



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ACROGRANINA POR LA HORMONA FOLÍCULO  
ESTIMULANTE (FSH) EN DOS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE OVARIO**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

PRESENTA:

**CARLOS EDUARDO PÉREZ JUÁREZ**

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA  
*FACULTAD DE MEDICINA, UNAM*  
DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO  
*INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM*



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 11 de noviembre de 2013, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **PÉREZ JUÁREZ CARLOS EDUARDO** con número de cuenta 511012363, con la tesis titulada **"REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ACROGRANINA POR LA HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) EN DOS LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER DE OVARIO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO**:

Presidente: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA  
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Secretario: DR. LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO  
Suplente: DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA  
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN MÉNDEZ HERRERA

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

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 20 de enero de 2014

*Mi del Coro Arizmendi*

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la excelencia académica que ofrece en su programa de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado para la realización de la presente tesis (número de registro de becario: 245530).

Al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo financiero otorgado al proyecto para la realización de esta tesis de maestría (N° de registro: R-2010-3606-23, FIS/IMSS/PROT/G11/987) y a la Coordinación de Investigación en Salud, IMSS (matricula de becario: 99095927).

A la Dra. Laura Elena Díaz Cueto, Investigador Asociado D en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, IMSS, por haber dirigido el trabajo de tesis.

A la Dra. María del Carmen Méndez Herrera, Profesor Titular A en la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y al Dr. Luis Alonso Herrera Montalvo, Investigador Titular C en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por haber conformado el comité tutor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Dra. Laura Díaz Cueto por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación bajo su asesoría, por su invaluable apoyo, por su enorme paciencia y sobre todo por todos sus conocimientos compartidos.

Al Dr. Fabián Arechavaleta Velasco por su inigualable forma de transmitirme sus conocimientos y por la valiosa ayuda que me ha brindado.

Al Dr. Pablo Domínguez López por su constante ayuda y sobre todo por su preciosa amistad.

A mis padres con especial reconocimiento por la confianza, el apoyo y el amor que de ellos he recibido en cada aspecto de mi vida.

A Claudia Cruz Campa, por su paciencia y comprensión, por su apoyo incondicional y sobre todo por su amor y amistad.

A la Dra. Carmen Méndez Herrera y a la C. D. María José Gómora por su amistad y ayuda ofrecida, pero sobre todo por su admirable trabajo en la promoción del conocimiento acerca del cáncer de ovario.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS .....	ii
RESUMEN .....	1
ABSTRACT .....	3
I. INTRODUCCIÓN .....	5
A) EL OVARIO .....	5
1.- Anatomía del ovario .....	5
2.- Histología del ovario .....	6
3.- Funciones del ovario.....	6
4.- Epitelio de superficie ovárica (OSE) .....	7
B) CÁNCER EPITELIAL DE OVARIO .....	11
1.- Epidemiología del cáncer de ovario .....	11
2.- Clasificación del cáncer epitelial de ovario .....	13
3.- Etiología y factores de riesgo del cáncer epitelial de ovario .....	16
C) ACROGRANINA.....	21
1.- Características estructurales .....	21
2.- Funciones de la acrogranina.....	23
3.- Acrogranina y cáncer de ovario .....	25
4.- Regulación de la expresión de acrogranina.....	28
D) HORMONA FOLÍCULO ESTIMULANTE (FSH) .....	30
1.- Estructura y síntesis .....	30
2.- Vías de señalización intracelular activadas por FSH .....	31
3.- La FSH y el epitelio de superficie ovárica (OSE) .....	32
4.- La FSH y el cáncer de ovario.....	34

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	37
III. OBJETIVOS .....	38
General .....	38
Particulares .....	38
IV. HIPÓTESIS .....	38
V. MATERIAL Y MÉTODOS .....	39
A) Tipo de estudio .....	39
B) Variables a considerar en el estudio .....	39
C) Material .....	39
1.- Líneas celulares .....	39
2.- Hormona folículo estimulante humana recombinante (r-hFSH) .....	39
3.- Calfostin C .....	40
D) Métodos .....	40
1.- Cultivo celular .....	41
2.- Ensayos celulares y tratamiento con r-hFSH .....	41
3.- Ensayos celulares y tratamiento con Calfostin C .....	41
4.- Cuantificación de proteínas .....	41
5.- Técnica de Western blot .....	42
6.- Extracción del ARNm .....	43
7.- Transcripción reversa (RT) .....	43
8.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final .....	44
9.- Ensayo de citotoxicidad .....	45
10.- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) .....	46
11.- Análisis estadístico de los datos .....	47

VI. RESULTADOS.....	48
Detección de la proteína acrogranina en las líneas celulares NIH-OVCAR-3 y TOV-21G .....	48
Presencia del ARNm y de la proteína del receptor de FSH (FSHR) en las líneas celulares de cáncer de ovario .....	48
El tratamiento con r-hFSH incremento tanto el ARNm como la proteína de acrogranina en las células TOV-21G pero no en las NIH-OVCAR-3 .....	49
Aumento de la secreción de acrogranina hacia el medio por el tratamiento con r-hFSH en las células TOV-21G.....	55
Efecto sobre la síntesis de la acrogranina por inhibición de la vía de PKC con Calphostin C y la estimulación de la vía por la r-hFSH .....	56
VII. DISCUSIÓN .....	58
VIII. CONCLUSIONES .....	64
IX. REFERENCIAS .....	65



## ABREVIATURA

ARNm	Ácido ribonucleico mensajero	KL	Ligando Kit
AC	Adenilato ciclasa	LDH	Lactato deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico	LEDGF	Factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario	LH	Hormona luteinizante
AKT	Oncogen viral homologo a v-akt de timoma murino	LHR	Receptor de la hormona luteinizante
BCA	Ácido bicinonínico	LPA	Ácido lisofosfatídico
BRCA	Gen de cáncer de mama	MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
BSA	Albumina sérica bovina	MCSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
cAMP	Adenosina monofosfato cíclico	MET	Transición mesénquima-epitelio
COX	Ciclooxigenasa	MMP	Metaloproteasa de matriz
CREB	Proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP	mTOR	Diana de mamífero para rapamicina
DAG	Diacilglicerol	OSE	Epitelio de superficie ovárica
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	PCDGF	Factor de crecimiento derivado de células PC
DR5	Receptor de muerte 5	PCOS	Síndrome de ovarios poliquísticos
EGF	Factor de crecimiento epidermal	PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
EGFR/HER	Receptor del factor de crecimiento epidermal	PDCD6	Proteína codificada por el gen de muerte celular programada 6
ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas	PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
EMT	Transición epitelio-mesénquima	PEPI	Proepitelina
EPAC	Proteína intercambiadora activada por cAMP	PGRN	Progranulina
ERK	Cinasa regulada por señal extracelular	PI(4,5)P2	Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato
ET-1	Endotelina 1	PI3K	Cinasa dependiente de fosfatidilinositol-3
EUA	Estados Unidos de América	PKA	Proteína cinasa dependiente de cAMP
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos	PKB/AKT	Proteína cinasa B
FIGO	Federación internacional de Ginecología y Obstetricia	PKC	Proteína cinasa C
FSH	Hormona folículo estimulante	PLC	Fosfolipasa C
FSHR	Receptor de la hormona folículo estimulante	r-hFSH	Hormona folículo estimulante humana recombinante
GCSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos	RPMI	Roswell Park Memorial Institute
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos-granulocitos	RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas	SAPK	Cinasa activada por estrés
GRN	Granulina	SLPI	Inhibidor de proteasas secretada por Leucocitos
hCG	Gonadotropina coriónica humana	STAT-3	Transductor de señal y activador de transcripción 3
HGF	Factor de crecimiento de hepatocitos	TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante $\beta$
HIF-1	Factor 1 inducible por hipoxia	TIMP	Inhibidor tisular de metaloproteasas
HNPCC	Síndrome de cáncer colorectal hereditario sin poliposis	TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$
IL	Interleucina	TSH	Hormona estimulante de la tiroides
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática	uPA	Activador de plaminógeno tipo urocinasa
IOSE	Epitelio de superficie ovárica inmortalizado	VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
IP3	Inositol 1,4,5 trifosfato	VEGFR	Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular
KGF	Factor de crecimiento de queratinocitos		

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Origen y destino del epitelio de superficie ovárica (OSE) .....	9
Figura 2. Teorías y factores involucrados en la génesis del cáncer epitelial de ovario.....	21
Figura 3. Estructura de la acrogranina .....	23
Figura 4. Vías de transducción de señal activadas por la hormona folículo estimulante (FSH) .....	33
Figura 5. Detección de la proteína acrogranina mediante la técnica de Western blot en los extractos celulares de las dos líneas de cáncer de ovario .....	48
Figura 6. Presencia del receptor de FSH (FSHR) en las líneas celulares de cáncer de ovario NIH-OVCAR-3 y TOV-21G.....	49
Figura 7. La r-hFSH incrementó el ARNm de acrogranina en la línea celular TOV-21G .....	51
Figura 8. La r-hFSH incrementó la síntesis de la proteína acrogranina en la línea celular TOV-21G.....	52
Figura 9. La r-hFSH no aumentó el ARNm de acrogranina en las células NIH-OVCAR-3. ....	53
Figura 10. La r-hFSH no incrementó la síntesis de la proteína acrogranina en las células NIH-OVCAR-3.....	54
Figura 11. Secreción relativa de la proteína acrogranina en el medio de cultivo .....	55
Figura 12. Producción de la proteína acrogranina en las células TOV-21G en respuesta a la inhibición de la vía de PKC con Calphostin C y a una estimulación con r-hFSH .....	57

Figura 13. Modelo propuesto de la vía de transducción de señal activada por la FSH que regula la expresión de acrogranina en las células TOV-21G .....	62
Tabla 1. Tipos de receptores presentes en el (OSE) y los más importantes productos de secreción por parte de este epitelio.....	10
Tabla 2. Estadificación del cáncer de ovario de acuerdo a la FIGO (2006) .....	15
Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados para la técnica de Western blot.....	43
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los diferentes ARNs mensajeros .....	45

## RESUMEN

En nuestro país y a nivel mundial, el cáncer de ovario es la tercera causa de muerte en mujeres por cánceres ginecológicos. En general este tipo de cáncer es diagnosticado en etapas avanzadas, cuando ya se ha diseminado a través de la cavidad abdominal. Hasta el momento no se conoce con certeza su etiología, pero varios factores de crecimiento han sido implicados en su inicio y progresión, algunos de los cuales son utilizados como factores pronósticos o como blancos terapéuticos. En los últimos años, varios estudios han demostrado el papel que tiene el factor de crecimiento acrogranina en el cáncer epitelial de ovario. A la acrogranina también se le conoce como precursor de granulinas y epitelinas (GEP), factor de crecimiento derivado de células PC (PCDGF) y progranulina. La sobre-expresión de esta proteína en cáncer de ovario ha sido asociada a proliferación celular, invasión, quimioresistencia y a una menor supervivencia de las pacientes. Previamente nosotros demostramos que la vía de transducción de señal que involucra a la proteína cinasa C (PKC) constituye una de las vías que regulan la síntesis de acrogranina en líneas celulares de cáncer de ovario, por este motivo y tratando de identificar proteínas que regulen la expresión de acrogranina y que activen a PKC, en la presente tesis decidimos valorar el efecto de la hormona folículo estimulante (FSH) sobre la acrogranina, siendo elegida la FSH por su importancia en el cáncer de ovario y por las vías de transducción de señal que activa en esta patología.

Las líneas celulares de cáncer de ovario TOV-21G (derivada de un carcinoma de células claras) y NIH-OVCAR-3 (derivada de un adenocarcinoma seroso) fueron estimuladas con FSH recombinante (r-hFSH) en dosis de 10 a 500 ng/mL y 10 a 1000 ng/mL respectivamente, y en periodos de 24, 48 y 72 h. Para determinar la participación de la vía de transducción de señal PKC fue utilizado el inhibidor Calfostin C. El ARNm y la proteína acrogranina fueron determinados a través de las técnicas de RT-PCR y Western blot respectivamente. En el medio condicionado, la acrogranina fue cuantificada por la técnica de ELISA y la viabilidad celular fue determinada con el estuche CytoTox 96. La intensidad de las

bandas tanto del ARNm como de la proteína fue determinada por densitometría y la diferencia entre las distintas dosis fue calculada. Todos los experimentos fueron repetidos 4 veces.

En las células TOV-21G, la proteína y el ARNm de la acrogranina se incrementaron con la adición de r-hFSH a la dosis de 500 ng/mL y después de 48 h de incubación, a las 24 y 72 h de incubación con la r-hFSH no se observó ningún efecto. Sin embargo, en el medio condicionado un incremento significativo de la proteína acrogranina se observó a las 72 h de incubación con la misma dosis de r-hFSH. En las células NIH-OVCAR-3 no se encontró ningún incremento en los niveles del ARNm ni de la proteína acrogranina en ninguno de los tiempos de incubación a pesar de que la dosis máxima de r-hFSH (1000 ng/mL) fue dos veces la utilizada en las células TOV-21G. Finalmente, la adición de Calfostin C a las células TOV-21G disminuyó la síntesis de acrogranina, pero cuando el inhibidor Calfostin C y la r-FSH fueron adicionados a los cultivos celulares en forma combinada se observó un incremento en la síntesis de acrogranina, sugiriendo la participación de otra vía de transducción de señal.

Los resultados de esta tesis sugieren que la regulación de la expresión de acrogranina por FSH podría ser uno de los mecanismos que expliquen la asociación entre el cáncer de ovario y las altas concentraciones sistémicas de FSH en la menopausia. Este efecto solamente fue observado en las células derivadas de un carcinoma de ovario de células claras y no en las células derivadas de un adenocarcinoma seroso ovárico, lo que indica que la acrogranina y la FSH podrían jugar un papel importante en la patogénesis del carcinoma de ovario de células claras. En el futuro estos resultados podrían ayudar a diseñar estrategias terapéuticas para este tipo histológico de tumores ováricos.

## 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. Several growth factors have been implicated in the onset and progression of this pathology, some of which are currently used as reliable prognostic or predictive markers and/or as therapeutic targets for this potentially lethal malignancy. More recently, accumulating evidence support a role for acrogranin in epithelial ovarian cancer. Acrogranin is also known as Granulin-epithelin precursor (GEP), PC-cell-derived growth factor (PCDGF) or Progranulin. Overexpression of acrogranin in epithelial ovarian cancer has been associated specifically with proliferation, invasion, chemoresistant and poor survival. We previously demonstrated that PKC signaling is involved in the regulation of acrogranin protein expression in ovarian cancer cell lines, therefore, trying to identify some proteins that could be activate PKC and regulate acrogranin expression, we decided to study FSH for its important role in ovarian cancer and the activation of different signal transduction pathways in this pathology.

Ovarian cancer cell lines TOV-21G (clear cell carcinoma) and NIH-OVCAR-3 (serous adenocarcinoma cells) were stimulated with recombinant FSH (r-hFSH) at doses of 10 to 500 ng/mL and 10 to 1000 ng/mL respectively, with incubation periods of 24, 48 and 72 h. To determine the role of PKC signal transduction pathway, Calfostin C (PKC inhibitor) was used. Acrogranin mRNA and protein were determined for RT-PCR and western blot techniques respectively. An ELISA was used for acrogranin quantification in conditioned medium. Cellular viability was checked using the CytoTox96 kit. The signal intensity of acrogranin bands of mRNA and proteins was measured by densitometry. Differences between different doses were calculated. All experiments were repeated at least 4 times.

Acrogranin mRNA and protein increased in the TOV-21G cells with the addition of r-hFSH at doses of 500 ng/mL only at 48 h of incubation, at 24 and 72 h no effect was observed. The NIH-OVCAR-3 cells did not show any increment of

acrogranin expression although the maximum dose of r-hFSH (1000 ng/mL) was twice that in TOV-21G cells. Moreover, an increment of acrogranin protein also was observed in conditioned medium of TOV-21G cell at 72 h of incubation with the same doses of r-hFSH. Finally, in the TOV-21G cells Calyculin A decreased acrogranin synthesis, but when Calyculin A and r-hFSH were added in combination to the cultures, an increase of acrogranin protein was detected, suggesting the participation of other signal transduction pathway.

The findings in this thesis suggest that acrogranin expression regulation by r-hFSH could be one of the mechanisms that explain the association of ovarian cancer and high systemic concentrations of FSH in the menopause. It is important to mention that this effect was only observed in cell line derived from a clear cell ovarian carcinoma and not in cell line derived from a ovarian serous adenocarcinoma. Therefore, acrogranin and FSH may be playing an important role in the pathogenesis of clear cell ovarian carcinoma. Besides, in the future these findings might help to design specific therapeutic strategies for this type of ovarian tumors.

# **I. INTRODUCCIÓN**

## **A) EL OVARIO**

### **1.- Anatomía del ovario**

Los ovarios son las gónadas femeninas, son órganos pares localizados uno a cada lado del útero, su tamaño y localización varían de acuerdo a la edad y etapa reproductiva en la que se encuentran las mujeres. En mujeres nulíparas los ovarios presentan un color blanco rosado, tienen una forma ovoide aplanada similar a una almendra con una superficie irregular por el desarrollo de los folículos, miden 3 cm de largo, 2 cm de ancho y 1 cm de espesor. En la mujer posmenopáusica su tamaño disminuye llegando a medir un cuarto del tamaño de los ovarios observado en el período fértil. Estos órganos se ubican en una depresión llamada fosa ovárica, la cual está localizada en la parte superior de las paredes laterales de la cavidad pélvica, adelante y lateralmente al recto, y por detrás y por debajo de las trompas de Falopio [1, 2].

En la cavidad pélvica el ovario está sujeto por varios pliegues o ligamentos entre los que se encuentran: 1) el mesovario, un pliegue que procede de la cara posterior del ligamento ancho del útero, 2) el mesosálpinx que se extiende desde el borde del mesovario hasta el infundíbulo de la trompa, 3) el ligamento infundibulopélvico que une su polo superior a la fosa ovárica y al infundíbulo de la trompa uterina, 4) el ligamento propio del ovario que une su polo inferior con el ángulo lateral del útero y finalmente 5) el peritoneo, el cual se detiene alrededor del hilio del ovario donde se interrumpe bruscamente el contacto con el epitelio de superficie ovárica, por lo que deja un borde libre en esa zona, es aquí en el hilio por donde entran y salen los nervios, vasos sanguíneos y vasos linfáticos, los cuales van dentro del ligamento infundibulopélvico y entran al ovario por su polo posterior entre las dos capas del mesovario. Una vez en el ovario los vasos sanguíneos y nervios se dispersan en la médula [1, 2].



## **2.- Histología del ovario**

En un corte sagital del ovario se pueden observar dos zonas entre las cuales no existe un límite histológico definido. A la zona central se le conoce como médula y a la zona externa que rodea a la médula se le denomina corteza. La médula, está formada por tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, conductos linfáticos y fibras nerviosas, además, de un grupo mínimo de células epiteloideas intersticiales y otro de células hiliares, así como del remanente embrionario llamado la *rete ovarii*. La corteza contiene los folículos en diferentes etapas de desarrollo, los cuales se encuentran incluidos en tejido conectivo denso. Directamente sobre la corteza se encuentra la túnica albugínea, una cápsula de tejido conectivo denso irregular cubierta por una capa de mesotelio simple, el cual es conocido como epitelio de superficie ovárica (OSE por sus siglas en inglés) [3, 4].

## **3.- Funciones del ovario**

El ovario realiza dos funciones, la gametogénica y la endocrina. La función gametogénica comprende dos procesos simultáneos, el primero es la foliculogénesis la cual dará lugar al crecimiento y maduración de los folículos y el segundo proceso es la ovogénesis, el cual se encarga de producir el crecimiento del ovocito, así como su maduración epigenética, citoplasmática y nuclear. La finalidad de ambos procesos es la producción de un ovocito competente para la fertilización y para mantener las etapas iniciales del desarrollo embrionario [5]. La función endocrina se refiere a la síntesis de esteroides sexuales, principalmente la producción de estrógenos, hormonas necesarias para el buen funcionamiento del sistema reproductor ya que preparan a los órganos reproductivos para la gestación y el nacimiento [6].

