



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**“CARACTERIZACIÓN DEL MECANISMO MOLECULAR DE PINX1 COMO
REGULADOR DE RECEPTORES DE HORMONAS ESTEROIDEAS EN LÍNEAS
CELULARES DE CÁNCER DE OVARIO”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

ANA LUISA ALVAREZ CHÁVEZ

TUTOR PRINCIPAL

ELIZABETH LANGLEY MCCARRON
Instituto Nacional de Cancerología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

ERNESTO SOTO REYES SOLÍS
Instituto Nacional de Cancerología

CARMEN MÉNDEZ HERRERA
Facultad de Medicina, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, MAYO 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Índice

Índice de figuras	4
Índice de tablas	7
Abreviaturas	8
Resumen	13
Abstract	14
1. Introducción.....	16
1.1. Cáncer de ovario.....	16
1.1.1. Fisiología del ovario.....	16
1.1.2. Epidemiología del cáncer de ovario.....	18
1.1.3. Variables epidemiológicas asociadas al cáncer de ovario.....	20
1.1.4. Diagnóstico del cáncer de ovario y estadificación	21
1.1.5. Clasificación histológica del cáncer de ovario	24
1.2. Papel de las hormonas esteroideas en el cáncer de ovario.....	26
1.2.1. Estrógenos	27
1.2.2. Progesterona	28
1.2.3. Andrógenos	28
1.3. Estructura y función de los receptores de hormonas esteroideas.....	29
1.4. Correguladores de receptores de hormonas esteroideas	31
1.5. Mecanismo y vías de señalización mediadas por el receptor de estrógenos (ER) en cáncer de ovario.....	37
1.6. Mecanismo y vías de señalización mediadas por el receptor de progesterona (PR) en cáncer de ovario	42
1.7. Mecanismo y vías de señalización mediadas por el receptor de andrógenos (AR) en cáncer de ovario	44
2. Antecedentes	49
2.1. PinX1 como nuevo corregulador de receptores de hormonas esteroideas	49
3. Justificación.....	58
4. Planteamiento del problema / Pregunta de investigación.....	59
5. Hipótesis	60
6. Objetivo general	61
6.1. Objetivos particulares.....	61

7.	Materiales y métodos	62
7.1.	Cultivo celular	62
7.2.	Extracción RNA y obtención de cDNA	63
7.3.	PCR a partir de cDNA.....	64
7.4.	Western Blot	64
7.5.	Inmunofluorescencia.....	65
7.6.	Transfección estable de líneas celulares	66
7.7.	Ensayo de proliferación celular	67
7.8.	Ensayo de clonogenicidad celular.....	67
7.9.	Ensayo de luciferasa.....	68
7.10.	Análisis estadístico.....	69
8.	Resultados	70
8.1.	Determinación de mRNA de receptores de hormonas esteroideas en líneas celulares de cáncer de ovario por RT-PCR	70
8.2.	Expresión y localización de receptores de hormonas esteroideas en líneas celulares de cáncer de ovario por inmunofluorescencia.....	72
8.3.	Expresión de PinX1 en líneas celulares de cáncer de ovario por Western Blot	74
8.4.	Localización de PinX1 en líneas celulares de cáncer de ovario por inmunofluorescencia	76
8.5.	Colocalización de PinX1 y receptores de hormonas esteroideas en líneas celulares de cáncer de ovario por inmunofluorescencia, en presencia y ausencia de tratamiento con hormonas	77
8.6.	Ensayos de proliferación celular de líneas celulares que sobreexpresan PinX1 de manera estable.....	80
8.7.	Ensayos de clonogenicidad celular en líneas celulares estables para la sobreexpresión de PinX1	83
8.8.	Ensayos de luciferasa tras transfección transitoria de PinX1, en presencia y ausencia de medio adicionado con hormonas	85
9.	Discusión.....	89
10.	Conclusiones.....	101
11.	Perspectivas.....	103
	Referencias	104
	Figuras Suplementarias	120

Índice de figuras

Figura 1. Estadísticas de morbilidad y mortalidad en cánceres a nivel mundial, ambos sexos (Globocan, 2018).....	18
Figura 2. Estadísticas de morbilidad y mortalidad en cánceres a nivel mundial, población femenina (Globocan, 2018).....	19
Figura 3. Estructura modular y dominios funcionales de receptores de hormonas esteroideas. (Modificado de Tsai y O'Malley, 1994).....	30
Figura 4. Receptores nucleares tipo I y II. Receptores nucleares “huérfanos” (Imai et al, 2013).	31
Figura 5. Mecanismo de acción de los receptores esteroideos sobre la transcripción génica en el contexto de correpresores y coactivadores. (Modificado de O'Malley et al, 2009)	32
Figura 6. Mecanismo de acción de PinX1 sobre la telomerasa (Zhou, 2011).	50
Figura 7. Principales dominios de la proteína humana PinX1 (Li et al, 2016).	52
Figura 8. Expresión de mRNA de SHR, productos de RT-PCR a punto final en gel de agarosa al 5%. Líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3.....	71
Figura 9. Inmunofluorescencia para la línea celular OVCAR-3, marcaje para (A) ER α (rojo) + DAPI, (B) ER β (verde) + DAPI, (C) AR (verde) + DAPI, (D) PR (verde) + DAPI. Inmunofluorescencia para la línea celular TOV-112D, marcaje para (E) ER α (rojo) + DAPI, (F) ER β (verde) + DAPI, (G) AR (verde) + DAPI, (H) PR (verde) + DAPI.....	73

Figura 10. Western Blot para identificación de PinX1 en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D, SK-OV-3 y HEK-293.....	75
Figura 11. Análisis por densitometría de PinX1 por Western Blot en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D, SK-OV-3 y HEKT-293.....	75
Figura 12. Inmunofluorescencia para las líneas celulares (A) OVCAR-3 (B) OV-90, (C) TOV-21G, (D) TOV-112D, (E) SK-OV-3, marcaje para PinX1 (verde) + DAPI.	77
Figura 13. Inmunofluorescencia para la línea celular SK-OV-3, marcaje para (A) ER α + PinX1 + DAPI. Tratamiento con EtOH. (B) Tratamiento con E2 20 nM. (C) Marcaje para ER β + PinX1 + DAPI. Tratamiento con EtOH. (D) Tratamiento con E2 20 nM. (E) marcaje para AR+ PinX1 + DAPI. Tratamiento con EtOH. (F) Tratamiento con DHT 20 nM (G) Marcaje para PR + PinX1 + DAPI. Tratamiento con EtOH. (H) Tratamiento con P4 20 nM. SHR (rojo), PinX1 (verde)..	79
Figura 14. Curvas de proliferación OVCAR-3 a 72 horas, bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM).....	81
Figura 15. Curvas de proliferación TOV-112D a 72 horas, bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM).....	82
Figura 16. Curva de proliferación SK-OV-3 a 72 horas, bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM).	82
Figura 17. Ensayo de clonogenicidad celular SK-OV-3 tras 10 días. Bajo tratamiento con EtOH, DHT (20 nM) y Flutamida (200 nM).....	84
Figura 18. Ensayo de clonogenicidad celular SK-OV-3 tras 10 días. Bajo tratamiento con EtOH, E2 (20 nM) y Tamoxifén (200 nM)..	84
Figura 19. Ensayo de luciferasa en línea celular OVCAR-3 tras transfección transitoria de 72 horas. Bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM)..	86

Figura 20. Ensayo de luciferasa en línea celular OV-90 tras transfección transitoria de 72 horas. Bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM)..... 87

Figura 21. Ensayo de luciferasa en línea celular SK-OV-3 tras transfección transitoria de 72 horas. Bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM). 88

Índice de tablas

Tabla 1. Principales correguladores involucrados en cáncer (Obeid et al, 2016; Daniels et al, 2014; Fenne et al, 2013).	37
Tabla 2. Oligonucleótidos para la amplificación de receptores nucleares y GAPDH.	64
Tabla 3. Plásmidos transfectados para ensayo de luciferasa, actividad de ER α . .	68
Tabla 4. Plásmidos transfectados para ensayo de luciferasa, actividad de AR.....	69
Tabla 5. Presencia de mRNA de los SHR ER α , ER β , AR, PR y GR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3.	70
Tabla 6. Localización de SHR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3.....	74

Abreviaturas

ADM	Adrenomedullin
AF-1	Activation Function 1
AF-2	Activation Function 2
AKR1B10	Aldo-Keto Reductase Family 1 Member B10
AKT	Serine/threonine Kinase 1
AP-4	Transcription Factor AP-4
AR	Androgen Receptor
ARA70	Androgen Receptor-Associated Protein 70
ARID1A	AT Rich Interaction Domain 1A
ASC2	Nuclear Receptor Coactivator 6
ATCC	American Type Culture Collection
ATF3	Activating Transcription Factor 3
BCAS 1, 2, 3	Breast Cancer-Amplified Sequence 1, 2, 3
BCL11b	BAF Complex Component
BRAF	B Raf Proto-oncogene, Serine/threonine Kinase
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
C/EBP	CCAAT Enhancer Binding Proteins
CA125	Cancer Antigen 125
CARM1	Coactivator Associated Arginine Methyltransferase 1
CASP8	Caspase 8
CAV1	Caveolin 1
CBP/p300	CREB Binding Protein
CCNA2	Cyclin A2
CDC6	Cell Division Cycle 6
CDK12	Cyclin Dependent Kinase 12
cDNA	Complementary DNA
CoCoA	Coiled-Coil Coactivator
NuRD	Nucleosome Remodeling and Deacetylase

CREB	CAMP Responsive Element Binding Protein
CSTD	Cathepsin D
CTNNB-1	Catenin Beta 1
CXCR	C-X-C Motif Chemokine Receptor
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DBD	DNA Binding Domain
DCK1	Dyskerin Pseudouridine Synthase 1
DHT	Dihydrotestosterone
DLC1	Rho GTPase Activating Protein
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNP	Diarylpropionitrile
E2	17 β -estradiol
E2F	Transcription Factor 1
E6AP	E6 Associated Protein
EGR1	Early Growth Response 1
EIF4E	Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E
ELKS	ETS Transcription Factors
EOC	Epithelial Ovarian Cancer
ERK 1, 2	Extracellular Signal Regulated Kinases
ER α	Estrogen Receptor Alpha
ER β	Estrogen Receptor Beta
Fas	Fas Cell Surface Death Receptor
FBS	Fetal Bovine Serum
FHS	Fetal Horse Serum
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FSH	Follicle Stimulating Hormone
GAC63	Grip1 Associated Coactivator 63
GATA-1	GATA Binding Factor 1
GNA13	G Protein Subunit Alpha 13
GPC3	Glypican 3

GPED	G Protein Coupled Estrogen Receptor 1
GR	Glucocorticoide Receptor
GSTPI	Glutathione S Transferase pi 1
GTF2E2	General Transcription Factor IIE Subunit 2
HDACs	Histone Deacetylases
HER2	Receptor Tyrosine Protein Kinase erbB-2
HGSC	High Grade Serous Carcinoma
HIF-1 α	Hypoxia Inducible Factor 1 alpha
HNF-1 β	Hepatocyte Nuclear Factor 1-beta
HPV16	Human Papillomavirus type 16
HRE	Hormone Response Elements
HSP90AA1	Heat Shock Protein 90 Alpha Family Class A Member 1
HUS1	HUS1 Checkpoint Clamp Component
IGFBPs	Insulin-like Growth Factor- Binding Protein
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
INTS10	Integrator Complex Subunit 10
JAG1	Jagged 1
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
KD	Knocked Down
kDa	kDalton
Ki67	Marker of Proliferation Ki-67
KRAS	KRAS Proto-oncogene, GTPase
KRT18	Keratin 18
LBD	Ligand Binding Domain
LGSC	Low Grade Serous Carcinoma
LH	Luteinizing Hormone
MAPKs	Mitogen Activated Protein Kinases
mBAFF	BAFF Ligand
MMP-2 y MMP-9	Matrix Metalloproteinase 2, 9

mRNA	Messenger RNA
MTA1	Metastatic Tumor Antigen 1
MUC1	Mucin 1
MyoD	Myoblast Determination Protein
NCoR	Nuclear Receptor Corepressor 1
NEIL2	Nei Like DNA Glycosylase 2
NF1	Neurofibromin 1
NF-κB	Nuclear Factor Kappa B
Nkx.3	Nk Homeobox 3
nm23-H2	NME/NM23 Nucleoside Diphosphate Kinase 2
NR	Nuclear Receptor
NTD	Amino Terminal Domain
OSE	Ovarian Surface Epithelium
p44/Mep50/WDR77	WD Repeat Domain 77
PAX-5,8	Paired Box Gene 5,8
PCBP1	Poly-C Binding Protein 1
PCR	Polymerase Chain Reaction
PIAS	Protein Inhibitor of Activated STATs
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase Catalytic Subunit Alpha
PinX1	PIN2 Interacting Protein 1
PMEPA1	Prostate Transmembrane Protein, Androgen Induced 1
POLR3D	RNA Polymerase III Subunit D
POT1	Protection Of Telomeres 1
PR	Progesterone Receptor
PR-A	Progesterone Receptor A Isoform
PR-B	Progesterone Receptor B Isoform
PSA	Prostate Specific Antigen
PTEN	Phosphatase and Tensin Homolog
PTGES3	Prostaglandin E Synthase 3
R3HCC1	R3H Domain and Coiled Coil Containing 1
RB1	Retinoblastoma

RERG	RAS Like Estrogen Regulated Growth Inhibitor
RET	Ret Proto-Oncogene
RMPI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RNA	Ribonucleic Acid
ROC curve	Receiver Operating Characteristic Curve
rRNA	Ribosomal Ribonucleic Acid
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RXR	Retinoic Acid Receptor
SCID	Severe Combined Immunodeficiency
SDF-1,	Stromal Cell Derived Factor 1
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SH3YL1	Src Homology 3 (SH3)-Domain Containing, Ysc84-like 1
SHR	Steroid Hormone Receptor
siRNAs	Small Interfering RNA
snoRNA	Small Nucleolar RNA
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SRA	Steroid Receptor RNA Activator
SRC-1, 2, 3	Steroid Receptor Coactivator-1
TAGLN	Transgelin
TBLR1	Transducin Beta Like 1 X-Linked
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TERT	Telomerase Reverse Transcriptase
TFF3	Trefoil Factor 3
TGFBR 1, 2	Transforming Growth Factor Beta Receptor 1, 2
TGF α	Transforming Growth Factor Alpha
TGF β 1,2,3	Transforming Growth Factor Beta 1, 2, 3
TID	Telomerase Inhibitory Domain
TRF1,2	Telomeric Repeat Binding Factor 1, 2
Ubch7	Ubiquitin Conjugating Enzyme H7
USF	Upstream Transcription Factor
WT-1	Wilm's Tumor-1

Resumen

El cáncer de ovario ocupa el décimo lugar a nivel mundial en incidencia con una muy alta mortalidad. Diversos estudios epidemiológicos y el análisis de biopsias de esta neoplasia han sugerido que el cáncer de ovario podría tener una estrecha regulación mediada por hormonas esteroideas con la participación de otras moléculas moduladoras de la transcripción como lo son los corre reguladores. PinX1 es una proteína cuya disminución se ha reportado en biopsias de diversos cánceres, con funciones relacionadas a la inhibición de la telomerasa, y de manera novedosa, descrita como un corre regulador de receptores de hormonas esteroideas en cáncer de mama y de próstata. De manera particular se ha reportado una expresión decrementada de PinX1 en la progresión del cáncer de ovario lo que sugiere una función crítica de esta proteína en el desarrollo de la neoplasia.

Para analizar los mecanismos por los cuales PinX1 podría ejercer cierta regulación sobre el desarrollo del cáncer de ovario y su papel en la modulación de receptores de hormonas esteroides en este tejido, se determinó la presencia de los receptores de hormonas esteroideas, así como la molécula de interés, para varias líneas celulares de diferentes subtipos histológicos de cáncer de ovario, encontrando positividad en su expresión y una localización predominantemente nuclear de estas moléculas. De manera interesante se observa una expresión disminuida de Pinx1 en las líneas celulares TOV-112D y OV-90 a comparación de las líneas celulares OVCAR-3, SK-OV-4 y TOV-21G, sugiriendo que la pérdida de PinX1 podría ser característica de ciertos subtipos histológicos y etapas avanzadas de esta neoplasia. La sobrepresión estable de PinX1 fue capaz de inhibir la proliferación celular y la formación de colonias, presumiblemente por sus múltiples acciones: ejerciendo una inhibición de la telomerasa, participando en la correcta segregación cromosomal y en la modulación de cascadas de señalización involucradas con la regulación del crecimiento celular.

Finalmente, se determina que PinX1 tiene un papel como coactivador del receptor ER α y AR, de manera dependiente y/o independiente de hormona, sugiriendo que esta molécula posee una función como corregulador dependiente del contexto celular en relación al receptor y el tejido sobre el cual se analice, apoyando la idea de que la activación o inhibición de la transcripción génica depende del microambiente celular y el efecto observado en la célula dependerá de los genes diana sobre los cuales actúe la modulación de la actividad transcripcional.

Abstract

Ovarian cancer ranks tenth in incidence worldwide with a high rate of mortality. Several epidemiological studies and the analysis of biopsies have suggested that ovarian cancer could be regulated by steroid hormones with the participation of other transcriptional modulators such as corregulators. PinX1 is a protein whose decreased expression has been reported in biopsies of various cancers, with functions related to telomerase inhibition. It has recently been described as a corregulator of steroid hormone receptors in breast and prostate cancer. Specifically, decreasing expression of PinX1 has been reported in the progression of ovarian cancer, which suggests a critical role of PinX1 in the development of this disease.

To analyze the mechanisms by which PinX1 could regulate the progression of ovarian cancer and its role in regulating steroid hormone receptor activity we examined the presence of steroid hormone receptors, as well as the molecule of interest, for several cell lines of different histological cancer subtypes, finding positivity in their expression and a predominantly nuclear location of these molecules. Interestingly, a decreased expression of Pinx1 is observed in the TOV-112D and OV-90 cell lines compared to OVCAR-3, SK-OV-4 and TOV-21G cell lines, suggesting that the loss of PinX1 could be characteristic of certain histological subtypes and advanced stages of this cancer. The stable

overexpression of PinX1 can strongly inhibits cell proliferation and colony formation, presumably due to its multiple mechanisms: exerting telomerase inhibition, participation in correct chromosomal segregation, modulation of signaling pathways involved in the regulation of the cell growth.

Finally, we determined that PinX1 has a role as a coactivator of the steroid hormone receptors ER α and AR, in a hormone-dependent and/or independent manner, suggesting that the coregulator function of PinX1 is dependent on the cellular context in relation to the receptor and the tissue analyzed, supporting the idea that the activation or inhibition of gene transcription depends on the cellular microenvironment and the effect observed in the cell will depend on the selection and modulation of target gene expression.

1. Introducción

1.1. Cáncer de ovario

1.1.1. Fisiología del ovario

El ovario es un órgano del sistema reproductor femenino, cuya unidad fundamental es el folículo ovárico, el cual contiene al ovocito que eventualmente será ovulado, y si es fecundado se convertirá en un embrión. El folículo ovárico también se encarga de secretar hormonas esteroideas principalmente, las cuales son necesarias para el mantenimiento del ciclo ovárico, el desarrollo de caracteres sexuales secundarios y la preparación del útero para la implantación del embrión (Carlson, 2014; Richardson, 1966).

Durante el periodo fetal, posterior al inicio de la primera meiosis, la ovogonia desnuda comienza a rodearse de células de la granulosa formando los folículos primordiales, posteriormente el ovocito primario queda revestido por un par de capas completas de estas células formando el folículo primario. En los años prepuberales, varios de los folículos primarios aumentan de tamaño, generando más capas de células granulosas, convirtiéndose en un folículo secundario. Una cubierta celular derivada del tejido conjuntivo del ovario (estroma), comienza a formarse alrededor de las capas de células de la granulosa, la cual se denomina teca folicular y que posteriormente se diferenciará en una teca interna y una teca externa. La maduración folicular a partir de la pubertad requiere la acción de la hormona luteinizante (LH), la cual actúa sobre las células de la teca las cuales producen andrógenos, que atraviesan la membrana granulosa hasta llegar al interior de estas células. La hormona folículo estimulante (FSH) actúa sobre las células de la granulosa, induciendo la síntesis de la enzima aromatasa que convierte los andrógenos provenientes de las células de la teca en estrógenos, los cuales ejercerán su efecto en diversos tejidos diana y el mismo tejido ovárico. Por efecto de estas influencias hormonales, el folículo aumenta de tamaño con rapidez y presiona contra la superficie del ovario, en este momento se denomina folículo terciario y durante la ovulación el folículo protruye de la superficie del ovario,

disrumpiendo el epitelio superficial y ocasionando la salida del ovocito secundario hacia las fimbrias de las tubas uterinas para su posterior transporte hacia el útero (Carlson, 2014).

El epitelio superficial del ovario (OSE) es una monocapa de células escamosas-cuboidales, caracterizadas por poseer queratina tipo 7, 8, 18 y 19, expresar el antígeno de mucina MUC1, 17β hidroxisteroide deshidrogenasa y cilios. El contacto intercelular y la integridad de este epitelio se mantiene por desmosomas simples, uniones comunicantes incompletas y cadherinas. El OSE que cubre el ovario mientras no ocurre la ovulación es en mesotelio estacionario con características epiteliales y mesenquimales, retiene la capacidad de alterar su estado y diferenciarse en respuesta a estímulos, iniciando una respuesta regenerativa (Auersperg et al, 2001).

El OSE se encarga de transportar moléculas hacia y desde la cavidad peritoneal y tiene un papel durante la ruptura cíclica de epitelio durante la ovulación y posterior reparación. Varias de estas funciones varían con el ciclo ovárico y son dependientes de hormonas. Está bien establecido que el epitelio superficial del ovario sufre un proceso de proliferación para reparar la pérdida de continuidad del epitelio que sucede durante la ovulación. Diversos reportes basados en microscopía electrónica e histoquímicas han sugerido que el OSE contienen inclusiones lisosómicas y produce enzimas proteolíticas que contribuyen a la ruptura durante la ovulación. También se han planteado evidencias las cuales mencionan que poco antes de la ovulación, la pérdida de continuidad de este epitelio es causado por un proceso de apoptosis inducido por prostaglandinas y posiblemente mediado por el antígeno Fas. Durante el proceso de reparación, el OSE sintetiza componentes de tejido epitelial y conectivo y posee actividad contráctil que asemejan a los fibroblastos durante el proceso de curación de heridas (Auersperg et al, 2001; Hussein, 2005).

1.1.2. Epidemiología del cáncer de ovario

El cáncer de ovario ocupa el décimo lugar a nivel mundial en incidencia (Fig. 1), el octavo lugar en población femenina a nivel mundial (Fig. 2) y es la neoplasia ginecológica más letal, representando el 4% de los cánceres en mujeres. Debido a la falta de métodos confiables para su detección temprana y la ausencia de síntomas específicos, cerca del 70% de las pacientes son diagnosticadas en etapas tardías, razón por la cual sólo aproximadamente el 53% de las pacientes con cáncer de ovario sobreviven 5 años tras el diagnóstico. El pronóstico depende en gran medida de la extensión de la enfermedad al momento de la detección, siendo que las mujeres diagnosticadas con neoplasia local tienen un porcentaje del 95% de supervivencia, mientras que aquellas diagnosticadas con neoplasia extendida tienen el 31% (Globocan, 2018; Kuffe et al, 2003).

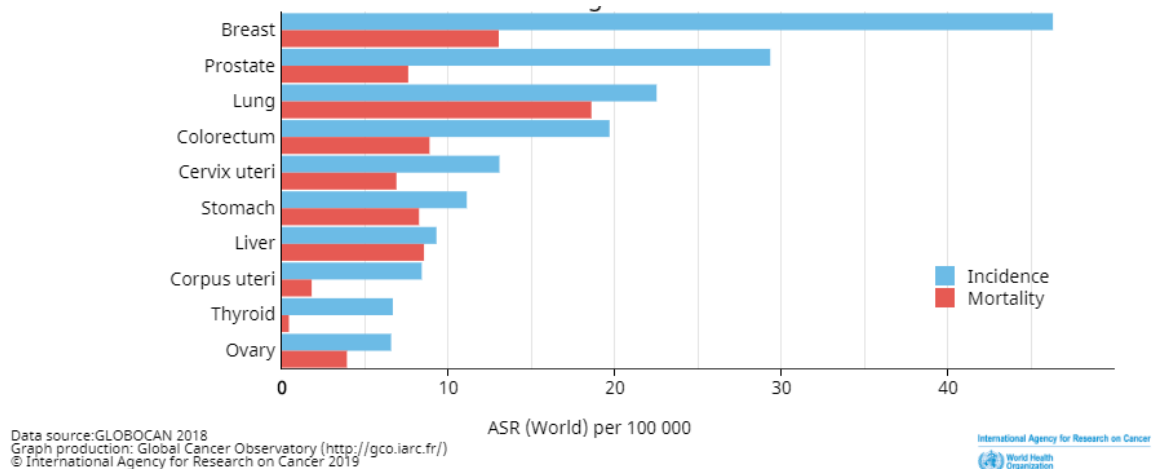


Figura 1. Estadísticas de morbilidad y mortalidad en cánceres a nivel mundial, ambos sexos (Globocan, 2018).

