovarian cancer: in association with transforming growth factor beta and vascular endothelial growth factor*. *Int J Gynecol Cancer*, 2004. 14(1): p. 82-8.
22. Nilsson, E.E. and M.K. Skinner, *Role of transforming growth factor beta in ovarian surface epithelium biology and ovarian cancer*. *Reprod Biomed Online*, 2002. 5(3): p. 254-8.
23. Zhou, H.Y., Y.L. Pon, and A.S. Wong, *HGF/MET signaling in ovarian cancer*. *Curr Mol Med*, 2008. 8(6): p. 469-80.
24. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008*. *CA Cancer J Clin*, 2008. 58(2): p. 71-96.
25. Bertone-Johnson, E.R., *Epidemiology of ovarian cancer: a status report*. *Lancet*, 2005. 365(9454): p. 101-2.
26. Salehi, F., et al., *Risk factors for ovarian cancer: an overview with emphasis on hormonal factors*. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev*, 2008. 11(3-4): p. 301-21.
27. Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian, C., et al., *Ovarian cancer and oral contraceptives: collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies including 23,257 women with ovarian cancer and 87,303 controls*. *Lancet*, 2008. 371(9609): p. 303-14.
28. Fathalla, M.F., *Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia?* *Lancet*, 1971. 2(7716): p. 163.
29. Russo, A., et al., *Hereditary ovarian cancer*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2009. 69(1): p. 28-44.
30. Kmet, L.M., L.S. Cook, and A.M. Magliocco, *A review of p53 expression and mutation in human benign, low malignant potential, and invasive epithelial ovarian tumors*. *Cancer*, 2003. 97(2): p. 389-404.
31. Aunoble, B., et al., *Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review)*. *Int J Oncol*, 2000. 16(3): p. 567-76.
32. Linnerth, N.M., et al., *cAMP response element-binding protein is expressed at high levels in human ovarian adenocarcinoma and regulates ovarian tumor cell proliferation*. *Int J Gynecol Cancer*, 2008. 18(6): p. 1248-57.



33. Gadducci, A., et al., *Sex-steroid hormones, gonadotropin and ovarian carcinogenesis: a review of epidemiological and experimental data*. *Gynecol Endocrinol*, 2004. 19(4): p. 216-28.
34. Stewart, S.L., et al., *Gonadotropin and steroid hormones stimulate proliferation of the rat ovarian surface epithelium*. *J Cell Physiol*, 2004. 198(1): p. 119-24.
35. Choi, J.H., et al., *Gonadotropins and ovarian cancer*. *Endocr Rev*, 2007. 28(4): p. 440-61.
36. Choi, K.C., et al., *Follicle-stimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells*. *J Clin Endocrinol Metab*, 2002. 87(5): p. 2245-53.
37. Rodriguez, G.C., et al., *Progesterin-induced apoptosis in the Macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta*. *J Natl Cancer Inst*, 2002. 94(1): p. 50-60.
38. Syed, V. and S.M. Ho, *Progesterone-induced apoptosis in immortalized normal and malignant human ovarian surface epithelial cells involves enhanced expression of FasL*. *Oncogene*, 2003. 22(44): p. 6883-90.
39. Li, A.J. and B.Y. Karlan, *Androgens and epithelial ovarian cancer: What's the connection?* *Cancer Biol Ther*, 2008. 7(11).
40. Evangelou, A., et al., *Down-regulation of transforming growth factor beta receptors by androgen in ovarian cancer cells*. *Cancer Res*, 2000. 60(4): p. 929-35.
41. Nash, M.A., et al., *The role of cytokines in both the normal and malignant ovary*. *Endocr Relat Cancer*, 1999. 6(1): p. 93-107.
42. Kioi, M., et al., *Expression and targeting of interleukin-4 receptor for primary and advanced ovarian cancer therapy*. *Cancer Res*, 2005. 65(18): p. 8388-96.
43. Lafky, J.M., et al., *Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1785(2): p. 232-65.
44. Reibenwein, J. and M. Krainer, *Targeting signaling pathways in ovarian cancer*. *Expert Opin Ther Targets*, 2008. 12(3): p. 353-65.