Las funciones ováricas se llevan a cabo en el ciclo menstrual como un conjunto de eventos que se repiten en promedio cada 28 días. Este ciclo se puede

dividir en dos fases, la primera es la fase folicular, la cual inicia desde el primer día de la menstruación (desprendimiento de la capa funcional del endometrio que se manifiesta como hemorragia) hasta el día de la ovulación, después de la ovulación comienza la fase lútea, fase que termina hasta el primer día del ciclo siguiente. La regulación del ciclo menstrual está dada por la integración de señales estimuladoras e inhibitoras dentro del circuito denominado eje hipotálamo-hipófisis-ovario, del cual hablaremos más adelante [7].

#### **4.- Epitelio de superficie ovárica (OSE)**

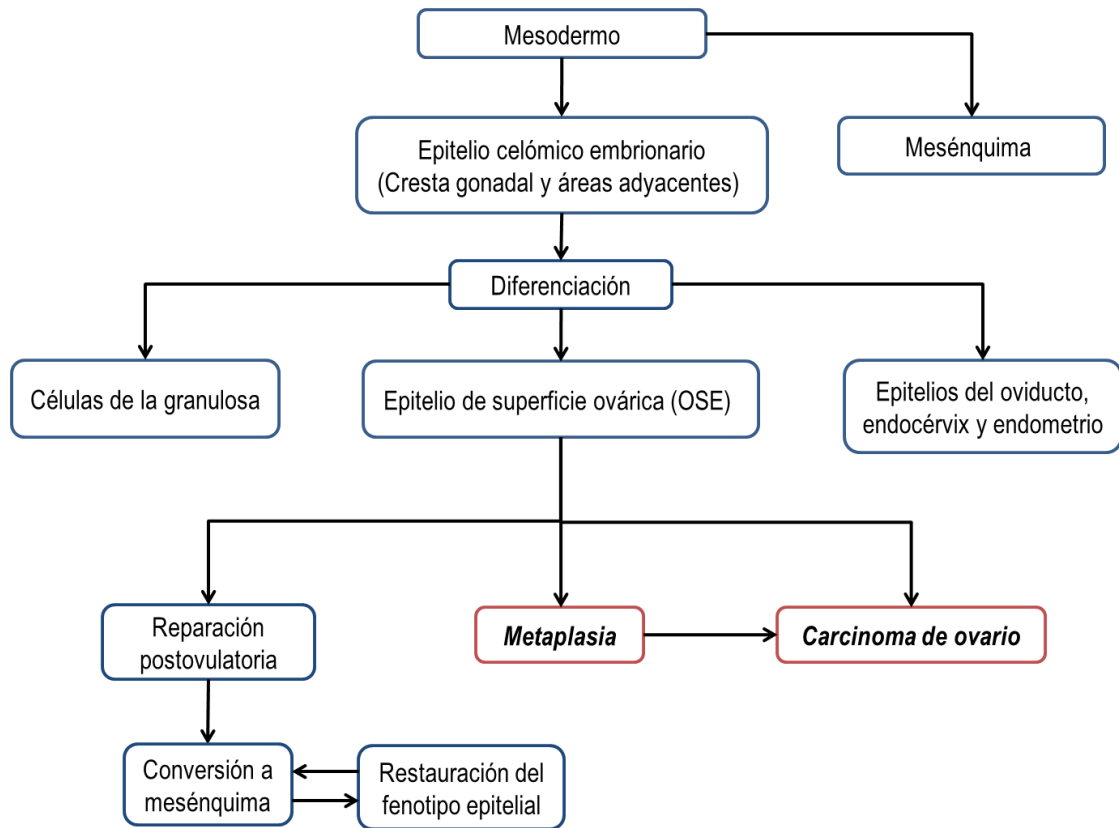
El OSE es un epitelio simple que cubre el ovario en forma de una monocapa, basalmente se encuentra inmediato a la túnica albugínea de la cual se separa por su lámina basal, apicalmente su superficie es continua al mesotelio del mesovario; sin embargo, se distingue de este último por la presencia de microvellosidades y cilios, además de la ausencia de expresión del antígeno CA-125, el principal marcador tumoral del cáncer epitelial de ovario. El OSE tiene una morfología que varía de un epitelio cúbico a un epitelio escamoso, además cuenta con la presencia de desmosomas y uniones estrechas incompletas, así como de integrinas y cadherinas las cuales mantienen su organización en monocapa. Una característica importante en el OSE es la expresión de cadherinas tipo N o neurales, que como su nombre lo dice son propias del tejido neural y también se encuentran en el tejido cardíaco. Los epitelios derivados del ectodermo o endodermo expresan cadherinas del tipo E o epiteliales, mas no cadherinas tipo N [8].

En respuesta a los estímulos ambientales, el OSE tiene la capacidad de diferenciarse hacia dos tipos celulares, el estromal y el epitelial, tiene además la característica de ser un mesotelio no comprometido que expresa proteínas típicas de células epiteliales tales como las queratinas 7, 8, 18 y 19, posee marcadores moleculares mesoteliales como la 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa y el antígeno de mucina MUC1, también tiene marcadores mesénquimales como la

vimentina, la  $\alpha$ -actina y la cadherina N como ya se mencionó anteriormente [9]. Dichas características le confieren la habilidad de efectuar las transiciones epitelio-mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) y mesénquima-epitelio (MET por sus siglas en inglés) como mecanismos que le permiten moverse durante el proceso de regeneración para reparar la herida después del daño ocasionado por la ruptura folicular. Existe la teoría de que cuando el OSE disminuye su capacidad para producir EMT puede transformarse hacia fenotipos epiteliales complejos, lo cual pudiera ocasionar una deformación metaplásica y posteriormente una transformación maligna [10, 11].

Tanto el OSE como las células de la granulosa, la corteza adrenal y los epitelios müllerianos (los epitelios del oviducto, del endometrio y del endocérvix) tienen el mismo origen embrionario, es decir se diferencian a partir del epitelio celómico, el cual deriva del mesodermo [9]. El epitelio celómico es considerado un epitelio pluripotencial que experimenta numerosos cambios durante el desarrollo prenatal y puede dar lugar a varios tejidos epiteliales como los mencionados anteriormente y que se muestran en la Figura 1. Esta relación entre el origen embrionario del OSE y las estructuras müllerianas podría explicar porque en ciertos tumores de ovario el OSE adquiere la morfología y las características funcionales de los epitelios müllerianos, ya que los tumores epiteliales serosos presentan características morfológicas similares a las trompas de Falopio, los tumores mucinosos se parecen al endocérvix y finalmente los tumores de tipo endometriode y de células claras se asemejan al endometrio [12].

Otra característica importante del OSE es su secreción y transportación de sustancias tales como hormonas, factores de crecimiento y citocinas, las cuales están involucradas en su crecimiento y proliferación, además el OSE expresa los receptores específicos para que estas moléculas puedan ejercer su acción (Tabla 1) [9].



**Figura 1.** Origen y destino del epitelio de superficie ovárica (OSE). Los epitelios müllerianos y el OSE se diferencian a partir del epitelio celómico. Modificado de Auersperg y cols. [9].

**Tabla 1.** Tipos de receptores presentes en el epitelio de superficie ovárica (OSE) y los más importantes productos de secreción por parte de este epitelio.

Receptores			
<u>Hormonas</u>	<u>Esteroides</u>	<u>Factores de crecimiento</u>	
GnRH FSH LH	Estrógenos Progesterona Andrógenos Corticosteroides	EGF HGF TGF- $\beta$ TNF- $\alpha$ PDGF Activina	
Productos de Secreción			
<u>Hormonas</u>	<u>Factores de crecimiento</u>	<u>Citocinas</u>	<u>Otros</u>
GnRH hCG	TGF- $\beta$ HGF EGF TNF- $\alpha$ Inhibina	IL-1 IL-6 M-CSF G-CSF GM-CSF	MUCI Quimiotripsina MMP-2 y 9 uPA Colágena II y III

Una de las funciones más significativas del OSE es su participación en la reparación de la herida ocasionada por la ovulación, así durante la ovulación el OSE contiguo a la pared apical del folículo preovulatorio secreta enzimas proteolíticas que degradan el tejido conectivo de la túnica albugínea y la teca folicular subyacente, secretando el factor activador de plasminógeno tipo urocinasa (uPA), dicha secreción está influenciada por la acción de la hormona luteinizante (LH). Una vez activado el plasminógeno y producida la plasmina, ésta activa colagenasas latentes y propicia la liberación del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) a nivel del anclaje del endotelio de los vasos sanguíneos en la teca. El TNF- $\alpha$  soluble induce mayor colagenólisis al incrementar la expresión de MMP-1 y MMP-2. Además, el TNF- $\alpha$  al igual que las prostaglandinas, promueve la apoptosis del OSE, de las células de la granulosa y de la teca a través del ligando FAS, así, el debilitamiento de la pared apical del folículo lleva a la formación del

estigma ovárico y la ruptura folicular [13, 14]. Una vez ocurrida la ovulación, la superficie del ovario dañada es reparada completamente, el epitelio alrededor de la herida prolifera y secreta matriz extracelular similar a la de fibroblastos, cambia su morfología hacia un estado mesénquimal alterando la expresión de moléculas de adhesión y convirtiéndose en células con un fenotipo migratorio realizando así la EMT. Finalmente las células retornan a su estado epitelial para cerrar la herida, realizando así la MET [10].

## **B) CÁNCER EPITELIAL DE OVARIO**

### **1.- Epidemiología del cáncer de ovario**

El cáncer de ovario representa un importante problema de salud en México y en el mundo. En el año 2008 se registraron 225,500 nuevos casos y 140,200 defunciones, ocupando así el quinto lugar en mortalidad a nivel mundial [15]. En Estados Unidos de América, la Sociedad Americana de Cáncer estimó que para el año 2013 se diagnosticarían 22,240 nuevos casos y se perderían 14,030 vidas, lo que ha representado que en ese país el cáncer de ovario ocupe el noveno lugar en frecuencia y la principal causa de muerte con respecto a los tumores malignos del aparato reproductivo [16]. En México no existen registros que permitan conocer con certeza la incidencia o mortalidad por año de este tipo de cáncer, sin embargo, existe un reporte del Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática (INEGI) del año 2009, en donde las estadísticas posicionaron al cáncer de ovario como la novena causa de muerte por tumores malignos en la mujer y la tercera causa de muerte de los tumores malignos ginecológicos, ya que la primera causa de muerte es por cáncer mama y la segunda por cáncer cervicouterino [17, 18].

La alta mortalidad de esta enfermedad está relacionada principalmente al diagnóstico tardío debido a la falta de signos y síntomas específicos y a la falta de un método de detección temprana. La mayoría de los casos se detectan cuando

el cáncer además de haber afectado a los ovarios ha hecho metástasis en órganos pélvicos, abdominales y fuera de la cavidad peritoneal, considerándose así estadios avanzados de la enfermedad (estadios III y IV) [19]. Además, la ubicación anatómica de los ovarios no permiten sospechar de la presencia de la enfermedad en etapas tempranas, los síntomas más comúnmente referidos son: dolor abdominal o pélvico, indigestión persistente, sensación de saciedad rápida, náuseas o vómitos, estreñimiento, diarrea, incremento en la frecuencia o urgencia para orinar, pérdida del apetito, pérdida de peso, aumento del tamaño abdominal inexplicable, incluso se han reportado otros síntomas como la fatiga, sangrado vaginal irregular, dolor durante las relaciones sexuales y dolor de espalda [20, 21].

El cáncer de ovario de origen epitelial es el más frecuente, representa el 90% de los casos, los menos frecuentes son los carcinomas de las células germinales y de las células de la granulosa. Los tumores de células germinales constituyen la mayoría de los casos de cáncer de ovario en mujeres menores de 20 años de edad, mientras que los de tipo epitelial se presentan principalmente en mujeres mayores de 50 años [19].

La mayoría de los casos de cáncer de ovario de tipo epitelial se consideran esporádicos, sin embargo, 5-10% de los casos se consideran hereditarios. Con respecto a estos, se ha determinado que existen al menos dos grupos de mujeres con una predisposición genética para desarrollar cáncer de ovario. La mayoría son mujeres que pertenecen a familias con casos de cáncer de ovario y de mama que se relacionan con mutaciones en los genes supresores de tumores BRCA 1 y BRCA 2. El riesgo de cáncer de ovario para estas mujeres es del 16-44% como portadoras de mutaciones en BRCA 1 y 27% con BRCA 2 [22, 23]. Por otra parte, una mínima proporción de mujeres que pertenecen a familias con el síndrome de cáncer colorectal hereditario sin poliposis (HNPCC por sus siglas en inglés, también conocido como síndrome de Lynch), están predispuestas a desarrollar cáncer de ovario debido a mutaciones en los genes de reparación del ADN, MSH2 y MLH1. El riesgo de cáncer de ovario para estas mujeres es del 10% a lo largo de la vida [22, 23].

## **2.- Clasificación del cáncer epitelial de ovario**

El cáncer epitelial de ovario es una enfermedad que se clasifica básicamente por la morfología celular del tumor, por lo tanto y de acuerdo a las características de las células, los tumores epiteliales de ovario se clasifican en: serosos, mucinosos, endometrioides, células claras, transicionales o de Brenner, indiferenciados y mixtos [24, 25]. Además, con base en el grado de diferenciación que presentan las células tumorales se clasifican como: Grado I (Bien diferenciado), Grado II (Moderadamente diferenciado) y Grado III (Pobremente diferenciado). También en la clasificación de los tumores de ovario se puede incluir la proporción de estructuras glandulares y papilares relativas al área de crecimiento de tumor sólido, así, Grado 1 corresponde a < 5%, Grado 2 del 5–50 % y Grado 3 >50% de crecimiento sólido [19].

Por otro lado, para la estadificación de la enfermedad, el sistema que más se utiliza es el propuesto por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) y se basa en los hallazgos de la exploración quirúrgica y la extensión de la enfermedad, clasificándose en estadios I, II, III y IV (Tabla 2) [26].

Una clasificación propuesta recientemente con el objetivo de buscar mejores alternativas de tratamiento, se basa en las características clínicas y patológicas que presentan las pacientes, así como, en las características moleculares que muestran los tumores, proponiéndose dos grupos. El grupo Tipo I, está formado por los carcinomas de bajo grado de tipo seroso y endometrioide, los carcinomas de células claras, mucinosos y transicionales (Brenner), estos tumores son poco agresivos y poco activos, por lo tanto crecen lentamente, se encuentran limitados generalmente al ovario, son estables genéticamente, pueden desarrollarse a partir de lesiones precursoras bien definidas como los llamados tumores limítrofes y su diagnóstico se efectúa generalmente en el estadio I [12, 27-30].

En contraste al grupo Tipo I, los tumores del Tipo II son altamente agresivos, crecen rápidamente, raramente limitados al ovario por lo que hay



invasión, tienen un alto nivel de inestabilidad genética y se caracterizan por mutaciones en el gen *p53*, se desarrollan *de novo*, aparentemente se originan del OSE o quistes de inclusión y generalmente se diagnostican en etapas avanzadas (estadio III y IV). A este grupo pertenecen los carcinomas pobremente diferenciados o de alto grado serosos y endometrioides, los carcinosarcomas (tumores mesodérmicos malignos mezclados) y los carcinomas indiferenciados [12, 27-30].

**Tabla 2.** Estadificación del cáncer de ovario de acuerdo a la FIGO (2006) [26].

ESTADIO	DESCRIPCIÓN
<b>I</b>	<b>Tumor limitado a los ovarios</b>
IA	Tumor limitado a un ovario, ningún tumor en la superficie ovárica, cápsula intacta, sin células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales
IB	Tumor limitado a ambos ovarios, ningún tumor en la superficie ovárica, cápsula intacta, sin células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales
IC	Clasificado como IA o IB, con cualquiera de los siguientes: Cápsula rota, tumor en la superficie ovárica, positivo para células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales
<b>II</b>	<b>Tumor que afecta a uno o ambos ovarios con extensión pélvica</b>
IIA	Extensión y/o implantes en el útero y/o trompas de Falopio
IIB	Extensión a otros órganos pélvicos
IIC	Clasificado como IIA o IIB , con tumor en la superficie ovárica, cápsula rota y/o positivo para células malignas en la ascitis o en los lavados peritoneales
<b>III</b>	<b>Tumor que afecta a uno o ambos ovarios con implantes peritoneales fuera de la pelvis y/o metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales y/o inguinales, metástasis en la cápsula del hígado, el intestino delgado u omento</b>
IIIA	Tumor limitado a la pelvis, con nódulos negativos, pero con metástasis peritoneal microscópica fuera de esta, en la superficie peritoneal abdominal, intestino delgado o mesenterio
IIIB	Tumor de uno o ambos ovarios con metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis (en la superficie peritoneal abdominal) menor o igual a 2 cm, nódulos negativos
IIIC	Metástasis peritoneal fuera de la pelvis mayores a 2 cm y/o metástasis en los nódulos linfáticos regionales
<b>IV</b>	<b>Crecimiento tumoral que afecta a uno o ambos ovarios con metástasis fuera de la cavidad peritoneal, presencia de efusión pleural y metástasis parénquimal de hígado</b>

### **3.- Etiología y factores de riesgo del cáncer epitelial de ovario**

Hasta el momento se desconocen las causas precisas del cáncer de ovario, sin embargo, se han podido identificar tanto una sobre-expresión de factores asociados al desarrollo de este cáncer así como una baja-expresión de factores o proteínas con efecto protector que evitan su desarrollo [31]. Además, existen varias teorías que tratan de explicar la etiología del cáncer epitelial de ovario espontáneo, en el cual no existe un componente hereditario.

Una de las teorías es la de la ovulación incesante propuesta por Fathalla en el año de 1971. En ella se menciona que durante la ovulación, el epitelio ovárico sufre rupturas para dar lugar a la salida del óvulo, lo cual ocasiona un daño continuo al epitelio, así, la proliferación subsecuente para sustituir las células perdidas o reparar el epitelio dañado incrementa la posibilidad de que ocurran mutaciones genéticas durante la replicación, lo que genera la malignidad del OSE [32]. De acuerdo con esta hipótesis existe un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario en las mujeres con más episodios de ovulación durante su vida, mujeres con menarca a edad temprana, mujeres con inicio tardío de la menopausia y en mujeres nulíparas. Mientras que tienen un menor riesgo de desarrollar cáncer de ovario las mujeres en las que el número de ovulaciones disminuye o mujeres en las cuales la ovulación es suprimida como en múltiples embarazos, uso de anticonceptivos orales y mayor tiempo de lactancia [32-34]

Como parte de la fisiopatología de la teoría de Fathalla, se sabe que después de haber ocurrido la ovulación, algunos fragmentos del OSE quedan atrapados en la corteza ovárica formando quistes de inclusión epitelial. De esta manera y de forma normal es en este momento cuando el OSE efectúa la transición EMT para convertirse hacia un fenotipo similar al de fibroblastos e incorporarse al estroma cortical. Por lo tanto, cuando el epitelio atrapado pierde la capacidad de realizar la EMT puede mantener la forma epitelial dentro del estroma ovárico y llevar 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 [9, 32].

Otra de las teorías en la génesis del cáncer de ovario es la de las gonadotropinas y los esteroides. En esta teoría se propone que los altos niveles de gonadotropinas circulantes podrían estimular la producción de estrógenos por parte de las células estromales que forman los quistes de inclusión, dichos estrógenos podrían estimular la diferenciación, proliferación y la subsecuente transformación maligna del OSE, no así la progesterona [35]. Datos que apoyan esta hipótesis, son el aumento en la incidencia de la enfermedad conforme avanza la edad de las mujeres, es común en la menopausia, cuya característica importante son las altas concentraciones circulantes de la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), el aumento en el riesgo de presentar cáncer de ovario de las pacientes en tratamiento por infertilidad con gonadotropinas recombinantes y la realización de técnicas de fertilización *in vitro* [36]. También, el mayor riesgo de la enfermedad lo presentan las mujeres con terapia de reemplazo estrogénico para disminuir los síntomas del climaterio y la postmenopausia. Por otro lado, se encuentra un menor riesgo a desarrollar éste tipo de cáncer en mujeres durante la lactancia, o con antecedentes de uso de anticonceptivos orales y el uso de medicamentos con actividad antiestrogénica como el tamoxifen o fulvestrant [37-40].