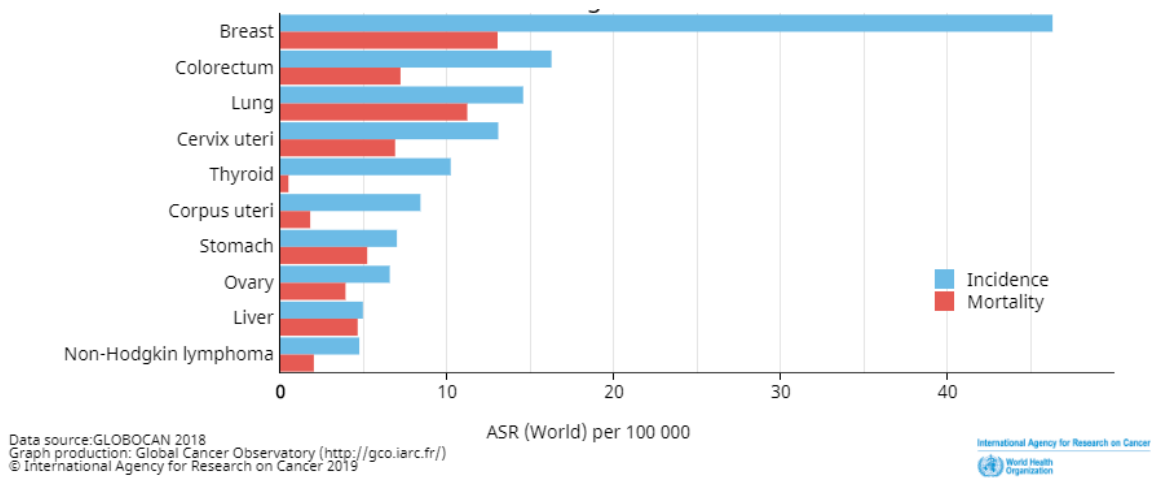


Figura 2. Estadísticas de morbilidad y mortalidad en cánceres a nivel mundial, población femenina (Globocan, 2018).

La edad media de diagnóstico del cáncer de ovario se encuentra en el rango de 60-65 años, siendo una enfermedad característica de mujeres postmenopáusicas. Esta neoplasia ocurre esporádicamente en la población, únicamente el 5-10% de este cáncer está asociado a componentes hereditarios. Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) de 2013, en México, el cáncer de ovario tiene una morbilidad promedio de 24.8 casos por cada 100 mil habitantes, a partir de los 20 años (0.024%). Con el mayor pico de incidencia en el rango de edad de 65 a 74 años, con una tasa de mortalidad de 5.46 por cada 100,000 habitantes (0.005%) (INEGI, 2016; Kuffe et al, 2003).

No se ha reportado como tal, una causa exógena para el desarrollo de cáncer de ovario. Se propone que un agente etiológico o un potenciador oncogénico puede entrar a la cavidad peritoneal a través del canal genital y esparcirse por el útero y las tubas uterinas. Se han estudiado posibles carcinógenos como agentes infecciosos y químicos, y algunos estudios han vinculado componentes ambientales, como la exposición a talcos con asbesto en lavados vaginales, con el desarrollo de tumores epiteliales. También se han hecho asociaciones con este tipo de neoplasia con poblaciones de raza blanca, con dietas altas en grasa y galactosa (Kuffe et al, 2003).

Aquellos cánceres vinculados a componentes hereditarios están asociados a mutaciones en BRCA1 y BRCA2, también hay cánceres asociados al síndrome Li-Fraumeni que ocurre por mutaciones en p53 de líneas germinales.

La prognosis del cáncer de ovario se puede correlacionar con numerosos factores clínicos y biológicos. Se ha demostrado que los cánceres de ovario son comúnmente aneuploides y que existe una correlación entre la etapa FIGO (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia) y la poliploidía (cánceres de etapa temprana tienden a ser diploides, mientras que los de etapas tardías son aneuploides). La mayor parte de los cánceres esporádicos evolucionan de una sola célula clonal; cuando son comparados los cánceres primarios con los metastásicos, se encuentra que más del 90% comparten los mismos patrones de pérdida de heterocigosidad, inactivación del mismo cromosoma X y, si es el caso, las mismas mutaciones en p53. El cáncer de ovario puede hacer metástasis por varias rutas, como otras neoplasias epiteliales (Kuffe et al, 2003).

1.1.3. Variables epidemiológicas asociadas al cáncer de ovario

Dentro de las variables epidemiológicas, la historia reproductiva y el número de ciclos de ovulación tienen el mayor impacto en el desarrollo de la enfermedad. Dentro de los factores considerados de riesgo para el desarrollo de cáncer de ovario se encuentran la nuliparidad y la infertilidad. El desarrollo de endometriosis, definida como la presencia y crecimiento de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, también se considera un factor de riesgo, y está asociado con carcinoma de célula clara. Los fármacos para inducir fertilidad, como el citrato de clomifeno o las gonadotropinas para inducir ciclos de ovulación, también representan un factor de riesgo. La alta incidencia de cáncer de ovario en mujeres nulíparas sugiere que una ovulación continua, ininterrumpida por embarazos o uso de anticonceptivos, puede predisponer el desarrollo de esta enfermedad (Kuffe et al, 2003).

Durante los ciclos de ovulación, la superficie epitelial del ovario sufre disrupción del tejido y posterior reparación, como consecuencias, las células epiteliales que cubren su superficie son estimuladas para proliferar, por lo que un mayor número de ciclos incrementa la probabilidad de sufrir mutaciones espontáneas en genes supresores de tumor o protooncogenes, lo cual contribuye a la oncogénesis.

Por otra parte, dentro de los factores asociados con una disminución del riesgo de desarrollar cáncer de ovario se encuentran el uso de anticonceptivos orales, reportando una disminución del 30%, incluso con periodos cortos de uso (a partir de 6 meses) y encontrándose un 20% de disminución de riesgo por cada 5 años de uso. La paridad está íntimamente relacionada con una disminución en el riesgo, otorgando un 30% de protección para un primer embarazo a término, y confiriendo un 10% adicional por cada embarazo a término posterior. De igual manera la ligación de tubas uterinas se reporta como factor de reducción de riesgo, aportando una reducción aproximada del 30%, al igual que la histerectomía (Ness et al, 2000; Braem et al, 2010; Tsilidis et al, 2011; Riman et al, 2004).

1.1.4. Diagnóstico del cáncer de ovario y estadificación

Los primeros signos de alarma en el diagnóstico de cáncer de ovario suelen ser síntomas inespecíficos y fácilmente atribuibles a otras patologías, las sospechas de presentar esta neoplasia son acompañadas de la información proveniente de la historia clínica, prestando especial énfasis en los factores de riesgo y de protección para el desarrollo de esta neoplasia. En estudios de casos y controles se ha propuesto un índice pronóstico sintomático que incluye: dolor pélvico, dolor abdominal, incremento del tamaño/volumen abdominal, inflamación, dificultades para comer o saciedad temprana. Los síntomas se evalúan retrospectivamente y se considera positivo si el síntoma ha estado presente al menos 12 veces al mes en los últimos 12 meses. Se demostró que este instrumento tenía una baja sensibilidad (56.7%) para la enfermedad en etapas tempranas, pero alta sensibilidad (79.5%) en la enfermedad en etapas tardías. La especificidad fue de

90% en mujeres de 50 años y más y de 86.7% en mujeres más jóvenes (Doubeni et al, 2016; Goff et al, 2007).

Tras la historia clínica y la evaluación de la sintomatología, si existe una sospecha de la presencia de esta neoplasia, se realiza un examen físico que incluye examinación rectovaginal con vejiga vacía para evaluar masas pélvicas o abdominales. Las dificultades que presenta esta exploración es que puede resultar inespecífica, sobre todo en pacientes obesas, dificultando la palpación de la masa. También se buscan signos de disfuncionalidad endócrina, síndromes paraneoplásicos y enfermedad metastásica, incluyendo linfadenopatías inguinales o supraclaviculares, efusión pleural y masa umbilical (Doubeni et al, 2016; Timmerman 2010).

Posteriormente se realiza un ultrasonido transvaginal, que determina la arquitectura del ovario y su vascularización, es capaz de diferenciar entre quistes y masas sólidas y detectar ascitis. La sensibilidad de esta herramienta para discriminar entre lesiones benignas de malignas es del 86-94% (Doubeni et al, 2016).

Estos métodos diagnósticos se complementan con estudios de laboratorio que incluyen biometría hemática y química sanguínea con examen de función hepática, también se pueden incluir algunos marcadores de suero como en antígeno de cáncer 125 (CA125) y HE4 (Human Epididymis Protein 4) (Doubeni et al, 2016).

La estadificación del cáncer de ovario se realiza de acuerdo a los parámetros propuestos por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO). Los estadios iniciales del cáncer de ovario comprenden los estadios I, II y los estadios avanzados comprenden los estadios III y IV (Pratt et al, 2014).

Estadio I: Cáncer limitado a los ovarios.

Estadio IA: Cáncer limitado a un ovario, sin ascitis, cápsula intacta, sin tejido tumoral en la superficie externa.

Estadio IB: Cáncer en ambos ovarios, sin ascitis, cápsula intacta, sin tejido tumoral en la superficie externa.

Estadio IC: Cáncer en uno o ambos ovarios y alguna de las siguientes condiciones:

Estadio IC1: Ruptura de la cápsula externa durante la extirpación quirúrgica (derrame quirúrgico intraoperatorio).

Estadio IC2: Ruptura de la cápsula externa antes de la intervención quirúrgica o tejido tumoral en la superficie.

Estadio IC3: Ascitis o lavado peritoneal con presencia de células malignas.

Estadio II: Cáncer de ovario con extensión pélvica.

Estadio IIA: Diseminación a útero y/o tubas uterinas.

Estadio IIB: Diseminación a otros tejidos pélvicos.

Estadio IIC: IIA o IIB con tejido tumoral en la superficie del ovario o ruptura de la cápsula o ascitis o lavado peritoneal con presencia de células malignas.

Estadio III: Cáncer de ovario con implantes peritoneales fuera de la pelvis y/o ganglios inguinales o ganglios retroperitoneales

Estadio IIIA: El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos retroperitoneales y/o metástasis microscópicas más allá de la pelvis.

Estadio IIIA1(i): Las metástasis miden 10 milímetros (mm) o menos.

Estadio IIIA1(ii): Las metástasis miden más de 10 mm.

Estadio IIIA2: Diseminación del cáncer con compromiso peritoneal extrapelviano microscópico, con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales

Estadio IIIB: Metástasis peritoneales macroscópicas más allá del borde de la pelvis ≤ 2 cm con o sin metástasis en los ganglios linfáticos retroperitoneales (incluye diseminación del tumor a la cápsula del hígado y el bazo).

Estadio IIIC: Metástasis peritoneales macroscópicas más allá del borde de la pelvis > 2 cm con o sin metástasis en los ganglios linfáticos retroperitoneales (incluye diseminación del tumor a la cápsula del hígado y el bazo).

Estadio IV: Metástasis a distancia.

Estadio IVA: Derrame pleural con características histológicas positivas.

Estadio IVB: Metástasis a órganos extra abdominales (incluye ganglios linfáticos inguinales y ganglios linfáticos fuera de la cavidad abdominal).

1.1.5. Clasificación histológica del cáncer de ovario

El 90% de los tumores en ovario son carcinomas epiteliales y con base en su morfología celular se clasifican posteriormente en 5 tipos histológicos diferentes: carcinoma seroso de bajo grado (LGSC), carcinoma seroso de alto grado (HGSC), carcinoma de célula clara, carcinoma endometroide y carcinoma mucinoso (Cho y Shih, 2009).

Se cree que los diversos tipos histológicos de los tumores epiteliales se derivan de distintos tejidos. Por ejemplo, los cánceres serosos de alto grado surgen de la superficie epitelial del ovario y/o de las trompas de Falopio distales. Los

carcinomas endometrioides y de células claras vienen de lesiones endometriósicas, mientras que la mayor parte de los tumores mucinosos surgen a partir de metástasis al ovario desde el tracto gastrointestinal, incluyendo el colon, apéndice y estómago (Bell, 2005; Nezhat et al, 2008; Lee y Young, 2003; Kelem y Kobel, 2011; Zaino et al, 2011).

El 70-80% de los casos de cáncer de ovario son de tipo seroso de alto grado (HGSC por sus siglas en inglés), de manera característica, este subtipo histológico expresa WT-1 (Wilm's tumor-1), ER α (Receptor de Estrógenos alfa) y PAX-8 en la mayoría de los casos analizados. También presenta un alto índice proliferativo Ki67. Hasta en el 10% de los casos se presentan alteraciones genéticas en BRCA1 o BRCA2. Las alteraciones genéticas específicas asociadas a este subtipo son de las moléculas: TP53 (hasta en el 96% de los casos), NF1, RB1, CDK12, PTEN y PIK3CA (Kurman et al, 2013; Vaughan et al, 2011; Bell et al, 2011).

Los carcinomas serosos de bajo grado (LGSC por sus siglas en inglés) representan menos del 5% de los casos de cáncer de ovario. Éstos muestran un bajo índice proliferativo Ki67, expresión normal de p53, usualmente expresan WT-1, ER α y PR. Las mutaciones características asociadas son de las moléculas KRAS y BRAF (Vang et al, 2009).

El 10% de los casos de cáncer de ovario son del subtipo histológico carcinoma endometroide. Estas células expresan vimentina, ER α , PR, PAX-8 y CA125. También presentan mutaciones en CTNNB-1 (β -catenina), PTEN, PIK3CA y ARID1A. El otro 10% de los casos corresponden a carcinomas de células claras, éstos expresan HIF-1 α (Hypoxia Inducible Factor 1 alpha), glypican-3 y HNF-1 β (Hepatocyte nuclear factor 1-beta). Las alteraciones genéticas para este subtipo incluyen: ARID1A KRAS, PTEN y PIK3CA (Vaughan et al, 2011; Catasús et al, 2004; Moreno-Bueno et al, 2001; Lee et al, 2007; Stadlmann et al, 2007; Kato et al, 2006; Tan et al, 2006).

Además, los tumores de ovario se han clasificado en tipo I, que incluye los serosos de bajo grado, mucinosos, endometrioides de bajo grado y de células claras; y en

tumores tipo II, que incluyen los serosos de alto grado, endometrioides de alto grado y carcinomas indiferenciados y mixtos. Los tipo I tienden a tener mutaciones en KRAS, BRAF, PTEN y CTNNB-1, mientras que los tipo II están usualmente asociados a mutaciones en p53 (Kurman et al, 2008).

Finalmente, se ha realizado una clasificación de la patogénesis en el cáncer de ovario de acuerdo con sus principales orígenes anatómicos, ya sea proveniente de tejido derivado propiamente de ovario o de la tuba uterina. Los subtipos provenientes del ovario vienen del epitelio de la superficie del ovario que deriva del mesotelio celómico que cubre a los ovarios. Se ha hipotetizado que este tipo de carcinoma viene de inclusiones o quistes corticales que han llevado a cabo una metaplasia Mulleriana. Por otra parte, los subtipos que vienen de la tuba uterina provienen de celoma, ya sea de los conductos mullerianos o paramesonéfricos. Se ha observado que la mayoría de los tumores serosos parecen venir de células secretoras en la tuba uterina distal (akahKoshiyama et al, 2017).

1.2. Papel de las hormonas esteroideas en el cáncer de ovario

Dada la importante correlación epidemiológica entre los factores de riesgo reproductivos y hormonales con el cáncer de ovario, se sugiere que las hormonas esteroideas juegan un papel clave en la etiología de la enfermedad. De igual manera, la presencia de receptores de hormonas esteroideas (SHR), tanto en tejido normal de ovario como en tumores epiteliales malignos, sugieren un papel crítico de las hormonas esteroideas en el proceso de inicio y progresión del cáncer de ovario. Específicamente, estudios in vitro y evidencias epidemiológicas, muestran el papel potencial de estrógenos, progesterona y andrógenos en la regulación, proliferación e invasión de las células epiteliales cancerosas en ovario (Akahira et al, 2001; Wada-Hiraike et al, 2006; Zhao et al, 2011; Siegel et al, 2011).

1.2.1. Estrógenos

La evidencia que relaciona los estrógenos con el cáncer de ovario epitelial (EOC, por sus siglas en inglés) es diversa. Por una parte, se sabe que el embarazo (factor de protección) eleva los niveles de estrógeno circulantes, pero reduce los niveles intraováricos. Los anticonceptivos orales (factor de protección) reducen los niveles endógenos de estrógeno. Las terapias de reemplazo hormonal, con correlación positiva para el desarrollo de cáncer de ovario, aumentan los estrógenos circulantes. La endometriosis (factor de riesgo) está asociada con un incremento en la producción de estradiol, así como un incremento en la expresión del ER α . Además, los niveles de estradiol circulante están aumentados en las etapas peri-menopáusicas (el inicio del pico de incidencia), comparados con los niveles en edad reproductiva. De manera conjunta, estos datos indicarían que los niveles circulantes de estrógenos aumentados están asociados con un incremento del riesgo de desarrollar cáncer de ovario (Killick et al, 1987; Prior, 2005).

Sin embargo, hay otros factores que no apoyan esta correlación entre los estrógenos y EOC, por ejemplo, factores como menarca temprana y menopausia tardía, asociados a una exposición mayor de estrógenos, no han sido correlacionados consistentemente con el desarrollo de EOC, a diferencia del cáncer de mama el cual tiene una fuerte correlación.

Se han propuesto otras asociaciones del cáncer de ovario con estados patológicos como la obesidad. Se sabe que el tejido adiposo es un tejido endócrino capaz de secretar moléculas como citocinas, factores de crecimiento, y estrógenos, entre otros. Además, se ha descrito que la leptina, molécula encargada de regular la ingesta de alimentos y cuyos niveles séricos son proporcionales a la cantidad de tejido graso, es capaz de activar a los receptores de estrógenos, aumentando la transcripción de este gen en líneas celulares de cáncer de ovario. Hay diversos estudios que demuestran una asociación positiva entre el estado hiperestrogénico que se da en la obesidad, con el desarrollo del cáncer de ovario; de manera particular, estas observaciones se han asociado con un mayor riesgo de presentar

cáncer de ovario endometroide, sugiriendo que los altos niveles de estrógenos en la obesidad podrían predisponer a un subtipo histológico en específico (Valladares et al, 2014; Foong y Bolton, 2017).

1.2.2. Progesterona

Progestinas y progesterona tienen un rol de protección para el desarrollo de cáncer de ovario. Los anticonceptivos orales con contenido de progestinas (factor de protección) elevan los niveles de progesterona hasta 3 veces más. El embarazo (factor de protección), también eleva los niveles de progesterona. La infertilidad ovulatoria (factor de riesgo) está asociada con una producción reducida de progesterona. La endometriosis (factor riesgo) está asociada a una resistencia a la progesterona la cual se ha dicho, es causada por la presencia de la isoforma inhibitoria PR-A y la ausencia de la isoforma más transcripcionalmente activa PR-B (Rosenberg et al, 1994; Haning et al, 1985; Brinton et al, 1989; Attia et al, 2000).

1.2.3. Andrógenos

Los anticonceptivos orales, la ligadura de tubas uterinas y la histerectomía (factores de protección) reducen los niveles circulantes de andrógenos. Mientras que el síndrome de ovario poliquístico, el cual está fuertemente asociado con el desarrollo de EOC, es una condición hiperandrogénica. También se ha reportado que existe un posible riesgo aumentado de desarrollar cáncer de ovario asociado al uso de agentes androgénicos exógenos. De manera conjunta, estos datos indican que los andrógenos circulantes aumentados, presentan un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario (Gaspard et al, 1983; Davison et al, 2005; Danforth et al, 2010).

A pesar de la evidencia epidemiológica del importante rol de estas hormonas esteroideas (andrógenos, estrógenos y progesterona) en el desarrollo y progresión

del cáncer de ovario, también existen estudios que no son concluyentes y en ocasiones incluso son contradictorios. Una posible explicación para este fenómeno es que la relación entre las hormonas y el riesgo de presentar cáncer de ovario depende más del ambiente intraovárico que de los niveles circulantes de estas hormonas. También es posible que los tiempos de exposición, por ejemplo, en los años pre o post menopáusicos puedan ser críticos para el rol que juegan estas hormonas posteriormente. Finalmente, es importante mencionar que los estudios realizados consideran el cáncer de ovario epitelial como enfermedad única, sin embargo, estudios recientes han demostrado que la asociación de hormonas circulantes y el cáncer de ovario difiere según la histología del tumor y grado de invasión (Lukanova y Kaaks, 2005; Lukanova et al, 2003; Modugno y Edwards, 2012).

1.3. Estructura y función de los receptores de hormonas esteroideas

Gran parte de la regulación de las hormonas esteroideas es a través de su interacción con receptores nucleares. La super familia de receptores nucleares (NR) son considerados factores de transcripción que regulan la expresión génica en respuesta a ligandos y reclutamiento de correguladores (McKenna y O'Malley, 2002).

Respecto a su estructura, se sabe que estos receptores nucleares contienen una región N-terminal, con un dominio regulador que contiene la función de activación AF-1, independiente de ligando, esta activación transcripcional puede ser débil o fuerte dependiendo del receptor, y tiene un efecto independiente o sinérgico con la actividad dependiente de ligando AF-2 dependiendo del tejido o del promotor. En la región central tiene el dominio de unión a DNA (DBD por sus siglas en inglés) el cual tiene una región conservada con dos dedos de zinc que se unen directamente al DNA en secuencias denominadas elementos de respuesta a hormonas (HRE, por sus siglas en inglés). Posteriormente, tiene una región bisagra que conecta el dominio DBD y el dominio de unión a ligando (LBD, por sus siglas en inglés). El

dominio LBD, que también ayuda a la dimerización del receptor, se encuentra moderadamente conservado en secuencia, pero altamente conservado a nivel estructural entre diversos receptores; en esta región se encuentra la función de activación 2 (AF-2) dependiente de ligando (Fig. 3) (Evans, 1988; Tsai y O'Malley, 1994).

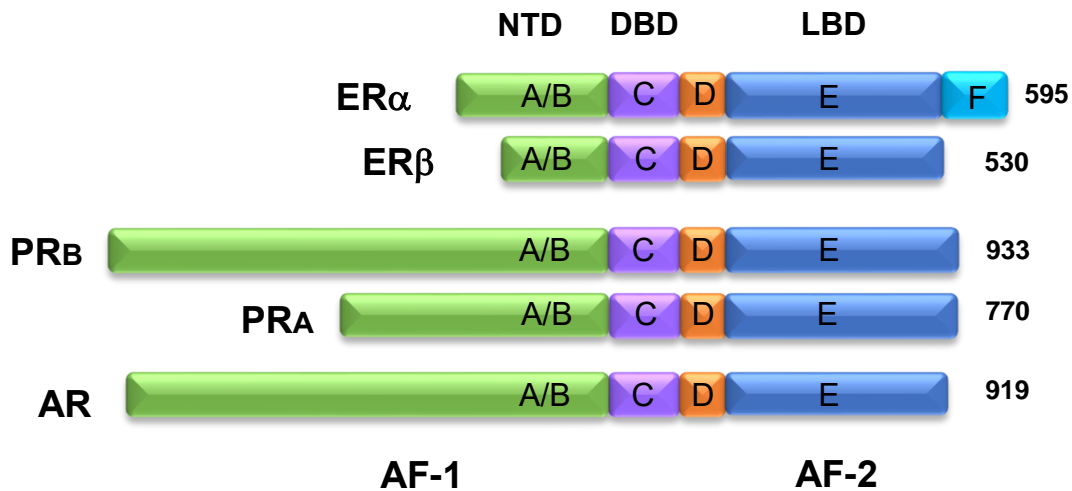


Figura 3. Estructura modular y dominios funcionales de receptores de hormonas esteroides. NTD, dominio amino Terminal; DBD, dominio de unión a DNA; LBD, dominio de unión a ligando; AF-1 y AF-2, regiones de activación transcripcional 1 y 2. (Modificado de Tsai y O'Malley, 1994)

Los receptores nucleares se dividen en distintas categorías: los receptores tipo I se encuentran en el citosol y tras la unión del ligando se disocian las proteínas de choque térmico que los acompañan, lo que ocasiona su translocación nuclear y la formación de homodímeros que se unen a sitios de reconocimiento de DNA (HRE, elementos de respuesta a hormonas). En esta clasificación se encuentran los receptores androgénicos, de estrógenos, de glucocorticoides, de progesterona, entre otros. Los receptores tipo II son retenidos en el núcleo sin importar la presencia del ligando, y se unen formando heterodímeros, usualmente formando un complejo con el receptor X retinoide (RXR). Aquí se incluyen el receptor de ácido retinoico, X retinoide y el de hormona tiroidea. También existen receptores llamados receptores "huérfanos" dado que sus ligandos no han sido aún identificados (Fig. 4) (Giguere, 1999; Mangelsdorf y Evans, 1995).

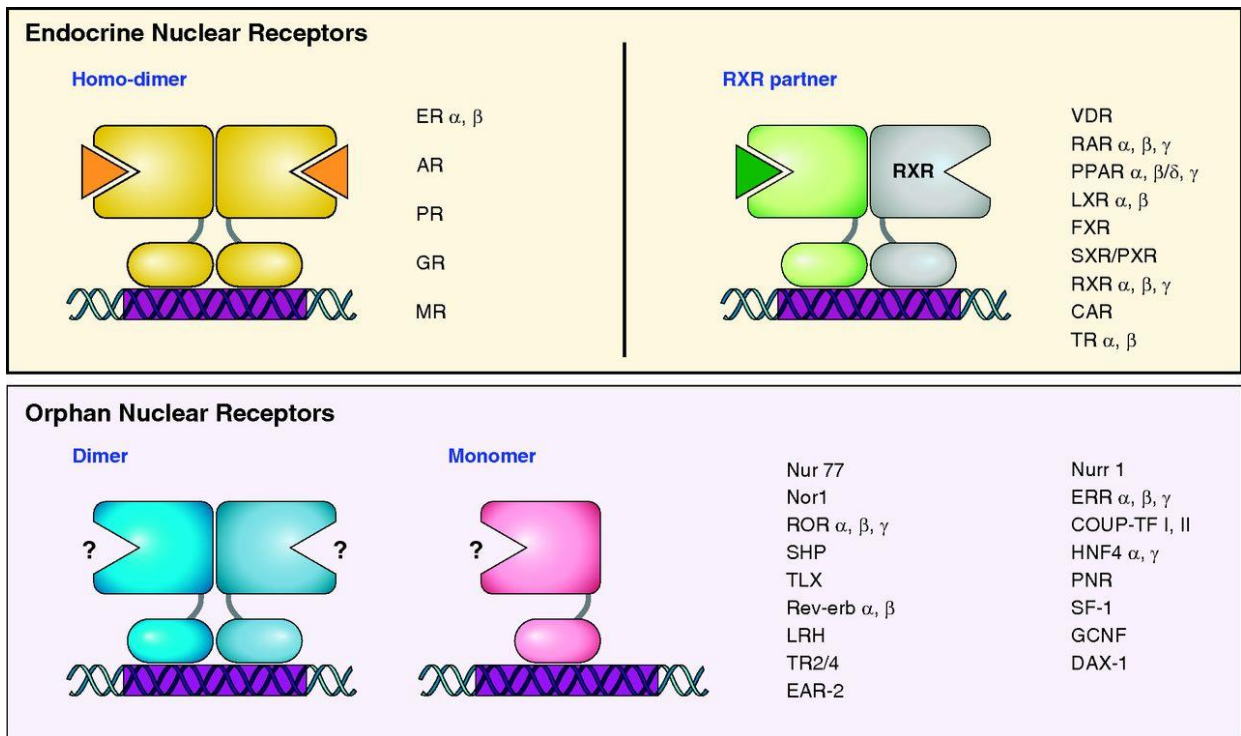


Figura 4. Receptores nucleares tipo I y II. Receptores nucleares “huérfanos” (Imai et al, 2013).