45. Wang, F.Q., et al., *Vascular endothelial growth factor-regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of matrix metalloproteinases*. *Int J Cancer*, 2006. 118(4): p. 879-88.
46. Yu, S., et al., *Lysophosphatidic acid receptors determine tumorigenicity and aggressiveness of ovarian cancer cells*. *J Natl Cancer Inst*, 2008. 100(22): p. 1630-42.
47. Lee, Z., et al., *Lysophosphatidic acid is a major regulator of growth-regulated oncogene alpha in ovarian cancer*. *Cancer Res*, 2006. 66(5): p. 2740-8.
48. Anakwe, O.O. and G.L. Gerton, *Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis*. *Biol Reprod*, 1990. 42(2): p. 317-28.
49. Baba, T., et al., *Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins, and epithelins, and*

- is expressed in somatic as well as male germ cells.* Mol Reprod Dev, 1993. 34(3): p. 233-43.
50. Zhu, J., et al., *Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair.* Cell, 2002. 111(6): p. 867-78.
  51. Hrabal, R., et al., *The hairpin stack fold, a novel protein architecture for a new family of protein growth factors.* Nat Struct Biol, 1996. 3(9): p. 747-52.
  52. Vranken, W.F., et al., *Solution structures of a 30-residue amino-terminal domain of the carp granulin-1 protein and its amino-terminally truncated 3-30 subfragment: implications for the conformational stability of the stack of two beta-hairpins.* Proteins, 2002. 47(1): p. 14-24.
  53. Daniel, R., et al., *Cellular localization of gene expression for progranulin.* J Histochem Cytochem, 2000. 48(7): p. 999-1009.
  54. Diaz-Cueto, L., et al., *Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor).* Dev Biol, 2000. 217(2): p. 406-18.
  55. Xu, S.Q., et al., *The granulin/epithelin precursor abrogates the requirement for the insulin-like growth factor 1 receptor for growth in vitro.* J Biol Chem, 1998. 273(32): p. 20078-83.
  56. Zanocco-Marani, T., et al., *Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor.* Cancer Res, 1999. 59(20): p. 5331-40.
  57. Lu, R. and G. Serrero, *Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(8): p. 3993-8.
  58. Zhou, J., et al., *Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line.* J Biol Chem, 1993. 268(15): p. 10863-9.
  59. Halper, J. and H.L. Moses, *Epithelial tissue-derived growth factor-like polypeptides.* Cancer Res, 1983. 43(5): p. 1972-9.
  60. Brown, C.A. and J. Halper, *Mitogenic effects of transforming growth factor type e on epithelial and fibroblastic cells--comparison with other growth factors.* Exp Cell Res, 1990. 190(2): p. 233-42.
  61. Shoyab, M., et al., *Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. 87(20): p. 7912-6.
  62. Plowman, G.D., et al., *The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth.* J Biol Chem, 1992. 267(18): p. 13073-8.
  63. van Swieten, J.C. and P. Heutink, *Mutations in progranulin (GRN) within the spectrum of clinical and pathological phenotypes of frontotemporal dementia.* Lancet Neurol, 2008. 7(10): p. 965-74.
  64. Liao, L.M., et al., *Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption.* Cancer Res, 2000. 60(5): p. 1353-60.
  65. Pan, C.X., et al., *PC cell-derived growth factor expression in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma.* Clin Cancer Res, 2004. 10(4): p. 1333-7.

66. Cheung, S.T., et al., *Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. 10(22): p. 7629-36.
67. Donald, C.D., et al., *Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium*. Anticancer Res, 2001. 21(6A): p. 3739-42.
68. Wang, W., et al., *PC cell-derived growth factor (granulin precursor) expression and action in human multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2003. 9(6): p. 2221-8.
69. Serrero, G. and O.B. Ioffe, *Expression of PC-cell-derived growth factor in benign and malignant human breast epithelium*. Hum Pathol, 2003. 34(11): p. 1148-54.
70. Jones, M.B., et al., *The granulin-epithelin precursor/PC-cell-derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer*. Clin Cancer Res, 2003. 9(1): p. 44-51.