Como parte de la fisiopatología de esta teoría se menciona que durante la ovulación el OSE es bañado por el líquido folicular rico en estrógenos, siendo éstos los responsables de que este epitelio incremente su índice mitótico para la reparación de la herida, lo que podría incrementar la posibilidad de que ocurran mutaciones. Además, dentro de los quistes de inclusión las células epiteliales atrapadas en el estroma se encuentran cercanas a los vasos sanguíneos y a las células intersticiales productoras de esteroides. Estudios *in vitro* han demostrado un incremento en la proliferación de las células del OSE normal bajo el estímulo de los estrógenos [37]. En relación a que los andrógenos elevados pudieran promover la carcinogénesis ovárica, el síndrome de ovarios poliquísticos (PCOS

por sus siglas en inglés) es un factor de riesgo mayor para cáncer de ovario por el hiperandrógenismo que presentan las pacientes. De hecho se ha observado en los ovarios de pacientes con PCOS una mayor cantidad de quistes de inclusión en comparación con los ovarios de mujeres sin el síndrome. Además, el tratamiento con danazol (una medicamento que suprime la secreción de gonadotropinas, pero con propiedades androgénicas) que es utilizado en el tratamiento de endometriosis, ha sido tomado en cuenta como un factor de riesgo para cáncer de ovario y a favor de esta hipótesis. Aunque no hay una asociación sólida entre el riesgo cáncer de ovario y obesidad, acné e hirsutismo también han sido considerados en este respecto. Por otro lado, de acuerdo con esta teoría, serían factores protectores para desarrollar cáncer de ovario, el embarazo y el uso de anticonceptivos orales, el primero no por suprimir la ovulación, sino por mantener elevados niveles de progesterona y los segundos por la inhibición de la producción de testosterona y el efecto apoptótico que tienen las progestinas como el norgestrel y levonorgestrel sobre el OSE [37, 41].

Otra de las teorías propuestas es la de Ness o la teoría de la inflamación, la cual se propuso para explicar el incremento de la incidencia de cáncer de ovario entre mujeres que usaban talco, presentaban endometriosis o enfermedad pélvica inflamatoria y porque aparentemente la histerectomía y la ligación de trompas prevenían la aparición de este cáncer [42], en la actualidad tanto el uso de talco, como la endometriosis y la enfermedad pélvica inflamatoria son considerados factores de riesgo para el cáncer de ovario. Además y complementando la teoría de Fathalla, remarca la importancia de la reacción inflamatoria aguda en el ovario una vez que ocurre la ovulación, donde el OSE queda expuesto de manera crónica a un ambiente rico en citocinas, interleucinas, metaloproteasas, factores de crecimiento y células inmunes. Dicho proceso inflamatorio va acompañado de un estrés oxidativo, lo que podría promover la iniciación, el desarrollo y la progresión de una degeneración maligna del OSE. Una vez transformado el OSE, desarrolla mecanismos para que las células inmunes y sus mediadores como IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$  apoyen el crecimiento y la progresión tumoral [10, 43]. Otras

citocinas como el Factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y el Factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) también intervienen en procesos de crecimiento y supervivencia celular. Consistente con esta hipótesis, mujeres que usan drogas antiinflamatorias no esteroideas como acetaminofén o aspirina reducen el riesgo de cáncer epitelial de ovario. Además de que células que expresan IL-6 son resistentes a la toxicidad del cisplatino y los altos niveles séricos de esta citocina están asociados con un mal pronóstico y baja supervivencia de pacientes con cáncer de ovario [44].

Además de las teorías ya mencionadas para la génesis del cáncer de ovario, también se han identificado mutaciones en oncogenes y genes supresores de tumores, entre las que se encuentran mutaciones que inactivan algunos de los genes supresores de tumor como *p53*, con lo que se presenta una evasión de la apoptosis y el arresto celular. Las mutaciones en el gen *PTEN*, pueden llevar a la pérdida de su función, con la consecuente activación de efectores río abajo de PI3K. Por otro lado, mutaciones que activan oncogenes como *c-Erb-1* (EGFR), *c-Erb-2* (HER-2), *c-K-ras* (transductor de señal), *c-myc* (factor de transcripción), así como *PIK3CA* (subunidad catalítica de PI3K) y *CTNNB1* ( $\beta$ -catenina) pueden dar lugar a proliferación celular [45, 46].

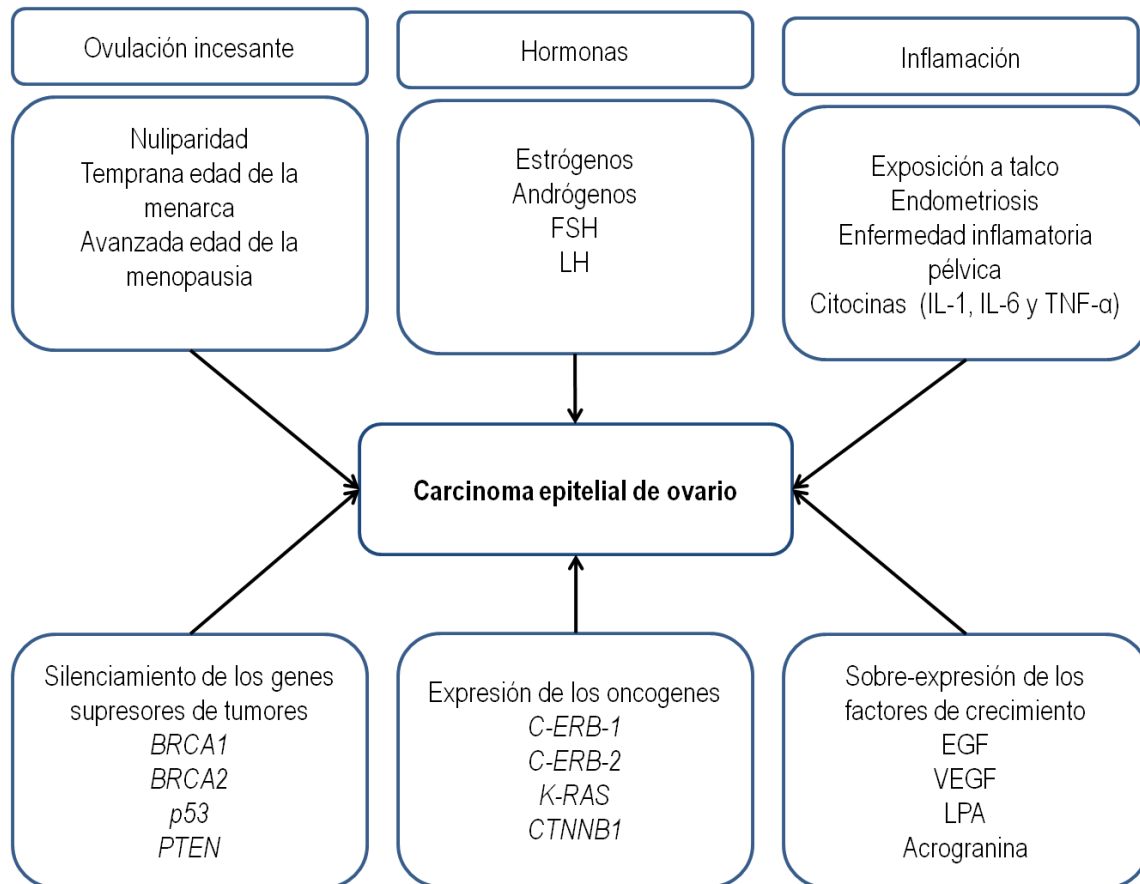
Por otra parte, también se ha descrito la participación de factores de crecimiento que están involucrados en la carcinogénesis ovárica. El Factor de crecimiento epidermal (EGF) y sobre todo su receptor (EGFR o HER), juegan un papel muy importante en la proliferación celular, supervivencia, adhesión, motilidad, invasión y angiogénesis, así como resistencia a la apoptosis. La sobre-expresión, pero sobre todo la mutación del receptor que genera su activación constitutiva puede contribuir a una transformación maligna del epitelio ovárico, a un peor pronóstico del cáncer y a una disminución de la respuesta al tratamiento terapéutico. En la actualidad el EGFR es considerado blanco en el tratamiento del carcinoma ovárico [47, 48].

Otro factor de crecimiento ampliamente estudiado en cáncer de ovario es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR), ambos participan de manera importante en la regulación fisiológica y patológica de la angiogénesis y la permeabilidad vascular por lo que pueden promover el crecimiento, progresión e invasión tumoral, así como la acumulación de ascitis. El VEGF se expresa constitutivamente en ovarios normales y neoplásicos, se expresa de manera diferencial en especímenes de tumores en comparación con tejidos ováricos benignos, su sobre-expresión en tumores de ovario y en sus metástasis es inducida por hipoxia y diferentes factores entre los que se encuentran EGF, TGF- $\beta$ , IL-6 y gonadotropinas. Su implicación en la migración e invasión es regulada a través de la activación de su receptor y la secreción y activación de metaloproteasas MMP-2, 7 y 9. La expresión de este factor esta inversamente correlacionada con supervivencia. En base al papel que juega el VEGF/VEGFR en el cáncer de ovario, agentes terapéuticos contra estas proteínas están bajo investigación clínica. [49]

Otro factor mitogénico que se encuentra sobre-expresado en este tipo de cáncer, así como en el líquido de ascitis de pacientes con esta patología es el ácido lisofosfatídico (LPA), este factor participa en cáncer de ovario a través de la regulación de otros factores entre los que se encuentran la glicodelina (una proteína con un rol inmunosupresor en carcinogénesis), IL-6 e IL-8, citocinas angiogénicas y la acrogranina (un factor de crecimiento y supervivencia para cáncer de ovario). Por lo tanto, el LPA es un factor que promueve el crecimiento, supervivencia, motilidad e invasión celular, así como resistencia a quimioterapéuticos [50].

En los últimos años, se ha demostrado la participación en el cáncer de ovario del factor de crecimiento llamado acrogranina. Esta proteína se encuentra sobre-expresada en esta patología y su producción puede ser estimulada por LPA, así como por otros factores, es capaz de promover el crecimiento, la supervivencia y la invasión celular en este tipo de cáncer.

En resumen y como se esquematiza en la Figura 2, son varias las teorías y muchos los factores y las condiciones que pueden ocasionar la degeneración maligna del OSE y como consecuencia la generación de un carcinoma epitelial de ovario.



**Figura 2.** Teorías y factores involucrados en la génesis del cáncer epitelial de ovario

## C) ACROGRANINA

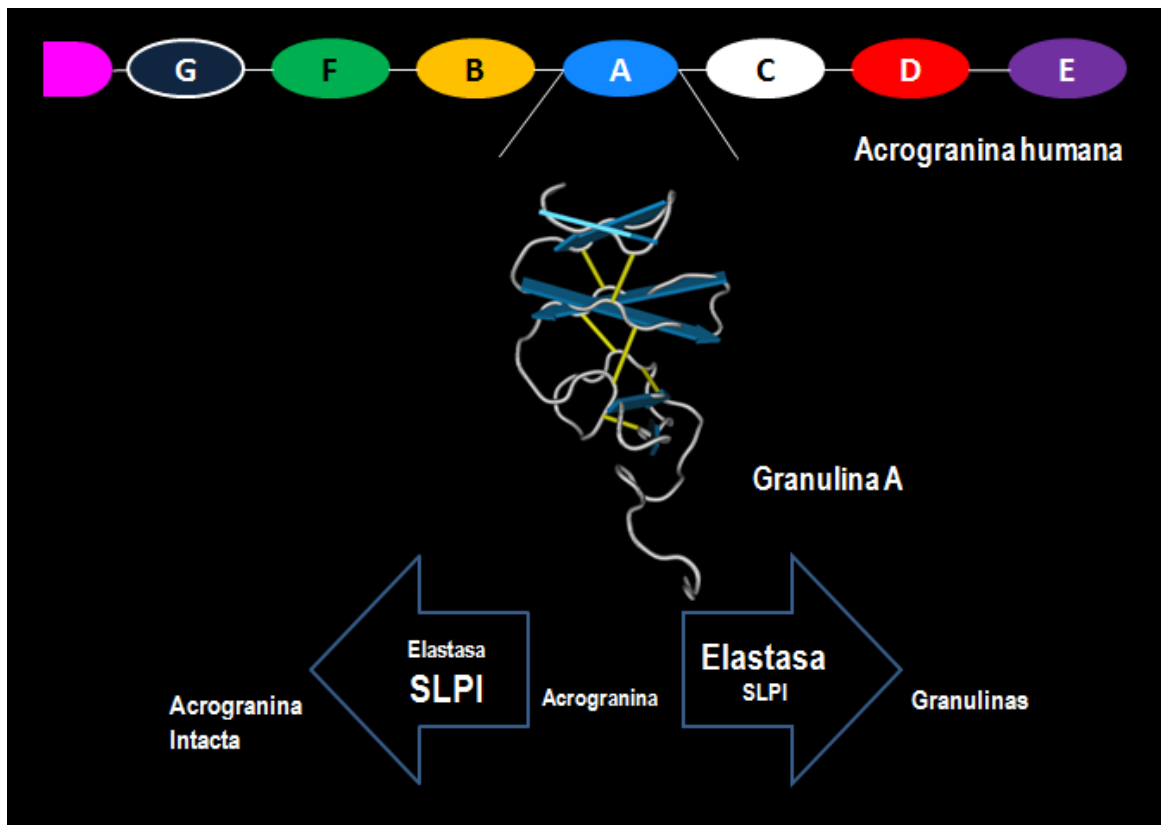
### 1.- Características estructurales

La acrogranina es una proteína de 593 residuos de aminoácidos, cuyo peso molecular es de 68 KDa. Es una proteína de secreción ya que contiene un péptido señal para este fin, aproximadamente 15% de su secuencia peptídica



corresponde a residuos de cisteínas. Además, consta de siete y media copias en tándem de un motivo altamente conservado que se presenta a lo largo de la molécula proteica. La estructura de cada motivo consiste de un esqueleto peptídico que adopta una conformación de pilas paralelas de cadenas  $\beta$  plegadas en forma de una hélice levógira, contiene 12 cisteínas que se entrelazan creando seis puentes disulfuro, formando así un eje a través del centro de la molécula (Figura 3) [51, 52].

La familia peptídica a la que pertenece la acrogranina fue identificada en la década de los noventa. La acrogranina fue purificada inicialmente de testículos de cobayo por Anakawe y Gerton en 1990. Simultáneamente a este evento, otros investigadores aislaban y caracterizaban a las granulinas (GRN's) y las epitelinas, péptidos que contienen uno o varios motivos y tiene un peso molecular que varía desde 45 hasta 6 KDa [51, 53]. Estudios posteriores determinaron que las granulinas y las epitelinas derivaban de un precursor común al que se le denominó proepitelina (PEPI) y/o progranulina (PGRN) [54, 55], péptido que coincidía con la secuencia de aminoácidos de la molécula de acrogranina. Por último, la proteína homóloga a la acrogranina pero glícosilada a la que se le denominó factor de crecimiento derivado de células PC (PCDGF) y con un peso molecular de 88 KDa fue purificada de células PC, una línea celular altamente tumorigénica derivada de la línea celular 1246 de teratoma de células adipogénicas [56]. Inicialmente y en general a esta familia se les conoció como factores de crecimiento o moduladores del crecimiento celular, aunque poco a poco se han ido identificando otros de sus efectos en los diversos tipos de células en los que se han estudiado.



**Figura 3.** Estructura de la acrogranina. En la parte superior de la figura, está representada la acrogranina en donde cada elipse representa un motivo de granulina con 12 residuos de cisteína, el semi-elipse corresponde al motivo parcial con 6 cisteínas. Al centro de la figura se observa la estructura tridimensional de la granulina A, en donde los puentes disulfuro en amarillo forman un eje a través del centro de la molécula, el esqueleto peptídico es gris y las cadenas  $\beta$  plegadas están representadas por flechas azules (Base de datos de estructuras MMDB: 63884, vista con el software Cn3D de NCBI). En la parte inferior de la figura se observan los efectos de SLPI y Elastasa sobre la acrogranina, si el efecto de SLPI es mayor se mantiene la integridad de la acrogranina, pero si el efecto de la Elastasa es mayor, se promueve su proteólisis en granulinas.

## 2.- Funciones de la acrogranina

Posterior a su descubrimiento, se empezaron a identificar las primeras funciones de la acrogranina, encontrando que la actividad de la acrogranina es regulada por proteólisis, es decir las elastasas pueden procesarla a sus formas pequeñas las granulinas y/o epitelinas, sin embargo, sí la acrogranina se encuentra unida al inhibidor de proteasas secretado por leucocitos (SLPI) se evita

su rompimiento o proteólisis, perdurando así su actividad (Figura 3) [57]. A la acrogranina se le han descrito funciones importantes en varios procesos fisiológicos tales como el proceso de cicatrización, en donde incrementa el número de fibroblastos y capilares que entran en la herida en la etapa temprana de curación [58, 59], en el desarrollo embrionario murino, donde promueve la cavitación y estimula la proliferación del trofoectodermo [60, 61], y en la diferenciación sexual cerebral como un factor de masculinización hipotalámica [62].

Además de su participación en procesos fisiológicos a la acrogranina se le ha relacionado con procesos fisiopatológicos, ya que se ha demostrado su participación en la aparición de la enfermedad neurológica conocida como demencia frontotemporal, en donde mutaciones autosómicas dominantes en el gene de la acrogranina ocasionan una baja o nula expresión de la proteína produciendo atrofia neuronal, por lo tanto, a la acrogranina se le ha considerado como un factor protector de la muerte neuronal prematura [63]. Por otro lado, a la acrogranina también se la ha considerado como un factor de crecimiento para condrocitos, ya que juega un gran papel en el desarrollo de cartílago y artritis inflamatoria, sin embargo, una función recientemente descubierta es su acción como un importante regulador de inflamación al unirse al receptor del Factor de necrosis tumoral y bloquear la acción de éste, para lo cual ya se creó un derivado de ésta proteína que está siendo probado farmacológicamente en animales por lo que se encuentra en fase cero o preclínica de estudio para artritis reumatoide [64-66].

Se ha observado un aumento de la expresión de acrogranina en varios tipos de tumores malignos incluyendo gliomas [67], mieloma múltiple [68], sarcoma de músculo liso uterino [69], cáncer de endometrio [70], carcinoma hepatocelular [71-73], cáncer de vejiga [74, 75], tumores laríngeos [76], cáncer esofágico [77], renal [16], de próstata [78, 79], de mama [80, 81] y cáncer de ovario [82, 83]. En la mayoría de estos tipos de tumores malignos se ha podido observar una

correlación positiva entre la progresión del cáncer y la expresión elevada tanto del ARNm como de la proteína acrogranina.