1.4. Correguladores de receptores de hormonas esteroideas

Gran parte del efecto ejercido por los receptores nucleares sobre los elementos de respuesta a hormona depende del reclutamiento de proteínas adicionales llamadas correguladores transcripcionales. Éstos han emergido como reguladores esenciales en la expresión génica a través de su interacción y modulación de la actividad de los receptores nucleares y otros factores de transcripción. De acuerdo al resultado funcional que se obtiene de su acción, se han dividido en dos grandes clases: coactivadores, los cuales están asociados con los receptores nucleares unidos a ligandos agonistas y provocan la inducción de la expresión génica; y los correpresores, los cuales reprimen la expresión génica a través de su interacción con receptores nucleares sin ligando o con su respectivo ligando agonista o antagonista (Fig. 5).

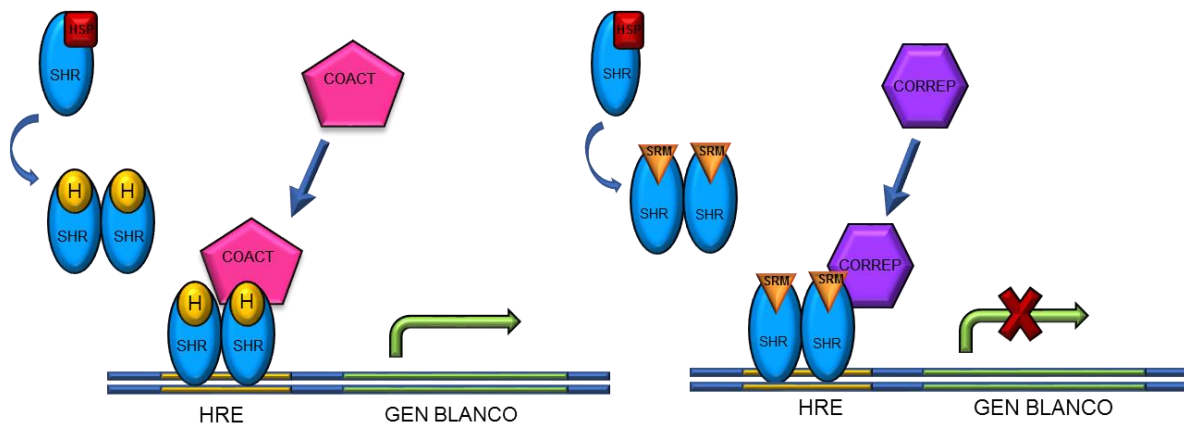


Figura 5. Mecanismo de acción de los receptores esteroides sobre la transcripción génica en el contexto de correpresores y coactivadores. (Modificado de O'Malley et al, 2009)

Tras la unión del ligando agonista a los receptores ocurre un cambio conformacional que ocasiona un incremento de afinidad de unión de las proteínas coactivadoras. Una característica estructural recurrente de los coactivadores es el motivo α -hélice LXXLL, también llamado caja NR, el cual se encuentra en una o varias copias en diversos coactivadores. Los coactivadores tienen una amplia gama de funciones, incluyendo la actividad de acetiltransferasa de histonas, las cuales actúan para generar un ambiente transcripcionalmente permisivo en la zona del promotor (McKenna y O'Malley, 2002).

Por otro lado, la unión de ligandos antagonistas induce un cambio conformacional en los receptores que ocasiona una inhibición de la unión de coactivadores y un incremento en la afinidad de unión de proteínas correpresoras, éstas a su vez, pueden reclutar enzimas como las desacetilasas de histonas o el factor Sin3, el cual posee actividad desacetilasa de histona, que al reducir los grupos acetilo en las histonas crearán un ambiente no permisivo a la transcripción. Los correpresores también pueden unirse en ausencia de ligando o en presencia de ligandos agonistas, en ciertos casos. El reconocimiento de algunos de estos correpresores por el receptor nuclear es mediado por "cajas CoRNR" las cuales son péptidos helicoidales anfipáticos (Nagy et al, 1997).

Los mecanismos por los cuales logran estos efectos de activación o represión génica son variados e incluyen el reclutamiento de complejos remodeladores de cromatina, unión de enzimas acetilasas/desacetilasas o la estabilización de la maquinaria transcripcional a través de la unión de otras proteínas correguladoras, por mencionar algunos. Ya que estos correguladores tienen una enorme influencia sobre la actividad de diversos receptores nucleares y factores de transcripción, ejercen un amplio efecto en las cascadas de señalización y contribuyen significativamente al desarrollo y progresión de múltiples neoplasias.

Desde el descubrimiento de SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1) en 1995, se han identificado más de 400 correguladores, de los cuales se han demostrado sus roles particulares en procesos de crecimiento y desarrollo, siendo que más de la mitad de ellos tienen importantes papeles en diversas patologías reproductivas, metabólicas y neoplásicas. La expresión alterada de correguladores de los receptores nucleares representan el mayor porcentaje de correguladores relacionados a patologías. Aunque es cierto que es posible que esta sobreexpresión o subexpresión de correguladores es más una consecuencia de la neoplasia que una causa, es cierto que la expresión alterada de factores regulatorios que integran las redes de señalización en una célula cancerosa provee el potencial para amplificar las señales que llevan a la progresión de la enfermedad, así como contrarrestar las propiedades de ciertos fármacos terapéuticos. De igual manera, se han descrito muchos genes diana de estos correguladores que juegan un papel fundamental en la progresión y desarrollo de diversos cánceres, como lo son: BCAS2, BCAS3, caveolina 1, ciclina A2, D1, D3, entre muchos genes más (O'Malley et al, 2009; Lanz et al, 2008; Le Marchand et al, 2003; Shu et al, 2005).

La evidencia actual indica que la definición operacional de un coactivador o correpresor, en realidad depende del contexto celular, la vía de señalización involucrada, los genes diana e incluso el tejido en el cual se observa su efecto. Los correguladores existen y funcionan en complejos multiprotéicos. Las funciones habituales en las cuales están involucradas las proteínas coactivadoras incluyen:

remodelación de la cromatina, inicio de la transcripción, elongación de cadenas de RNA, splicing de mRNA e incluso terminación proteolítica de la respuesta transcripcional. También se ha descrito que ciertos corre reguladores pueden ejercer un efecto fuera del núcleo, en procesos como la traducción de mRNA, funciones mitocondriales y motilidad (McKenna et al, 2002; Nagaich et al, 2004; Lonard et al, 2007; O'Malley et al, 2009).

La concentración de coactivadores y corre presores en el ambiente celular es crítica para ejercer sus efectos. Frecuentemente, estos niveles de proteína son regulados mediante la velocidad de degradación post traduccional, dando como resultado que una alta concentración celular de uno o varios coactivadores conlleve a una señal amplificada río abajo de la señalización mediada por los receptores nucleares, mientras que una alta concentración de corre presores ejerce el efecto contrario. Además, se ha demostrado una importancia fundamental del “código post traduccional” en los efectos mediados por estas moléculas, siendo que ciertas combinaciones de modificaciones post traduccionales pueden llevar a funciones ligeramente distintas de la misma secuencia proteica. Aumentando su afinidad a formar ciertos complejos multiprotéicos y, por ende, interactuando de manera preferencial con ciertos elementos reguladores de genes diana y ejecutar distintas funciones en una misma célula. Por ejemplo, se han descrito más de 40 modificaciones post traduccionales distintas en el coactivador SRC-3, las cuales incluyen fosforilaciones, metilaciones, acetilaciones, ubiquitinaciones, SUMOilaciones, entre otras, lo que crea un enorme potencial de formación de complejos con distintas combinaciones (Lonard et al, 2000; Lonard et al, 2008).

EL SRC-3, es uno de los corre reguladores mejor estudiados, y ha servido como prototipo para explicar la gran variedad de funciones y mecanismos de estas moléculas. Se ha reportado sobre expresado en una gran variedad de cánceres como cáncer de mama, nasofaríngeo, de próstata, entre otros. Adicionalmente, esta sobreexpresión se ha asociado con resistencia a inhibidores de ER como tamoxifén y disminución en la expresión de p53 y HER2. El potencial oncogénico

de SRC-3 se ha demostrado en modelos in vivo, en ratones transgénicos, en los cuales, la sobreexpresión de esta molécula causa desarrollo espontáneo de tumores malignos, mientras que en ratones SRC-3 $-/-$, se ha demostrado una resistencia a la inducción de cáncer vía carcinógenos químicos y tumorigenesis inducida por virus. A pesar de haber sido descritos consistentemente sus mecanismos de acción como oncogén, SRC-3 puede actuar, paradójicamente, como un supresor de tumores en el sistema linfático, siendo que estos ratones SRC-3 $-/-$ desarrollan espontáneamente linfoma de células B (Osborne et al, 2003; Lanz et al, 2008; Kuang et al, 2005; Coste et al, 2006).

Respecto a su estructura y dominios de interacción, SRC-3, junto con el resto de su familia que incluye a SRC-1 y 2, posee un dominio C-terminal capaz de mediar su unión con acetiltransferasas de histonas y los corre reguladores CBP y p300, mientras que su dominio N-terminal puede interactuar con corre reguladores adicionales como CoCoA (coiled-coil coactivator), GAC63 (Grip1-associated coactivator 63) y CARM1 (Coactivator associated arginine methyltransferase 1). Además, se ha descrito que, estas relaciones pueden estar moduladas por fosforilaciones postraduccionales de SRC-3, dando como resultado una afinidad diferencial por estas moléculas, dependiendo del sitio y extensión de la fosforilación. Todas estas observaciones plantean un panorama en el cual pueden existir múltiples interacciones y combinaciones diferentes mediadas por una sola proteína corre reguladora, lo que da indicios de la complejidad de la formación de los complejos multiprotéicos reguladores (Chen et al, 2005; Wu et al, 2014).

Como se mencionó brevemente con SRC-3, se ha demostrado que existen corre reguladores que pueden funcionar tanto como coactivadores como corre presores. Un ejemplo muy claro de este fenómeno es el corre regulador MTA1 (Metastatic tumor antigen), el cual se ha identificado como parte del complejo NuRD, siendo que su blanco directo es el ER α , y presenta una importante interacción con HDACs, ocasionando la represión de la actividad transcripcional de ER y promoviendo el crecimiento tumoral independiente de hormona en cáncer de mama. Además de la desacetilación de histonas, el complejo MTA1-HDAC

interactúa y desacetila proteínas como HIF1 α , p53 y el mismo ER α , afectando los mecanismos de acción de estas moléculas. Por otra parte, se han descrito mecanismos de MTA1 como coactivador sobre BCAS3 (breast cancer-amplified sequence 3) y Pax5, gracias a su interacción con la polimerasa de RNA III. También se ha descrito que actúa como coactivador de ciertos genes involucrados en la transición epitelio-mesénquima y procesos de inflamación. Se han planteado varias hipótesis para tratar de explicar esta función dual de la misma molécula, se ha mencionado que podría deberse a modificaciones postraduccionales diferenciales de MTA1 que ocasionen distintas interacciones proteína-proteína, a la abundancia relativa o estabilidad de los complejos de correpresores vs coactivadores, las influencias tiempo-espaciales de la cromatina alrededor de los genes diana o el desplazamiento o competencia entre los complejos proteicos de corre reguladores con HDACs. En la última década se han descrito diversos corre reguladores que muestran esta función dual, lo que recalca la diversidad y versatilidad de acciones que ejercen estas moléculas, dependiendo del contexto celular y tejido donde se observe su función (Zhang et al, 1999; Mazumdar et al, 2001; Gururaj et al, 2006; Balasenthil et al, 2007; Rogatsky et al, 2001; Xu et al, 2001).

Por otra parte, también se han descrito corre reguladores con múltiples funciones más allá de sus propiedades como coactivadores o correpresores. PCBP1 (poly-C binding protein 1) posee múltiples funciones en procesos de transcripción, splicing y traducción. Originalmente, fue una proteína descubierta por sus propiedades de unión a RNA, participando en el procesamiento de mRNA en diversas etapas en el citoplasma, esta función de inhibición de la traducción de mRNAs es dependiente de su fosforilación por p21. Paralelamente, PCBP1 fosforilada es capaz de translocarse al núcleo donde participa en eventos de transcripción y splicing, como proteína corre reguladora se une a el F4E estimulando la transcripción, además es capaz de interactuar con otros corre reguladores como Caper-alpha, lo que afecta el reclutamiento del complejo del spliceosoma incrementando la tasa de mRNA maduro. Se ha descrito que esta función de PCBP1 como coactivador, es dependiente de su fosforilación y su localización nuclear, lo que da indicios de la

capacidad de esta molécula para cambiar entre sus distintas funciones dependiendo de su localización subcelular y estado de fosforilación y, por ende, la gran capacidad de responder a los cambios en las señales del ambiente celular (Meng et al, 2007; Choi et al, 2009).

Específicamente para los correguladores que interactúan con receptores nucleares, se han determinado diversos coactivadores o correpresores propios de cada tipo de neoplasia, en su gran mayoría cánceres endócrinos, y que ejercen su acción sobre determinado receptor nuclear (Tabla 1).

Corregulador	Factor que modula	Cánceres involucrados
SRC-1	PR, ER, GR, TR, AR	Mama, próstata
SRA	PR, ER, GR, TR, AR, RAR α , PPAR δ , VDR	Mama, ovario
E6AP	ER, AR, PR, GR, TR, RAR	Cervicouterino, mama, próstata, leucemia, linfoma
ASC2	ER, GR, TR, RAR, SNF, AP1, NF- κ B	Mama, urotelial, pulmón, colon
PIAS	AR, GR, PR, ER	Próstata, testículo
BRCA1	ER, PR, AR, GR	Mama, ovario, próstata
UbcH7	PR, AR, GR, RAR, ER	Mama
SH3YL1	AR	Próstata, mama
Zimp	AR	Próstata
SRC-2	ER- α , AR	Mama, Próstata
TBLR1	AR, ER	Próstata, Mama

Tabla 1. Principales correguladores involucrados en cáncer (Obeid et al, 2016; Daniels et al, 2014; Fenne et al, 2013).

1.5. Mecanismo y vías de señalización mediadas por el receptor de estrógenos (ER) en cáncer de ovario

El receptor de estrógenos (ER) tiene dos formas generadas a partir de distintos genes: ER α y ER β , ambos contienen los dominios funcionales característicos de la super familia de los receptores nucleares, con distintos porcentajes de homología. La función de activación AF-1 constitutiva en la región A/B tiene tan solo el 20% de

homología entre los receptores, el dominio de unión a DNA presenta una alta homología, la región bisagra tiene una homología del 30%, mientras que el dominio de unión a hormona en el que se encuentra la función de activación de la transcripción AF2 tiene un 55% de homología, la secuencia de aminoácidos únicamente difiere en 2 posiciones, sin embargo esto tiene como consecuencia la formación de una cavidad más reducida en ER β , lo que podría tener significancia en la unión específica de ligandos. Dado que son receptores de tipo I, en ausencia de ligando se encuentran de forma monomérica unidos a proteínas de choque térmico. Al unirse el ligando, se disocian de éstas y forman homodímeros, los cuales a su vez forman un complejo con múltiples moléculas correguladoras, posicionándose en un elemento de unión a ER en la región promotora de sus genes diana para alterar el patrón de transcripción de éstos (Osborne et al, 2001; Zhao et al, 2008; Delaunay et al, 2000).

Se ha encontrado una expresión diferencial de ER α en los diversos subtipos histológicos. Lee y colaboradores (2005), en un estudio inmunohistoquímico de 332 muestras de carcinoma primario de ovario, encontraron que el 77.3% de los casos mostraban positividad para ER, siendo que el más alto porcentaje se encontraba en los subtipos histológicos serosos y endometrioides. No se encontró una asociación significativa entre la presencia de ER y la sobrevida de las pacientes. Anteriormente, Cardillo y colaboradores (1998) encontraron una expresión de ER en el 74.19% en un análisis de tumores de ovario, se encontró una correlación entre la expresión del receptor con la etapa FIGO (Lee et al, 2005; Cardillo et al, 1998).

Sieh y colaboradores (2013) encontraron una correlación significativa entre la expresión de ER y la sobrevida de las pacientes, pero únicamente en carcinomas endometrioides (Sieh et al, 2013).

Se sabe que ER β está altamente expresado en tejido normal de ovario, como las células de la granulosa, las células de la teca, el cuerpo lúteo, los ovocitos, así como cultivos primarios de superficie epitelial de ovario. Bardin y colaboradores

(2004) demostraron una expresión variable de ER β a nivel de mRNA, demostrando una expresión del 72.7% en tejido normal de ovario, 57.1% en quistes de ovario y 29.31% en carcinomas. Además, Chan y colaboradores (2008) mostraron una expresión significativamente mayor en tejidos normales comparados con tejidos con tumores malignos, al igual que una expresión significativamente mayor en tumores etapa I, comparados con etapas II-IV. Se ha demostrado que su expresión se pierde progresivamente durante el desarrollo y progresión del cáncer, y esta pérdida no sólo está asociada a un nivel génico, también hay evidencia que puede ser resultado de cambios epigenéticos, específicamente la hiper metilación de su promotor. De igual manera, se ha demostrado que ER β tiene una localización nuclear en tejidos normales de ovario, pero se localiza en citoplasma en tejidos tumorales (Lau et al, 1999; Bardin et al, 2004; Chan et al, 2008).

Por otra parte, se ha encontrado que una mayor expresión de ER β está significativamente correlacionada con mayor supervivencia, así como periodo libre de enfermedad de las pacientes (Chan et al, 2008).

Se sabe que ER β inhibe la proliferación y motilidad de las células cancerígenas de ovario, también facilita la apoptosis. En estudios de susceptibilidad genética, se ha encontrado que las mujeres con el genotipo rs1271572 TT poseían un riesgo significativamente más alto de desarrollar EOC que las mujeres con el alelo G, esta asociación era aún mayor en mujeres mayores de 50 años. rs1271572 está localizado en el promotor del gen para ER β (ESR2), mapeado en el sitio de unión para MyoD y AP-4, los cuales se ha demostrado, son importantes para la expresión de ER β (Lurie et al, 2011; Bardin et al, 2004; Cheng et al, 2004; Trecek et al, 2007).

Por otra parte, el ER α mantiene su expresión o incluso se ve aumentado en una variedad de tumores de ovario. Bardin y colaboradores (2004) demostraron que no hay una diferencia significativa en la expresión de ER α en muestras de tejido de ovario normales, quistes y carcinomas, siendo que los tres grupos tienen niveles

detectables de esta isoforma. Numerosos estudios han identificado los genes diana del ER α activados por estrógeno, los cuales están involucrados en la proliferación, invasión, y regulación del ciclo celular en cáncer de ovario. Algunos de estos genes son catepsina D, c-fos, pS2, ciclinas, TGF α , fibulina, c-myc, SDF-1, PR y miembros de la familia de la semaforina. También se han descrito ciertos IGFBPs regulados por estrógeno (Rao y Slotman, 1991; Chan et al, 2008; Bardin et al, 2004).

Para demostrar la función de ER α como aquel que estimula la proliferación en células malignas, se han realizado experimentos en líneas celulares tratadas con ligandos específicos para el receptor alfa y beta, mostrando que los tratamientos con PPT, el ligando específico para ER α , pero no con el ligando DNP, específico para ER β , tienen como resultado una estimulación en el crecimiento de estas células, confirmando el rol de ER α en la proliferación mediada por estrógenos. Dado el rol diferencial de estas formas del receptor, la sobreexpresión de ER β resulta en una inhibición de la movilidad e invasión de células de cáncer de ovario (O'Donnell et al, 2005; Feng et al, 2011).

También se han encontrado otras moléculas involucradas en la regulación del ciclo celular las cuales son afectadas de manera diferencial por las dos proteínas. Utilizando la línea celular PEO14 de cáncer de ovario, negativa para ER y realizando transfecciones con ER α o ER β , se encontró que ER α es capaz de activar la expresión de fibulina 1C y el receptor de progesterona (PR) en presencia de 17 β -estradiol, mientras que ER β no muestra este mismo efecto. Además, ER α induce la expresión de ciclina D1 en presencia de estradiol, mientras que ER β inhibe la expresión de esta ciclina de manera independiente de ligando. La introducción de ER β en las células cancerosas es capaz de incrementar cerca de dos veces los niveles de expresión de p21 de manera independiente de ligando. Dados sus efectos sobre moléculas de control del ciclo celular, se demostró que ER β es capaz de inhibir la proliferación celular hasta en un 60%, comparado con células transfectadas con ER α o vector vacío. Igualmente, se demostró una invasión significativamente menor, en ensayos de cierre de herida, en aquellas

células con ER β comparadas con transfecciones con ER α o vector vacío. Finalmente, se ha demostrado un incremento en la apoptosis tras la transfección con ER β , no así con ER α (Bardin et al, 2004).

Es importante mencionar que la estimulación y activación mediada por estrógenos sobre las dos formas es diferente, siendo que, en ensayos de activación de gen reportero con elementos de respuesta a estrógenos, ER α muestra una fuerte activación mientras que ER β tiene una activación de la mitad, comparada el α (Bardin et al, 2004).

De manera general, los genes regulados por estrógeno pueden ser factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento u otras moléculas de señalización. Su más potente activador en ambos subtipos es el 17 β -estradiol (E2). También tiene ligandos conocidos como moduladores selectivos que pueden modificar al receptor de maneras diversas, por ejemplo, el ligando tamoxifén puede ejercer efectos agonistas y antagonistas dependiendo de la especie, tejido y gen diana. Se sabe que este ligando es agonista en hueso y endometrio, pero es antagonista en genes de proliferación celular y supervivencia en mama. Esta acción diferencial está relacionada con la formación de complejos con correguladores que tienen la capacidad de afectar la actividad de ER unido a ligando. Los ligandos esteroideos anti estrogénicos como fulvestrant, también se unen a ER, pero con un efecto diferente, estos ligandos inhiben la dimerización y la unión a DNA. También antagonizan las funciones de activación 1 y 2, así como promover la degradación del mismo ER.

Hay varias vías de señalización que están involucradas en la modulación de la actividad de ER, así como en la proliferación de células tumorigénicas, como la vía AKT, la proliferación celular mediada por MAPKs, ERK1 y 2, y las vías inducidas por estrés mediadas por JNK y p38 MAPKs. A pesar de la complejidad de señalización de estas vías, cada una de ellas puede modular independientemente la actividad de ER. Diversos estudios han demostrado que los estrógenos ejercen una acción pro proliferativa en la progresión del cáncer que puede ser bloqueada

con fármacos antiestrogénicos. Hay evidencia que muestra a los estrógenos como mediadores de una movilidad incrementada e invasión de las células cancerígenas de ovario (Osborne et al, 2001; Galtier et al, 1992; Langdon et al, 1994; Hua et al, 2008).

Gran parte de esta actividad pro proliferativa de los estrógenos ha sido explicada gracias a la identificación de los genes diana de ER α activado, los cuales están involucrados en cascadas de señalización de división y diferenciación celular, sin embargo también se han descrito otros mecanismos como la proteína transmembranal acoplada a proteína G con función de ER transmembranal, llamada GPER, que tiene la capacidad de unir estrógenos y activar sistemas de segundos mensajeros que pueden desencadenar respuestas rápidas. Se ha demostrado que esta cascada de señalización activa a ERK-1/2.

1.6. Mecanismo y vías de señalización mediadas por el receptor de progesterona (PR) en cáncer de ovario

El receptor de progesterona tiene dos isoformas PR-A y PR-B, las cuales difieren por 164 aminoácidos en el extremo N-terminal, los cuales se encuentran en PR-B, pero no en PR-A. Estas isoformas son producto del mismo gen.

Respecto a la expresión de este receptor nuclear en carcinomas de ovario, Diep y colaboradores (2013), en un estudio de cohorte de 504 casos, encontraron un porcentaje de expresión de PR en el 35% de los tumores, siendo que la expresión mayor de PR se encontraba en el subtipo endometroide (67%), seguido de carcinomas serosos de bajo grado (64%) y serosos de alto grado (35%). Utilizando el consorcio internacional Ovarian Tumor Tissue Analysis, con cerca de 3,000 tumores epiteliales invasivos de ovario analizados, se encontró una expresión mayoritaria de PR en carcinomas endometrioides (67%), seguidos de carcinomas serosos de bajo grado (57%) y serosos de alto grado (31%). Adicionalmente, se confirmó que la expresión de PR en carcinomas serosos de alto grado y

endometrioides está correlacionado con un aumento significativo en la supervivencia de las pacientes, la expresión de PR en carcinomas endometrioides está asociado con un incremento en el periodo libre de enfermedad de las pacientes. En el estudio antes mencionado de Lee y colaboradores (2005), se encontró que PR estaba expresado en el 26.2% de los casos, de estos casos positivos para PR, el 64.2% era de tipo endometriode, en este estudio se encontró una asociación significativa entre la presencia de PR y la supervivencia de las pacientes. Anteriormente, Cardillo y colaboradores (1998) encontraron una expresión del 41.16% de PR en tumores de cáncer de ovario (Lee et al, 2005; Cardillo et al, 1998, Sieh et al, 2013; Diep et al, 2013).