71. Davidson, B., et al., *Granulin-epithelin precursor is a novel prognostic marker in epithelial ovarian carcinoma*. Cancer, 2004. 100(10): p. 2139-47.
72. Cuevas-Antonio R, C.C., Arechavaleta-Velasco F, Andrade A, Barron L, Estrada I, Fernandez RL, Olguin V, Ruiz S, Imani F, Zeferino-Toquero M, Ulloa-Aguirre A, Gerton GL, Diaz-Cueto L, *Expression of Progranulin (Acrogranin/PCDGF/Granulin-Epithelin Precursor) in Benign and Malignant Ovarian Tumors and Activation of MAPK Signaling in Ovarian Cancer Cell Line*. Cancer Invest, 2009: p. En Prensa.
73. Pizarro, G.O., et al., *Prosurvival function of the granulin-epithelin precursor is important in tumor progression and chemoresponse*. Int J Cancer, 2007. 120(11): p. 2339-43.
74. Miyanishi, M., et al., *Immortalized ovarian surface epithelial cells acquire tumorigenicity by Acrogranin gene overexpression*. Oncol Rep, 2007. 17(2): p. 329-33.
75. Monami, G., et al., *Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex*. Cancer Res, 2006. 66(14): p. 7103-10.
76. He, Z. and A. Bateman, *Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell-derived growth factor, acrogranin) mediates tissue repair and tumorigenesis*. J Mol Med, 2003. 81(10): p. 600-12.
77. Serrero, G., *Autocrine growth factor revisited: PC-cell-derived growth factor (progranulin), a critical player in breast cancer tumorigenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. 308(3): p. 409-13.
78. Lu, R. and G. Serrero, *Stimulation of PC cell-derived growth factor (epithelin/granulin precursor) expression by estradiol in human breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. 256(1): p. 204-7.
79. Kamrava, M., et al., *Lysophosphatidic acid and endothelin-induced proliferation of ovarian cancer cell lines is mitigated by neutralization of granulin-epithelin precursor (GEP), a prosurvival factor for ovarian cancer*. Oncogene, 2005. 24(47): p. 7084-93.
80. Cotran, R.S., Robbins, S.L., Kumar, V., *Tissue Renewal and Repair: Regeneration, Healing, and Fibrosis*, in Robbins and Cotran Pathologic

- Basis of Disease*, R.S.a.R. Cotran, S.L, Editor. 2005, Elsevier Saunders: Philadelphia, Pennsylvania. p. 88-119.
81. Faivre, S., S. Djelloul, and E. Raymond, *New paradigms in anticancer therapy: targeting multiple signaling pathways with kinase inhibitors*. *Semin Oncol*, 2006. 33(4): p. 407-20.
  82. Nicosia, S.V., et al., *Oncogenic pathways implicated in ovarian epithelial cancer*. *Hematol Oncol Clin North Am*, 2003. 17(4): p. 927-43.
  83. Adjei, A.A. and M. Hidalgo, *Intracellular signal transduction pathway proteins as targets for cancer therapy*. *J Clin Oncol*, 2005. 23(23): p. 5386-403.
  84. Koivunen, J., V. Aaltonen, and J. Peltonen, *Protein kinase C (PKC) family in cancer progression*. *Cancer Lett*, 2006. 235(1): p. 1-10.
  85. Griner, E.M. and M.G. Kazanietz, *Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer*. *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(4): p. 281-94.
  86. Oliva, J.L., E.M. Griner, and M.G. Kazanietz, *PKC isozymes and diacylglycerol-regulated proteins as effectors of growth factor receptors*. *Growth Factors*, 2005. 23(4): p. 245-52.
  87. Martiny-Baron, G. and D. Fabbro, *Classical PKC isoforms in cancer*. *Pharmacol Res*, 2007. 55(6): p. 477-86.
  88. Serova, M., et al., *Preclinical and clinical development of novel agents that target the protein kinase C family*. *Semin Oncol*, 2006. 33(4): p. 466-78.