### **3.- Acrogranina y cáncer de ovario**

Jones MB y cols. demostraron en uno de los primeros estudios acerca de acrogranina y cáncer de ovario, que en librerías de ADN complementario (ADNc) construidas a partir de ARN de tumores ováricos de tipo seroso y mucinoso tanto invasivos como de bajo potencial maligno o limítrofes, los transcritos de acrogranina se expresaban en los carcinomas invasivos pero no en los tumores de bajo potencial maligno. Además, por la técnica de inmunohistoquímica, la localización de la acrogranina en las células de estos tipos de tumores era diferente. En los tumores invasivos la acrogranina estaba presente en el citosol de las células epiteliales con un patrón difuso, sin embargo, en los tumores de bajo potencial maligno su localización era apicalmente en la célula y con un patrón uniforme [82]. También observaron que la transfección de un constructo de ADN de acrogranina anti-sentido a las líneas celulares de cáncer de ovario HEY-A8 y OVCAR-3 disminuía la síntesis de la proteína acrogranina, logrando reducir la tasa de proliferación *in vitro* hasta en un 50%, así como la capacidad de colonización en agar hasta un 60% y 70% respectivamente, comparadas con sus controles [82]. Más tarde, el estudio de Kamrava M y cols. demostró que en las mismas líneas celulares, anticuerpos neutralizantes en contra de acrogranina producían apoptosis en ambas líneas celulares, incluso después de haber sido tratadas con dos factores que son capaces de regular a la alta la síntesis de acrogranina, el ácido lisofosfatídico (LPA) y la endotelina 1 (ET-1) [84]. Por otra parte, la transfección del gen de acrogranina en la línea celular A2780 de cáncer de ovario, demostró que la sobre-producción de esta proteína producía un incremento del crecimiento celular en monocapa, un aumento del 30% en la formación de las colonias en agar semisólido, así como un incremento de 42% en su capacidad de migración y de 29% en su poder de invasión, todo esto en comparación con sus controles [85]. Además, el estudio *in vivo* en ratones atímicos desnudos, demostró que células de cáncer de ovario transfectadas con el gen de la acrogranina

promovieron dos veces más rápido la formación de tumores en estos ratones que las células control a las cuales se les transfeció solo el vector sin el gen de acrogranina [85]. Los datos de estos estudios demuestran que la acrogranina es un factor de crecimiento que incrementa la tumorigenicidad de las células cancerígenas y actúa como un factor de sobrevivencia para este tipo de células.

Para demostrar que la acrogranina es capaz de producir una transformación maligna de células normales, en otro estudio, células fenotípicamente normales de OSE inmortalizadas a las cuales se les transfeció el gen de la acrogranina fueron capaces de aumentar su crecimiento en agar semisólido y producir la formación de tumores en todos los ratones atímicos desnudos inoculados con estas células, sin embargo, en ninguno de los ratones inoculados con las células control de OSE inmortalizadas desarrollaron tumores después de 4 meses de seguimiento [86].

Por otra parte, se ha logrado observar en diferentes líneas celulares de cáncer de ovario que la síntesis de acrogranina está asociada con un fenotipo quimiorresistente, ya que las células que sintetizan mayor cantidad de acrogranina son más resistentes a altas concentraciones de cisplatino. Más aun, se ha podido observar que las células A2780 transfecidas con el gen de acrogranina formaron hasta un 61% más colonias en agar en comparación con sus controles a pesar del tratamiento con el agente quimioterapéutico. También fueron capaces de formar tumores en ratones con tratamiento con cisplatino, a pesar de esto, su crecimiento fue continuo y por un periodo de tiempo más largo a diferencia de sus controles en los cuales el crecimiento tumoral se estabilizó a los 23 días de seguimiento [85].

La síntesis de acrogranina no solo se confina al tumor primario, ya que Davidson B y cols. analizaron la producción de acrogranina en células de carcinomas primarios de ovario, sus metástasis sólidas y de células de efusiones pleurales o peritoneales, logrando determinar una asociación entre la sobreproducción de acrogranina, la enfermedad metastásica y un pobre pronóstico clínico para las pacientes, ya que existe una relación inversa entre la producción de la proteína y la supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario. Las pacientes

cuyos tumores primarios expresaron acrogranina en las células estromales tuvieron una menor sobrevida total comparada con las pacientes con tumores negativos para la presencia de acrogranina en este compartimiento celular (26 vs 36 meses respectivamente) [83]. En nuestro laboratorio, determinamos la expresión del ARNm y de la proteína de la acrogranina en tumores malignos y benignos de ovario, así como en tejidos normales de ovario, encontrando también una expresión diferencial entre los tejidos, ya que los niveles de acrogranina fueron mayores en forma significativa en los tumores malignos en comparación con los tumores benignos y tejidos normales de ovario. Además, también confirmamos la correlación entre los niveles altos de ARNm de acrogranina y una menor sobrevida de las pacientes [87].

La Acrogranina ha sido considerada como una biomarcador potencial de estados avanzados y recurrencia de cáncer epitelial de ovario, así como de sobrevida libre de enfermedad en las pacientes. El estudio clínico realizado por Han JJ y cols. en donde se valoraron las proteínas acrogranina, SLPI, CA-125 y la proteína epidídimo 4 de humano (HE4) mostró que las concentraciones séricas de acrogranina después de 3 meses sin enfermedad fueron mayores en pacientes con recurrencia antes de 18 meses (sensibilidad del 93% y especificidad del 100%). La tasa de sobrevivencia libre de enfermedad a 5 años para pacientes con concentraciones de acrogranina iguales o menores a 59 ng/mL fue de 60% comparada con 0% para pacientes con más de 59 ng/mL de acrogranina sérica. En comparación, las concentraciones de CA-125 se elevaron 3 meses antes de la recurrencia en 50% de los casos (sensibilidad 50% y especificidad 100%) por lo que acrogranina predijo recurrencia antes del aumento en CA-125. Los demás marcadores analizados de manera individual no estuvieron asociados con sobrevivencia libre de progresión del cáncer [88]. Estos resultados deben considerarse con cierta reserva, pues a pesar de los análisis estadísticos realizados el tamaño de la muestra es pequeña y por lo tanto necesita ser validado. Otro estudio más reciente en donde se valoró acrogranina y SLPI como posibles marcadores pronósticos en cáncer de ovario, cuantifico la concentración

de ambas proteínas en plasmas provenientes de 50 pacientes con patología benigna de ovario, 50 pacientes con cáncer de ovario estadio I y II, así como 100 pacientes con cáncer de ovario estadio III y IV. Los investigadores demostraron que las concentraciones de acrogranina no estuvieron tan altas en cáncer de ovario, pero las relativamente altas concentraciones observadas de acrogranina plasmática se asociaron con una disminución en la supervivencia de pacientes en estadios avanzados. Las concentraciones plasmáticas de SLPI estuvieron elevadas en estadios tempranos y tardíos de cáncer de ovario y también estuvieron aumentadas aún en los plasmas donde las concentraciones de CA-125 fueron normales [89].

Por todas las evidencias moleculares, patológicas y clínicas mencionadas anteriormente se ha considerado que la acrogranina juega un papel importante en la patogénesis del cáncer de ovario.

#### **4.- Regulación de la expresión de acrogranina**

En la actualidad solo se conocen tres factores que aparentemente regulan la expresión de la acrogranina en diferentes tipos de cáncer, el  $17\beta$ -estradiol, la ET-1 y el LPA. En cuanto al  $17\beta$ -estradiol, Lu R y Serrero G en su estudio utilizando la línea celular MCF-7 de cáncer de mama, demostraron que este estrógeno ejerce una regulación positiva sobre la síntesis de la proteína y del ARNm de acrogranina. A las 4 h de exposición con el estradiol a dosis de  $10^{-9}$  M y utilizando la técnica de Northern blot observaron un incremento en el ARNm de la acrogranina 1.5 veces con respecto al control, llegando a aumentar hasta 5 veces lo del control a las 12 h. Un mayor incremento en la proteína acrogranina también fue observado a las 12 y 24 h de la exposición con el estradiol tanto en el lisado celular como en el medio condicionado [81]. El efecto del LPA y la ET-1 sobre la acrogranina fue valorado en células de cáncer de ovario, ambos factores fueron capaces de regular la síntesis de acrogranina a la alta. Con respecto al control, LPA incremento esta proteína hasta un 40% y la ET-1 la incremento un 20%.

Ambos factores promovieron esta regulación positiva de la acrogranina a través de la vía de señalización cAMP/EPAC/ERK1,2 [84]. Por otra parte, en nuestro laboratorio, utilizando inhibidores farmacológicos de diferentes vías de transducción de señal en las líneas celulares NIH-OVCAR y SK-OV-3 de cáncer de ovario logramos identificar que la vía de PKC está involucrada en la regulación de la acrogranina, ya que la inhibición de esta vía con el compuesto farmacológico Calphostin C (inhibidor general de PKC) disminuyó la síntesis de la proteína acrogranina en forma dosis dependiente, logrando disminuir sus niveles hasta en un 50% con respecto al control. Sin embargo, la síntesis del ARNm no se vio afectada, lo que nos indica una regulación a nivel post-transcripcional [90].

Tratando de encontrar los posibles péptidos que podrían activar la vía de PKC y regular la expresión de la acrogranina en líneas celulares de cáncer de ovario, decidimos estudiar a la FSH por su participación en esta patología y por las señales de transducción que activa en esta patología.



## **D) Hormona folículo estimulante (FSH)**

### **1.- Estructura y síntesis**

La hormona folículo estimulante (FSH) es una glicoproteína que junto con la hormona luteinizante (LH), la hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) y la hormona estimulante de la tiroides (TSH) forman la familia de las gonadotropinas. Estas hormonas están compuestas de dos subunidades, la alfa ( $\alpha$ ) y la beta ( $\beta$ ). La subunidad  $\alpha$  es común para todas, sin embargo, la subunidad  $\beta$  es la que les confiere la especificidad a cada una de ellas, ambas subunidades están unidas de una manera no covalente. Las gonadotropinas FSH y LH son las reguladoras de las funciones reproductivas tanto del ovario como del testículo, específicamente en ambos órganos regulan la esteroidogénesis y la gametogénesis [91].

La síntesis y secreción de las gonadotropinas FSH y LH por la hipófisis está regulada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), este péptido es secretado de manera pulsátil por el hipotálamo medio basal y viaja por el sistema venoso portal hipofisario hasta los gonadotropos de la adenohipófisis en donde se une a su receptor para promover la síntesis de ambas gonadotropinas. Una vez sintetizadas son liberadas a la circulación periférica, llegando al ovario y regulando sus funciones fisiológicas, formando así la unidad hipotálamo-hipófisis-ovario [92].

En el ovario la FSH estimula la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y por ende la selección, crecimiento y maduración de los folículos antrales hasta el estado preovulatorio, así como la maduración del ovocito y la síntesis de estrógenos y proteínas reguladoras de la unidad hipotálamo-hipófisis-ovario. En las células de la granulosa durante la fase folicular del ciclo menstrual, la FSH induce la síntesis de su receptor (FSHR), inhibina B, P450 aromatasas, P450 reductasa y 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 $\beta$ -HSD), estos complejos enzimáticos participan en la aromatización y transformación de los precursores androgénicos en estrógenos como estrona y 17 $\beta$ -estradiol. Al final de la fase folicular, la FSH promueve la diferenciación de las células de la granulosa al inducir la expresión del receptor de LH (LHR). Por otra parte, los efectos de la

LH en el ovario incluyen la regulación de la síntesis de andrógenos por las células de la teca, la inducción de la maduración del folículo preovulatorio y la luteinización de las células de la granulosa para la síntesis de andrógenos durante la fase folicular tardía del ciclo menstrual, también es indispensable para la ruptura del folículo y la liberación del ovocito, así como la formación del cuerpo lúteo [5, 7].

## **2.- Vías de señalización intracelular activadas por FSH**

La FSH actúa sobre sus células diana a través de la unión a su receptor FSHR, este pertenece a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, específicamente a la subfamilia de receptores similares a rodopsina y  $\beta$ -adrenérgicos [93, 94]. El FSHR es una cadena simple de 678 residuos de aminoácidos que forma siete dominios  $\alpha$  hélice transmembranales conectados por tres asas intracelulares y tres extracelulares, tiene un dominio amino terminal extracelular rico en leucinas esencial para la unión del receptor a su ligando y el dominio carboxilo terminal intracelular el cual es necesario para la unión a proteínas efectoras, además, contiene tres sitios consenso para N-glicosilación y se expresa como dímeros en la membrana celular [95, 96].

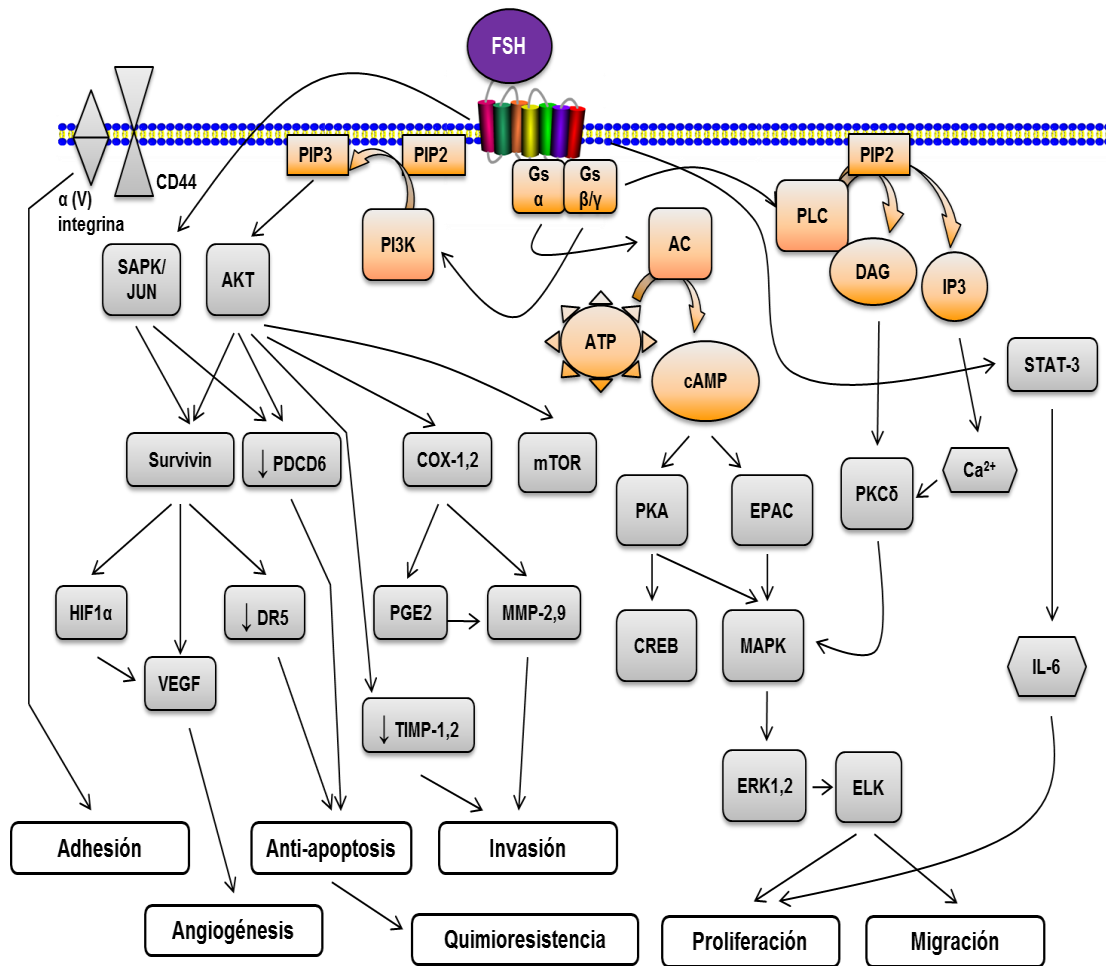
Tanto en células de la granulosa como en células epiteliales de cáncer de ovario, una vez que la FSH se une a su receptor provoca cambios conformacionales en el asa extracelular que se propagan por los dominios transmembranales y modifican la conformación del dominio intracelular del receptor permitiendo el acoplamiento a las proteínas efectoras, principalmente a la proteína heterotrimerica  $G_s$ , la cual se disocia en dos moléculas, la subunidad  $\alpha$  estimula el efector adenilato ciclasa y la subunidad  $\beta/\gamma$  activa la fosfolipasa C y probablemente la cinasa dependiente de fosfatidilinositol (PI3K) [93, 94]. La subunidad  $G_s$  estimula la actividad de adenilato ciclasa, y como consecuencia incrementa la síntesis del segundo mensajero adenosina monofosfato cíclico (cAMP), la acumulación de éste activa dos efectores, la proteína cinasa dependiente de cAMP (PKA) y la proteína intercambiadora activada por cAMP

(EPAC), la vía de PKA es considerada como el mecanismo canónico de la acción biológica de la FSH sobre las células de la granulosa. La PKA fosforila varios blancos nucleares y citoplasmáticos, entre los que se encuentran la proteína de unión al elemento de respuesta de cAMP (CREB) y algunos miembros de la familia de la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK), por otra parte la EPAC puede activar la proteína cinasa B (PKB/AKT) [97] y ambas, PKA y EPAC contribuyen a la activación de p38MAPK y MEK/ERK (Figura 4) [98, 99].

La subunidad  $\beta/\gamma$  de la proteína Gs activa la fosfolipasa C (PLC) y PI3K probablemente de manera directa o indirectamente a través de Rap1. La activación de PLC rompe el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PI(4,5)P<sub>2</sub>] en inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), el IP<sub>3</sub> contribuye a la liberación de calcio intracelular y ambos productos a la activación de las isoformas convencionales y nuevas de la proteína cinasa C (PKC) (Figura 4) [93].

### **3.- La FSH y el epitelio de superficie ovárica (OSE)**

El efecto de la FSH sobre el OSE ha sido estudiado en diferentes especies. En general el efecto de FSH sobre el OSE proveniente de diferentes animales y cultivado *in vitro* es el de estimular la proliferación celular y síntesis de ARN [100-102]. Se ha descrito que en el OSE de bovino, la FSH estimula la proliferación celular y puede inducir la expresión del ARNm de factores de crecimiento tales como el factor de crecimiento de queratinocitos (KGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el ligando kit (KL), los cuales podrían regular el crecimiento epitelial [103]. En cultivos primarios de OSE humano y en líneas celulares de OSE inmortalizadas (IOSE) en donde se encuentra presente el FSHR, la hormona incrementa la proliferación celular a través de la inducción de la secreción de IL-6 y la activación de la vía de señalización STAT-3, así como también la activación de la cascada de señalización MAPK/ERK1,2/ELK1 [104]. Por otro lado, en células IOSE la FSH incrementa la síntesis del ARNm y la proteína del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) a través de la activación de la vía de PI3K/AKT y



**Figura 4.** Vías de transducción de señal activadas por la hormona folículo estimulante (FSH). La FSH se une a su receptor y activa a las proteínas efectoras adenilato ciclasa (AC), fosfolipasa C (PLC) y a la cinasa dependiente de fosfatidilinositol (PI3K), cuyas señalizaciones de manera fisiológica están involucradas en la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa (figuras naranjas). Dichas proteínas efectoras activan río abajo cascadas de señalización que pueden inducir la expresión o regulación a la baja (↓) de diferentes proteínas (recuadros grises), las cuales pueden ser mediadoras de procesos patológicos (recuadros blancos) en la carcinogénesis ovárica.

ERK1, 2 lo que provoca un efecto mitogénico en estas células [105]. Además, se ha visto un efecto sinérgico de la FSH y el EGF sobre la proliferación celular, este efecto es aparentemente a través de señales río arriba de PI3K y ERK que involucran cAMP, PKA y EPAC [106]. Por lo tanto, la FSH puede inducir su efecto mitogénico de forma directa o indirecta al actuar en conjunto con factores de crecimiento en células de IOSE como lo hace normalmente en las células de la granulosa [99].

#### **4.- La FSH y el cáncer de ovario**

Varios estudios han demostrado que la FSH está involucrada en la regulación de procesos relacionados con el desarrollo del cáncer de ovario, entre los cuales se encuentran la proliferación celular, inhibición de la apoptosis, adhesión, migración, invasión, angiogénesis y quimioresistencia (Figura 4) [43, 107].

En cuanto a la proliferación celular inducida por FSH, se ha observado tanto en IOSE como en líneas preneoplásicas y neoplásicas de ovario a través de la activación de la vía de señalización de MAPK (ERK 1,2) y el factor transcripcional Elk 1 [108]. En otras líneas celulares de cáncer de ovario también se ha demostrado la activación de otras vías de transducción de señal que modulan el crecimiento celular, como activación de la PKC $\alpha$  [109], la activación de la vía PKC $\delta$  y ERK1 [110], así como, la vía de PKA a través de IL-6/STAT3 (Figura 4) [44].

En referencia al efecto anti-apoptótico en modelos celulares *in vitro* y modelos murinos *in vivo*, el estímulo de FSH incrementa la expresión de ciclina D1, ciclina E y survivina, moléculas que en conjunto contribuyen a la proliferación celular, además, disminuye la expresión del receptor de muerte 5 (DR5) y de la proteína codificada por el gen de muerte celular programada 6 (PDCD6) lo que reduce la apoptosis, estos efectos son a través de la activación de las vías de

señalización PI3K/AKT y de las cinasas activadas por estrés SAPK/JUN (Figura 4) [111].