Respecto a las isoformas de PR, se ha reportado una expresión diferencial de éstas en tumores de cáncer de ovario. Se ha determinado una dominancia de la expresión de PR-B en los tumores, sin importar el subtipo histológico, encontrándose una mayor expresión de PR-B en los carcinomas serosos. Por otra parte, en un estudio que consolidó información de 12 estudios distintos con 4788 casos y 7614 controles acerca de un SNP funcional (+331/CT), en el receptor de progesterona, el cual altera la transcripción relativa de las dos isoformas PR-A y PR-B, no se encontró una asociación significativa entre el desarrollo de cáncer de ovario y las variantes de PR (Pearce et al, 2008; Akahira et al, 2001).

Algunos estudios muestran que los tratamientos con progesterona resultan en una disminución de la proliferación celular y un incremento de la apoptosis. Esta inducción está asociada con una disminución en la expresión de TGF β 1 y un incremento en la expresión TGF β 2 y TGF β 3, lo que sugiere que esta regulación diferencial de la familia de TGF β podría tener un rol en la inducción de la apoptosis mediada por progestinas. Además de esta inducción de la apoptosis, la activación de PR también ocasiona arresto del ciclo celular y senescencia. Con estudios en líneas celulares y micro arreglos, se han identificado una serie de genes regulados por progesterona entre los que destacan ATF3, caveolina-1, DLC1 y nm23-H2, los cuales se ha demostrado que son genes diana directos de PR activado, y dado que tienen propiedades antitumorales y anti invasivas, se ha propuesto que la

inducción de estos genes podría estar relacionada con los efectos antitumorales inducidos por progesterona. También hay cierta evidencia que demuestra que la progesterona podría actuar en sinergia con otros fármacos quimioterapéuticos para inducir la apoptosis, sin embargo, se han reportado efectos opuestos. Esta controversia podría deberse, en parte, a la acción de las isoformas del receptor de progesterona, PRA y PRB y su expresión diferencial en células diana (Rodríguez et al, 2002; Syed et al, 2007; Takahashi et al, 2009).

1.7. Mecanismo y vías de señalización mediadas por el receptor de andrógenos (AR) en cáncer de ovario

Se sabe que el AR se encuentra expresado tanto en tejido normal de ovario como en cáncer de ovario, y se ha descrito su presencia tanto en tumores como en líneas celulares caracterizadas (OVCAR-3 y OSEC2). Kohan-Ivani y colaboradores (2016), reportaron un incremento significativo de la expresión de AR en tejidos de carcinoma seroso comparados con tejidos sin afectación. Cardillo y colaboradores (1998) reportaron una expresión de AR en el 84% de tejidos de tumor de ovario analizados. Se ha reportado una expresión diferencial de AR en los distintos tipos histológicos de esta neoplasia. Lee y colaboradores (2005) encontraron una expresión de AR en 43.7% de los casos de carcinoma primario de ovario analizados, siendo que los carcinomas serosos representaron el más alto porcentaje de expresión entre los subtipos histológicos (47.5%). También se ha evaluado la relación entre la expresión de AR con otras características clínicas patológicas. Jonsson y colaboradores (2015) demostraron que la negatividad de AR estaba asociada con carcinomas de alto grado, sin embargo, estudios previos han demostrado que no hay una asociación entre la presencia de AR y la etapa FIGO en tumores malignos de ovario (Cardillo et al, 1998; Jonsson et al, 2015; Butler et al, 2013; Lee et al, 2005; Kohan-Ivani et al, 2016).

Diversos estudios han demostrado que el epitelio superficial del ovario es un tejido responsivo a andrógenos. Edmondson y colaboradores (2012), utilizando cultivos primarios de células epiteliales superficiales de ovario, demostraron que el tratamiento con andrógenos causa un incremento en la proliferación y una disminución en la apoptosis. Por otra parte, Syed y colaboradores (2001) demostraron que la testosterona y 5 α -dihidrotestosterona (DHT) estimulan significativamente el crecimiento y proliferación en líneas celulares epiteliales de ovario tanto benignas como malignas, además esta estimulación mediada por andrógenos es revertida por el cotratamiento de estas células con el antiandrógeno 4-hidroxi-flutamida. Sheach y colaboradores (2009), demostraron un aumento en la proliferación en líneas celulares benignas y malignas de cáncer de ovario bajo el estímulo de DHT, así como un incremento en la fracción celular en fase S bajo este estímulo androgénico, además, se encontró una correlación positiva entre el incremento en la localización nuclear de AR con el incremento de la fracción en fase S. Estos efectos eran revertidos por la adición del antagonista específico de AR, Casodex, apoyando la dependencia de AR para causar estos fenómenos (Sheach et al, 2009; Elattar y Edmondson, 2012; Syed et al, 2001).

Se han explorado algunas vías de señalización que podrían estar reguladas por AR en la progresión y desarrollo de cáncer de ovario. Se ha propuesto un rol de AR en el aumento de la proliferación celular mediado por la regulación negativa de la acción de TGF- β , proteína con un papel fundamental en la proliferación y diferenciación celular y que actúa como un inhibidor del crecimiento de las células epiteliales de ovario. Evangelou y colaboradores (2000) demostraron una disminución a nivel de mRNA de los receptores para TGF- β (TGFBR1 y TGFBR2), betaglicano y endogлина, al tratar distintas líneas celulares de ovario con DHT. Se encontró que la disminución de TGFBR2 es dosis dependiente de DHT, y que el tratamiento con DHT previene la inhibición del crecimiento mediado por TGF β -I exógeno. Kohan-Ivani y colaboradores (2016) igualmente demostraron una disminución de TGFBR1 y TGFBR2 a nivel de proteína, bajo tratamiento con DHT,

mientras que los niveles de proteína se recuperaban bajo tratamiento con DHT, indicando la posible actividad de AR-DHT sobre la expresión de las proteínas TGFBR1 y TGFBR2 (Evangelou et al, 2000; Kohan-Ivani, 2016).

Por otra parte, también se ha reportado una disminución en la presencia de p21 en células de cáncer de ovario bajo tratamiento con DHT, así como una degradación de p27 vía proteosoma, bajo este mismo tratamiento (Kohan-Ivani, 2016; Shi et al, 2011).

Respecto a otras vías de señalización involucradas en la proliferación celular, se ha encontrado un efecto positivo del tratamiento con DHT en células de cáncer de ovario sobre la secreción de IL-6 e IL-8, dando como resultado un incremento en la proliferación celular. De igual manera se determinó que el tratamiento con Flutamida inhibe tanto la proliferación celular como la misma producción de estas citocinas. Aunado a esto, se encontró que, en ausencia de andrógenos, IL-6 e IL-8 promueven la expresión de AR, así como la activación de su promotor, dando un panorama en el cual hay una importante regulación entre AR y estas citocinas (Wang et al, 2007).

También se ha demostrado que este efecto de los andrógenos sobre la proliferación celular está asociado a la telomerasa, incrementando su expresión, actividad y fosforilación. De igual manera, la activación de AR parece estimular la invasión celular en cáncer de ovario, como han reportado Ligr y colaboradores (2011), existe una mayor invasión celular de las líneas SKOV-3 y OVCAR-3 bajo tratamiento con andrógenos sintéticos comparados con medios libres de hormona (Shi et al, 2011; Edmondson et al, 2002; Sheach et al, 2009; Gogoi et al, 2008; Ligr et al, 2011).

Respecto de los genes diana del AR, se han identificado más de 100 genes en la línea celular OVCAR-3, la mayoría están relacionados con transcripción, proliferación y señalización por proteínas G. Las proteínas G que fueron inducidas

de manera significativa por este tratamiento de andrógenos son GNA13, ELKS, GSTPI, RERG, Rab25, Rab45 y Rab35. Rab25 es una GTPasa que ha demostrado participación en la proliferación, supervivencia e invasión en líneas celulares de cáncer de ovario y también se ha demostrado su sobreexpresión en cánceres ovario agresivos (Sheach et al, 2009; Yang et al, 2006; Cheng et al, 2004).

Como se ha mencionado anteriormente, se sabe que gran parte del efecto de estos receptores nucleares está altamente controlado por proteínas correguladoras, por lo que éstas cumplen una importante función en la activación o represión de los receptores esteroideos y pueden tener un rol importante en el desarrollo y progresión del cáncer de ovario. Por ejemplo, se conoce que SRC3/AIB1 está amplificado hasta en un 25% en cáncer de ovario.

El corregulador p44/Mep50/WDR77 incrementa la actividad de ER y AR y estimula la proliferación y la invasión en cáncer de ovario en un contexto dependiente de ligando, ejerciendo sus efectos sobre los receptores en presencia de estrógenos o andrógenos, respectivamente. Este corregulador muestra una localización citoplasmática en células superficiales epiteliales de ovario y células epiteliales de tuba uterina, mientras que es mayoritariamente de localización nuclear en carcinomas invasivos de ovario. El coactivador ARA70 (Androgen Receptor-Associated protein 70), uno de los coactivadores mejor estudiados para el AR, es capaz de incrementar hasta 10 veces la actividad de AR, amplificando la acción de los andrógenos sobre líneas celulares de cáncer de ovario. Se ha demostrado una mayor presencia de este coactivador en tejidos de carcinomas invasivos de ovario comparados con tejido normal (Ligr et al, 2011; Shaw et al, 2001).

Finalmente, los correpresores también parecen jugar un papel importante en el cáncer de ovario, se ha demostrado que el 35% de los tumores de ovario

expresan NCoR y el 71% expresan NCoR/SMRT (Bautista et al, 1997; Tanner et al, 2000; Ligr et al, 2011; Shaw et al, 2001; Havrilesky et al, 2011).

Dado el carácter variable de acción de los receptores nucleares dependiente del ligando unido, así como los correguladores involucrados, resulta de suma importancia la identificación y caracterización de estos correguladores que forman el complejo que efectuará la activación o inhibición de los genes diana.

2. Antecedentes

2.1. PinX1 como nuevo corregulador de receptores de hormonas esteroideas

En el Instituto Nacional de Cancerología, en el laboratorio a cargo de la Dra. Elizabeth Langley, se ha caracterizado a PinX1, como un nuevo corregulador en cáncer de mama y cáncer de próstata. PinX1 ya se ha visto involucrada en procesos tumorigénicos en diversos tipos de cánceres y se han identificado múltiples funciones putativas de esta proteína.

La proteína 1 de interacción con Pin2 (PinX1) ha sido identificada como un inhibidor de telomerasa, y un posible supresor de tumores. Fue originalmente identificada y caracterizada por Zhou y colaboradores en 2001. Constantemente se ha encontrado desregulada en diversos tipos de cánceres como mama, cervicouterino, próstata, entre otros. Se encuentra en la región cromosómica 8p23, donde es frecuente la pérdida de heterocigocidad en tumores. La desregulación de PinX1 se encuentran en mayor proporción en carcinomas, donde su expresión es reducida (Zhou et al, 2001; Banik et al, 2004; Zhou et al, 2011).

La elongación telomérica es un evento común en una gran variedad de cánceres epiteliales y se relaciona con etapas avanzadas de progresión del cáncer y mal pronóstico. En células de mamífero, la vigilancia de la acción de la telomerasa es llevada a cabo por 3 proteínas de unión a DNA: TRF1, TRF2 y POT1, así como sus proteínas asociadas. TRF2 y POT1 mantienen la integridad de los telómeros y TRF1 mantiene los telómeros en la longitud adecuada, por lo que proteínas que interaccionan con TRF1 tienen influencia sobre la longitud del telómero. PinX1 regula directamente la función de mantenimiento de TRF1 a través de un mecanismo de retroalimentación negativo y por su interacción con la telomerasa transcriptasa inversa (TERT). Cuando la telomerasa extiende la región telomérica, ésta permite la unión de TRF1 que a su vez recluta PinX1, esta proteína inhibe la actividad de la telomerasa evitando la adición de más repeticiones al telómero.

Pero cuando la región extendida es más corta, se unirá menos TRF1 que a su vez reclutará a menos PinX1 por lo que no habrá inhibición de la adición de repeticiones, creando una secuencia telomérica más larga, de esta manera se mantiene una longitud adecuada de esta región. Una expresión reducida de PinX1 evita la inhibición de la acción de la telomerasa ocasionando alargamiento de los telómeros y causando inestabilidad cromosómica (Fig. 6) (Zhou et al, 2001; Banik et al, 2004; Zhou et al, 2011).

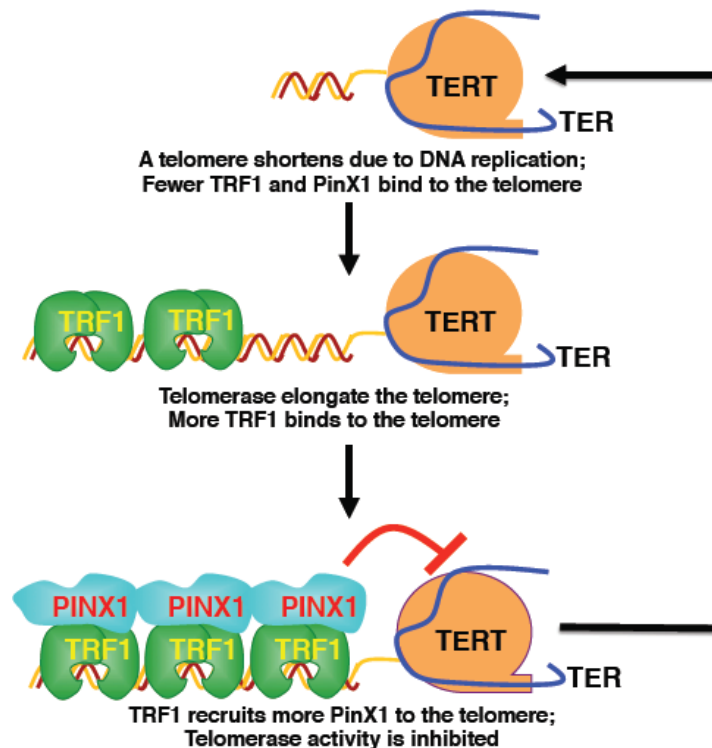


Figura 6. Mecanismo de acción de PinX1 sobre la telomerasa (Zhou, 2011).

Además de esta función como inhibidor de la telomerasa, se le han descrito otras funciones putativas. Se ha observado que en la regulación de la telomerasa mediada por PinX1 en cáncer gástrico está involucrada la vía de señalización Mad/c-Myc. Además, se han reportado que PinX1 es una proteína de unión a microtúbulos esencial para la segregación cromosómica durante la mitosis, siendo que la supresión de PinX1 mediante siRNAs evita la correcta segregación de cromosomas. Adicionalmente, en el promotor de PinX1 se han identificado varios sitios de unión putativos para factores de transcripción como CREB, p53, E2F,

GATA-1, USF, HNF, NF- κ B y C/EBP. Recientemente, se ha demostrado que la expresión de PinX1 es directamente activada por p53 en células de cáncer cervicouterino, y se ha observado que la proteína HPV16 E6 es capaz de inhibir la expresión de PinX1 vía la supresión de la actividad transcripcional de p53, y por ende aumentar la actividad de la telomerasa. Finalmente, se ha descrito que PinX1 es capaz de inhibir la migración e invasión de células ccRCC y BC de tejido renal a través de la supresión de expresión y actividad de MMP-2 y MMP-9 respectivamente, vía la transcripción dependiente de NF- κ B (Wang et al, 2010; Yuan et al, 2009; Wang et al, 2004; Wu et al, 2014).

Respecto a su estructura, PinX1 es una proteína de 328 aminoácidos, cuyo peso molecular teórico es de 37.035 kDa, sin embargo, de manera experimental se ha reportado como una proteína de 45 kDa. También se ha descrito una segunda isoforma de PinX1 de 174 aminoácidos con un peso teórico de 19.714 kDa sin reporte de peso experimental. En su segmento carboxilo terminal se encuentra su dominio de inhibición a la telomerasa (TID), el cual contiene 74 aminoácidos y va de la posición 254 a 328. Específicamente su región 254-289 es la que se une a Pin2/TRF1, esta interacción tiene un papel fundamental en la estabilización de los telómeros. La región 290-328 contiene una señal de localización nucleolar, y es aquella que se puede asociar con TERT para efectuar la inhibición de la actividad de telomerasa. Su segmento amino-terminal contiene un dominio rico en residuos de glicina (G-patch), el cual está involucrado en el proceso de maduración de rRNA y snoRNA y metabolismo del telómero. De manera paralela el G-patch tiene una influencia negativa sobre la localización nucleolar de PinX1. Entre su segmento C-terminal y N-terminal, se localiza un dominio central, el cual tiene cierto efecto mediando la localización nucleolar de TERT (Fig.7) (Chen et al, 2010; Guglielmi et al, 2002; Chen et al, 2014; Yoo et al, 2009; Lin et al, 2007; Zhan et al, 2014).

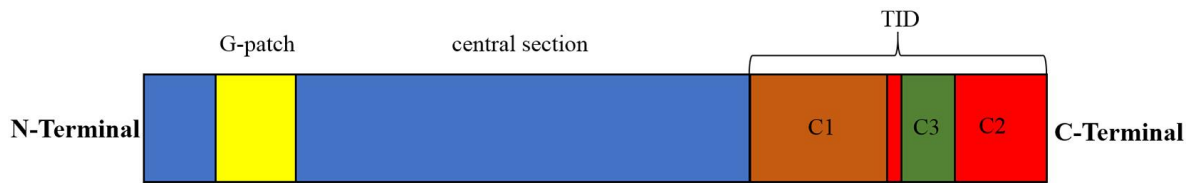


Figura 7. Principales dominios de la proteína humana PinX1 (Li et al, 2016).

Se han realizado diversos estudios para determinar la sobreexpresión o subexpresión de PinX1 en diversos tipos de cánceres y buscar relaciones significativas con factores como pronóstico de paciente, etapa de progresión de la neoplasia, metástasis, entre otros. Se ha observado que la expresión de PinX1 difiere dependiendo del tipo de tumor. Kondo y colaboradores (2005) determinaron una expresión reducida de PinX1 en 68.5% de casos estudiados de cáncer gástrico, siendo que estos tejidos con expresión reducida mostraban una mayor actividad de la telomerasa a comparación de aquellos con expresión normal de PinX1. La pérdida de heterocigosidad en el locus de PinX1 se detectó en el 33.3% de los casos de cáncer gástrico analizados y fue relacionada significativamente con una expresión reducida de PinX1. De igual manera, Ma y colaboradores (2009) reportaron una mayor frecuencia de pérdida de heterocigosidad en los casos de cáncer gástrico con metástasis a nódulo linfático y una mayor etapa de progresión. En conjunto, estos datos han demostrado que la pérdida de PinX1 podría relacionarse con una mayor progresión de este tipo de cáncer (Kondo et al, 2005; Ma et al, 2009).

Respecto a otros tipos de cánceres, Liu y colaboradores (2013) han reportado una disminución de PinX1 tanto a nivel de mRNA como proteína en muestras de cáncer de vejiga comparado con tejido normal, además, los niveles de PinX1 se observaron inversamente correlacionados con la multiplicidad tumoral, mayor etapa de progresión, mayor índice de proliferación y menor supervivencia en los pacientes. Shi y colaboradores (2014) han reportado una expresión reducida de PinX1 en tejidos de cáncer de próstata, y sus niveles de expresión se han visto inversamente correlacionados con etapa de progresión avanzada, puntaje mayor

de Gleason, metástasis positiva a ganglio linfático y metástasis a distintos sitios (Liu et al, 2013; Shi et al, 2014).

Por otro lado, algunos estudios han demostrado un perfil de expresión de PinX1 contrario a lo observado usualmente en varios tipos de cánceres. Quian y colaboradores (2013) demostraron que PinX1 está frecuentemente sobre expresado en tejidos de carcinoma esofágico de células escamosas. Tian y colaboradores (2014) encontraron una sobreexpresión de PinX1 en tejidos de carcinomas primarios cervicouterinos de células escamosas, así como en 5 líneas celulares malignas de cáncer cervicouterino. Esta información sugiere que las funciones de PinX1 en el desarrollo y progresión tumoral pueden ser diversas y depender del tipo de carcinoma sobre el cual se analiza (Quian et al, 2013; Tian et al, 2014).

Ahondando en el tipo de alteraciones que PinX1 podría poseer, Huang y colaboradores (2017) exploraron las alteraciones que PinX1 podría tener a nivel génico, tras el análisis de 105 estudios usando la plataforma de cBioportal Web, encontraron que la delección de PinX1 parece ser común en el genotipo de pacientes con distintos tipos de cáncer, representando la más alta frecuencia de alteraciones génicas en comparación con mutaciones y amplificaciones. Se observa que las mutaciones de PinX1 son más comunes en ciertos tipos de cánceres: carcinoma urotelial de vejiga, adenocarcinoma de pulmón, y melanoma. Se encontraron más de 33 sitios de mutación distintas localizadas entre los aminoácidos 150-328, de los cuales únicamente 3 sitios se consideran mutaciones nivel 2 (S161N/R, A175T, R209C/H), y se localizan en el dominio funcional de la proteína, el dominio de localización nucleolar y el dominio de inhibición a la telomerasa, lo que impediría la formación del complejo PinX1-TRF1-TERT, y por ende promovería la elongación de los telómeros en estas células. Como se ha mencionado antes, es frecuente la pérdida de heterocigocidad en el cromosoma 8p23 en diversas neoplasias, explicando la mayor frecuencia de delecciones de PinX1 en los casos de estudio. Aparentemente, la copia homóloga de PinX1 resulta insuficiente para ejercer su acción completa de inhibición de la actividad de

la telomerasa, resultando en la inmortalización de las células afectadas. Estas observaciones sugieren que las mutaciones somáticas en el gen de PinX1, no son el mecanismo predominante para la inactivación de PinX1, siendo más relevante la pérdida de heterocigocidad que parece jugar el papel fundamental en la inactivación de PinX1 (Johnson et al, 2011; Cheung et al, 2017; Zhou et al, 2011; Kim et al, 2012; Huang et al, 2017).

Parece ser que la regulación ejercida por PinX1 es tejido específica y sus funciones en la progresión y desarrollo de diversos tipos de cáncer podrían tener una importante participación de otras moléculas correguladoras. Utilizando igualmente el portal cBioportal, se encontraron ciertos genes con una correlación positiva con PinX1 entre los que destacan: NEIL2, R3HCC1, POLR3D, GTF2E2 e INTS10. Respecto a las funciones de los productos de estos genes, se sabe que NEIL2 participa en la reparación de DNA por escisión de bases en daños por especies reactivas de oxígeno. POLR3D participa en el bloqueo de la progresión del ciclo celular en G1. GTF2E2, también llamado TFIIE, es parte del complejo de iniciación de la polimerasa II de RNA. INTS10 es una subunidad del complejo integrador que se asocia con la polimerasa II de RNA y participa en la maduración de los mRNAs, así como el procesamiento de los snRNAs U1 y U2. Además, se determinó que PinX1 es capaz de interactuar con TERT, DCK1, PTGES3 y HSP90AA1, moléculas conectadas con procesos celulares como: el mantenimiento de los telómeros, reparación de DNA y procesos de señalización (Huang et al, 2017; Dou et al, 2003; Ittmann et al, 1994; Kuschal et al, 2016; Baillat et al, 2005; Hope et al, 2008; Patel et al, 2016; Marcos-Carcavilla et al, 2008).

Específicamente, para el cáncer de ovario se ha demostrado que existe una expresión disminuida de la proteína PinX1 en esta enfermedad, y se ha encontrado una correlación con el desarrollo tumoral y como un factor de mal pronóstico. En un análisis de tejidos de tumores de ovario epiteliales se encontró un 100% de positividad para PinX1 en tejidos catalogados como normales, un 84% para cistoadenomas, 76% para tumores “borderline” y 66% para carcinomas de ovario, demostrando una fuerte correlación entre la expresión reducida de

PinX1 con pacientes con mal pronóstico, caracterizado por metástasis de nódulo linfático, metástasis distante y etapa tardía según FIGO. También se encontró una importante correlación entre la pérdida de PinX1 y el acotamiento de supervivencia de la paciente (Cai et al, 2010).

De acuerdo con datos de la plataforma Oncomine, Lu y colaboradores (2004) reportan una aparente sobreexpresión de PinX1 a nivel de mRNA en distintos tipos de cáncer de ovario en comparación con tejido normal. Yoshihara y colaboradores (2009) reportan una disminución en los niveles de PinX1 a nivel de mRNA en tejidos de adenocarcinoma seroso de ovario en comparación con tejido normal. Mientras que un reporte de TCGA, conjuntando más de 1000 casos analizados, reporta una disminución de expresión de PinX1 en tejidos de cistoadenocarcinoma seroso de ovario en comparación con tejido normal (Lu et al, 2004; Yoshihara et al, 2009; TCGA, 2013).

Finalmente, Huang y colaboradores (2017) demostraron que la inhibición de PinX1 mediante siRNAs (KD) potencializa la proliferación en líneas celulares de diversos tipos de cánceres, entre las que se encuentran las líneas celulares SKOV-3 y Hey, de cáncer de ovario (Huang et al, 2017).