  89. Zhang, L., et al., *Integrative genomic analysis of protein kinase C (PKC) family identifies PKC $\iota$  as a biomarker and potential oncogene in ovarian carcinoma*. *Cancer Res*, 2006. 66(9): p. 4627-35.
  90. Fields, A.P. and R.P. Regala, *Protein kinase C  $\iota$ : human oncogene, prognostic marker and therapeutic target*. *Pharmacol Res*, 2007. 55(6): p. 487-97.
  91. Mackay, H.J. and C.J. Twelves, *Targeting the protein kinase C family: are we there yet?* *Nat Rev Cancer*, 2007. 7(7): p. 554-62.
  92. Cho-Chung, Y.S., et al., *cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth*. *Crit Rev Oncol Hematol*, 1995. 21(1-3): p. 33-61.
  93. Cho-Chung, Y.S. and M.V. Nesterova, *Tumor reversion: protein kinase A isozyme switching*. *Ann N Y Acad Sci*, 2005. 1058: p. 76-86.
  94. Cheadle, C., et al., *Regulatory subunits of PKA define an axis of cellular proliferation/differentiation in ovarian cancer cells*. *BMC Med Genomics*, 2008. 1: p. 43.
  95. Choi, J.H., et al., *Gonadotropins activate proteolysis and increase invasion through protein kinase A and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human epithelial ovarian cancer cells*. *Cancer Res*, 2006. 66(7): p. 3912-20.
  96. Slot, K.A., et al., *Luteinizing hormone inhibits Fas-induced apoptosis in ovarian surface epithelial cell lines*. *J Endocrinol*, 2006. 188(2): p. 227-39.
  97. D'Souza, T., R. Agarwal, and P.J. Morin, *Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells*. *J Biol Chem*, 2005. 280(28): p. 26233-40.
  98. Jiang, B.H. and L.Z. Liu, *PI3K/PTEN signaling in tumorigenesis and angiogenesis*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. 1784(1): p. 150-8.

99. Engelman, J.A., J. Luo, and L.C. Cantley, *The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism*. Nat Rev Genet, 2006. 7(8): p. 606-19.
100. Zhao, L. and P.K. Vogt, *Class I PI3K in oncogenic cellular transformation*. Oncogene, 2008. 27(41): p. 5486-96.
101. Brown, R.A. and P.R. Shepherd, *Growth factor regulation of the novel class II phosphoinositide 3-kinases*. Biochem Soc Trans, 2001. 29(Pt 4): p. 535-7.
102. Backer, J.M., *The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34*. Biochem J, 2008. 410(1): p. 1-17.
103. Meng, Q., et al., *Role of PI3K and AKT specific isoforms in ovarian cancer cell migration, invasion and proliferation through the p70S6K1 pathway*. Cell Signal, 2006. 18(12): p. 2262-71.
104. Shayesteh, L., et al., *PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer*. Nat Genet, 1999. 21(1): p. 99-102.
105. Zhang, L., et al., *The oncogene phosphatidylinositol 3'-kinase catalytic subunit alpha promotes angiogenesis via vascular endothelial growth factor in ovarian carcinoma*. Cancer Res, 2003. 63(14): p. 4225-31.
106. Stokoe, D., *The phosphoinositide 3-kinase pathway and cancer*. Expert Rev Mol Med, 2005. 7(10): p. 1-22.
107. Fresno Vara, J.A., et al., *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. Cancer Treat Rev, 2004. 30(2): p. 193-204.
108. Nicholson, K.M. and N.G. Anderson, *The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy*. Cell Signal, 2002. 14(5): p. 381-95.
109. Bellacosa, A., et al., *Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas*. Int J Cancer, 1995. 64(4): p. 280-5.
110. Cheng, J.Q., et al., *AKT2, a putative oncogene encoding a member of a subfamily of protein-serine/threonine kinases, is amplified in human ovarian carcinomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. 89(19): p. 9267-71.