Con respecto a la adhesión celular, elevadas concentraciones de FSH podrían facilitar la diseminación del cáncer de ovario por metástasis peritoneales. Se ha visto que esta hormona promueve la adhesión de las células MLS (línea celular derivada de un carcinoma de ovario) en placas de cultivo recubiertas con hialuronano, fibronectina y con un péptido derivado de trombina que contiene una secuencia RGD (arginina-glicina-ácido aspártico). En este estudio se pudo observar que las células incrementaron la expresión de la subunidad  $\alpha(v)$  de integrina, y del receptor de superficie a hialuronano CD44 (Figura 4) [112]. Otros investigadores han demostrado que en estas células la FSH eleva la expresión de manera tiempo y dosis dependiente tanto de la sintetasa de hialuronano como de las enzimas degradadoras como las hialuronidasas 1 y 2. Estos efectos podrían parecer contradictorios pero aparentemente el hialuronano tiene actividad dual en el proceso de adhesión, las células se adhieren en el mesotelio a hialuronano de alto peso molecular. Una vez adheridas, las células usan hialuronidasas para romper el hialuronano en fragmentos de bajo peso molecular que inducen la angiogénesis tumoral y exponen el CD44 para una mejor adhesión. Por otro lado, en un modelo *in vivo*, ratones ovariectomizados en quienes se les indujo la menopausia, se pudo observar que las células MLS implantadas en el peritoneo adquirirían una forma esferoide y se adherían en una mayor cantidad al peritoneo en comparación con los controles, indicando que el cambio en el ambiente hormonal aumenta la habilidad de los esferoides para adherirse, por lo tanto se piensa que la FSH pudiera facilitar este proceso [113].

En cuanto a la capacidad de invasión en varias líneas celulares de cáncer de ovario (BG-1, CaOV-3 y SKOV-3) la FSH promueve este proceso al aumentar su actividad proteolítica por medio de la expresión y activación de las metaloproteasas de matriz MMP-2 y MMP-9, así como la disminución en la secreción de los inhibidores de estas metaloproteasas, TIMP-1 y TIMP-2, este efecto es mediado a través de las vía de transducción de señal PKA y PI3K/AKT

(Figura 4) [114]. Esta última vía también está involucrada en la síntesis y activación de las metaloproteasas al modular la expresión del ARNm y proteína de las ciclooxigenasas 1 y 2 (COX-1 y 2) [115]. Además, las cinasas PKC $\delta$  y ERK1,2 activadas por FSH promueven la migración en las células OVCAR-3 y OV207 (Figura 4) [110].

En referencia a la angiogénesis, tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* se ha observado que la FSH promueve la expresión de VEGF en una manera dosis dependiente. En cultivos *in vitro*, la FSH además de estimular VEGF es capaz de activar la vía de señalización de PI3K/AKT que regula a la alta la expresión de survivina, proteína que a su vez incrementa la expresión de VEGF (Figura 4) [116]. Por otro lado, en experimentos *in vivo* en ratones ovariectomizados la FSH también incrementa la vascularización tumoral [117]. Otro estudio ha mostrado que la estimulación de células de carcinoma ovárico con FSH, aumenta la expresión de VEGF-C, lo cual se pudo comprobar en estudios *in vivo* en ratones ovariectomizados con xenoinjertos de carcinoma de ovario, en los cuales se vio un aumento del factor de crecimiento derivado del epitelio del cristalino (LEDGF/p75) que a su vez se une al promotor de VEGF-C y activa su expresión, incrementando la linfangiogénesis y angiogénesis tumoral [118].

Finalmente en cuanto a quimioresistencia se refiere, la FSH podría estar participando de una manera indirecta en este proceso ya que disminuye significativamente la apoptosis y el arresto celular inducido por cisplatino en las células OVCAR-3, este efecto es mediado por la sobreexpresión de la proteína inhibidora de apoptosis survivina y regulación a la baja de la actividad de caspasas (Figura 4) [119, 120].

## II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La acrogranina juega un papel importante en cáncer de ovario ya que participa en la proliferación celular, transformación maligna y quimioresistencia, sin embargo, poco se sabe acerca de los factores que regulan su expresión o sobre-expresión en este tipo de cáncer. Recientemente observamos que en las líneas celulares de cáncer de ovario NIH-OVCAR-3 y SK-OV-3 la vía de señalización de PKC está implicada en la regulación de su expresión, por lo que en la presente propuesta se pretende responder las siguientes preguntas:

1) Dada la función y la importancia de FSH en cáncer de ovario ¿Es la FSH un factor que participa en la regulación en forma positiva de la expresión de la acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario?.

2) Si la FSH es un factor que regula la expresión de acrogranina ¿La FSH utiliza la vía de señalización de PKC para dicho fin?.

En lo particular, falta mucho por conocer acerca de cuáles son los mecanismos que regulan la expresión de la acrogranina en el cáncer de ovario. El conocimiento de estos mecanismos podría ser de gran utilidad para establecer nuevos blancos terapéuticos y por lo tanto nuevas estrategias de tratamiento en el cáncer de ovario.



### **III. OBJETIVOS**

#### **Objetivo general**

Determinar la regulación que ejerce la FSH en la expresión de la acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario NIH-OVCAR-3 y TOV-21G.

#### **Objetivos particulares**

- a) Determinar el efecto de la FSH sobre la expresión del ARNm de la acrogranina en las líneas celulares NIH-OVCAR-3 y TOV-21G.
- b) Conocer la acción que ejerce la FSH en la síntesis de la proteína acrogranina.
- c) Determinar si dicho efecto es a través de la vía de señalización PKC.

### **IV. HIPÓTESIS**

La expresión de la acrogranina en las líneas celulares de cáncer de ovario NIH-OVCAR-3 y TOV-21G es regulada en forma positiva por la hormona folículo estimulante (FSH).

## **V. MATERIAL Y MÉTODOS**

### **A) Tipo de estudio**

Es un estudio experimental con líneas celulares, prospectivo, longitudinal y comparativo de causa-efecto.

### **B) Variables a considerar en el estudio**

En el presente estudio solo se contemplan dos variables, la variable independiente corresponde a las concentraciones de FSH utilizadas y la variable dependiente que concierne a la expresión de acrogranina (proteína y ARNm).

### **C) Material**

#### **1.- Líneas celulares**

Para la realización de este proyecto se utilizaron las líneas celulares NIH-OVCAR-3 y TOV-21G, ambas líneas fueron obtenidas de The American Type Culture Collection (ATCC, EUA). La línea celular NIH-OVCAR-3 proviene de ascitis de una paciente con adenocarcinoma ovárico, está constituida por células con cariotipo anormal por aneuploidía, son resistentes a medicamentos utilizados en quimioterapia como la adriamicina, melfalán y cisplatino. Estas células crecen en multicapas apiladas verticalmente y son capaces de formar colonias en agar semisólido, el tiempo de duplicación es de 2 días. Por otra parte, la línea celular TOV-21G proviene de un carcinoma de células claras. Estas células crecen en monocapas y presentan una trisomía del cromosoma 10. Su tiempo de duplicación es de 1.5 días y pueden crecer en agar semisólido, además son sensibles a radiaciones y al paclitaxel.

#### **2.- Hormona folículo estimulante humana recombinante (r-hFSH)**

Para el estímulo de las células se usó la r-hFSH comercialmente conocida como Gonal-f® y producida por Merk-Serono S.p.A. (Bari, Italia). Esta preparación comercial es producida en células de ovario de hámster chino (CHO) modificadas

por ingeniería genética. La presentación comercial es de 5.5 µg equivalentes a 75 UI. Las concentraciones utilizadas en este proyecto estuvieron en el rango de 10 a 1000 ng/mL y estuvieron basadas en la literatura [108, 114].

### **3.- Calfostin C**

Para inhibir la vía de transducción de señal de PKC, se utilizó el Calfostin C (Calbiochem, EMD Millipore, EUA) el cual es un inhibidor general de las cinasas de la familia de la proteína cinasa C, es un compuesto que compite por el dominio regulatorio de estas proteínas. La dosis efectiva al 50% (ED<sub>50</sub>) es de 50 nM. Las dosis utilizadas en el presente proyecto fueron de 600 y 1200 nM previamente valoradas en nuestro laboratorio [90].

## **D) Métodos**

### **1.- Cultivo celular**

Las células NIH-OVCAR-3 fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 y las células TOV-21G en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies, EUA), ambos medios fueron suplementados con 5% de suero fetal bovino (SFB) y conteniendo 1 mM de piruvato de sodio y una solución de antibiótico/antimicótico equivalente a 100 U/mL de penicilina G, 100 µg/mL de estreptomina y 0.25 µg/mL de amfotericina B (Life Technologies, EUA). Las células se cultivaron en una atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C y se mantuvieron en botellas de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Inc., EUA). Los pases de las células se realizaron con tripsina al 0.25% p/v y 1 mM de EDTA·4Na en solución salina de Hank al 0.85% (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

## **2.- Ensayos celulares y tratamiento con r-hFSH.**

Para los ensayos celulares con el estímulo de la r-FSH, las células fueron sembradas en placas de 12 pozos (Corning Inc., EUA) en cantidad de  $2 \times 10^5$  células/pozo. Después de 24 h las células fueron lavadas con buffer salino de fosfatos (PBS) (Life Technologies, EUA) con pH 7.4 y los medios fueron remplazados por medio sin SFB y sin rojo fenol, dejándolas en ayuno 24 h. Después de este período de ayuno, se adicionó la r-hFSH en concentraciones de 10, 100 y 1000 ng/mL para las células NIH/OVCAR-3 y de 10, 100 y 500 ng/mL para las células TOV-21G. Estas concentraciones están basadas en la literatura y de acuerdo a la respuesta de las células. El periodo de incubación con r-hFSH fue de 24, 48 y 72 h. En cada uno de los experimentos, los controles fueron células en medio sin SFB, sin rojo fenol y en ausencia de r-hFSH.

## **3.- Ensayos celulares y tratamiento con Calfostin C**

Para estos ensayos se utilizaron solamente las células TOV-21G, las cuales fueron sembradas en placas de 12 pozos (Corning Inc., EUA) en cantidad de  $2 \times 10^5$  células/pozo. Después de 24 h los medios fueron remplazados con DMEM sin rojo fenol, con SFB (5%) y con Calfostin C (600 y 1200 nM) por un periodo de 24 h. Posterior a este periodo de incubación, a los pozos con 1200 nM de Calfostin C se les adicionó la r-hFSH a concentración de 500 ng/mL en ausencia de SFB y la incubación se prolongó 24 h más.

## **4.- Cuantificación de proteínas**

Una vez concluidos los cultivos celulares, las células fueron lisadas con buffer de lisis con un pH de 7.4, conteniendo 50 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1.5 mM  $MgCl_2$ , 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 10% glicerol, además de una mezcla de inhibidores de proteasas Complete-Mini-free EDTA, (Roche Applied Science, EUA). El lisado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 10 min a 4°C. Una vez obtenido el sobrenadante, las proteínas totales fueron cuantificadas utilizando el método de ácido bicinconínico (BCA) [Protein assay Kit, (Thermo Fisher Scientific,

EUA)]. En resumen, este método se basa en la combinación de la reacción de biuret en la cual en un medio alcalino se produce una reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  por las proteínas presentes y la detección colorimétrica del ion  $\text{Cu}^{1+}$  por el BCA da lugar a la formación de un color púrpura cuya intensidad es proporcional a la concentración de proteínas totales y es medida espectrofotométricamente. Una vez cuantificadas las muestras, éstas fueron guardadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su futuro análisis por Western blot.

### **5.- Técnica de Western blot**

La inmunodetección se realizó como ha sido descrito previamente por Díaz-Cueto y colaboradores [61]. Diez  $\mu\text{g}$  de proteínas totales fueron separadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y posteriormente se transfirieron a una membrana de PVDF (GE Healthcare, EUA). Una vez transferidas las proteínas, la membrana fue bloqueada 1 h a temperatura ambiente con buffer salino-tris (TBS) conteniendo 0.1% de Tween-20 (TBST) y 5% de leche. Posteriormente las membranas fueron incubadas toda la noche a una temperatura de  $4^{\circ}\text{C}$  con los anticuerpos específicos para detectar acrogranina, receptor de FSH,  $\beta$ -actina y VEGF en forma independiente. Los anticuerpos se diluyeron en TBST más 5% de leche, cuyas diluciones y fuentes de obtención se muestran en la Tabla 3. Posterior a esto, la membrana fue lavada con TBST y se añadió un segundo anticuerpo, una IgG anti-conejo para la detección de acrogranina y el receptor de FSH o una IgG anti-ratón para la detección de  $\beta$ -actina y VEGF, ambas conjugadas con peroxidasa (Jackson ImmunoResearch, EUA) a una dilución de 1:10,000, incubando por 90 min a temperatura ambiente. Finalmente la membrana fue sometida a varios lavados con TBST y las proteínas fueron detectadas por medio del estuche de quimioluminiscencia [SuperSignal West Femto Substrate (Thermo Fisher Scientific, EUA)] sobre placas radiográficas. Finalmente se realizó el análisis densitométrico de las bandas obtenidas.

**Tabla 3.** Anticuerpos primarios utilizados para la técnica de Western blot.

Proteína	Marca o Donación	Tipo	Dilución
Acrogranina	Dr. George Gerton Universidad de Pensilvania, EUA	Policlonal	1:2000
Receptor de FSH	Abcam (Abcam plc., Reino Unido)	Policlonal	1: 500
Actina	Dr. José Manuel Hernández H. CINVESTAV, México	Monoclonal	1:2000
VEGF	Upstate (EMD Millipore, EUA)	Monoclonal	1:500

## 6.- Extracción del ARNm

Para la obtención del ARNm se utilizó el reactivo TRIzol (Life Technologies, EUA) siguiendo la técnica descrita por el fabricante. Esta técnica se basa en el método de isotiocianato de guanidina y fenol. Brevemente, las células fueron homogeneizadas en 500  $\mu$ L del TRIzol, se separó el ARN total de los demás componentes celulares con cloroformo, precipitaciones subsecuentes con isopropanol y etanol permitieron el aislamiento del ARN total. Finalmente el ARN total fue cuantificado por espectrofotometría a 260 y 280 nm, determinando también su pureza.

## 7.- Transcripción reversa (RT)

Previo a la generación del ADN complementario (ADNc), 1  $\mu$ g de ARN total fue tratado con DNasa I (Promega Corp., EUA), enzima que permite la eliminación de DNA contaminante. Posteriormente el ADNc se generó usando la SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Life Technologies, EUA). La mezcla de reacción para realizar la transcripción reversa consistió de 10 mM de dNTPs (Promega Corp., EUA), 0.5  $\mu$ g del cebador Oligo(dT)<sub>15</sub> (Promega Corp., EUA), 0.1 M de Ditiotretol (DTT) (Life Technologies, EUA), 40 U de Inhibidor de ribonucleasas RNase OUT (Life Technologies, EUA) y 200 U de la enzima

SuperScript II RNase H-Reverse Transcriptase (Life Technologies, EUA ). La mezcla de reacción fue incubada a 42°C por 50 min y 70°C por 15 min en un termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf AG, Alemania). El ADNc obtenido fue diluido en H<sub>2</sub>O-DEPC (1 µg de ADNc en 200 µL de volumen) y se procedió a la realización de la reacción en cadena de la polimerasa.

### **8.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final**

Para la determinación de la expresión del ARNm de acrogranina, del receptor de FSH y de β-actina se empleó la técnica de PCR. En la Tabla 4, se muestran los oligonucleótidos de los ARNs estudiados. Para la reacción de la PCR se utilizó Platinum PCR Supermix (Life Technologies, EUA), 300 nM (1 µL) de cada uno de los oligonucleótidos y 10 µL del ADNc generado previamente en un volumen final de 50 µL. La amplificación se realizó utilizando el termociclador MasterCycler gradient (Eppendorf AG, Alemania) bajo las siguientes condiciones: para acrogranina y β-actina; un ciclo inicial de 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 30 seg y 60°C por 1 min. Para FSHR las condiciones fueron: un ciclo inicial de 95°C por 5 min, seguido por 40 ciclos a 95°C por 1 min, 50°C por 1 min y 72°C por 1 min. Finalmente, los fragmentos de 174, 244 y 99 pares de bases correspondientes a acrogranina, FSHR y β-actina respectivamente, fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% p/v. En todos los casos se incluyó agua estéril como control negativo.

**Tabla 4.** Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los diferentes ARNs mensajeros.

ARN	Oligonucleótidos
Acrogranina	5'-CGGGCATTGGAAGTACTGATC-3' 5'-GTCTCAGGGACTTCCAGTTGCT-3'
Receptor de FSH	5'-GCGGAACCCCAACATCGTGTC-3' 5'-TGAAGAAATCTCTGCGAAAGT-3'
$\beta$ -actina	5'-TCTAGACTTCGAGCAGGAGATGG-3' 5'-TCGTTGCCAATAGTGATGACTTG-3'

## 9.- Ensayo de citotoxicidad

Para determinar la toxicidad celular provocada por la r-hFSH y el inhibidor de PKC se utilizó el estuche CytoTox 96 Non-Radioactive (Promega Corp., EUA). Esta técnica se basa en la detección de la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) liberada al medio de cultivo por células lisadas y la conversión de la sal de tetrazolio INT (color salmón) hacia formazán (rojo), lo que permite la determinación de la proporción de células muertas. Para este ensayo, se cultivaron  $2 \times 10^4$  células/pozo en placas de 96 pozos (Corning Inc., EUA) en 100  $\mu$ L de medio, a las cuales se les adicionó r-hFSH o Calfostin C de igual manera que se describe en la sección ensayos celulares y tratamiento con r-hFSH o con Calfostin C. Una vez concluidos los cultivos, la mitad de los medios (50  $\mu$ L) fue separada y transferida a pozos limpios, posteriormente, las células fueron lisadas agregando 5  $\mu$ L de una solución de lisis 10X (9% v/v de Tritón X-100) e incubadas por 45 min. Transcurrido este tiempo, tanto a los pozos con las células lisadas como a los pozos que contenían únicamente medio, se les adicionaron 50  $\mu$ L de la solución sustrato que al reaccionar con el medio de cultivo produjo un cambio de coloración, una vez percibido éste cambio de color, a cada pozo se les adicionó 50  $\mu$ L de una solución de ácido acético 1M para detener la reacción. Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm.



## **10.- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)**

Los medios condiciones obtenidos de los cultivos de las células TOV-21G a las 24, 48 y 72 h de estímulo con r-hFSH fueron utilizados para la determinación cuantitativa de acrogranina por medio de la técnica de ELISA tipo sándwich. Esta técnica se basa en el reconocimiento de la acrogranina por anticuerpos policlonales específicos fijados en los pozos y anticuerpos unidos a la enzima biotina. Para esto se utilizó el estuche de ELISA [Progranulin Human (AdipoGen, Corp, EUA)], en donde, 100  $\mu$ L de medio condicionado previamente diluidos (1:25) fueron colocados en cada uno de los pozos, incubándose esta reacción por 1 h a 37°C. Transcurrido este período, cada uno de los pozos fueron lavados tres veces con 300  $\mu$ L de PBS conteniendo 0.05% de Tween 20. Una vez hechos los lavados, a cada uno de los pozos se les agregó 100  $\mu$ L del anticuerpo de detección específico para progranulina acoplado a biotina, incubando por un periodo de 1 h a 37°C. Posteriormente, los pozos fueron lavados 3 veces y una vez concluidos se adicionaron 100  $\mu$ L del conjugado estreptavidina-peroxidasa con un periodo de incubación de 1 h a 37°C. Nuevamente se lavaron los pozos y el desarrollo del color se realizó incubando las placas en oscuridad con 100  $\mu$ L del substrato 3,3', 5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB) a temperatura ambiente por 10 min y finalmente se adicionaron 100  $\mu$ L de ácido fosfórico 1 M para detener la reacción. La intensidad del color fue directamente proporcional a la concentración de acrogranina en las muestras, la intensidad del color de la reacción se midió por espectrofotometría a una absorbancia de 450 nm.