Aunado a estos mecanismos de acción de PinX1, en estudios en nuestro laboratorio se ha mostrado que esta proteína interactúa de manera directa con receptores de hormonas esteroideas. Se ha mostrado que PinX1 interactúa con ER α y ER β en su dominio N-terminal en presencia de su ligando E2. PinX1 funge como correpresor del ER α en líneas celulares de cáncer de mama, reprimiendo la activación transcripcional de manera dependiente de E2, y se observa que es reclutado al promotor de genes diana del complejo ER α -ligando. Tras la sobreexpresión de PinX1 y la adición de E2, se observa una expresión disminuida de los genes IGFBP2, CASP8, pS2, y PR, es interesante notar que los genes CSTD y C-MYC poseen una regulación a la baja tras la sobreexpresión de PinX1 de manera independiente de E2, sugiriendo un posible papel regulador de PinX1 sobre estos genes de manera independiente de hormona. Igualmente, en líneas

celulares de cáncer de mama, se observa que PinX1 es un coactivador de PR dependiente de la adición de P4. Se ha mostrado que la sobreexpresión de PinX1 en células cancerígenas de mama inhibe proliferación de manera dependiente de E2, y que la depleción de PinX1 incrementa la proliferación celular, tanto en presencia como en ausencia de E2. De igual manera la depleción de PinX1 ocasiona un aumento en la formación de colonias (Noriega-Reyes et al, 2015).

Por otra parte, también se ha reportado que PinX1 es capaz de interactuar de manera directa con AR tanto en presencia como en ausencia de ligando. En líneas celulares de cáncer de próstata, PinX1 actúa como coactivador de AR de manera dependiente de la adición de DHT y con menor significancia de manera independiente de ligando. De manera dependiente de DHT, la sobreexpresión de PinX1 induce la expresión del gen PSA y tras la adición de su ligando antagonista Flutamida, induce la expresión del gen Nkx.3. Además, en estas líneas celulares, se observa que PinX1 actúa como correpressor de ER α en presencia de su ligando específico PPT y coactivador de ER β en presencia de DPN. De manera contraria a lo observado en líneas celulares de cáncer de mama, la sobreexpresión de PinX1 da por resultado un incremento en la proliferación andrógeno regulada en células de cáncer de próstata, así como un aumento en la migración celular. Estos datos mostrados en cáncer de mama y cáncer de próstata dan indicios de la importancia de analizar a la proteína PinX1 en un contexto celular específico, en el cual sus funciones como activador o represor de la actividad transcripcional mediada por receptores de hormonas esteroideas dependen tanto del tejido analizado como del recetor sobre el cual actúa (Flores-Ramírez et al, en preparación; Noriega-Reyes et al, 2015).

Finalmente, dada su relevancia hasta ahora demostrada como gen supresor de tumores y sus múltiples funciones reguladoras sobre funciones celulares, se han realizado diversos estudios que describen su posible eficacia como blanco terapéutico. Por ejemplo, se ha demostrado que la sobreexpresión de PinX1 suprime el crecimiento de células de hepatocarcinoma, mientras que la inhibición de PinX1 potencializa el crecimiento celular. También se ha descrito que Pinx1

disminuye la invasión y metástasis en carcinomas renales y de mama, tanto de manera in vitro como in vivo, lo cual también se ha observado para otros tumores como fibrosarcoma, carcinoma hepatocelular, linfoma de Burkitt, carcinoma nasofaríngeo y cáncer esofágico. Aunado a estas observaciones, ya se han comenzado a estudiar posibles mecanismos de sobreexpresión de esta molécula con fines terapéuticos. Chen y colaboradores (2011), fusionaron el dominio TID de PinX1 con un polipéptido capaz de translocarse a través de la membrana celular, obteniendo una eficiente transducción de esta proteína en células de carcinomas hepatocelulares y células de hepatoblastoma en ratones, se observó un acortamiento del telómero, proliferación limitada e inhibición de crecimiento de tumores de estas células. Zang y colaboradores (2011) generaron proteínas recombinantes conteniendo mBAFF (un ligando para terapia dirigida contra neoplasias con receptor BAFF positivo) y PinX1, para atacar células de linfoma, exitosamente, estas proteínas de fusión fueron capaces de matar las células positivas para BAFF en linfomas de Burkitt. Experimentos terapéuticos usando proteínas de fusión conteniendo el carboxilo terminal de PinX1 en ratones SCID implantados con células Raji, mostraron una prolongación en la supervivencia, lo que indica las posibles propiedades antitumorales de esta proteína (Li et al, 2015; Zhang et al, 2009; Chen et al, 2011; Zhang et al 2011; Lai et al, 2012; Zuo et al, 2013).

Explorando su posible sinergia con otras moléculas terapéuticas, Long y colaboradores (2014) combinaron doxorrubicina con un siRNA para PinX1 en una nanopartícula, encontrando que este compuesto tiene un rol efectivo en la inhibición de gliomas. También se ha demostrado que la sobreexpresión de PinX1 puede potencializar la sensibilidad a 5-fluorouracilo en líneas de cáncer gástrico. Se ha descrito que el knockdown de PinX1 potencializa la citotoxicidad de paclitaxel a células escamosas de carcinoma cervicouterino, así como la sensibilidad a la radioterapia y quimioterapia en el tratamiento de esofágico de células escamosas (Long et al, 2014; Wang et al, 2011; Tan et al, 2014).

3. Justificación

Según datos epidemiológicos que reportan la presencia de receptores de hormonas esteroideas en biopsias de cáncer de ovario, así como la activación de la transcripción de ciertos genes en este tejido, los cuales son dependientes del complejo receptor-ligando, se ha determinado que el cáncer de ovario podría tener una estrecha regulación mediada por hormonas esteroideas. La regulación ejercida por este receptor y su respectivo ligando es dependiente de un contexto celular en el cual se ven involucradas moléculas denominadas corre reguladores, los cuales son capaces de aumentar o inhibir las funciones de transcripción.

PinX1 es una proteína ampliamente descrita en biopsias de diversos cánceres, con funciones relacionadas a la telomerasa, y de manera novedosa, descrita como una molécula corre reguladora de receptores de hormonas esteroideas. Se ha reportado una expresión decremada de PinX1 en la progresión del cáncer de ovario (Cai et al, 2010), lo que sugiere una función crítica de PinX1 en el desarrollo de esta neoplasia. Dada la información reportada de PinX1 como corre regulador en cáncer de mama y próstata, siendo estas neoplasias reguladas por hormonas igualmente, resulta de interés determinar los efectos de PinX1 sobre los receptores de hormonas esteroideas en células de cáncer de ovario, así como los efectos de su sobreexpresión en el crecimiento celular in vitro, con el fin de comenzar a dilucidar las funciones de PinX1 sobre la regulación de esta enfermedad.

4. Planteamiento del problema / Pregunta de investigación

Debido a que no se conoce si PinX1 tiene funciones de corregulador en las células de cáncer de ovario, y si es capaz de aumentar o inhibir la actividad transcripcional de los receptores de hormonas esteroideas ER α y AR, y si su sobreexpresión es capaz de modular funciones de crecimiento celular *in vitro*, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

¿La proteína PinX1 es capaz de actuar como corregulador de los receptores de hormonas esteroideas ER α y AR, aumentando o disminuyendo su actividad transcripcional, en líneas celulares de cáncer de ovario?

¿La sobreexpresión estable de PinX1 en líneas celulares de cáncer de ovario es capaz de inhibir la proliferación celular y la formación de colonias?

5. Hipótesis

La proteína PinX1 actúa como corregulador de los receptores nucleares ER α , y AR en líneas celulares de cáncer de ovario, y su sobreexpresión inhibe la proliferación celular y la formación de colonias en estas células.

6. Objetivo General

Caracterización de la actividad de PinX1 como modulador de los efectos de hormonas esteroides, estradiol (E2) y dihidrotestosterona (DHT), mediadas por sus receptores nucleares específicos en células de cáncer de ovario y determinar los efectos de su sobreexpresión sobre la proliferación celular y la clonogenicidad en estas células.

6.1. Objetivos particulares

1. Caracterización de líneas celulares de ovario para determinar la presencia de receptores nucleares, ER, PR y AR, y PinX1, en términos de expresión de mensajero y proteína.
2. Determinar la localización de PinX1 dentro de la célula y su colocalización con receptores nucleares.
3. Determinar los efectos de la sobreexpresión de PinX1 sobre los receptores de hormonas esteroides en presencia de sus respectivos ligandos agonistas.
4. Determinar los efectos proliferativos de la sobreexpresión de PinX1 en presencia y ausencia de estradiol y dihidrotestosterona.
5. Determinar los efectos de la sobreexpresión de PinX1 sobre la clonogenicidad de líneas celulares de cáncer de ovario en presencia y ausencia de ligandos agonistas y antagonistas de ER y AR.

7. Materiales y métodos

7.1. Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares de cáncer de ovario: OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3 en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 5% y 100 U/mL penicilina/estreptomicina, CO₂ al 5%, en atmósfera humidificada y 37°C. La línea celular OVCAR-3 fue cultivada en medio RPMI suplementado al 8% con suero fetal bovino (FBS). Para los tratamientos con hormonas, se reemplazó el medio de cultivo por medio libre de rojo fenol adicionado con suero fetal bovino tratado con carbón activado (sFBS) al 3%, DMEM o RPMI según la línea celular.

Características de las líneas celulares:

SK-OV-3

Tejido de ovario (ascitis), morfología epitelial, adenocarcinoma, hipodiploide. Sin reporte de receptores nucleares en ATCC. Reportado receptor ER α , ER β (Lau et al, 1999).

La línea celular SKOV3 se ha descrito como resistente a los tratamientos con estrógenos y antiestrógenos, lo cual está asociado con la pérdida de PR y la sobreexpresión de HER-2. También se ha descrito una delección de 32 pares de bases en el exón 1 del ER α en esta línea celular (Hua et al, 1995; Lau et al, 1999).

OVCAR-3

Tejido de ovario (ascitis), morfología epitelial, adenocarcinoma, aneuploide. Positiva para ER, AR y PR según ATCC, AR positivo (Sheach et al, 2009).

OV-90

Tejido de ovario, derivada de sitio metastásico (ascitis), morfología epitelial, adenocarcinoma papilar seroso maligno, grado 3, etapa IIIC. Sin reporte de receptores nucleares en ATCC.

TOV-21G

Tejido de ovario, morfología epitelial, adenocarcinoma primario maligno, grado 3, etapa III, carcinoma de célula clara. Sin reporte de receptores nucleares en ATCC.

TOV-112D

Tejido de ovario, morfología epitelial, adenocarcinoma primario maligno, grado 3, etapa IIIC, carcinoma endometroide. Sin reporte de receptores nucleares en ATCC.

7.2. Extracción RNA y obtención de cDNA

Se realizó la extracción de RNA de las líneas celulares antes mencionadas utilizando el reactivo TRIzol Reagent (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del proveedor. Se verificó la presencia de las 2 bandas propias de las subunidades ribosomales (18S y 28S) en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente se procedió a tratar 1µg del RNA obtenido con DNasa para eliminar los trazos de DNA, utilizando el reactivo DNase I, RNase Free (Invitrogen), según instrucciones del proveedor. Se obtuvo cDNA a partir del RNA previamente tratado utilizando el reactivo SuperScript IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) según instrucciones del proveedor.

7.3. PCR a partir de cDNA

A partir del cDNA obtenido, se amplificaron los receptores ER α , ER β , AR, PR, GR y como control GAPDH según los oligonucleótidos diseñados (Tabla 2).

Primer	Secuencia	Tm (°C)	Long. producto
ER α fw	GTGTACCTGGACAGCAGCAAG	58.2	192 nt
ER α rev	CGGAGACACGCTGTTGAGTG	58.3	
ER α fw	GTGGTCCATCGCCAGTTATC	55.6	169 nt
ER α rev	CATCCCTCTTTGAACCTGGAC	55.4	
PR fw	CAGCTGCTGGAAGACGAAAG	56.2	214 nt
PR rev	CTTCCTCCTCCTCCTTTATC	51.5	
AR fw	CGCTTCTACCAGCTCACCAA	60.0	111 nt
AR rev	AAAGTCCACGCTCACCATGT	59.9	
GR fw	CGGGAGAAGACGATTCATTC	53.0	150 nt
GR rev	CTGTTTTCACTTGGGGCAGTG	56.7	
GAPDH fw	CCTCAACGACCACTTTGTCA	55.1	169 nt
GAPDH rev	CCCTGTTGCTGTAGCCAAAT	55.6	

Tabla 2. Oligonucleótidos para la amplificación de receptores nucleares y GAPDH.

7.4. Western Blot

Se realizó un protocolo de Western Blot para determinar la presencia de los SHR en las líneas celulares, así como GAPDH y PinX1 a nivel de proteína. Se realizó la extracción y cuantificación proteica a partir de las líneas celulares antes mencionadas, cultivadas en medio rojo fenol en ausencia de hormona o ligando específico y hasta alcanzar el 80% de confluencia.

Para cuantificar la concentración de proteína se utilizó un ensayo con curva tipo de BSA (Invitrogen), para determinar la concentración proteica de las muestras. Se analizaron en un gel SDS-PAGE, 20 μ g de proteína en cada pozo, y se utilizó el marcador PageRuler™ (Thermo Scientific). Para la separación de las proteínas a

analizar se utilizó un gel espaciador SDS-PAGE a una concentración del 12% y 5% para el gel concentrador.

Se utilizó el anticuerpo primario del control GAPDH de la marca Santa Cruz a una dilución 1:5000, y el anticuerpo para PinX1 de la marca Abcam a una dilución 1:5000; posteriormente el anticuerpo secundario correspondiente, a una dilución de 1:10,000 de la marca Jackson ImmunoResearch Laboratories.

- GAPDH (I-18) sc-48167 goat polyclonal
- PinX1 (ab190252) rabbit monoclonal

7.5. Inmunofluorescencia

Se realizó un protocolo de detección de receptores nucleares, así como la molécula de interés PinX1 a través de una técnica de inmunofluorescencia indirecta, de manera individual y colocalizada, con el uso de microscopía confocal (Leica Microsystems). Se determinó la expresión de estas moléculas en células cultivadas en medio rojo fenol en ausencia de hormona o ligando, hasta alcanzar una confluencia del 70% en todas las líneas celulares. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% durante 20 minutos, posteriormente se bloqueó con PBS Tritón al 1% y PBS con FHS (suero fetal de caballo) al 5% durante una hora cada uno. Se utilizaron anticuerpos primarios de la marca Santa Cruz para los receptores nucleares, así como el anticuerpo PinX1 de la marca Abcam, con la dilución recomendada en la hoja técnica (1:50):

- ER α (D-12) sc-8005 mouse monoclonal
- ER β (H-150) sc-8974 rabbit polyclonal
- AR (441) sc-7305 mouse monoclonal
- PR (H-100) sc-7208 rabbit polyclonal
- PinX1 (ab190252) rabbit monoclonal

Los anticuerpos secundarios acoplados a fluorescencia utilizados fueron los siguientes de la marca Invitrogen:

- Alexa fluor 647 donkey antimouse
- Alexa fluor 488 goat antirabbit

Para la tinción del núcleo se utilizó una solución de DAPI durante 2 minutos y posteriormente se sellaron las laminillas con Vecta-Shield (Vecto Laboratories).

Para determinar la colocalización de los receptores nucleares con la molécula de interés, se realizaron tratamientos en ausencia y presencia de hormona, con una duración de 48 horas previas a la fijación de células. Los ensayos se realizaron de la misma manera descrita previamente. Para el procedimiento de colocalización, se colocó el anticuerpo primario durante 24 horas, los anticuerpos fluorescentes secundarios durante 1 hora para cada ocasión, y el segundo anticuerpo primario, Pinx1 de la marca Abcam a una dilución 1:50, se colocó durante 60 minutos.

7.6. Transfección estable de líneas celulares

Las células fueron cultivadas 24 horas antes de la transfección, en medio DMEM o RPMI, libre de rojo fenol, suplementado con 3% sFBS para obtener un 80-90% de confluencia. Se utilizó el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) siguiendo indicaciones del proveedor y realizando la transfección del plásmido para PinX1 o el vector vacío. El constructo del plásmido de PinX1 tiene como base el plásmido pcDNA3.1/His/A, el cual fue modificado agregando la secuencia codificante de PinX1. Como vector vacío se utilizó pcDNA3.1/His/A. En placas de 6 pozos, se transfectó 1µg de plásmido de PinX1 o vector vacío en cada pozo con un volumen de medio de cultivo de 2ml. La transfección se retiró tras 24 horas y se procedió a seleccionar las células con expresión estable de PinX1 o VV, con el antibiótico G418 a una concentración de 0.8 mg/ml durante 15 días.

7.7. Ensayo de proliferación celular

Las líneas celulares con la sobreexpresión estable de PinX1 o el vector vacío, fueron cultivadas en placas de 96 pozos en medio libre de rojo fenol, según lo indicado para cada línea celular (DMEM o RPMI) donde se realizaron los tratamientos en presencia y ausencia de hormonas: EtOH o DHT 20 nM o E2 20 nM. Finalmente, se procedió a medir la viabilidad celular con el reactivo XTT (Thermo Fisher) según instrucciones del proveedor, tras 24, 48 y 72 horas de proliferación bajo las distintas condiciones de tratamiento. Se realizaron 3 experimentos independientes, los cuales poseen la misma tendencia. Se muestra la gráfica con los datos de un experimento con 5 repeticiones y una prueba t-student no pareada para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y sobreexpresión estable de PinX1 vs control.

7.8. Ensayo de clonogenicidad celular

Las líneas celulares con la sobreexpresión estable de PinX1 o el vector vacío, fueron cultivadas en placas de 6 pozos donde se realizaron los tratamientos en presencia y ausencia de hormonas (E2 20 nM o DHT 20 m), y presencia o ausencia de ligando antagonista (Tamoxifen 200 nM o Flutamida 200 nM). Finalmente se procedió a realizar un protocolo de fijación de las colonias con Cristal Violeta tras 10 días de crecimiento celular bajo las distintas condiciones de tratamiento. Para la tinción de las colonias con Cristal Violeta (1% peso/volumen en dH₂O) se realizó un tratamiento durante 30 minutos con el colorante seguido de 5-6 lavados con dH₂O hasta eliminar el colorante residual. Se procedió a tomar fotografías de las placas.

Para contar las colonias se utilizó el software Clono-Counter, ajustando los parámetros "Threshold", (ajuste en escala de grises del fondo), "Minimum" (píxeles mínimos que contiene cada colonia visualizada) y "Gray width" (discriminación entre una colonia o agrupación de múltiples colonias). Se graficó con los datos de

3 experimentos independientes y se realizó una prueba t-student no pareada para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y sobreexpresión estable de PinX1 vs control.

7.9. Ensayo de luciferasa

Tras 24 horas de crecimiento celular en placas de 24 pozos, alcanzando una confluencia del ~80% se realizó un protocolo de transfección utilizando el reactivo Lipofectamine 2000 (Invitrogen) y los siguientes plásmidos: 200 ng plásmido reportero (MMTV-Luc para los ensayos con el receptor de andrógenos o 3xERE-Luc para los ensayos con el receptor de estrógenos), 10 ng de plásmido reportero pCMV- β -galactosidasa, 50 ng de plásmidos con los receptores ER α , AR o vector vacío, y 100 ng de plásmido de expresión para PinX1 (Tabla 3-4). Los extractos celulares se prepararon tras 48 horas de tratamiento en presencia o ausencia de 17 β -estradiol (E2) 20 nM o dihidrotestosterona (DHT) 20 nM. Se efectuó un ensayo de actividad de luciferasa y β -galactosidasa en el mismo tubo utilizando el equipo GloMax® 96 Microplate Luminometer (Promega). Se realizaron 3 experimentos independientes, los cuales muestran la misma tendencia. Se graficó con los datos por triplicado de un experimento y se realizó una prueba t-student no pareada para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y sobreexpresión de PinX1 vs control.

200 ng 3xERE-Luc			
10 ng β -gal			
50 ng ER α		50 ng pcDNA	
100 ng PinX1	100 ng pcDNA	100 ng PinX1	100 ng pcDNA

Tabla 3. Plásmidos transfectados para ensayo de luciferasa, actividad de ER α .

200 ng MMTV			
10 ng β -gal			
50 ng AR		50 ng pcDNA	
100 ng PinX1	100 ng pcDNA	100 ng PinX1	100 ng pcDNA

Tabla 4. Plásmidos transfectados para ensayo de luciferasa, actividad de AR.

7.10. Análisis estadístico

Para determinar las diferencias significativas entre los distintos tratamientos, se verificó que los datos tuvieran una distribución normal mediante la prueba Shapiro-Wilk, posteriormente se realizaron pruebas t-student no pareadas comprando los grupos de interés para determinar la existencia de diferencias significativas entre ellos, calculando el valor de p. Las diferencias significativas son definidas por una $p < 0.05$ o $p < 0.01$. Se realizaron 3 experimentos independientes, los cuales muestran la misma tendencia, se expone el análisis estadístico y la gráfica de un experimento representativo.

Para el análisis por densitometría de PinX1 por Western Blot en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D, SK-OV-3 y HEKT-293. Se realizó un análisis ANOVA unidireccional con prueba Tukey para determinar líneas celulares con diferencia significativa.

8. Resultados

8.1. Determinación de mRNA de receptores de hormonas esteroideas en líneas celulares de cáncer de ovario por RT-PCR

Con el fin de caracterizar las líneas celulares a analizar, dada la relevancia de los receptores nucleares para el desarrollo del proyecto, y a falta de literatura que describiera previamente la presencia o ausencia de estas moléculas de interés para todas las líneas celulares utilizadas, se inició por determinar la presencia de los receptores nucleares ER α , ER β , AR y PR a nivel de mRNA en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3.

Se describe la presencia de los receptores ER α , ER β , AR y PR a nivel de mRNA en todas líneas celulares antes mencionadas, comparando el fragmento de mRNA esperado según su longitud en pares de bases, así como la comparación con el plásmido control que contiene el receptor de interés y el cual fue amplificado utilizando el mismo protocolo y bajo las mismas condiciones experimentales (Fig. 8).

Todas las líneas celulares analizadas (OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3) se reportan positivas para la presencia de mRNA de los receptores nucleares ER α , ER β , AR, PR y GR (Tabla 5).

Líneas celulares					
Receptor	OVCAR-3	OV-90	TOV-21G	TOV-112D	SK-OV-3
ER α	+	+	+	+	+
ER β	+	+	+	+	+
AR	+	+	+	+	+
PR	+	+	+	+	+
GR	+	+	+	+	+

Tabla 5. Presencia de mRNA de los SHR ER α , ER β , AR, PR y GR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3.

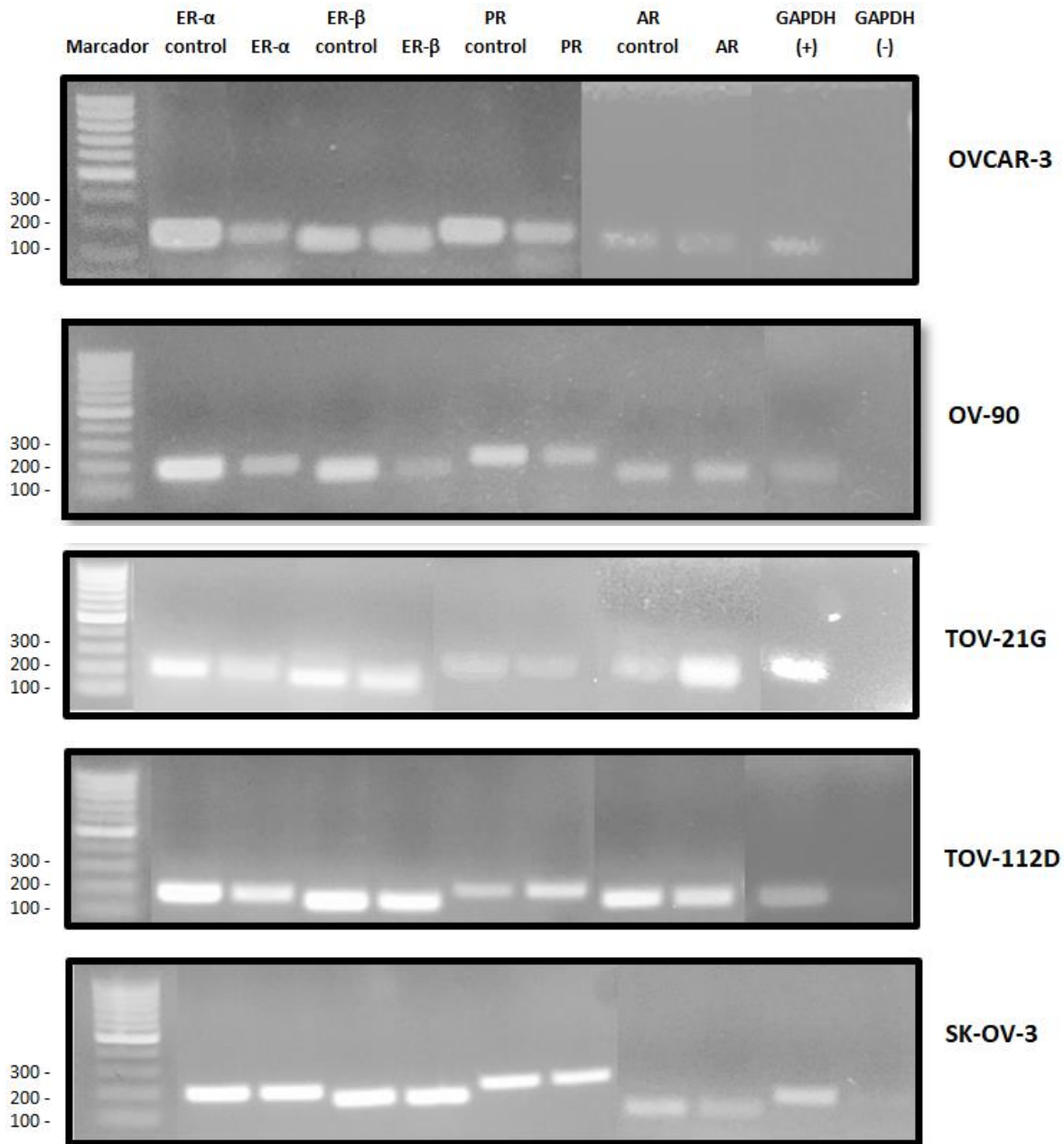
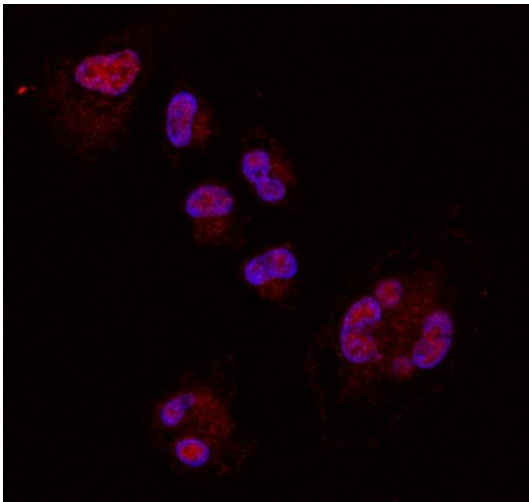


Figura 8. Expresión de mRNA de SHR, productos de RT-PCR a punto final en gel de agarosa al 5%. Líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3. Se muestran controles de plásmidos de SHR. Se muestra experimento representativo de 2 repeticiones.