111. Blanco-Aparicio, C., et al., *PTEN, more than the AKT pathway*. Carcinogenesis, 2007. 28(7): p. 1379-86.
112. Sheng, S., M. Qiao, and A.B. Pardee, *Metastasis and AKT activation*. J Cell Physiol, 2009. 218(3): p. 451-4.
113. Kolasa, I.K., et al., *PIK3CA amplification associates with resistance to chemotherapy in ovarian cancer patients*. Cancer Biol Ther, 2009. 8(1).
114. Hu, L., et al., *Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase increases efficacy of paclitaxel in in vitro and in vivo ovarian cancer models*. Cancer Res, 2002. 62(4): p. 1087-92.
115. Dancey, J.E., *Molecular targeting: PI3 kinase pathway*. Ann Oncol, 2004. 15 Suppl 4: p. iv233-9.
116. Hu, L., J. Hofmann, and R.B. Jaffe, *Phosphatidylinositol 3-kinase mediates angiogenesis and vascular permeability associated with ovarian carcinoma*. Clin Cancer Res, 2005. 11(22): p. 8208-12.
117. LoPiccolo, J., et al., *Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations*. Drug Resist Updat, 2008. 11(1-2): p. 32-50.
118. Turjanski, A.G., J.P. Vaque, and J.S. Gutkind, *MAP kinases and the control of nuclear events*. Oncogene, 2007. 26(22): p. 3240-53.

119. Mor, A. and M.R. Philips, *Compartmentalized Ras/MAPK signaling*. Annu Rev Immunol, 2006. 24: p. 771-800.
120. Raman, M., W. Chen, and M.H. Cobb, *Differential regulation and properties of MAPKs*. Oncogene, 2007. 26(22): p. 3100-12.
121. Wang, X., et al., *The cellular response to oxidative stress: influences of mitogen-activated protein kinase signalling pathways on cell survival*. Biochem J, 1998. 333 ( Pt 2): p. 291-300.
122. Weston, C.R. and R.J. Davis, *The JNK signal transduction pathway*. Curr Opin Cell Biol, 2007. 19(2): p. 142-9.
123. Zarubin, T. and J. Han, *Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway*. Cell Res, 2005. 15(1): p. 11-8.
124. Chang, L. and M. Karin, *Mammalian MAP kinase signalling cascades*. Nature, 2001. 410(6824): p. 37-40.
125. Dhillon, A.S., et al., *MAP kinase signalling pathways in cancer*. Oncogene, 2007. 26(22): p. 3279-90.
126. Johnson, G.L. and R. Lapadat, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*. Science, 2002. 298(5600): p. 1911-2.
127. Bulavin, D.V. and A.J. Fornace, Jr., *p38 MAP kinase's emerging role as a tumor suppressor*. Adv Cancer Res, 2004. 92: p. 95-118.
128. Sanchez-Prieto, R., et al., *A role for the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in the transcriptional activation of p53 on genotoxic stress by chemotherapeutic agents*. Cancer Res, 2000. 60(9): p. 2464-72.
129. Taylor, J.L., et al., *New paradigms for the function of JNKK1/MKK4 in controlling growth of disseminated cancer cells*. Cancer Lett, 2008.
130. Hui, L., et al., *p38alpha: a suppressor of cell proliferation and tumorigenesis*. Cell Cycle, 2007. 6(20): p. 2429-33.
131. Perona, R. and I. Sanchez-Perez, *Signalling pathways involved in clinical responses to chemotherapy*. Clin Transl Oncol, 2007. 9(10): p. 625-33.
132. Ong, C.H. and A. Bateman, *Progranulin (granulin-epithelin precursor, PC-cell derived growth factor, acrogranin) in proliferation and tumorigenesis*. Histol Histopathol, 2003. 18(4): p. 1275-88.
133. Sivko, G.S., et al., *CCAAT/Enhancer binding protein delta (c/EBPdelta) regulation and expression in human mammary epithelial cells: II. Analysis of activating signal transduction pathways, transcriptional, post-transcriptional, and post-translational control*. J Cell Biochem, 2004. 93(4): p. 844-56.
134. Chabannes, E., et al., *Protein kinase C signalling pathway is involved in the regulation of vascular endothelial growth factor expression in human bladder transitional carcinoma cells*. Cell Signal, 2001. 13(8): p. 585-91.