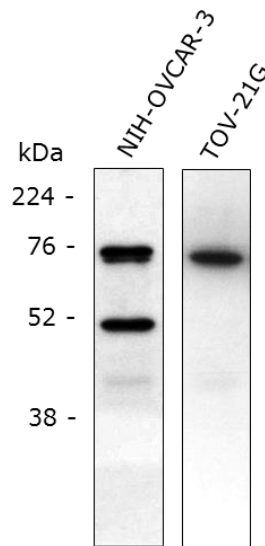
## **12.- Análisis estadístico de los datos**

Las diferentes bandas de acrogranina y actina (utilizada como control interno) fueron analizadas por densitometría utilizando un programa NIH ImageJ, con la finalidad de obtener un valor semicuantitativo. El mismo procedimiento fue realizado para las bandas del ARNm obtenidas en las fotografías de los geles de agarosa. Para valorar si existían diferencias estadísticamente significativas tanto para el ARNm como para la proteína de acrogranina, se realizó el análisis estadístico con los datos de 4 experimentos 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

### Detección de la proteína acrogranina en las líneas celulares NIH-OVCAR-3 y TOV-21G.

En los extractos celulares de ambas líneas de cáncer de ovario se detectó la acrogranina. En la línea celular NIH-OVCAR-3 esta proteína fue detectada como dos bandas, una de ellas con un peso molecular de 68 kDa y la otra con un peso molecular de aproximadamente 50 kDa, sin embargo, en las células TOV-21G solo se detectó una banda correspondiente a 68 kDa (Figura 5).

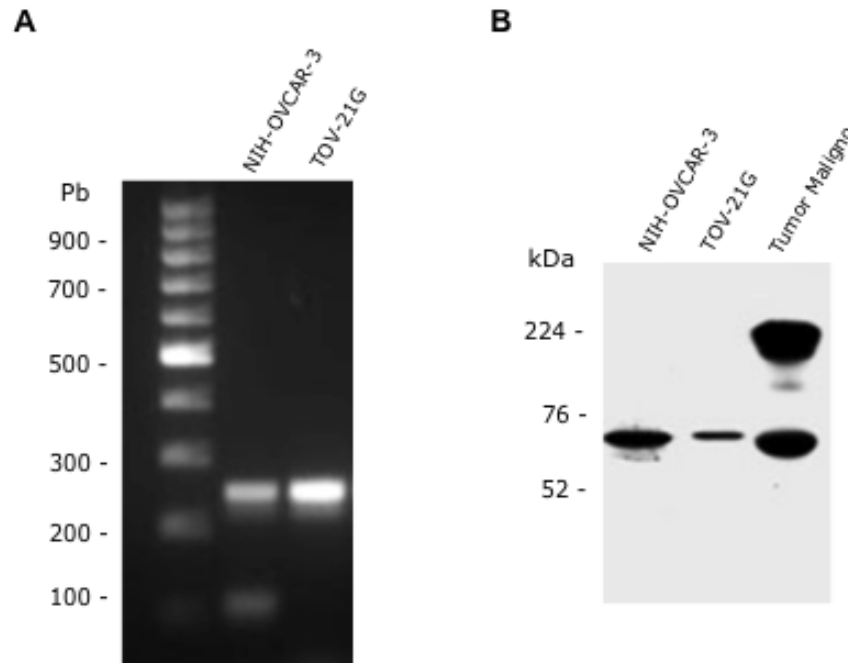


**Figura 5.** Detección de la proteína acrogranina mediante la técnica de Western blot en los extractos celulares de las dos líneas de cáncer de ovario. En las células NIH-OVCAR-3 la acrogranina se detectó como dos bandas, una de 68 kDa y la otra de aproximadamente 50 kDa, sin embargo en las células TOV-21-G se detectó como una sola banda de 68 kDa.

### Presencia del ARNm y de la proteína del receptor de FSH (FSHR) en las líneas celulares de cáncer de ovario

En ambas líneas celulares de cáncer de ovario NIH-OVCAR-3 y TOV-21-G el ARNm y la proteína del FSHR están presentes. En los geles de agarosa el ARNm se identificó por medio de una banda de aproximadamente 244 pares de

bases (Pb) (Figura 6A). Por otra parte, la proteína fue visualizada en ambas líneas celulares como una banda menor de 76 kDa utilizando el anticuerpo policlonal (Abcam) (Figura 6B), sin embargo, la muestra de tumor maligno de ovario usada como control mostró una segunda banda por debajo de 200 kDa.



**Figura 6.** Presencia del receptor de FSH (FSHR) en las líneas celulares de cáncer de ovario NIH-OVCAR-3 y TOV-21G. **A.** El ARNm del FSHR se detectó como una banda de ~244 pares de bases (Pb) en ambas líneas celulares. **B.** En las dos líneas celulares, la proteína del FSHR se visualizó como una banda menor de 76 kDa, sin embargo, en el tumor maligno de ovario utilizado como control se detectó una banda extra, superior a 76 kDa.

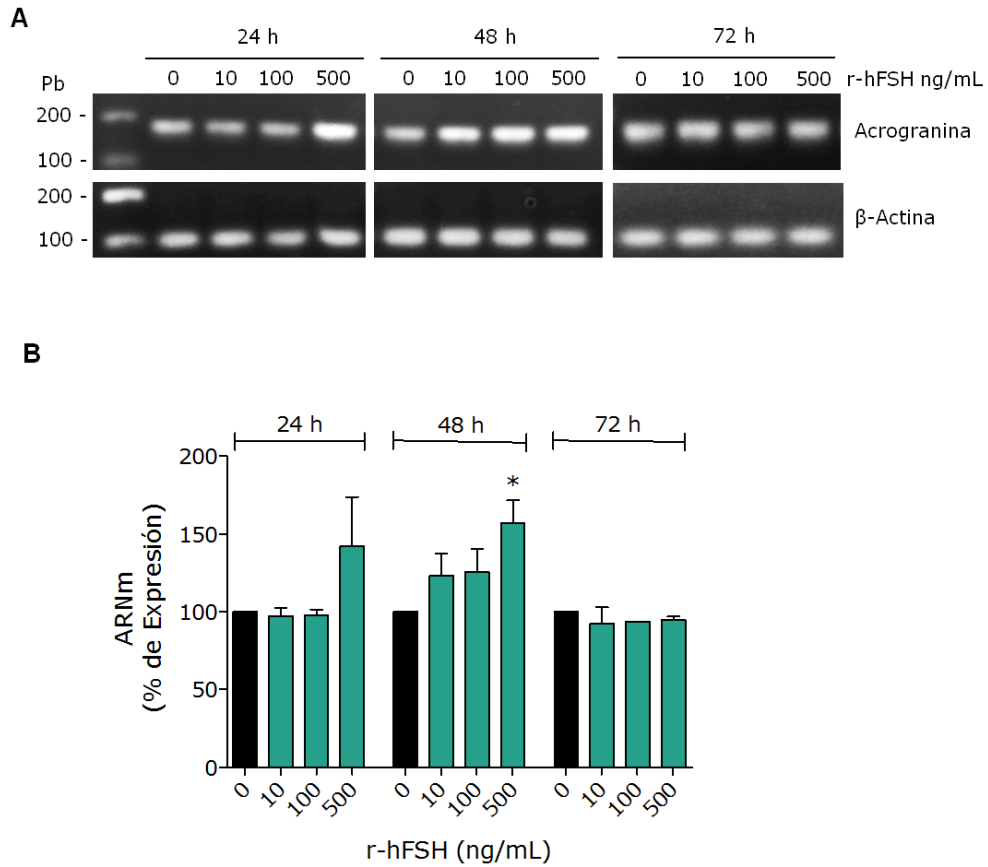
### **El tratamiento con r-hFSH incrementó tanto el ARNm como la proteína de acrogranina en las células TOV-21G pero no en las NIH-OVCAR-3**

La r-hFSH fue utilizada para investigar si esta hormona es capaz de producir una regulación en la expresión de acrogranina. Después de analizar los niveles del ARNm de 4 experimentos en las células TOV-21G, encontramos que a las 48 h con el estímulo de r-hFSH y con la dosis de 500 ng/mL se presentó un

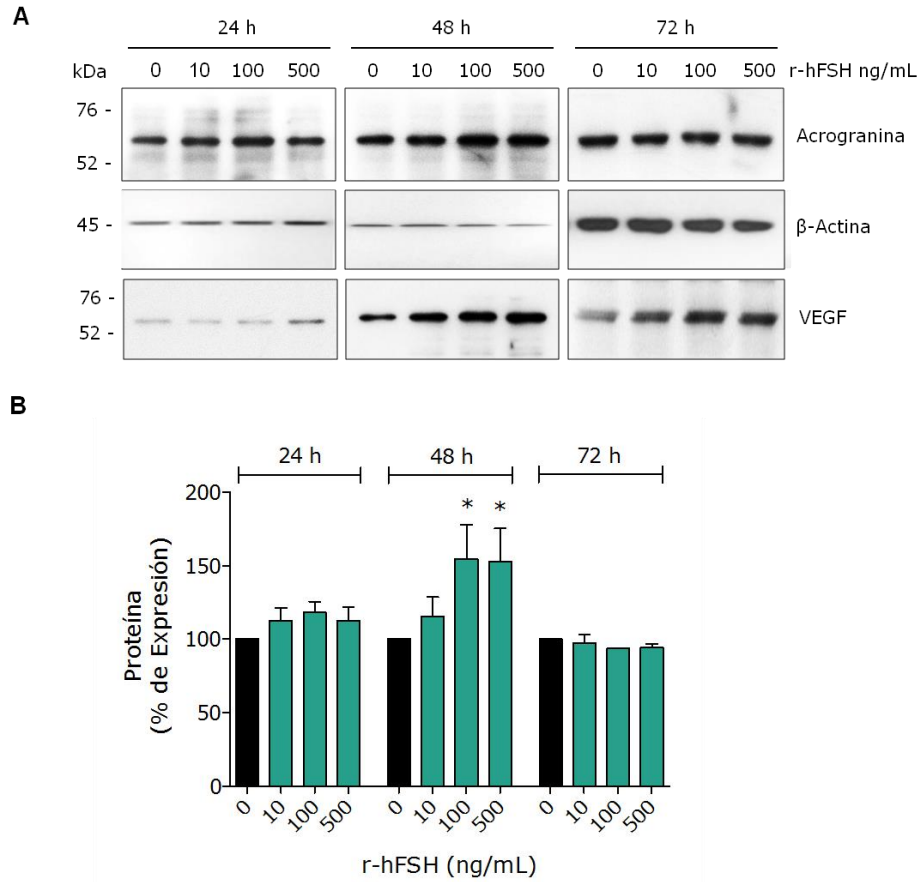
aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el ARNm ( $157.1\% \pm 14.5\%$ ) con respecto al control (100%) el cual consistió de medio en ausencia de r-hFSH. A las 24 y 72 h de estímulo no se observaron aumentos significativos en la producción del ARNm con las diferentes dosis de r-hFSH (Figura 7 A y B).

En forma similar a la expresión del ARNm en las células TOV-21G, a las 48 h de estímulo con la r-hFSH la proteína acrogranina también mostró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) con las concentraciones de 100 ng/mL ( $154.8\% \pm 23.2\%$ ) y 500 ng/mL ( $152.8\% \pm 22.7\%$ ) con respecto al control (100%) (Figura 8 A y B). Además, al igual que con el ARNm no se observaron aumentos significativos en la síntesis de la proteína a las 24 y 72 h de estímulo con las diferentes dosis de r-hFSH (Figura 8B). Datos en la literatura demuestran que FSH es capaz de estimular la producción de VEGF en líneas celulares de cáncer de ovario [116, 121] proteína que utilizamos como un control positivo para la validación de los resultados de los ensayos celulares (Figura 8A).

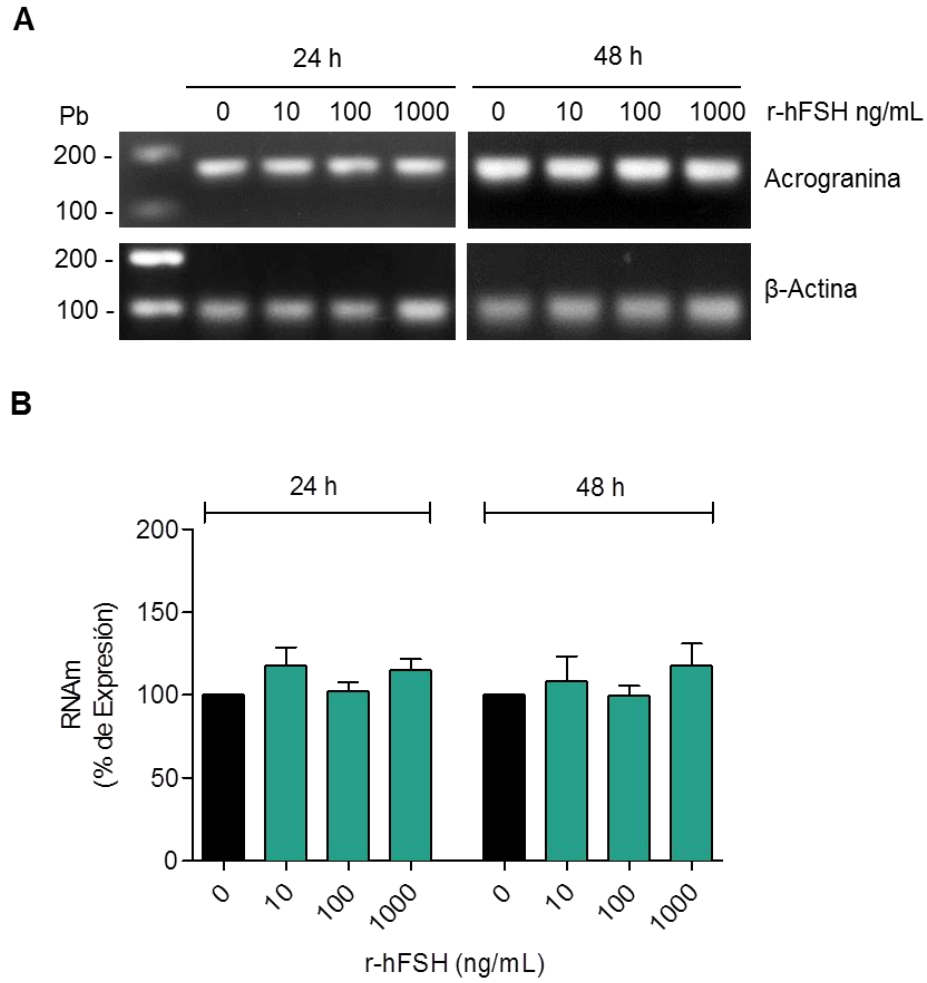
En las células NIH-OVCAR-3 no se observó ningún aumento en la expresión del ARNm de la acrogranina (Figura 9) ni de su proteína (Figura 10) con las diferentes concentraciones de r-hFSH ni en los diferentes tiempos de incubación estudiados. Es importante remarcar que en esta línea celular la concentración más alta de r-hFSH utilizada fue de 1000 ng/mL, lo doble de la concentración utilizada en las células TOV-21G. En esta línea celular, FSH también estimuló la síntesis de VEGF en forma constante en cada uno de los experimentos analizados ( $n=4$ ), lo que demuestra la funcionalidad del receptor de FSH y ciertas propiedades de la FSH en cada una de las líneas celulares estudiadas.



**Figura 7.** La r-hFSH incrementó el ARNm de acrogranina en la línea celular TOV-21G. **A.** Los geles representativos del RT-PCR muestran la expresión del transcrito de acrogranina (~174 Pb) después del estímulo con r-hFSH. Como control se usó el ARNm de β-actina (~99 Pb). **B.** El análisis densitométrico de las bandas detectadas en los geles de agarosa demostró que a las 48 h de estímulo con 500 ng/mL de r-hFSH hubo un incremento significativo (\*P<0.05) en la expresión del ARNm de acrogranina.

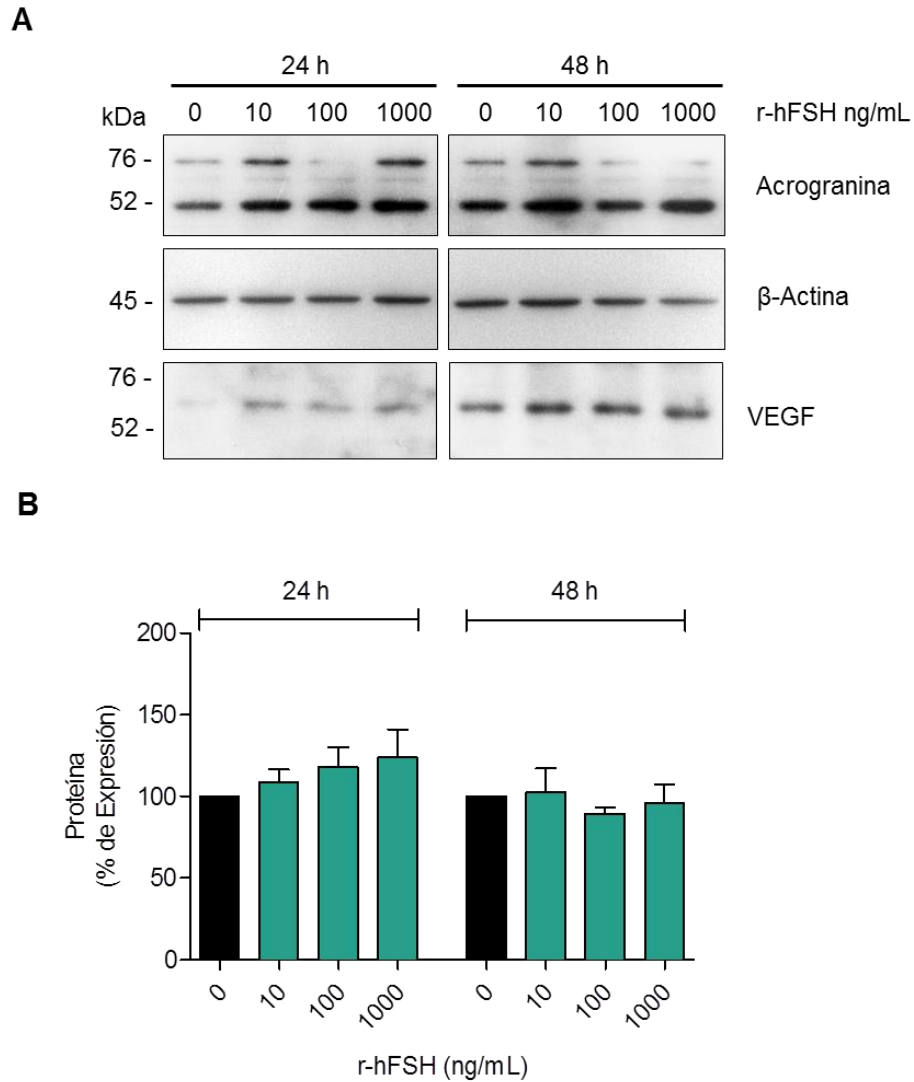


**Figura 8.** La r-hFSH incrementó la síntesis de la proteína acrogranina en la línea celular TOV-21G. **A.** Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó a la  $\beta$ -Actina y VEGF como control positivo para estímulo de la r-hFSH. **B.** Representación gráfica del análisis de cuatro experimentos en donde se observa un aumento significativo ( $*P < 0.05$ ) con respecto al control en la expresión de acrogranina a las 48 h con las dosis de 100 y 500 ng/mL de r-hFSH. No se observó ningún aumento de proteína ni a las 24 h ni a las 72 h.



**Figura 9.** La r-hFSH no aumentó el ARNm de acrogranina en las células NIH-OVCAR-3. **A.** Figura representativa de geles de agarosa de cuatro experimentos en donde se muestra la expresión del transcrito de acrogranina (~174 Pb) después del estímulo con r-hFSH. Como control de carga se utilizó el ARNm de la  $\beta$ -actina. **B.** La representación gráfica del análisis densitométrico de las bandas detectadas en los geles de agarosa en donde se muestra que no hubo aumentos significativos en la expresión del ARNm de la acrogranina con las diferentes concentraciones de r-hFSH ni en los diferentes periodos de incubación.