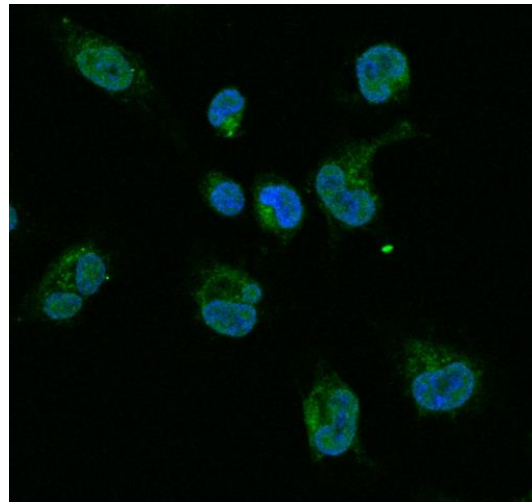
8.2. Expresión y localización de receptores de hormonas esteroideas en líneas celulares de cáncer de ovario por inmunofluorescencia.

Continuando con la caracterización de los receptores nucleares en las líneas celulares, se determinó la presencia de los receptores nucleares ER α , ER β , AR y PR a nivel de proteína mediante una técnica de inmunofluorescencia en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3 (Fig. 9).

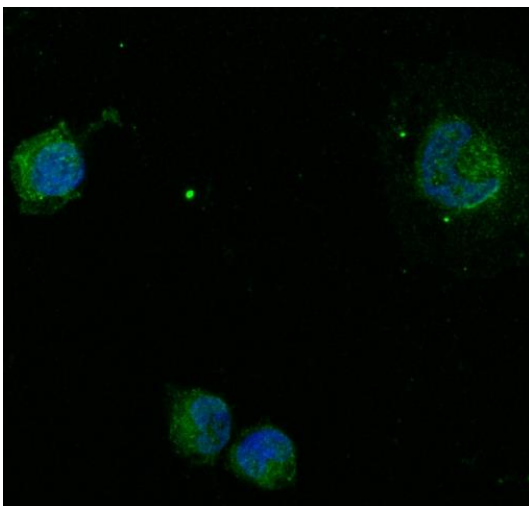
A



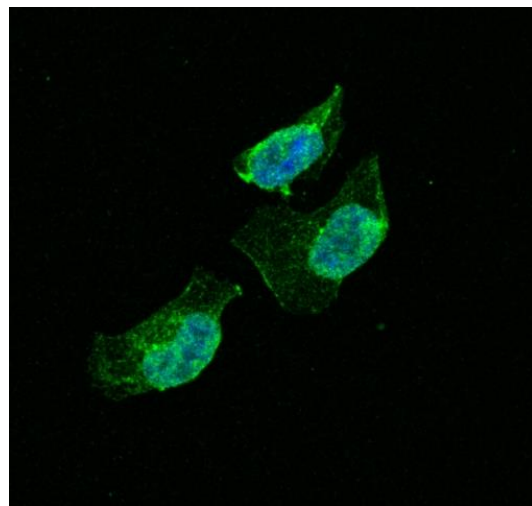
B



C



D



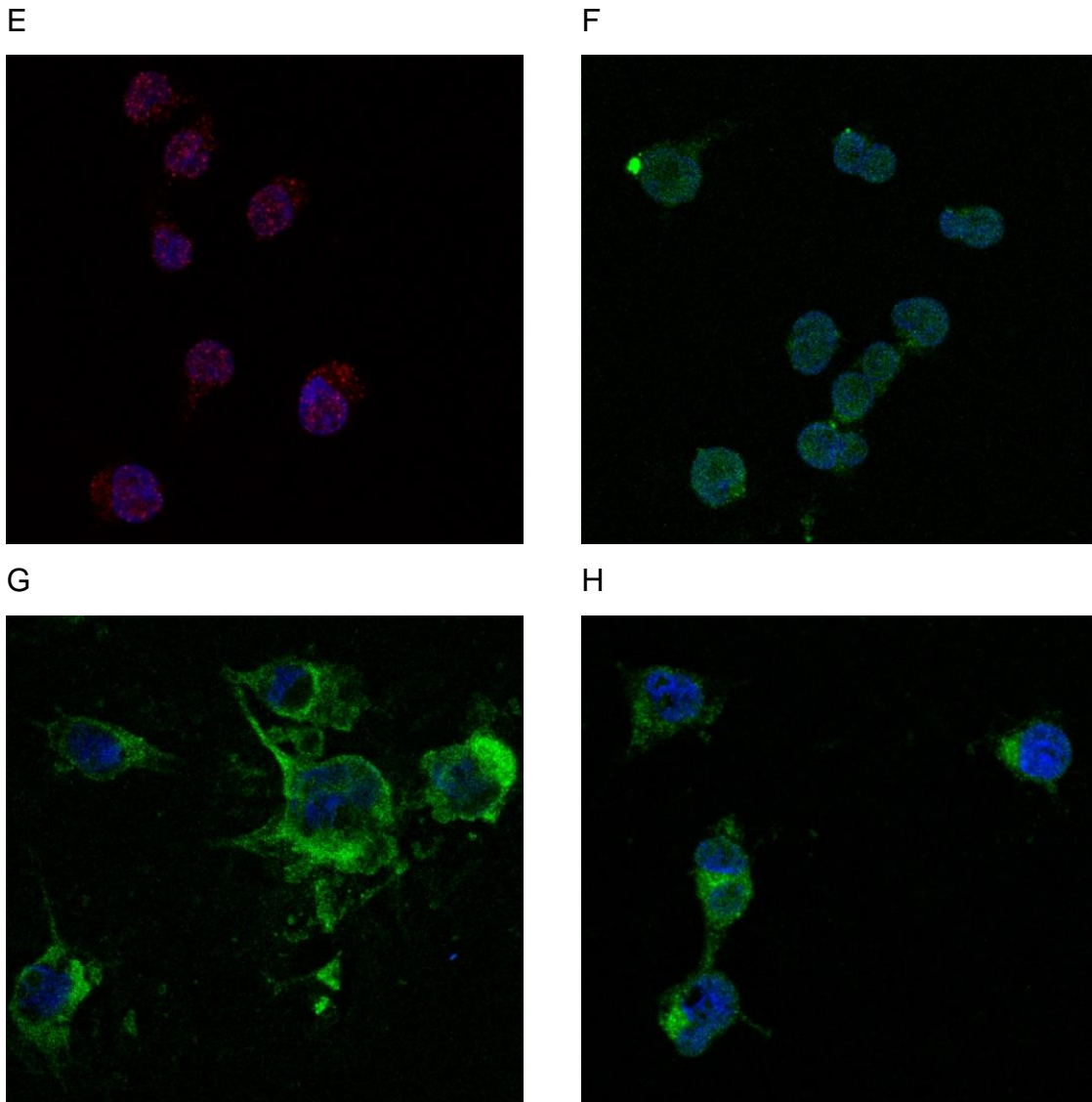


Figura 9. Inmunofluorescencia para la línea celular OVCAR-3, marcaje para (A) ER α (rojo) + DAPI, (B) ER β (verde) + DAPI, (C) AR (verde) + DAPI, (D) PR (verde) + DAPI. Inmunofluorescencia para la línea celular TOV-112D, marcaje para (E) ER α (rojo) + DAPI, (F) ER β (verde) + DAPI, (G) AR (verde) + DAPI, (H) PR (verde) + DAPI.

Las células fueron cultivadas en ausencia de hormona o ligando específico. Se encontró positividad para todos los receptores en las líneas celulares, con un predominio nuclear y/o citoplasmático dependiendo de la línea celular y SHR en estudio (Tabla 6). De igual manera para determinar la expresión de los SHR, se

realizó una técnica de Western Blot, en la cual también se mostró positividad para los SHR en las líneas celulares antes mencionadas (Fig. suplementaria 1).

Líneas celulares					
Receptor	OVCAR-3	OV-90	TOV-21G	TOV-112D	SK-OV-3
ER α	Nuclear, moderadamente en citoplasma.	Nuclear y citoplasmático	Nuclear y citoplasmático	Predominantemente nuclear.	Nuclear y citoplasmático.
ER β	Nuclear y perinuclear.	Nuclear y perinuclear.	Nuclear y citoplasmático con dominancia en núcleo.	Predominantemente nuclear.	Nuclear y citoplasmático.
AR	Nuclear y perinuclear.	Nuclear y perinuclear con dominancia en núcleo.	Nuclear y ligeramente citoplasmático	Citoplasmático y moderadamente en núcleo.	Nuclear y citoplasmático con dominancia en núcleo.
PR	Nuclear y citoplasmático con dominancia en núcleo.	Nuclear y citoplasmático.	Nuclear y perinuclear.	Nuclear y perinuclear.	Nuclear y citoplasmático.

Tabla 6. Localización de SHR en líneas celulares de cáncer de ovario OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3.

8.3. Expresión de PinX1 en líneas celulares de cáncer de ovario por Western Blot

Se ha descrito que PinX1 es una molécula con niveles de expresión variables entre diversos cánceres, y etapas de progresión. Por lo cual resulta de relevancia determinar la presencia y cantidad aparente de PinX1 en las líneas celulares a analizar y determinar si existe una expresión diferencial entre las líneas celulares representantes de diversos tipos de cáncer de ovario.

Se determinó la presencia de PinX1 a nivel de proteína mediante Western Blot en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D, SK-OV-3 y HEK-293. Encontrándose positividad para PinX1 en todas las líneas celulares antes mencionadas (Fig. 10), se observa una menor expresión de Pinx1 en la línea celular TOV-112D y OV-90 en comparación con las otras líneas celulares, mientras que las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3 muestran la mayor expresión de PinX1 a nivel de proteína (Fig. 11).

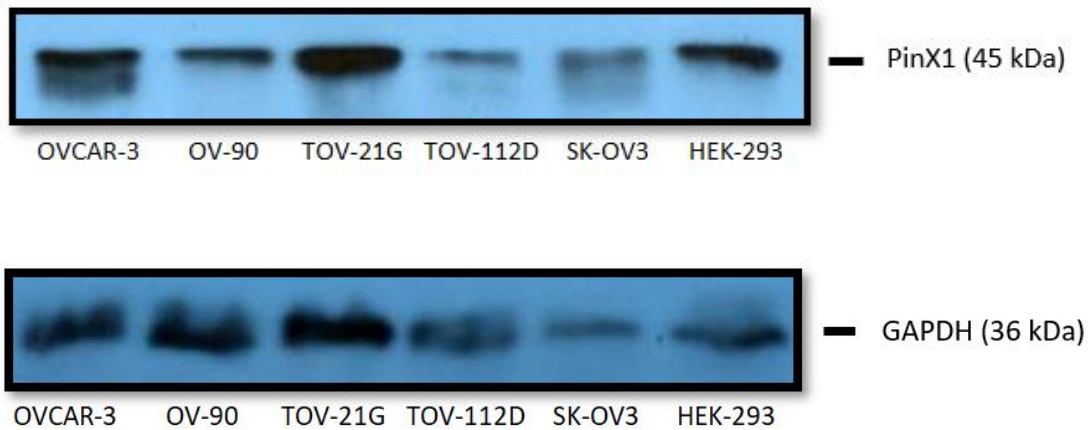


Figura 10. Western Blot para identificación de PinX1 en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D, SK-OV-3 y HEK-293. Se muestra una imagen representativa de 2 experimentos independientes.

Proteína PinX1 en líneas celulares de cáncer de ovario

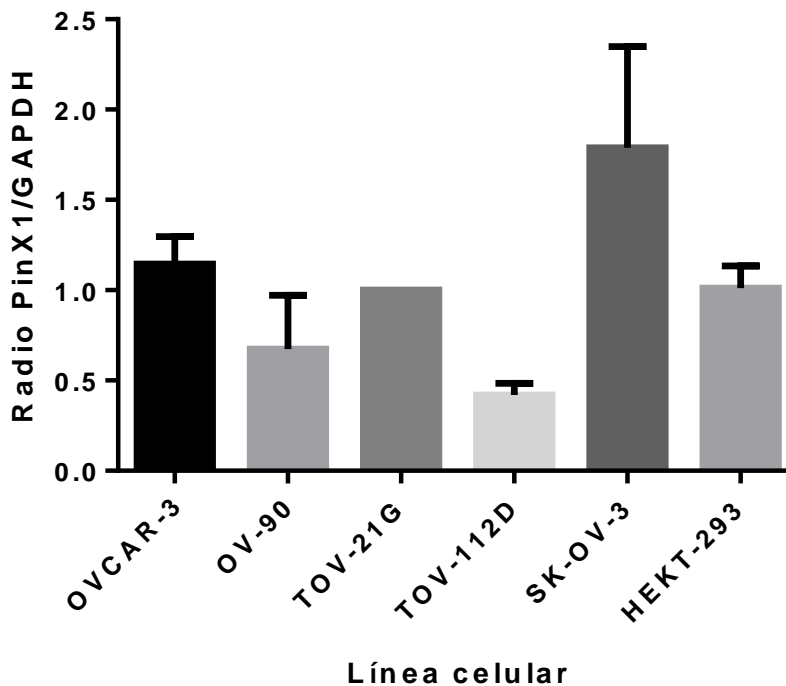
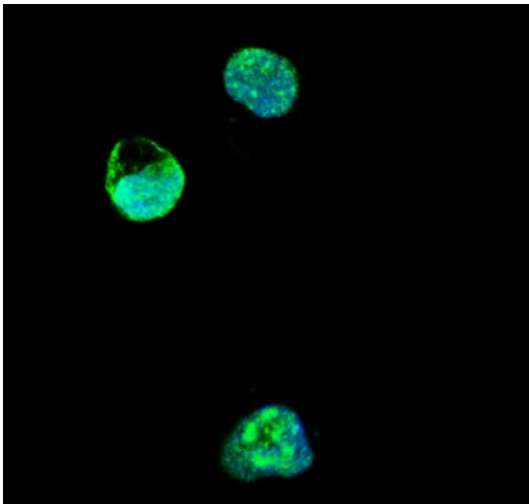


Figura 11. Análisis por densitometría de PinX1 por Western Blot en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D, SK-OV-3 y HEK-293. Se muestra media y desviación estándar de 2 experimentos independientes. Se observa una diferencia significativa entre la cantidad de proteína PinX1 ($p < 0.0001$) por prueba ANOVA unidireccional. Se realiza prueba Tukey para determinar líneas celulares con diferencia significativa.

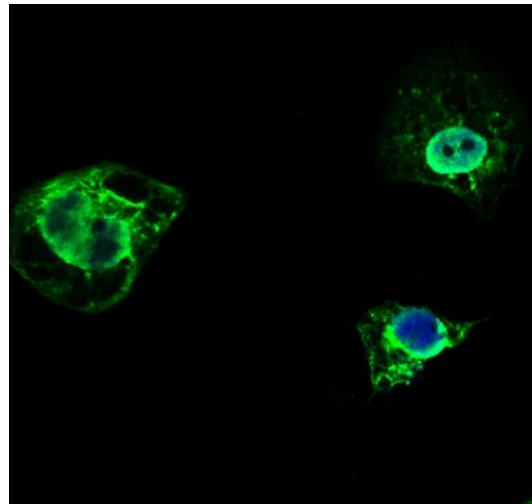
8.4. Localización de PinX1 en líneas celulares de cáncer de ovario por inmunofluorescencia

Se determinó la presencia de PinX1 a nivel de proteína mediante inmunofluorescencia en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3. Encontrándose positividad para la expresión de esta proteína en todas en las líneas celulares (Fig. 12).

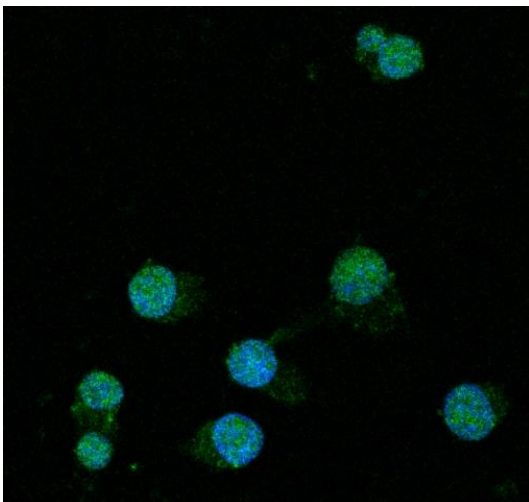
A



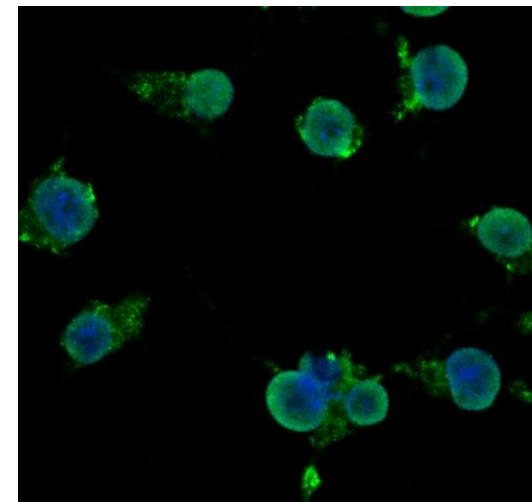
B



C



D



E

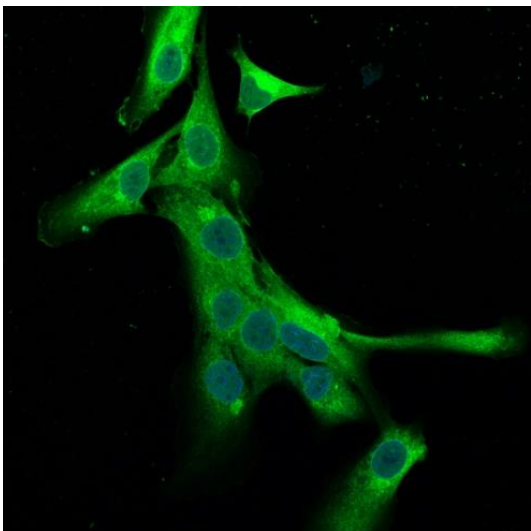


Figura 12. Inmunofluorescencia para las líneas celulares (A) OVCAR-3 (B) OV-90, (C) TOV-21G, (D) TOV-112D, (E) SK-OV-3, marcaje para PinX1 (verde) + DAPI.

En la línea celular OVCAR-3 se describe una localización nuclear de PinX1. La línea celular OV-90 muestra una localización predominantemente perinuclear de PinX1 con moderada presencia en núcleo. En la línea celular TOV-21G, se observa una localización predominantemente nuclear de PinX1. En la línea TOV-112D se observa una localización tanto nuclear como perinuclear de la proteína PinX1. En la línea celular SK-OV-3, se observa una localización nuclear y citoplasmática de Pinx1.

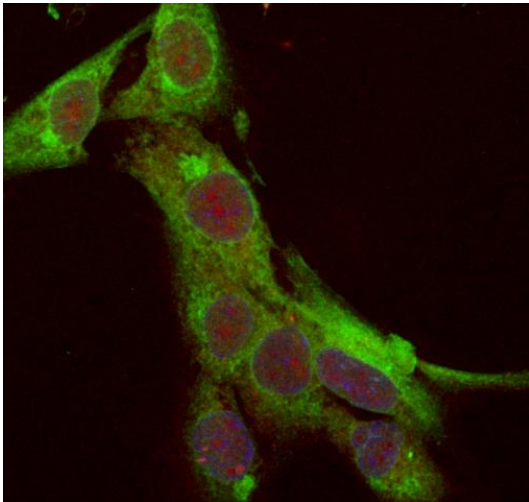
8.5. Colocalización de PinX1 y receptores de hormonas esteroideas en líneas celulares de cáncer de ovario por inmunofluorescencia, en presencia y ausencia de tratamiento con hormonas

Se ha reportado en la literatura el movimiento de los receptores de hormonas esteroideas en presencia de ligando al interior del núcleo para efectuar su función canónica. Por otra parte, dadas las funciones descritas de PinX1 como inhibidor de la telomerasa, participante en la segregación cromosómica y corregulador de los receptores de hormonas esteroideas, resulta de relevancia determinar su

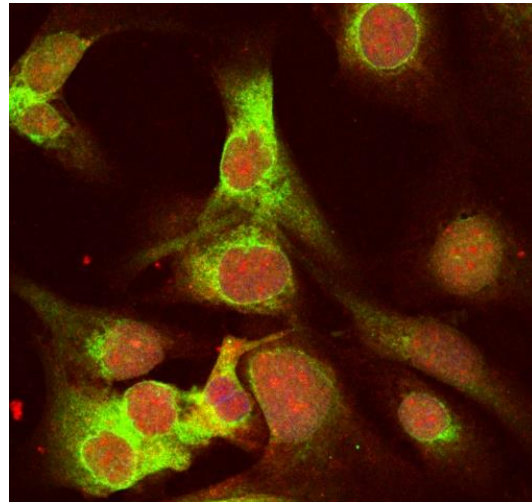
localización celular en presencia y ausencia de hormonas. Para observar este fenómeno en las líneas celulares analizadas, se determinó por inmunofluorescencia la localización de los receptores de hormonas esteroideas, así como la molécula de interés PinX1 en presencia y ausencia de ligando.

Específicamente, se determinó la presencia de los receptores nucleares ER α , ER β , AR y PR junto con PinX1 mediante inmunofluorescencia en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3, en presencia y ausencia de tratamiento con hormonas (17- β -estradiol (E2), dihidrotestosterona (DHT) y progesterona (P4)) (Fig. 13).

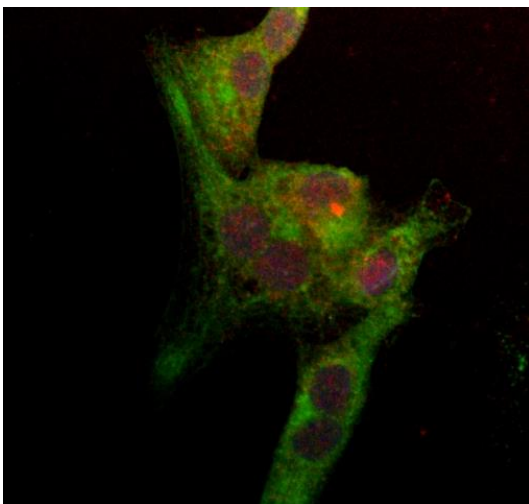
A



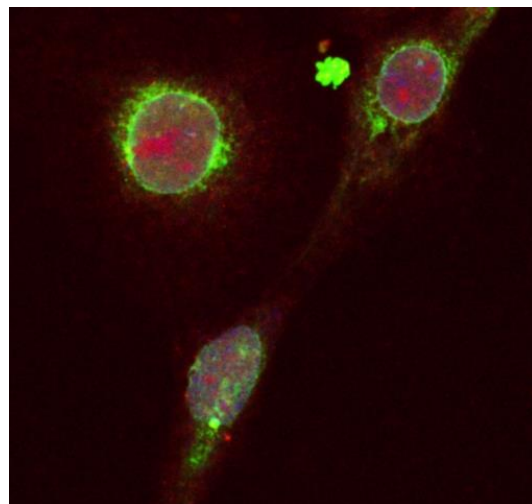
B



C



D



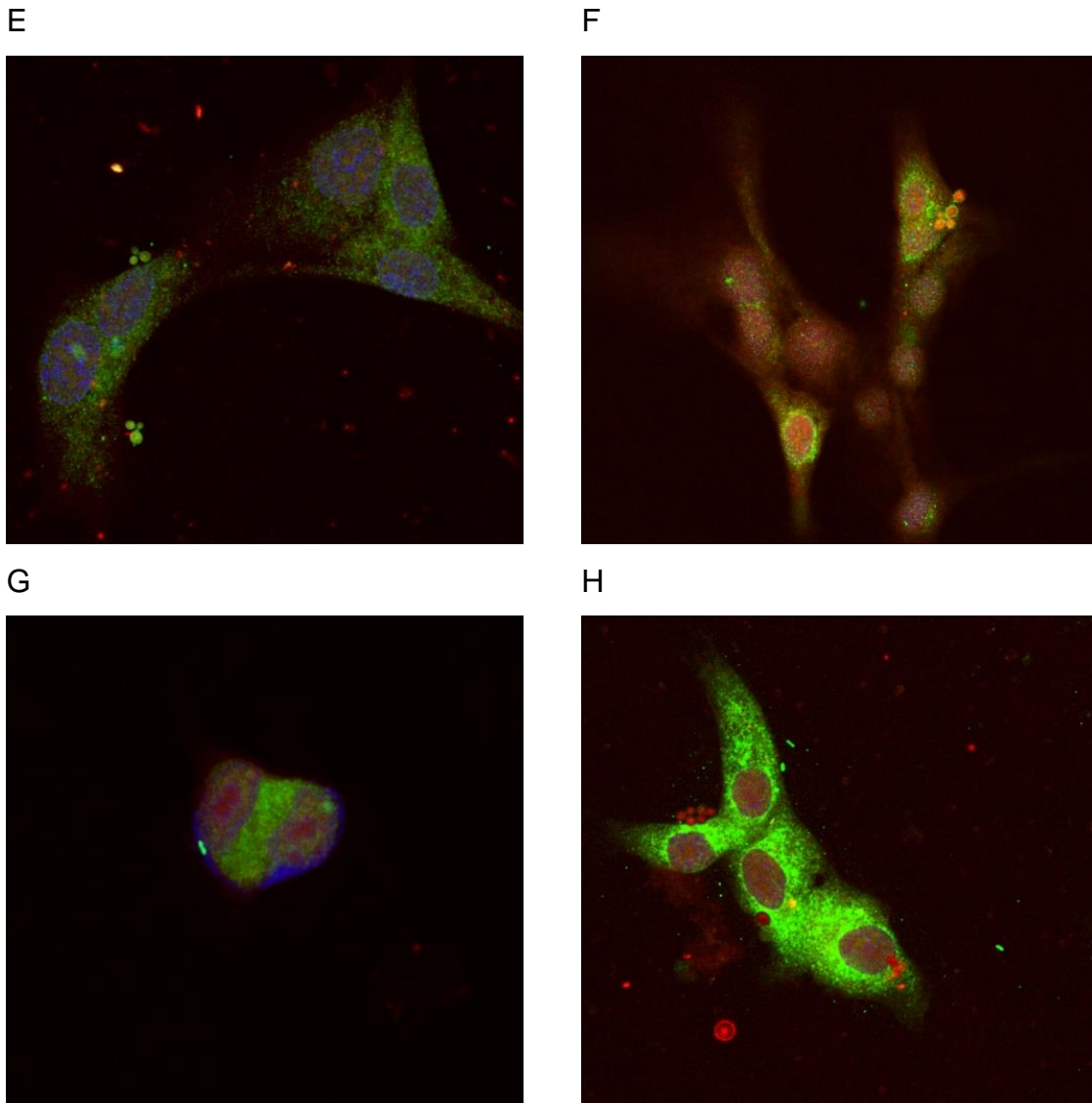


Figura 13. Inmunofluorescencia para la línea celular SK-OV-3, marcaje para (A) ER α + PinX1 + DAPI. Tratamiento con EtOH. (B) Tratamiento con E2 20 nM. (C) Marcaje para ER β + PinX1 + DAPI. Tratamiento con EtOH. (D) Tratamiento con E2 20 nM. (E) marcaje para AR+ PinX1 + DAPI. Tratamiento con EtOH. (F) Tratamiento con DHT 20 nM (G) Marcaje para PR + PinX1 + DAPI. Tratamiento con EtOH. (H) Tratamiento con P4 20 nM. SHR (rojo), PinX1 (verde).