135. Xu, H., et al., *Protein kinase C alpha promotes angiogenic activity of human endothelial cells via induction of vascular endothelial growth factor*. Cardiovasc Res, 2008. 78(2): p. 349-55.
136. Humbert, O., et al., *Implication of protein kinase C in the regulation of DNA mismatch repair protein expression and function*. J Biol Chem, 2002. 277(20): p. 18061-8.

137. Hernandez-Pigeon, H., et al., *hMutS alpha is protected from ubiquitin-proteasome-dependent degradation by atypical protein kinase C zeta phosphorylation*. J Mol Biol, 2005. 348(1): p. 63-74.
138. Whitley, B.R., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt regulates the balance between plasminogen activator inhibitor-1 and urokinase to promote migration of SKOV-3 ovarian cancer cells*. Gynecol Oncol, 2007. 104(2): p. 470-9.
139. Wilt, F.H., Hake Sarah, *Overview of development in Principles of Developmental Biology*, N. Company, Editor. 2004: New York. p. 3-13.
140. Walker, E.H., et al., *Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine*. Mol Cell, 2000. 6(4): p. 909-19.
141. Ui, M., et al., *Wortmannin as a unique probe for an intracellular signalling protein, phosphoinositide 3-kinase*. Trends Biochem Sci, 1995. 20(8): p. 303-7.
142. Vlahos, C.J., et al., *A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002)*. J Biol Chem, 1994. 269(7): p. 5241-8.
143. Hazeki, K., et al., *Opposite effects of wortmannin and 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-1(4H)-benzopyran-4-one hydrochloride on toll-like receptor-mediated nitric oxide production: negative regulation of nuclear factor- $\kappa$ B by phosphoinositide 3-kinase*. Mol Pharmacol, 2006. 69(5): p. 1717-24.
144. Holleran, J.L., et al., *Use of high-performance liquid chromatography to characterize the rapid decomposition of wortmannin in tissue culture media*. Anal Biochem, 2003. 323(1): p. 19-25.
145. Son, K.K. and J. Rosenblatt, *Overexpression of protein kinase A - R1alpha reduces lipofection efficiency of cisplatin-resistant human tumor cells*. Cancer Lett, 2001. 165(1): p. 81-6.
146. Villedieu, M., et al., *Anticancer and chemosensitizing effects of 2,3-DCPE in ovarian carcinoma cell lines: link with ERK activation and modulation of p21WAF1/CIP1, Bcl-2 and Bcl-xL expression*. Gynecol Oncol, 2007. 105(2): p. 373-84.
147. Cao, Z., et al., *Insulin-like growth factor-I induces cyclooxygenase-2 expression via PI3K, MAPK and PKC signaling pathways in human ovarian cancer cells*. Cell Signal, 2007. 19(7): p. 1542-53.
148. Chakrabarty, S. and L. Kondratick, *Insulin-like growth factor binding protein-2 stimulates proliferation and activates multiple cascades of the mitogen-activated protein kinase pathways in NIH-OVCAR3 human epithelial ovarian cancer cells*. Cancer Biol Ther, 2006. 5(2): p. 189-97.
149. Workman, P., *Inhibiting the phosphoinositide 3-kinase pathway for cancer treatment*. Biochem Soc Trans, 2004. 32(Pt 2): p. 393-6.
150. Ali, A.S., et al., *Exploitation of protein kinase C: a useful target for cancer therapy*. Cancer Treat Rev, 2009. 35(1): p. 1-8.
151. Ma, W.W. and A.A. Adjei, *Novel agents on the horizon for cancer therapy*. CA Cancer J Clin, 2009. 59(2): p. 111-37.

152. Ihle, N.T. and G. Powis, *Take your PIK: phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors race through the clinic and toward cancer therapy*. Mol Cancer Ther, 2009. 8(1): p. 1-9.
153. Maira, S.M., et al., *PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand?* Biochem Soc Trans, 2009. 37(Pt 1): p. 265-72.
154. Ho, J.C., et al., *Granulin-epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma*. Hepatology, 2008. 47(5): p. 1524-32.