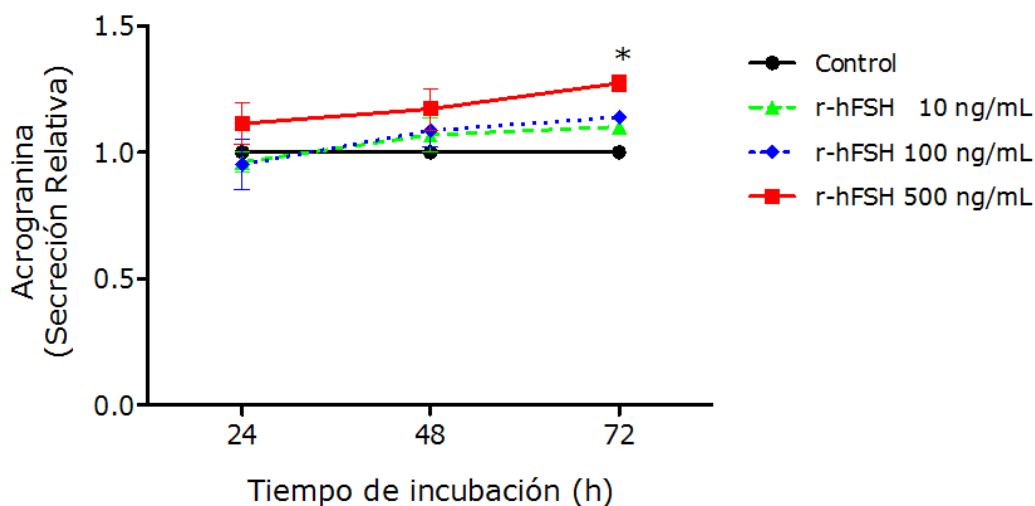




**Figura 10.** La r-hFSH no incrementó la síntesis de la proteína acrogranina en las células NIH-OVCAR-3. **A.** Western blot representativo de cuatro experimentos independientes. Como control de carga se detectó la  $\beta$ -actina y VEGF como control positivo al estímulo de r-hFSH. **B.** Representación gráfica del análisis de cuatro experimentos en donde no se observa ningún aumento significativo en la expresión de acrogranina ni a las 24 ni a las 48 h de estímulo con r-hFSH.

## Aumento de la secreción de acrogranina hacia el medio por el tratamiento con r-hFSH en las células TOV-21G.

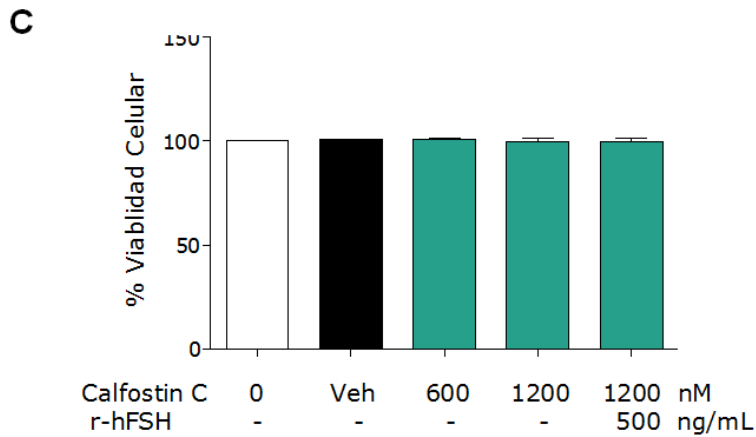
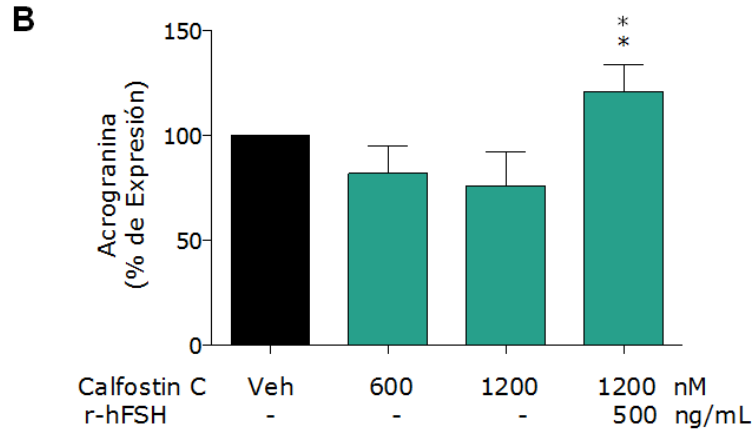
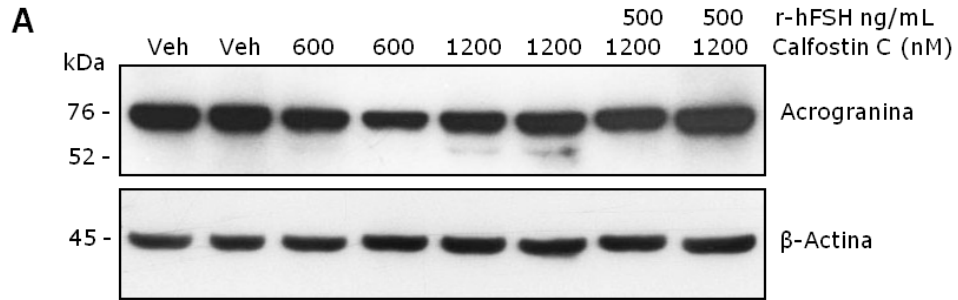
La acrogranina es considerada un factor autocrino y paracrino [122], razón por la cual evaluamos su secreción hacia el medio por las células TOV-21G cultivadas en presencia de las diferentes concentraciones de r-hFSH y en los diferentes periodos de incubación. Una vez realizados los ensayos, se cuantificó la acrogranina por la técnica de ELISA en los medios condicionados de 4 experimentos. Los resultados expresados como concentración relativa mostraron que las 3 concentraciones (10, 100 y 500 ng/mL) de r-hFSH aumentaron discretamente la secreción de la acrogranina al medio, pero fue con la concentración de 500 ng/mL con la cual este aumento fue gradual a través del tiempo de incubación, observando el mayor incremento a las 72 h en forma significativa con respecto al control (medio en ausencia de r-hFSH) (Figura 11).



**Figura 11.** Secreción relativa de la proteína acrogranina en el medio de cultivo. La acrogranina fue cuantificada por la técnica de ELISA en los medios condicionados de 4 experimentos. Los resultados mostraron que las 3 concentraciones (10, 100 y 500 ng/mL) de r-hFSH aumentaron discretamente la secreción de la acrogranina al medio, sin embargo, con la concentración de 500 ng/mL el aumento fue gradual a través del tiempo de incubación con un mayor incremento a las 72 h en forma significativa (\* $p < 0.05$ ) con respecto al control.

## **Efecto sobre la síntesis de la acrogranina por la inhibición de la vía de PKC con Calfostin C y la estimulación de la vía por la r-hFSH**

Posteriormente al haber observado el aumento en la síntesis de la proteína y del ARNm de la acrogranina por la r-hFSH en las células TOV-21G, se decidió determinar si dicho efecto era a través de la vía de señalización de PKC. Para esto, inicialmente fue utilizado un inhibidor general de la vía de PKC el Calfostin C en dosis de 600 y 1200 nM, dosis con las cuales previamente observamos una disminución en la expresión de la acrogranina en líneas celulares de cáncer de ovario [90]. Una vez incubadas las células por 24 h con el Calfostin C, se les adicionó la r-hFSH (500 ng/mL) por un periodo de incubación de 24 h más. Después de un periodo de incubación total de 48 h, los resultados del análisis de 3 experimentos mostraron que la expresión de la acrogranina disminuyó al ser inhibida la vía de PKC, pero que al adicionar la r-hFSH, su expresión aumentó hasta casi un 50% a partir de la inhibición con Calfostin C (1200 nM) y de un 20% a partir de la producción basal (Figura 12 A y B). Las concentraciones de Calfostin C y de r-hFSH utilizadas en este estudio no afectaron la viabilidad celular, la cual fue determinada por el ensayo Cytotox 96 (Figura 12 C).



**Figura 12.** Producción de la proteína acrogranina en las células TOV-21G en respuesta a la inhibición de la vía de PKC con Calfostin C y a una estimulación con r-hFSH. **A.** Western blot representativo de tres experimentos independientes. Como control de carga se detectó a la  $\beta$ -actina. **B.** Representación gráfica del análisis de los tres experimentos en donde se observa una disminución en la expresión de acrogranina con las dos dosis de Calfostin C (600 y 1200 nM) durante 24 h y una recuperación en forma significativa de su expresión al adicionar 500 ng/mL de r-hFSH por 24 h más. El aumento en la expresión fue de un 20% a partir del control (vehículo) y de un 50% a partir de la inhibición con Calfostin C (1200 nM). **C.** La viabilidad celular no fue modificada por las altas concentraciones de Calfostin c.

## VII. DISCUSIÓN

La acrogranina es un factor de crecimiento con múltiples funciones en varios tejidos y órganos [122]. Esta proteína está presente en cáncer de ovario, por lo que se ha sugerido que participa en su desarrollo y progresión. Una mayor expresión del ARNm y de la proteína acrogranina se ha observado en los carcinomas epiteliales de ovario en comparación con tumores de bajo potencial maligno, tumores benignos de ovario y tejidos ováricos normales [82, 86, 87]. Su sobre-expresión promueve la proliferación celular [82, 123], el crecimiento independiente de la adhesión celular [86], la capacidad de migración e invasión [85, 123], así como, la capacidad tumorigénica tanto de líneas celulares de cáncer de ovario como de células IOSE fenotípicamente normales [85, 86]. La sobre-expresión de acrogranina también se ha asociado con una mayor supervivencia celular y un fenotipo quimiorresistente [84, 85], así como, con una menor supervivencia de las pacientes [83, 87].

Es poco lo que se sabe acerca de los mecanismos o proteínas que regulan la expresión de la acrogranina y hasta el momento son tres los factores que se han asociado con la regulación de su expresión en diferentes tipos de cáncer. Uno de ellos es el  $17\beta$ -estradiol, el cual es capaz de regular la expresión a la alta tanto del ARNm como de la proteína en una línea celular de cáncer de mama [81]. Los otros dos factores son la endotelina 1 (ET-1) y el ácido lisofosfatídico (LPA), ambos modulan la expresión de la acrogranina en forma positiva a través de la vía de señalización cAMP/EPAC/ERK1,2 en células de cáncer de ovario [84]. Por otro lado, la vía de transducción de señal de PKC también está asociada a la regulación de esta proteína a nivel post-traducciona, ya que solo aumenta la síntesis de la proteína, pero no de su ARNm, esto también en líneas celulares de cáncer de ovario (NIH-OVCAR y SK-OV-3). Esta regulación por PKC fue documentada en nuestro laboratorio y no ha sido valorada en otros sistemas [90]. Dada la importancia de la acrogranina en cáncer de ovario y a los pocos datos que existen en cuanto a su regulación, en la presente tesis tratamos de identificar si la FSH es capaz de producir cambios a la alta en la síntesis de esta proteína en

líneas celulares de cáncer de ovario, seleccionando a la FSH como blanco de estudio por su participación y vías de transducción de señal que activa en este tipo de cáncer [107].

Nuestros resultados mostraron que la r-hFSH es capaz de regular la síntesis de la acrogranina tanto de su ARNm como de la proteína en las células TOV-21G pero no en las células NIH-OVCAR-3. En las células TOV-21G la dosis máxima de r-hFSH utilizada y con la que se logró visualizar el efecto a las 48 h de incubación fue de 500 ng/mL, sin embargo y a pesar de que en las células NIH-OVCAR-3 la dosis máxima de r-hFSH fue 1000 ng/mL (doble de la dosis que en las células TOV-21G) no se observó incremento alguno de la proteína ni de su ARNm en ninguno de los tiempos de incubación analizados.

Además, en las células TOV-21G con la dosis máxima utilizada de r-hFSH también se pudo observar a las 72 h de incubación un aumento en la acrogranina secretada al medio de cultivo, es decir, la secreción al medio fue mayor después de haber observado el incremento en su síntesis.

La FSH ha sido asociada al cáncer de ovario principalmente por estudios epidemiológicos en donde muestran un aumento en la prevalencia y en la agresividad de este tipo de cáncer en pacientes menopaúsicas y post-menopaúsicas las cuales presentan altas concentraciones de esta gonadotropina. También, estudios *in vitro* han demostrado que la FSH juega un papel importante en este tipo de cáncer sobre todo en proliferación celular, inhibición de la apoptosis, adhesión, migración, invasión, angiogénesis y quimioresistencia [43, 107], a través de la regulación de la expresión de diversas proteínas implicadas en estos procesos, como VEGF, donde la FSH es capaz de incrementar su expresión, contribuyendo de esta manera con el potencial angiogénico que tienen los tumores malignos de ovario, lo cual facilita su crecimiento y su recurrencia [121]. Por otra parte, la FSH también es capaz de incrementar la síntesis de proteínas como ciclina D1, ciclina E y survivina, moléculas que en conjunto participan en la proliferación celular, evento que se ve apoyado con la reducción

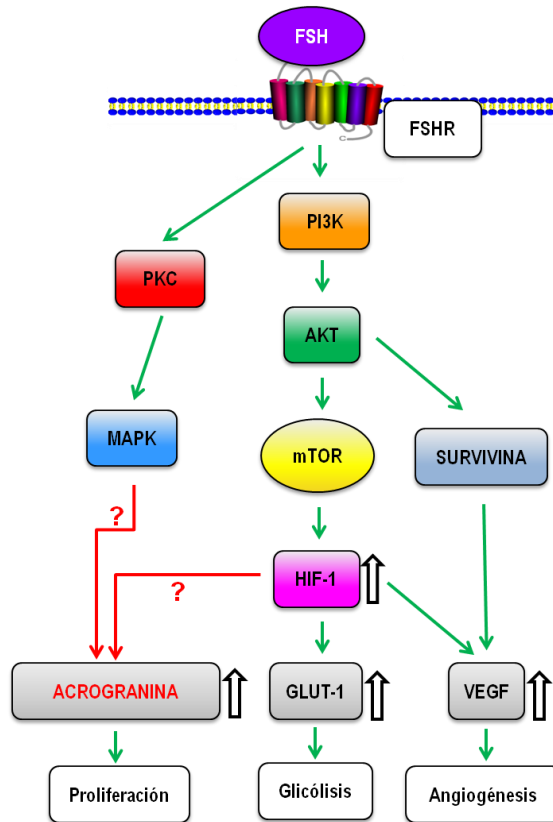
de la apoptosis que se presenta al disminuir la expresión del receptor de muerte 5 (DR5) y de la proteína codificada por el gen de muerte celular programada 6 (PDCD6) por la FSH [111]. De igual manera que con estas proteínas, el aumento de la acrogranina inducido por el estímulo de FSH en las células TOV-21G, pudiera contribuir en los procesos de proliferación, progresión maligna y resistencia de las células a la quimioterapia, eventos en los cuales ya se ha documentado la participación de esta proteína [82, 84, 85].

La diferencia observada en la respuesta al estímulo de FSH por las líneas celulares de cáncer de ovario estudiadas pudiera estar asociada con el origen de las mismas. Es bien sabido que las células establecidas de diferente origen tienen distinto fenotipo y distinto perfil de expresión génica, aunque ambas provienen de un cáncer de ovario, las células TOV-21G son derivadas de un carcinoma de células claras y las NIH-OVCAR-3 de un adenocarcinoma seroso. Llama la atención la respuesta negativa de las células NIH-OVCAR-3 en términos de la expresión de la acrogranina al estímulo de FSH, sin embargo, resultados similares se obtuvieron con las células SK-OV-3 (datos no mostrados en esta tesis) las cuales también derivan de un adenocarcinoma seroso de ovario. De acuerdo con estos datos, la regulación en la expresión de acrogranina a nivel post-traducciona l y post-transcripcional por la FSH en las células TOV-21G, pudiera ser selectivo de esta línea celular, ya que tanto en estas células como en las NIH-OVCAR-3 se documentó la funcionalidad del receptor de FSH en base al aumento en la expresión de la proteína VEGF observado en ambas líneas celulares. La expresión del receptor de FSH en estas líneas celulares ya ha sido descrita previamente [108, 124], pero fue corroborada con el anticuerpo seleccionado por nosotros (Figura 6).

El aumento de la acrogranina en las células TOV-21G tanto intracelular (Figura 8) como la secretada al medio (Figura 11) producidos por el estímulo de la FSH, pudiera estar en relación con la activación de la vía de transducción de señal PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 que se ha descrito en la línea celular ES-2 también derivada de un carcinoma ovárico de células claras (Figura 13) [111]. En estas

células, la FSH incrementa la producción de HIF-1 alfa a través de la activación de PI3K/AKT/mTOR, que a su vez produce el aumento de VEGF. Esta misma vía puede ser activada por la hipoxia celular teniendo como eventos finales un aumento de HIF-1 alfa, lo que incrementa la expresión de VEGF y del transportador de glucosa 1 (GLUT-1) [125-127] (Figura 13). Ya se ha descrito que la hipoxia es un factor que puede incrementar la expresión de la acrogranina tanto en fibroblastos como en líneas celulares de neuroblastoma que fueron expuestas a hipoxia, así como en tejidos trofoblásticos de casos de preeclampsia y de fetos con restricción de crecimiento [128-130]. Estos datos sugieren que probablemente el incremento de HIF-1 alfa ocasionado por el estímulo de FSH en este tipo de carcinoma de células claras ovárico, pudiera ser el responsable de la regulación de la expresión a la alta de la acrogranina. Esta regulación es independiente de VEGF en la vía de señalización que se está activando (Figura 13), ya que un aumento en la expresión de VEGF también fue observado en las células NIH-OVCAR-3 y en las SK-OV-3 (datos no mostrados), lo que indica que probablemente en estas líneas celulares la vía de transducción de señal que aumenta survivina con el estímulo de FSH, es la que produce el incremento de VEGF como ya ha sido descrito previamente en la línea celular SK-OV-3 [116] (Figura 13). Sin embargo, estudios adicionales son requeridos para establecer el mecanismo exacto por el cual FSH regula la expresión de acrogranina en las células TOV-21G.





**Figura 13.** Modelo propuesto de la vía de transducción de señal activada por la FSH que regula la expresión de acrogranina en las células TOV-21G. Modificado de Huang y cols. [111].

En cáncer de ovario, la vía de PKC ha sido asociada con la estimulación de proliferación celular y progresión maligna de las células [109, 110]. Previamente nosotros hemos demostrado que tanto en las células NIH-OVCAR-3 como en las SK-OV-3, la vía de PKC es una de las principales vías de transducción de señal que regulan la síntesis de la acrogranina en estas células [90]. Dado que se sabe que la FSH activa esta vía en células de cáncer de ovario [109, 110], se propuso valorar si a través de esta vía la FSH regula la expresión a la alta de la acrogranina en las células TOV-21G. Sin embargo, al parecer pudiera estar utilizado otra vía además de la de PKC, ya que al inhibir la vía con Calphostin C (compuesto que compite por el dominio regulatorio de la proteína cinasa C) se redujo la expresión de acrogranina, la cual se reactivó con el estímulo de FSH aun en presencia del inhibidor de PKC, esto nos dice, que estando bloqueada la vía de

PKC la FSH fue capaz de regular la síntesis de la acrogranina, lo cual probablemente se deba a la activación de otra vía como la de PI3K como previamente lo estamos proponiendo o bien la vía de PKA. Sin embargo, otros estudios son necesarios para determinar cuál de estas vías está participando en la regulación de la acrogranina en las células claras de cáncer de ovario TOV-21G, ya que en las células NIH-OVCAR-3 y SK-OV-3 las vías de PI3K y PKA no participan en la regulación de la acrogranina, como lo demostramos previamente [90].