Se observa una localización aparentemente similar de ambas moléculas en todas las líneas celulares antes mencionadas. También es de notar que se observa una localización citoplasmática y nuclear de los receptores nucleares y PinX1 en ausencia de tratamiento con hormonas, mientras que bajo tratamiento con hormonas se observa una localización predominantemente nuclear de los receptores y PinX1, sin embargo, aún es posible visualizar cierta presencia de

estas moléculas fuera del núcleo. También se puede observar una localización nucleolar de PinX1.

Se muestra una imagen representativa de algunas líneas celulares con y sin tratamiento de hormonas. En color rojo se observa el receptor de hormonas esteroideas, en color verde se observa PinX1 y en color azul se observa el núcleo celular.

8.6. Ensayos de proliferación celular de líneas celulares que sobreexpresan PinX1 de manera estable

Se ha descrito una importante disminución en la expresión de PinX1 en diversos tipos de cánceres, y en referencia al cáncer de ovario se ha observado una disminución en los niveles de PinX1 relacionados al aumento en la agresividad del tumor y un peor pronóstico. Dada la interacción de PinX1 con los receptores de hormonas esteroideas para la modulación de los efectos de estos receptores en ausencia y presencia de hormonas, se realizaron ensayos de proliferación con líneas celulares estables para la sobreexpresión de PinX1 en presencia y ausencia de hormonas.

Se realizó un ensayo de proliferación celular a diferentes tiempos hasta las 72 horas en las líneas celulares OVCAR-3, TOV-112D y SK-OV-3, comparando la sobreexpresión estable de PinX1 contra la expresión control de un plásmido vacío (VV). Se observa una disminución significativa de la proliferación celular en las líneas con sobreexpresión de PinX1 comparadas con el control. De igual manera, se observa este efecto de manera independiente de la presencia de hormonas. Se muestra una curva de proliferación representativa de 3 experimentos independientes para las líneas celulares antes mencionadas.

Se observa una inhibición de la proliferación celular tras la sobreexpresión estable de PinX1 en la línea celular OVCAR-3. Este efecto se observa tanto en presencia

como ausencia de hormona. La proliferación en esta línea celular parece no ser sensible al E2 ni DHT dado que la adición de cualquiera de estas hormonas al medio no incrementa la proliferación celular de una manera significativa (Fig. 14).

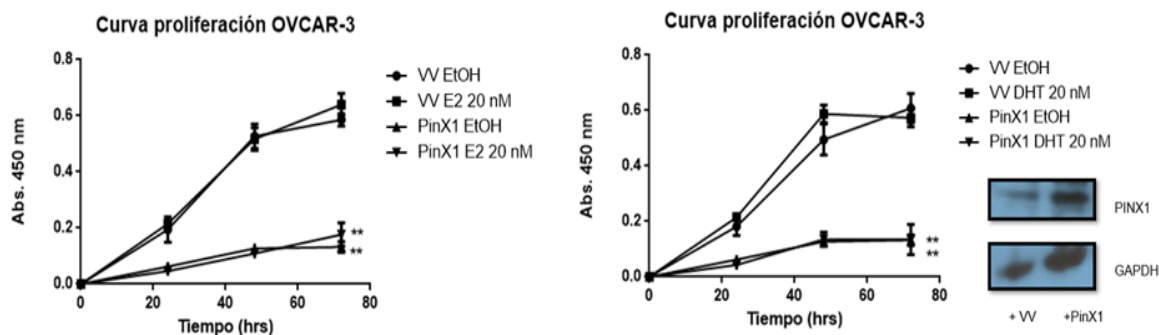


Figura 14. Curvas de proliferación OVCAR-3 a 72 horas, bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM). Se compara con prueba t-student VV EtOH vs PinX1 EtOH, VV E2 20 nM vs PinX1 E2 20 nM y VV DHT 20 nM vs PinX1 DHT 20 nM (** $p < 0.01$). Se muestra gráfica con datos de 5 repeticiones con media y desviación estándar. Se muestra gráfica representativa de 3 experimentos independientes.

En la línea celular TOV-112D que sobre expresa a PinX1, se observa una inhibición de la proliferación. Este efecto se observa tanto en presencia como ausencia de hormona. Sin embargo, la línea celular parece ser sensible a E2, encontrándose un aumento significativo de la proliferación celular al adicionar la hormona al medio. Al realizar los ensayos en presencia y ausencia de DHT, también se observa una inhibición de la proliferación celular que es independiente del ligando utilizado. Sin embargo, la línea celular parece ser sensible a la hormona DHT, encontrándose un aumento significativo de la proliferación celular al adicionarla al medio (Fig. 15).

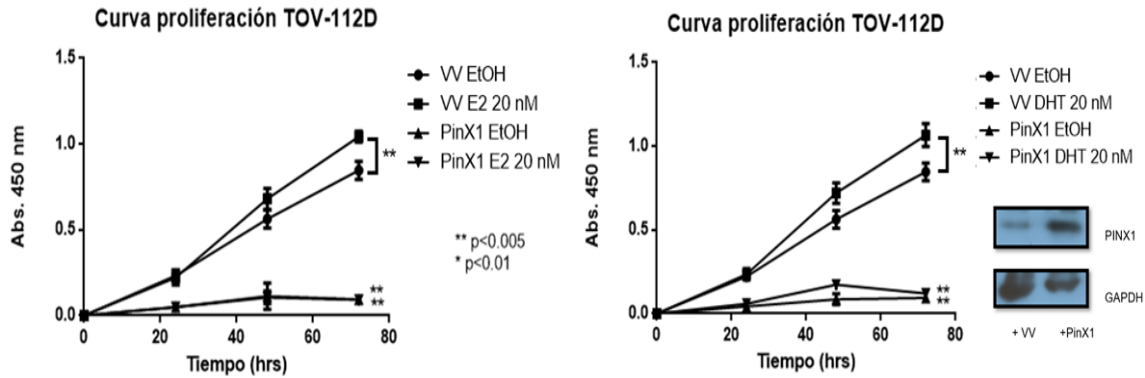


Figura 15. Curvas de proliferación TOV-112D a 72 horas, bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM) Se compara con prueba t-student VV EtOH vs PinX1 EtOH, VV E2 20 nM vs PinX1 E2 20 nM, VV EtOH vs VV E2 20 nM, DHT 20 nM vs PinX1 DHT 20 nM y VV EtOH vs VV DHT 20 nM (** p<0.005 * p<0.01). Se muestra gráfica con datos de 5 repeticiones con media y desviación estándar. Se muestra gráfica representativa de 3 experimentos independientes.

Se observa una inhibición de la proliferación celular tras la sobreexpresión estable de PinX1 en la línea celular SK-OV-3. Este efecto se observa tanto en presencia como ausencia de hormona. La línea celular parece ser sensible a la hormona E2, encontrándose un aumento significativo de la proliferación celular al adicionar la hormona al medio, sin embargo, la adición de DHT no induce un incremento en la proliferación celular, por lo que parece no ser sensible a esta hormona (Fig. 16).

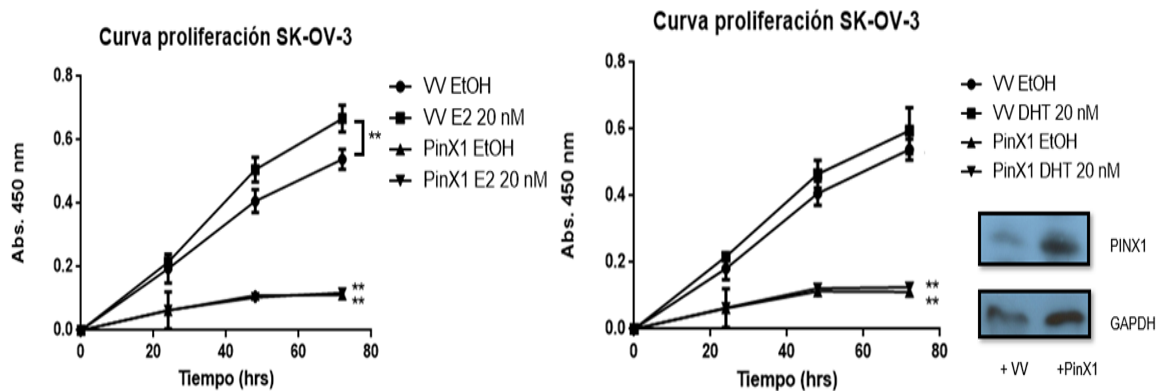


Figura 16. Curva de proliferación SK-OV-3 a 72 horas, bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM) Se compara con prueba t-student VV EtOH vs PinX1 EtOH, VV E2 20 nM vs PinX1 E2 20 nM, VV EtOH vs VV E2 20 nM y VV DHT 20 nM vs PinX1 DHT 20 nM (** p<0.01). Se muestra gráfica con datos de 5 repeticiones con media y desviación estándar. Se muestra gráfica representativa de 3 experimentos independientes.

8.7. Ensayos de clonogenicidad celular en líneas celulares estables para la sobreexpresión de PinX1

Dados los resultados obtenidos en los ensayos de proliferación celular y los mecanismos antes descritos de las funciones de PinX1 sobre los procesos de crecimiento celular, resulta de relevancia describir otro mecanismo mediante el cual PinX1 pudiera ejercer efectos sobre la supervivencia celular.

Se realizó un ensayo de formación de colonias a 10 días con la línea celular SK-OV-3, comparando la sobreexpresión estable de PinX1 contra la expresión control de un vector vacío. Se observa una disminución en la formación de colonias en las líneas con sobreexpresión de PinX1 comparadas con el control, tanto en presencia o ausencia de hormonas. Se encuentra una disminución significativa en el número de colonias formadas al comparar la línea celular SK-OV-3 con sobreexpresión estable de PinX1 y la línea celular con expresión estable del vector vacío. Esta diferencia es significativa ($p < 0.05$) en presencia de etanol como vehículo control, así como bajo tratamiento con DHT 20 nM ($p < 0.01$). La diferencia no se muestra como significativa bajo tratamiento con flutamida, sin embargo, muestra una tendencia a la baja (Fig. 17).

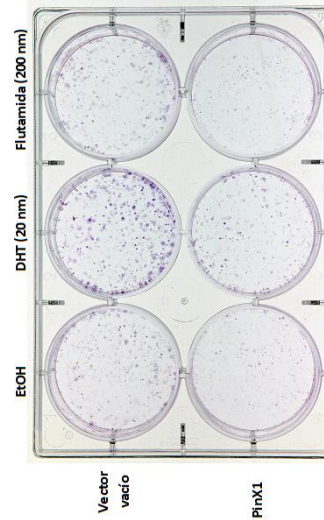
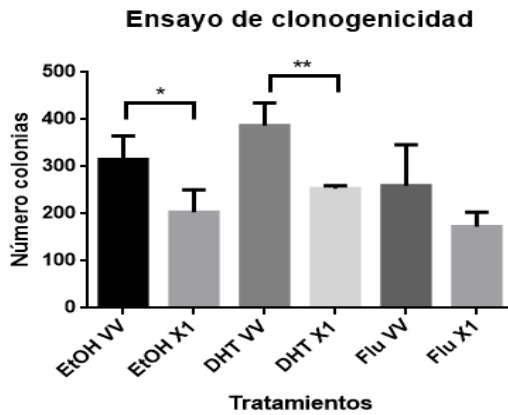


Figura 17. Ensayo de clonogenicidad celular SK-OV-3 tras 10 días. Bajo tratamiento con EtOH, DHT (20 nM) y Flutamida (200 nM). Se muestra gráfica con media y desviación estándar de 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Se encuentra una disminución significativa en el número de colonias formadas al comparar la línea celular SK-OV-3 con sobreexpresión estable de PinX1 y la línea celular con expresión estable del vector vacío. Esta diferencia es significativa ($p < 0.05$) en presencia de etanol como vehículo control, así como bajo tratamiento con E2 20 nM ($p < 0.05$). La diferencia también se muestra significativa bajo tratamiento con tamoxifén ($p < 0.01$) (Fig. 18).

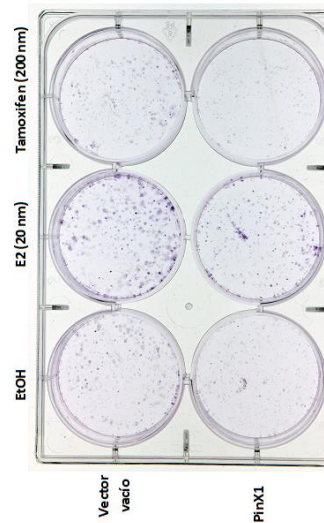
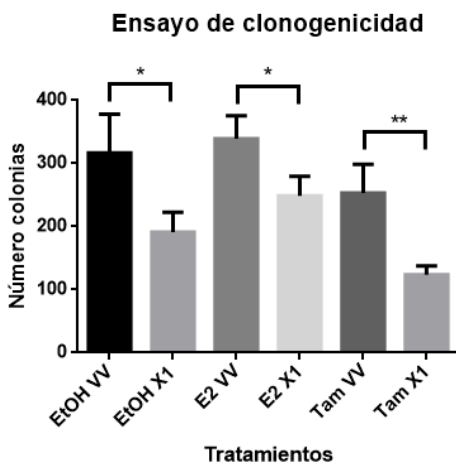


Figura 18. Ensayo de clonogenicidad celular SK-OV-3 tras 10 días. Bajo tratamiento con EtOH, E2 (20 nM) y Tamoxifén (200 nM). Se muestra gráfica con media y desviación estándar de 3 experimentos independientes (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

Al igual que lo observado en los ensayos de proliferación celular, la sobreexpresión de PinX1 parece tener un efecto inhibitorio en procesos celulares de crecimiento y supervivencia, siendo que la sobreexpresión de PinX1 ocasiona una disminución en la formación de colonias, aún en ausencia de hormona esteroidea. Es de notar que aún bajo el tratamiento con hormonas, la sobreexpresión de PinX1 sigue disminuyendo de manera significativa la formación de colonias, siendo que la adición de hormona al medio no recupera la formación de colonias abolida por la sobreexpresión de PinX1.

8.8. Ensayos de luciferasa tras transfección transitoria de PinX1, en presencia y ausencia de medio adicionado con hormonas

Literatura reciente ha descrito a PinX1 como un corregulador de receptores de hormonas esteroideas, con propiedades de coactivador para el AR y ER α o correpresor del ER α . Con el fin de determinar si PinX1 posee actividad de corregulador en células de cáncer de ovario, así como determinar la actividad que efectuará sobre los receptores de hormonas esteroideas, ya sea como activador o correpresor, se realizaron ensayos de luciferasa para determinar los efectos de la sobreexpresión de PinX1 sobre la actividad de los receptores nucleares ER α y AR. Después de transfectar tanto PinX1 como el ER α y tratar las células en presencia y ausencia de ligando durante 48 horas, se observa un aumento en la actividad transcripcional mediada por ER α , sugiriendo una función de PinX1 como coactivador del ER α , este efecto se observa en presencia y ausencia de E2. Por otra parte, también se observa un aumento en la actividad transcripcional mediada por AR tras la sobreexpresión de PinX1, sugiriendo una función de PinX1 como coactivador del AR, este efecto se observa mayoritariamente en presencia de DHT.

Para la línea celular OVCAR-3 se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad transcripcional mediada por ER α tras la sobreexpresión de PinX1 en presencia y en ausencia de E2. No se muestran diferencias significativas en la

activación de ER α por la adición de E2, por lo que parece que este efecto es independiente de ligando. Igualmente se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad transcripcional mediada por AR tras la sobreexpresión de PinX1 en presencia de DHT. Esta activación de AR se observa únicamente bajo adición de DHT, por lo que se considera dependiente de AR y de ligando (Fig. 19).

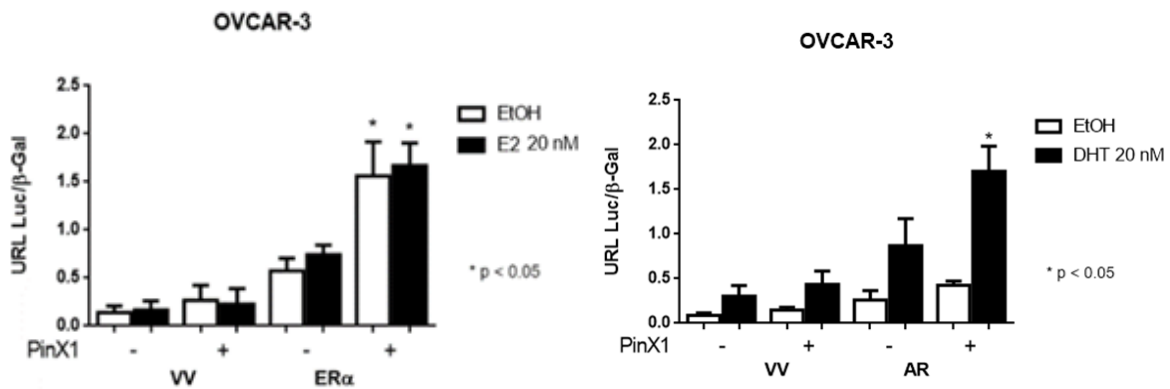


Figura 19. Ensayo de luciferasa en línea celular OVCAR-3 tras transfección transitoria de 72 horas. Bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM). Se compara con prueba t-student, ER α (PinX1-) EtOH vs ER α (PinX1+) EtOH; ER α (PinX1-) E2 20 nM vs ER α (PinX1+) E2 20 nM. Se compara con prueba t-student, AR (PinX1-) EtOH vs AR (PinX1+) EtOH; AR (PinX1-) DHT 20 nM vs AR (PinX1+) DHT 20 nM. Se muestra gráfica con media y desviación estándar de observaciones por triplicado. Se muestra gráfica representativa de 3 experimentos independientes.

Para la línea celular OV-90 se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad transcripcional mediada por ER α tras la sobreexpresión de PinX1 en presencia de E2, a diferencia de lo observado con la línea celular OVCAR-3, esta activación de ER- α se observa únicamente bajo la adición de E2 al medio. Además, se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad transcripcional mediada por AR tras la sobreexpresión de PinX1 tanto en presencia de DHT ($p < 0.05$) como en ausencia de ligando ($p < 0.01$), comparando con su control sin transfección con de PinX1. Se observa poca diferencia, no significativa en la activación de AR por la adición de DHT en ausencia de PinX1 (Fig. 20).

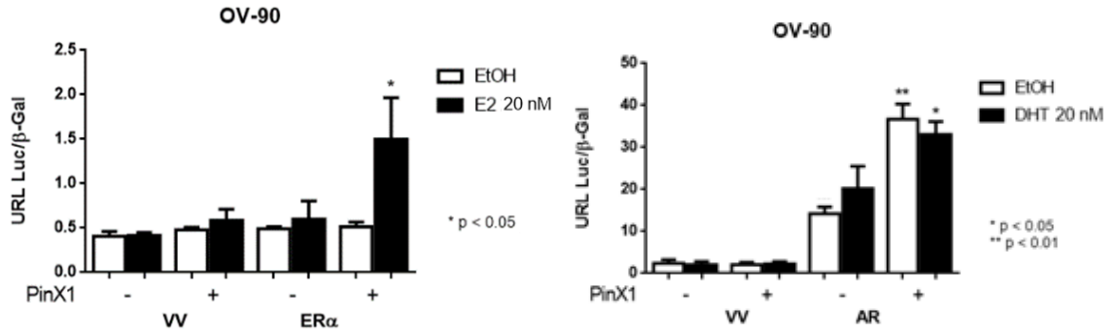


Figura 20. Ensayo de luciferasa en línea celular OV-90 tras transfección transitoria de 72 horas. Bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM). Se compara con prueba t-student, ERα (PinX1-) EtOH vs ERα (PinX1+) EtOH; ERα (PinX1-) E2 20 nM vs ERα (PinX1+) E2 20 nM. Se compara con prueba t-student, AR (PinX1-) EtOH vs AR (PinX1+) EtOH; AR (PinX1-) DHT 20 nM vs AR (PinX1+) DHT 20 nM. Se muestra gráfica con media y desviación estándar de observaciones por triplicado. Se muestra gráfica representativa de 3 experimentos independientes.

Para la línea celular SK-OV-3 se observa un aumento significativo ($p < 0.01$) en la actividad transcripcional mediada por ERα tras la sobreexpresión de PinX1 en presencia y en ausencia de E2. A pesar de que no se muestran diferencias significativas en la activación de ER-α por la adición de E2, la hormona parece potencializar el efecto de la activación de ER-α mediada por PinX1. Por otra parte, se observa un aumento significativo ($p < 0.05$) en la actividad transcripcional mediada por AR tras la sobreexpresión de PinX1 en presencia de DHT. Esta activación de AR se observa únicamente bajo adición de DHT, por lo que parece ser dependiente de ligando (Fig. 21).

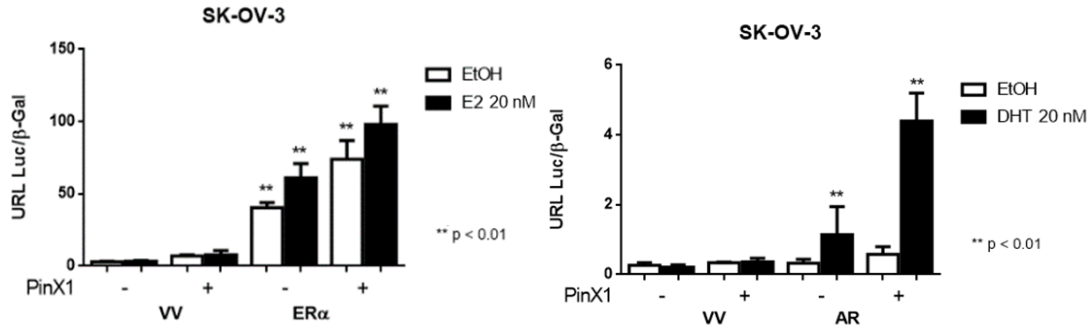


Figura 21. Ensayo de luciferasa en línea celular SK-OV-3 tras transfección transitoria de 72 horas. Bajo tratamiento con EtOH, E2 y DHT (20 nM). Se compara con prueba t-student, ER α (PinX1-) EtOH vs ER α (PinX1+) EtOH; ER α (PinX1-) E2 20 nM vs ER α (PinX1+) E2 20 nM. Se compara con prueba t-student, AR (PinX1-) EtOH vs AR (PinX1+) EtOH; AR (PinX1-) DHT 20 nM vs AR (PinX1+) DHT 20 nM. Se muestra gráfica con media y desviación estándar de observaciones por triplicado. Se muestra gráfica representativa de 3 experimentos independientes.