Los hallazgos en la presente tesis sugieren que el aumento de la acrogranina por el estímulo de la FSH pudiera ser uno más de los mecanismos que expliquen la asociación de cáncer de ovario y un aumento en las concentraciones de la FSH en forma sistémica. Es importante remarcar que esto sólo se observó en la línea celular derivada de un carcinoma de células claras y no en la línea celular derivada de un adenocarcinoma seroso, por lo que acrogranina y FSH pudieran estar jugando un papel importante en la fisiopatogenia de los tumores malignos de ovario de células claras, los cuales son muy agresivos y con una alta mortalidad. Además, esta regulación diferencial de la acrogranina por la FSH en las líneas celulares estudiadas podría ayudar a diseñar estrategias terapéuticas específicas para el carcinoma ovárico de células claras, contribuyendo así a la disminución del crecimiento tumoral y la formación de metástasis de la enfermedad.

## VIII. CONCLUSIONES

1.- La r-hFSH fue capaz de regular a la alta las concentraciones de acrogranina tanto intracelular como extracelular (la secretada al medio) en las células TOV-21G, una línea celular derivada de un carcinoma de células claras de ovario. Sin embargo, este efecto no se observó en las células NIH-OVCAR-3, línea celular derivada de un adenocarcinoma seroso de ovario. Por lo que se propone la participación de acrogranina y FSH en la patogénesis de este tipo histológico de tumores malignos de ovario.

2.- La r-hFSH fue capaz de regular a la alta las concentraciones de acrogranina a pesar de haber bloqueado la vía de PKC en las células TOV-21G, lo que sugiere que además de la vía de PKC otras vías de transducción de señal podrían participar en la regulación de la expresión de la acrogranina en esta línea celular.

3.- Otros estudios son necesarios para establecer primeramente que vías de señalización están participando en esta relación FSH y acrogranina en las células TOV-21G y posteriormente para conocer si acrogranina pudiera ser un blanco terapéutico en este tipo histológico de tumores de ovario.

## IX. REFERENCIAS

1. Lippert, H., *Anatomía con orientación clínica para estudiantes*. 1 ed2010, España: Marbán libros.
2. Drake, R.L., A.W. Vogl, and A.W.M. Mitchell, *Gray Anatomía para estudiantes*. 2 ed2010, España: Elsevier.
3. Ross, M.H. and W. Pawlina, *Histología. Texto y atlas a color con biología celular y molecular*. 5 ed2007, México: Médica Panamericana.
4. Gartner, L.P. and J.L. Hiatt, *Atlas en color de histología*. 5 ed2011, México: Médica Panamericana.
5. Strauss, J.F., III and C.J. Williams, *The Ovarian Life Cycle*, in *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management*, J.F. Strauss, III and R.L. Barbieri, Editors. 2009, Saunders Elsevier: Philadelphia, PA. p. 155-190.
6. Gougeon, A., *Dynamics of Human Follicular Growth: Morphologic, Dynamic, and Functional aspect*, in *The Ovary*, P.C.K. Leung, Editor 2004, Elsevier Academic Press: USA. p. 25-40.
7. Díaz-Cueto, L. and A. Ulloa-Aguirre, *Regulación neuroendocrina de la función reproductiva*, in *Cuadernos de Medicina reproductiva. Neuroendocrinología reproductiva*, A. Pellicer and c. Simón, Editors. 2003, Médica panamericana, S.A.: españa. p. 47-60.
8. Saito, M., et al., *Classical and desmosomal cadherins at a glance*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 11): p. 2547-52.
9. Auersperg, N., et al., *Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology*. *Endocr Rev*, 2001. **22**(2): p. 255-88.
10. Ahmed, N., E.W. Thompson, and M.A. Quinn, *Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm*. *J Cell Physiol*, 2007. **213**(3): p. 581-8.
11. Vergara, D., et al., *Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer*. *Cancer Lett*, 2010. **291**(1): p. 59-66.
12. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. *Am J Surg Pathol*, 2010. **34**(3): p. 433-43.
13. Murdoch, W.J. and A.C. McDonnel, *Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis*. *Reproduction*, 2002. **123**(6): p. 743-50.
14. Okamura, H. and H. Katabuchi, *Pathophysiological dynamics of human ovarian surface epithelial cells in epithelial ovarian carcinogenesis*. *Int Rev Cytol*, 2005. **242**: p. 1-54.
15. Jemal, A., et al., *Global cancer statistics*. *CA Cancer J Clin*, 2011. **61**(2): p. 69-90.
16. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2013*. *CA Cancer J Clin*, 2013. **63**(1): p. 11-30.
17. INEGI, *Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer, 2009*: México. p. 1-6.
18. Salud, S.N.d.l.e., et al., *Perfil epidemiológico de los tumores malignos en México, 2011*, IEPSA: México. p. 33-97.
19. Benedet, J.L., et al., *FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers*. *FIGO Committee on Gynecologic Oncology*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2000. **70**(2): p. 209-62.
20. Goff, B., *Symptoms associated with ovarian cancer*. *Clin Obstet Gynecol*, 2012. **55**(1): p. 36-42.

21. Lim, A.W., et al., Predictive value of symptoms for ovarian cancer: comparison of symptoms reported by questionnaire, interview, and general practitioner notes. *J Natl Cancer Inst*, 2012. **104**(2): p. 114-24.
22. Hunn, J. and G.C. Rodriguez, Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol*, 2012. **55**(1): p. 3-23.
23. Lynch, H.T., et al., Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol*, 2009. **3**(2): p. 97-137.
24. Scully, R.E., World Health Organization classification and nomenclature of ovarian cancer. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1975. **42**: p. 5-7.
25. Scully, R.E., Classification of human ovarian tumors. *Environ Health Perspect*, 1987. **73**: p. 15-25.
26. Berek, J.S., C. Crum, and M. Friedlander, Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum. *Int J Gynaecol Obstet*, 2012. **119 Suppl 2**: p. S118-29.
27. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*, 2011. **42**(7): p. 918-31.
28. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol*, 2008. **27**(2): p. 151-60.
29. Lalwani, N., et al., Histologic, molecular, and cytogenetic features of ovarian cancers: implications for diagnosis and treatment. *Radiographics*, 2011. **31**(3): p. 625-46.
30. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol*, 2004. **164**(5): p. 1511-8.
31. Bell, D.A., Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol*, 2005. **18 Suppl 2**: p. S19-32.
32. Fathalla, M.F., Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia? *Lancet*, 1971. **2**(7716): p. 163.
33. Landen, C.N., Jr., M.J. Birrer, and A.K. Sood, Early events in the pathogenesis of epithelial ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(6): p. 995-1005.
34. Fleming, J.S., et al., Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Mol Cell Endocrinol*, 2006. **247**(1-2): p. 4-21.
35. Cramer, D.W. and W.R. Welch, Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst*, 1983. **71**(4): p. 717-21.
36. Arslan, A.A., et al., Serum follicle-stimulating hormone and risk of epithelial ovarian cancer in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2003. **12**(12): p. 1531-5.
37. Lukanova, A. and R. Kaaks, Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005. **14**(1): p. 98-107.
38. Simpkins, F., A. Garcia-Soto, and J. Slingerland, New insights on the role of hormonal therapy in ovarian cancer. *Steroids*, 2013.
39. Cuna, S., P. Hoffmann, and P. Pujol, Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 2004. **94**(1): p. 25-32.
40. Zhou, B., et al., Hormone replacement therapy and ovarian cancer risk: a meta-analysis. *Gynecol Oncol*, 2008. **108**(3): p. 641-51.
41. Risch, H.A., Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. *J Natl Cancer Inst*, 1998. **90**(23): p. 1774-86.
42. Ness, R.B. and C. Cottreau, Possible role of ovarian epithelial inflammation in ovarian cancer. *J Natl Cancer Inst*, 1999. **91**(17): p. 1459-67.
43. Choi, J.H., et al., Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev*, 2007. **28**(4): p. 440-61.

44. Syed, V., et al., Reproductive hormone-induced, STAT3-mediated interleukin 6 action in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *J Natl Cancer Inst*, 2002. **94**(8): p. 617-29.
45. Kalamathan, S., et al., The mutational profile of sporadic epithelial ovarian carcinoma. *Anticancer Res*, 2011. **31**(8): p. 2661-8.
46. Cho, K.R. and M. Shih le, Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol*, 2009. **4**: p. 287-313.
47. Gui, T. and K. Shen, The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol*, 2012. **36**(5): p. 490-6.
48. Sheng, Q. and J. Liu, The therapeutic potential of targeting the EGFR family in epithelial ovarian cancer. *Br J Cancer*, 2011. **104**(8): p. 1241-5.
49. Masoumi Moghaddam, S., et al., Significance of vascular endothelial growth factor in growth and peritoneal dissemination of ovarian cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 2012. **31**(1-2): p. 143-62.
50. Ye, X. and J. Chun, Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate reproduction. *Trends Endocrinol Metab*, 2010. **21**(1): p. 17-24.
51. 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.
52. Tolkmachev, D., et al., Structure dissection of human progranulin identifies well-folded granulin/epithelin modules with unique functional activities. *Protein Sci*, 2008. **17**(4): p. 711-24.
53. Bateman, A., et al., Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990. **173**(3): p. 1161-8.
54. Bhandari, V., R.G. Palfree, and A. Bateman, Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(5): p. 1715-9.
55. 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.
56. 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.
57. 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.
58. Zanicco-Marani, T., et al., Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res*, 1999. **59**(20): p. 5331-40.
59. He, Z., et al., Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med*, 2003. **9**(2): p. 225-9.
60. Diaz-Cueto, L. and G.L. Gerton, The influence of growth factors on the development of preimplantation mammalian embryos. *Arch Med Res*, 2001. **32**(6): p. 619-26.
61. Diaz-Cueto, L., et al., Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). *Dev Biol*, 2000. **217**(2): p. 406-18.
62. Suzuki, M., et al., Roles of progranulin in sexual differentiation of the developing brain and adult neurogenesis. *J Reprod Dev*, 2009. **55**(4): p. 351-5.
63. Galimberti, D. and E. Scarpini, Genetics of frontotemporal lobar degeneration. *Front Neurol*, 2012. **3**: p. 52.
64. Liu, C.J., Progranulin: a promising therapeutic target for rheumatoid arthritis. *FEBS Lett*, 2011. **585**(23): p. 3675-80.
65. Liu, C.J. and X. Bosch, Progranulin: a growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target. *Pharmacol Ther*, 2012. **133**(1): p. 124-32.

66. Tang, W., et al., The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science*, 2011. **332**(6028): p. 478-84.
67. 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.
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. Matsumura, N., et al., Oncogenic property of acrogranin in human uterine leiomyosarcoma: direct evidence of genetic contribution in *in vivo* tumorigenesis. *Clin Cancer Res*, 2006. **12**(5): p. 1402-11.
70. Jones, M.B., et al., The granulin-epithelin precursor is a steroid-regulated growth factor in endometrial cancer. *J Soc Gynecol Investig*, 2006. **13**(4): p. 304-11.
71. 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.
72. Cheung, P.F., et al., Granulin-epithelin precursor is an oncofetal protein defining hepatic cancer stem cells. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e28246.
73. Ho, J.C., et al., Granulin-epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 2008. **47**(5): p. 1524-32.
74. 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.
75. Lovat, F., et al., Proepithelin is an autocrine growth factor for bladder cancer. *Carcinogenesis*, 2009. **30**(5): p. 861-8.
76. Kong, W.J., et al., PC cell-derived growth factor overexpression promotes proliferation and survival of laryngeal carcinoma. *Anticancer Drugs*, 2007. **18**(1): p. 29-40.
77. Chen, X.Y., et al., Expression of PC cell-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma and their clinicopathologic significance. *Chin Med J (Engl)*, 2008. **121**(10): p. 881-6.
78. 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.
79. Monami, G., et al., Proepithelin regulates prostate cancer cell biology by promoting cell growth, migration, and anchorage-independent growth. *Am J Pathol*, 2009. **174**(3): p. 1037-47.
80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. Davidson, B., et al., Granulin-epithelin precursor is a novel prognostic marker in epithelial ovarian carcinoma. *Cancer*, 2004. **100**(10): p. 2139-47.
84. 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.

85. Pizarro, G.O., et al., Prosurvival function of the granulins-epithelin precursor is important in tumor progression and chemoresponse. *Int J Cancer*, 2007. **120**(11): p. 2339-43.
86. Miyanishi, M., et al., Immortalized ovarian surface epithelial cells acquire tumorigenicity by Acrogranin gene overexpression. *Oncol Rep*, 2007. **17**(2): p. 329-33.
87. Cuevas-Antonio, R., et al., 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*, 2010. **28**(5): p. 452-8.
88. Han, J.J., et al., Progranulin is a potential prognostic biomarker in advanced epithelial ovarian cancers. *Gynecol Oncol*, 2011. **120**(1): p. 5-10.
89. Carlson, A.M., et al., Utility of progranulin and serum leukocyte protease inhibitor as diagnostic and prognostic biomarkers in ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(10): p. 1730-5.
90. Diaz-Cueto, L., et al., PKC signaling is involved in the regulation of progranulin (acrogranin/PC-cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) protein expression in human ovarian cancer cell lines. *Int J Gynecol Cancer*, 2012. **22**(6): p. 945-50.
91. Ascoli, M. and D. puett, *The Gonadotropin Hormones and their receptors*, in Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management J.F. Strauss, III and R.L. Barbieri, Editors. 2009, Saunders Elsevier Philadelphia, PA p. 35-56.
92. Hall, J.E., *Neuroendocrine Control of the Menstrual Cycle*, in Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology, and clinical management, J.F. Strauss, III and R.L. Barbieri, Editors. 2009, Saunders Elsevier: Philadelphia, PA. p. 139-154.
93. Ulloa-Aguirre, A., et al., Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine*, 2007. **32**(3): p. 251-63.
94. Gloaguen, P., et al., Mapping the follicle-stimulating hormone-induced signaling networks. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2011. **2**: p. 45.
95. Guan, R., et al., Structural determinants underlying constitutive dimerization of unoccupied human follitropin receptors. *Cell Signal*, 2010. **22**(2): p. 247-56.
96. Thomas, R.M., et al., Follice-stimulating hormone receptor forms oligomers and shows evidence of carboxyl-terminal proteolytic processing. *Endocrinology*, 2007. **148**(5): p. 1987-95.
97. Gonzalez-Robayna, I.J., et al., Follicle-Stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-Induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Mol Endocrinol*, 2000. **14**(8): p. 1283-300.
98. Yu, F.Q., et al., Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. *J Endocrinol*, 2005. **186**(1): p. 85-96.
99. Wayne, C.M., et al., Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol*, 2007. **21**(8): p. 1940-57.
100. Osterholzer, H.O., E.J. Streibel, and S.V. Nicosia, Growth effects of protein hormones on cultured rabbit ovarian surface epithelial cells. *Biol Reprod*, 1985. **33**(1): p. 247-58.
101. 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.
102. Davies, B.R., et al., Administration of gonadotropins stimulates proliferation of normal mouse ovarian surface epithelium. *Gynecol Endocrinol*, 1999. **13**(2): p. 75-81.



103. Parrott, J.A., et al., Expression and actions of both the follicle stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol*, 2001. **172**(1-2): p. 213-22.
104. !!! INVALID CITATION !!!
105. Choi, J.H., et al., Gonadotropins upregulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. *Endocr Relat Cancer*, 2005. **12**(2): p. 407-21.
106. Choi, J.H., et al., Gonadotropin-stimulated epidermal growth factor receptor expression in human ovarian surface epithelial cells: involvement of cyclic AMP-dependent exchange protein activated by cAMP pathway. *Endocr Relat Cancer*, 2009. **16**(1): p. 179-88.
107. Mertens-Walker, I., R.C. Baxter, and D.J. Marsh, Gonadotropin signalling in epithelial ovarian cancer. *Cancer Lett*, 2012. **324**(2): p. 152-9.
108. 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.
109. Ohtani, K., et al., Follicle-stimulating hormone promotes the growth of human epithelial ovarian cancer cells through the protein kinase C-mediated system. *Cancer Lett*, 2001. **166**(2): p. 207-13.
110. Mertens-Walker, I., et al., Gonadotropin-induced ovarian cancer cell migration and proliferation require extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation regulated by calcium and protein kinase C{delta}. *Endocr Relat Cancer*, 2010. **17**(2): p. 335-49.
111. Huang, Y., et al., FSH inhibits ovarian cancer cell apoptosis by up-regulating survivin and down-regulating PDCD6 and DR5. *Endocr Relat Cancer*, 2011. **18**(1): p. 13-26.
112. Schiffenbauer, Y.S., et al., Gonadotropin stimulation of MLS human epithelial ovarian carcinoma cells augments cell adhesion mediated by CD44 and by alpha(v)-integrin. *Gynecol Oncol*, 2002. **84**(2): p. 296-302.
113. Tzuman, Y.C., et al., Peritoneal adhesion and angiogenesis in ovarian carcinoma are inversely regulated by hyaluronan: the role of gonadotropins. *Neoplasia*, 2010. **12**(1): p. 51-60.
114. 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.
115. Lau, M.T., A.S. Wong, and P.C. Leung, Gonadotropins induce tumor cell migration and invasion by increasing cyclooxygenases expression and prostaglandin E(2) production in human ovarian cancer cells. *Endocrinology*, 2010. **151**(7): p. 2985-93.
116. Huang, Y., et al., Activation of the PI3K/AKT pathway mediates FSH-stimulated VEGF expression in ovarian serous cystadenocarcinoma. *Cell Res*, 2008. **18**(7): p. 780-91.
117. Menon, K.M., C.L. Clouser, and A.K. Nair, Gonadotropin receptors: role of post-translational modifications and post-transcriptional regulation. *Endocrine*, 2005. **26**(3): p. 249-57.
118. Sapoznik, S., et al., Gonadotropin-regulated lymphangiogenesis in ovarian cancer is mediated by LEDGF-induced expression of VEGF-C. *Cancer Res*, 2009. **69**(24): p. 9306-14.
119. Huang, C.F., D.Y. Liu, and K. Shen, [Follicle stimulating hormone inhibits cisplatin induced apoptosis in ovarian cancer cells]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2003. **25**(4): p. 447-50.
120. Huang, C.F., et al., [Protective effect of follicle stimulating hormone on apoptosis of human epithelial ovarian cancer cell induced by cisplatin]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao*, 2003. **25**(4): p. 443-6.

121. Wang, J., et al., VEGF expression and enhanced production by gonadotropins in ovarian epithelial tumors. *Int J Cancer*, 2002. **97**(2): p. 163-7.
122. Bateman, A. and H.P. Bennett, The granulin gene family: from cancer to dementia. *Bioessays*, 2009. **31**(11): p. 1245-54.
123. Liu, Y., et al., Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF)/granulin-epithelin precursor (GEP) decreased cell proliferation and invasion through downregulation of cyclin D and CDK4 and inactivation of MMP-2. *BMC Cancer*, 2007. **7**: p. 22.
124. 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.
125. Harasawa, M., et al., Analysis of mTOR inhibition-involved pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Acta Histochem Cytochem*, 2011. **44**(2): p. 113-8.
126. Miyazawa, M., et al., Therapeutic strategy targeting the mTOR-HIF-1alpha-VEGF pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Pathol Int*, 2009. **59**(1): p. 19-27.
127. Kato, M., et al., Aberrant expression of the mammalian target of rapamycin, hypoxia-inducible factor-1alpha, and glucose transporter 1 in the development of ovarian clear-cell adenocarcinoma. *Int J Gynecol Pathol*, 2012. **31**(3): p. 254-63.
128. Piscopo, P., et al., Hypoxia induces up-regulation of progranulin in neuroblastoma cell lines. *Neurochem Int*, 2010. **57**(8): p. 893-8.
129. Guerra, R.R., et al., Progranulin is a stress-response factor in fibroblasts subjected to hypoxia and acidosis. *Growth Factors*, 2007. **25**(4): p. 280-5.
130. Stubert, J., et al., Trophoblastic progranulin expression is upregulated in cases of fetal growth restriction and preeclampsia. *J Perinat Med*, 2012. **40**(5): p. 475-81.