9. Discusión

El cáncer de ovario es una neoplasia a la que se han asociado diversas variables epidemiológicas relacionadas a las hormonas esteroideas, por lo que, éstas moléculas y sus respectivos receptores se han postulado como participantes en la formación de complejos involucrados con la patogénesis de este cáncer. Diversos estudios han mostrado que cerca del 70% de los tumores epiteliales de ovario tienen una importante presencia de receptores de hormonas esteroideas (SHR). Como se ha mencionado anteriormente, la señalización hormonal es mediada por los SHR, que, tras la unión de su respectivo ligando, se translocan al interior del núcleo dónde ejercen su función de factor transcripcional sobre los promotores de sus genes diana. La inhibición o potencialización de esta función es llevada a cabo por los correguladores compartidos o propios de cada receptor nuclear, los que en algunas ocasiones son incluso específicos para el tejido donde se encuentra el receptor. Se han identificado múltiples correguladores propios de los SHR en las células epiteliales del ovario, muchos de los cuales se han observado con una expresión aumentada o disminuida en tejidos neoplásicos, esto sugiere que la simple existencia de los receptores y su correspondiente ligando no es suficiente para efectuar cambios sobre la actividad transcripcional, también se requieren de estas proteínas correguladoras. Con el enorme potencial que tienen estas moléculas para modular los efectos de los receptores nucleares, queda claro que la desregulación de estos correguladores puede proveer a las células cancerosas ciertas ventajas en la proliferación y metástasis.

Para determinar de manera particular el papel de PinX1 sobre la señalización mediada por los receptores nucleares en las líneas celulares de cáncer de ovario, utilizadas como modelo de estudio, se realizó un proceso de caracterización de las mismas, observando la presencia de los receptores nucleares a nivel de mRNA y proteína, mostrando positividad en la expresión de los SHR (ER α , ER β , AR, y PR)

en todas las líneas celulares analizadas (OV-90, OVCAR-3, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3).

Como bien se sabe, varios mecanismos moleculares llevados a cabo en el microambiente del ovario son regulados por los receptores de hormonas esteroideas y sus respectivos ligandos. Al analizar la literatura disponible respecto a la expresión de los receptores de hormonas esteroideas en cáncer de ovario se ha encontrado que probablemente el receptor que posee mayor cantidad de estudios respecto a su expresión es ER α , encontrando desde un 43% hasta un 77.3% de positividad. En la gran mayoría de los estudios, la presencia de ER α se ha visto asociada con un mejor pronóstico. Retomando lo reportado sobre la literatura respecto a la presencia de otros receptores nucleares, en muestras de tejido neoplásico, se ha observado hasta 72.7% de positividad para ER β , hasta un 41.6% de positividad para PR con predominancia en carcinoma endometroide, y hasta un 84% de positividad para AR. Siendo que las líneas celulares muestran diversos subtipos histológicos, los resultados obtenidos en esta caracterización parecen representar la positividad de los receptores nucleares en muestras de tejidos neoplásicos reportados en la literatura. (Lee et al, 2004; Bardin et al, 2004; Cardillo et al, 1998; Kohan-Ivani et al, 2016).

Además, se determinó mediante la técnica de inmunofluorescencia la localización de los receptores nucleares dentro de la célula, observándose una localización predominantemente nuclear en todas las líneas celulares, fenómeno que se va aumentando bajo el tratamiento con medio adicionado con hormonas (17- β -estradiol y dihidrotestosterona). Al analizar los resultados obtenidos mediante la técnica de inmunofluorescencia es posible determinar la presencia de PinX1 dentro de la célula, observándose una localización predominantemente nuclear. Según sus funciones reportadas como inhibidor de la telomerasa y corregulador de receptores nucleares, efectivamente es de esperarse que dicha molécula se encuentre en esta localización celular. Es de interés notar que, tanto PinX1 como los SHR se observan en localización nuclear, en presencia y en ausencia de hormona, lo que sugiere que ambas moléculas podrían estar ejerciendo cierta

función en el núcleo de estas células. Por otra parte, se puede observar la presencia de PinX1 en nucleolo, siendo esta otra posible localización de PinX1 según lo reportado por Eun y colaboradores (2009) quienes mencionan que PinX1 es capaz de regular la acumulación nucleolar y la asociación telomérica de TRF1 (Eun et al, 2009).

Al determinar la presencia de la molécula de interés, PinX1, en las células de estudio, se observa una expresión positiva en cada línea celular mediante la técnica de Western Blot. De manera cuantitativa, se observa una mayor expresión de PinX1 en la línea celular SK-OV-3, caracterizada únicamente como adenocarcinoma seroso, mientras que la línea celular TOV-112D de adenocarcinoma primario maligno, grado 3, etapa IIIC, carcinoma endometroide, parece mostrar la menor cantidad de PinX1 comparadas con las otras líneas celulares.

Es interesante notar que, aunque todas las líneas celulares analizadas poseen una expresión positiva de PinX1, cualitativa y cuantitativamente, es posible distinguir cierta expresión diferencial en la proteína de interés, viendo una expresión reducida de PinX1 en líneas celulares como TOV-112D y OV-90, ambas líneas celulares caracterizadas como etapa FIGO IIIC, lo que podría sugerir que la deficiencia en la expresión de PinX1 podría relacionarse con una estadificación más avanzada del cáncer de ovario. De manera general, para varios tipos de cáncer, se ha reportado que la delección de PinX1 es un genotipo relativamente común en pacientes con neoplasias, lo que sugiere que la insuficiente expresión de PinX1 podría llevar al desarrollo y progresión de la enfermedad, además, el gen que codifica para PinX1 se encuentra en la región cromosómica 8p23, donde es frecuente la pérdida de heterocigocidad en tumores. Haciendo alusión a su importante función como inhibidor de la telomerasa, se sabe que la elongación telomérica es un evento común en una gran variedad de cánceres epiteliales y se relaciona con etapas avanzadas de progresión del cáncer y mal pronóstico, reforzando la hipótesis de que aquellos cánceres con etapificación más avanzada

podría presentar una menor expresión de PinX1 a comparación de aquellos en etapas más tempranas.

Ahondando en esta relación entre PinX1 y la progresión del cáncer de ovario, se han realizado algunos estudios para determinar la expresión de PinX1 en distintas etapas de esta neoplasia, Cai y colaboradores en 2010, reportaron el valor pronóstico de la expresión de PinX1, encontrando un 100% de positividad para PinX1 en tejidos catalogados como normales, un 84% para cistoadenomas, 76% para tumores “borderline” y 66% para carcinomas de ovario. Para determinar con precisión la positividad y negatividad de la expresión de PinX1, los autores realizaron el estudio con curvas ROC para determinar el punto de corte para la positividad/negatividad de PinX1 según el parámetro clínico-patológico analizado (supervivencia, etapa T, N y M, grado histológico del tumor y tipo histológico del tumor). La tasa de expresión de PinX1 fue significativamente mayor en pacientes con factores pronósticos favorables: ausencia de metástasis a ganglio linfático ($p=0.024$), sin metástasis distante ($p < 0.001$) y etapa Figo temprana ($p < 0.001$). La expresión negativa de PinX1 se asoció significativamente con un acortamiento en la sobrevida de las pacientes ($p < 0.001$). Estos datos parecen indicar que la pérdida en la expresión de PinX1 en cáncer de ovario, facilita la progresión de la neoplasia, así como el proceso de metástasis, indicando importantes mecanismos de regulación celular a cargo de PinX1 en el desarrollo y progresión del cáncer. (Cai et al, 2010).

En esta línea de investigación, Huang y colaboradores (2017), orientados a determinar la relación entre PinX1 y el cáncer, determinaron la presencia de esta proteína a nivel de mRNA en diversos tejidos neoplásicos. Específicamente para cáncer de ovario, se determinó una disminución en la expresión de PinX1 a nivel de mRNA, comparado con epitelio normal de ovario, en el 66.7% de las muestras de cistoadenoma serosos de ovario analizadas. Con ayuda de la plataforma OncoPrint, se compararon otros hallazgos de PinX1 en biopsias, Yoshihara y colaboradores (2009) reportan una disminución en los niveles de PinX1 a nivel de mRNA en tejidos de adenocarcinoma seroso de ovario a comparación de tejido

normal, mientras que un reporte de TCGA conjuntando más de 1000 casos analizados reporta una disminución de expresión de PinX1 en tejidos de cistoadenocarcinoma seroso de ovario a comparación de tejido normal. Únicamente Lu y colaboradores (2004) reportan una aparente sobreexpresión de PinX1 a nivel de mRNA en distintos tipos de cáncer de ovario a comparación de tejido normal en una muestra de 50 biopsias. (Lu et al, 2004; Yoshihara et al, 2009; TCGA, 2013).

Dada esta aparente expresión diferencial de PinX1 en tejidos neoplásicos de ovario, sería de sumo interés, tras determinar cuantitativamente la expresión diferencial de PinX1 en las antes mencionadas líneas celulares, asociar características propias del subtipo histológico con posibles mecanismos involucrados con PinX1 y la progresión y desarrollo de esta neoplasia.

Según lo observado en las biopsias de cáncer de ovario respecto a la expresión de PinX1, resulta de interés determinar si esta proteína posee un papel anti proliferativo en esta neoplasia, por lo que, para determinar el efecto de PinX1 sobre la proliferación celular y la formación de colonias, se generaron líneas celulares estables con expresión aumentada de PinX1, las cuales fueron utilizadas para realizar los experimentos. Se muestra que la sobre expresión de PinX1 es capaz de reducir la proliferación celular, de manera independiente de hormona en varias líneas celulares de cáncer de ovario. Se observa una disminución en la proliferación celular incluso tras 24 horas, la cual se ve consistentemente disminuida tras 48 y 72 horas. Estos resultados sugieren un potente mecanismo de PinX1 para inhibir la proliferación celular, presumiblemente mediada por su función como inhibidor de la telomerasa y posiblemente mediante otros mecanismos de acción como la inducción de genes pro apoptóticos.

Es de interés notar que la línea celular OVCAR-3 se observa insensible a E2 y DHT, no presentando un aumento en su proliferación celular tras la adición de la hormona. La línea celular TOV-112D se muestra sensible a E2 y DHT, potencializando su proliferación tras la adición de estas hormonas. La línea celular

SK-OV-3 se reporta sensible a E2 e insensible a DHT. De manera general, los efectos de la inhibición en la proliferación celular no parecen ser dependientes de la adición de hormona, lo que indica un papel de PinX1 independiente de hormona, que podría actuar en sinergia o incluso antagonismo a aquel propuesto por su interacción con SHR.

En la línea celular SK-OV-3, se determinaron los efectos de la sobreexpresión estable de PinX1, encontrándose que la expresión aumentada de Pinx1 es capaz de inhibir la formación de colonias, de manera independiente de la adición de hormonas al medio o el ligando inhibidor de ER α o AR (tamoxifén o flutamida, respectivamente), observándose una disminución significativa en la formación de colonias independiente de los ligandos adicionados. Estos datos apoyan la aparente independencia de presencia de ligandos en los efectos mediados por PinX1 en la clonogenicidad de estas células.

La inhibición de la proliferación celular por expresión amentada de PinX1, parecen concordar con lo anteriormente reportado por Huang y colaboradores (2017), cuya investigación muestra un aumento en la proliferación celular tras inhibición de la expresión de PinX1 mediada por un siRNA específico para esta molécula (KD) en las líneas celulares SKOV-3 y Hey, de cáncer de ovario. Estos autores reportan un incremento significativo en la proliferación celular a partir de 36 horas tras la transfección (Huang et al, 2017).

Ahondando en los mecanismos por los cuales PinX1 es capaz de ejercer esta modulación del crecimiento celular, como se ha mencionado anteriormente, posee una importante función como inhibidor de la telomerasa dada su interacción con TRF1 a través de un mecanismo de retroalimentación negativo y por su interacción con la telomerasa transcriptasa inversa (TERT), las cuales fueron las primeras evidencias sobre el papel regulador de PinX1 en la supervivencia celular (Zhou et al, 2001; Banik et al, 2004).

Además, se han descrito otras vías de señalización en las cuales se encuentra involucrado PinX1 y sobre las cuales pudiera ejercer su modulación anti

proliferativa. Tian y colaboradores (2017) realizaron estudios sobre líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas, reportando que el silenciamiento de PinX1 mediante un siRNA, es capaz de aumentar la expresión de la proteína Bcl-2 (antiapoptótica), mientras reduce la expresión de la proteína Bax (proapoptótica). De igual manera, tras el silenciamiento de PinX1 se observa una disminución en la expresión de las proteínas P15 y Rb, así como un aumento en la expresión de CDK4, CiclinaD1, CiclinaD2 y p-Rb (p-Ser608), indicando que el efecto de PinX1 sobre la proliferación celular y la formación de colonias, podría estar mediado por el aumento o disminución del ratio Bcl-2/Bax así como la modulación de la vía de señalización P15/ciclinaD1 (Tian et al, 2017).

Shi y colaboradores (2015), reportan a PinX1 en líneas celulares de cáncer de mama como regulador de la expresión de MMP-9 vía NF-κB, encontrando que la sobreexpresión de PinX1 reduce la expresión de NF-κB y p65 con una subsecuente disminución de MMP-9, lo que sugiere otro mecanismo mediante el cual PinX1 podría participar en la inhibición de la proliferación celular y metástasis (Shi et al, 2015) .

PinX1 también se ha visto involucrada en vía de señalización Mad/c-Myc reportada en carcinoma gástrico, se ha evidenciado su capacidad de inhibir la migración e invasión de células ccRCC y BC de carcinoma renal a través de la supresión de expresión y actividad de MMP-2 y MMP-9, respectivamente, vía la transcripción dependiente de NF-κB, así como su función dentro de la segregación cromosómica durante la mitosis, presentando funciones como proteína de unión a microtúbulos. Por otra parte, se ha reportado que la expresión génica de esta molécula está modulada por diversas proteínas y factores de transcripción que se ven comúnmente en vías de señalización relacionadas a la proliferación celular como lo son: CREB, p53, E2F, GATA-1, USF, HNF, NF-κB y C/EBP. De manera específica, se ha mostrado que la expresión de PinX1 es directamente activada por p53 en células de cáncer cervicouterino, y se ha observado que la proteína HPV16 E6 es capaz de inhibir la expresión de PinX1 vía la supresión de la actividad transcripcional de p53, y por ende aumentando la actividad de la

telomerasa. Esta importante relación entre la actividad de p53 y PinX1 podría ayudar a explicar la gran desregulación que presenta PinX1 transversalmente en un gran número de cánceres (Wang et al, 2010; Yuan et al, 2009; Wang et al, 2004; Wu et al, 2014).

Mediante los ensayos de luciferasa se observa que PinX1 tiene un efecto positivo sobre la actividad transcripcional mediada por ER α , observándose un incremento en la actividad transcripcional tras la transfección de PinX1, este efecto se observa en presencia y ausencia de hormona en diversas líneas celulares de cáncer de ovario. A pesar de observarse una actividad contraria a la anteriormente reportada para PinX1 y ER α , en la cual se ha mencionado como un correpresor de la actividad transcripcional mediada por ER α en cáncer de mama, cabe destacar que aún se desconocen otras interacciones que el complejo PinX1- ER α podría tener en el contexto de células de cáncer de ovario, pudiendo enmascarar los efectos antes reportados como correpresor de este receptor. Otro dato de interés que podría explicar este comportamiento es la modulación por PinX1 de genes diana de ER α de manera independiente de hormona, el cual ha sido reportada por Noriega-Reyes y colaboradores (2015). Siendo que las líneas celulares analizadas muestran una baja sensibilidad a hormonas, sería de interés determinar si PinX1 es capaz de ejercer cierto efecto regulador sobre los elementos de respuesta a ER α sin reclutamiento del complejo ER α -ligando (Noriega-Reyes et al, 2015).

Analizando la posibilidad de PinX1 como coactivador de ER α e inhibidor de la proliferación celular y clonogenicidad, resulta de interés determinar los genes diana que podrían estar siendo activados por el complejo PinX1-ER α y que participen en la inhibición de la proliferación celular. Uno de los genes activados por ER α es CASP8, el cual se ha mostrado como un gen regulado por la interacción PinX1-ER α en cáncer de mama y se presenta como una posibilidad para explicar la activación de genes diana anti proliferativos mediada por la sobreexpresión de PinX1 (Noriega-Reyes et al, 2015).

Existen otros ejemplos particulares de coactivadores de ER α , capaces de modular la expresión de genes inhibidores de la proliferación celular, entre los que se encuentra SRC-2 (TIF-2) que ha sido caracterizado como un coactivador de ER α , perteneciente a la familia de los Coactivadores de Receptores Esteroideos (SRC). A pesar de estar funcionalmente relacionado con los otros miembros de esta familia, se han descrito funciones distintas para este coactivador, se cree que esta especificidad en sus funciones es gracias a su expresión específica en tejidos, diferente afinidad por los receptores nucleares, así como modificaciones postraduccionales que regulan su actividad (Fenne et al, 2013).

Fenne y colaboradores (2013) sugieren que SRC-2 es importante para la expresión de diversos genes diana de ER α involucrados en la progresión del cáncer de mama, incluyendo tanto oncogenes como genes supresores de tumores. En primera instancia se ha demostrado que la depleción de SRC-2 aumenta la proliferación de la línea celular MCF-7, sugiriendo un rol antiproliferativo de esta proteína a pesar de su caracterización como coactivador de ER α . Por otra parte, en otros estudios, se ha demostrado que niveles reducidos de SRC-2 en pacientes con carcinoma hepatocelular se encuentra asociado con un peor pronóstico, mientras que la expresión aumentada de SRC-2 en células tumorales de mesotelioma pleural maligno está asociado con un mejor pronóstico (Fenne et al, 2013).

De manera puntual, se ha demostrado que la inhibición en la expresión de SRC-2 mediada por un siRNA, induce una expresión reducida de los genes EGR1, TAGLN, CAV1, BCL11b y AKR1B10 en comparación con su control; y, por el contrario, induce un aumento en la expresión de RET (tv2 y tv4), BCAS1, TFF3, ADM y CXCR4. Los genes con expresión reducida: EGR1, CAV1, TAGLN y BCL11b son genes responsivos a estrógenos descritos como genes supresores de tumores. Dada la expresión reducida de estos genes al inhibir la expresión de SRC-2, se sugiere que esta proteína podría ser un coactivador de ER, aumentando la expresión de este subgrupo de genes supresores de tumor, lo que

explicaría en parte la capacidad que tiene SRC-2 de inducir una disminución en la proliferación celular de la línea celular MCF-7 (Fenne et al, 2013).

De igual manera, mediante los ensayos de luciferasa se observa que PinX1 tiene un efecto positivo sobre la actividad transcripcional mediada por AR, observándose un incremento en la actividad transcripcional tras la transfección de PinX1, este efecto se observa en presencia y ausencia de hormona en diversas líneas celulares de cáncer de ovario. Este efecto de PinX1 como coactivador de AR se ha observado en líneas celulares de cáncer de próstata. Si bien es cierto que se han descrito diversas vías en cáncer de ovario en las cuales la activación de AR lleva a la inducción de la proliferación celular, varios autores han reportado la importancia del corregulador involucrado en la activación del receptor nuclear para determinar los genes diana cuya transcripción se ve aumentada. Para el caso particular de la activación de AR como mediador de la transcripción, Daniels y colaboradores (2014) han descrito al corregulador TBLR1 como coactivador de AR en cáncer de próstata, demostrando el incremento en la expresión de ciertos genes relacionados con la supresión de crecimiento celular y procesos de diferenciación como HUS1, NKX3.1, PMEPA1 y KRT18 y JAG1. Adicionalmente, han observado un incremento en la expresión de BMPR1B, un gen asociado con una baja expresión en cáncer de próstata, así como el gen JAG1, el ligando del receptor Notch 1, al cual se le han descrito posibles funciones como supresor de tumores en diversas neoplasias. También, se ha descrito que esta sobreexpresión de TBLR1 ocasiona un aumento en la expresión de p27. Respecto a este mismo coactivador, se ha mostrado que tras su transfección y bajo tratamiento con andrógenos no hay incremento en la expresión de genes asociados con proliferación celular, como CCNA2 Y CDC6. De manera específica se ha observado que TBLR1 efectivamente ocupa las regiones promotoras de los genes NKX3.1 y HUS1, y este fenómeno se ve aumentado bajo la estimulación con andrógenos. Esta investigación posiciona a TBLR1 como coactivador de AR, siendo capaz de activar la expresión de genes asociados con la supresión del crecimiento celular y la diferenciación, pero sin ser capaz de activar la

transcripción de genes pro proliferativos dependientes de AR. (Daniels et al, 2014; Flores-Ramírez et al, en preparación).

TBLR1 es un interesante ejemplo de un corregulador dual, el cual se reporta como correpresor de ER α en cáncer de mama y coactivador de AR en cáncer de próstata, y cuya sobreexpresión en líneas celulares de cáncer de mama induce un aumento en la proliferación celular, mientras que en cáncer de próstata induce una disminución en la proliferación celular, efectos contrarios a los esperados por su acción sobre los SHR involucrados. Estas evidencias resaltan la importancia de identificar los genes cuya expresión es activada por un coactivador putativo del receptor de hormonas esteroideas, y plantea la posibilidad de observar un coactivador cuya función se oriente a la inhibición del crecimiento y proliferación celular (Daniels et al, 2014; Wu et al, 2016).

Como se ha mencionado anteriormente, parece ser que la regulación ejercida por PinX1 es tejido específico y podría depender de la participación de otras moléculas correguladoras. Se han identificado ciertos genes con una correlación positiva con PinX1 como lo son: NEIL2, R3HCC1, POLR3D, GTF2E2 e INTS10. Respecto a las funciones de los productos de estos genes, se sabe que NEIL2 participa en la reparación de DNA por escisión de bases en daños por especies reactivas de oxígeno. POLR3D participa en el bloqueo de la progresión del ciclo celular en G1. GTF2E2, también llamado TFIIE, es parte del complejo de iniciación de la polimerasa II de RNA. INTS10 es una subunidad del complejo integrador que se asocia con la polimerasa II de RNA y participa en la maduración de los mRNAs, así como el procesamiento de los snRNAs U1 y U2. Además, se determinó que PinX1 es capaz de interactuar con TERT, DCK1, PTGES3 y HSP90AA1, moléculas conectadas con procesos celulares como: el mantenimiento de los telómeros, reparación de DNA y procesos de señalización. Sería de interés determinar si estas moléculas ya caracterizadas con cierta relación con PinX1 también se encuentran asociadas a los mecanismos celulares relacionados con los receptores de hormonas esteroideas (Huang et al, 2017; Dou et al, 2003;

Ittmann et al, 1994; Kuschal et al, 2016; Baillat et al, 2005; Hope et al, 2008; Patel et al, 2016; Marcos-Carcavilla et al, 2008).

10. Conclusiones

- Las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3 se reportan positivas para la expresión de AR, ER α , ER β y PR a nivel de mRNA y proteína.
- Las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3 se reportan positivas para la expresión de la proteína PinX1, encontrándose una expresión diferencial entre las líneas celulares, dónde las líneas celulares TOV-112D y OV-90 presentan la menor expresión, mientras que la línea celular SK-OV-3 presenta la mayor expresión.
- Se observa una localización predominantemente nuclear de los SHR en las células de cáncer de ovario. De igual manera se observa a la proteína PinX1 en una localización predominantemente nuclear.
- La línea celular OVCAR-3 se reporta insensible a E2 y DHT, no presentando un aumento en su proliferación celular tras la adición de la hormona. La línea celular TOV-112D se reporta sensible a E2 y DHT, potencializando su proliferación tras la adición de estas hormonas. La línea celular SK-OV-3 se reporta sensible a E2 e insensible a DHT.
- La sobreexpresión estable de Pinx1 inhibe la proliferación celular en las líneas celulares OVCAR-3, TOV-112D y SK-OV-3, de manera independiente de la adición de las hormonas E2 o DHT. Se observa una diferencia significativa en la proliferación celular a partir de las 24 horas.
- La sobreexpresión estable de Pinx1 inhibe la formación de colonias en la línea celular SK-OV-3, de manera independiente a adición de las hormonas E2 o DHT. El efecto de la inhibición en la clonogenicidad se observa

igualmente en los 3 escenarios reportados: sin tratamiento con hormona, bajo la adición de las hormonas E2 o DHT, y bajo la adición de los ligandos antagonistas para los SHR ER α y AR, Tamoxifén o Flutamida respectivamente.

- PinX1 tiene un efecto positivo sobre la actividad transcripcional mediada por ER α y AR, en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90 y SK-OV-3. Se observa un efecto positivo sobre la actividad transcripcional mediada por ER α de manera independiente de E2 en las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3, y dependiente de E2 en la línea celular OV-90. Se observa un efecto positivo sobre la actividad transcripcional mediada por AR de manera dependiente de DHT en las líneas celulares OVCAR-3 y SK-OV-3, e independiente de DHT en la línea celular OV-90.

11. Perspectivas

Por los datos reportados que sugieren una aparente expresión diferencial de PinX1 en tejidos neoplásicos de ovario y su relación con la etapa de progresión, sería de relevancia determinar cuantitativamente la expresión diferencial de PinX1 en las antes mencionadas líneas celulares, así como en biopsias de tejido neoplásico de distintos subtipos histológicos, asociando características propias del subtipo histológico con posibles mecanismos involucrados con PinX1 y la progresión y desarrollo de esta neoplasia.

Por el efecto que tiene PinX1 sobre procesos de proliferación celular y formación de colonias induciendo una aparente inhibición de los mismos, sería de interés determinar mediante otras técnicas de migración celular y apoptosis, los efectos en la sobreexpresión de esta proteína. De igual manera podría ser interesante observar los efectos de la subexpresión de PinX1 en las antes mencionadas líneas celulares.

Por el papel observado como corregulador de los receptores de hormonas esteroideas, sería de importancia determinar los genes diana cuya transcripción se ve activada por el complejo PinX1-SHR, determinando la tasa de cambio en la expresión de los genes y el efecto que esta sobrerregulación de su expresión tiene sobre las células.

Como se ha mencionado anteriormente, parece ser que la regulación ejercida por PinX1 es tejido específico y podría depender de la participación de otras moléculas correguladoras, por lo cual también sería de relevancia determinar la posible participación de otras moléculas en el complejo PinX1-SHR.

Referencias

1. Akahira, J.-I., Yoshikawa, H., Shimizu, Y., Tsunematsu, R., Hirakawa, T., Kuramoto, H., Sato, S. (2001). Prognostic Factors of Stage IV Epithelial Ovarian Cancer: A Multicenter Retrospective Study. *Gynecologic Oncology*, 81(3), 398–403. <https://doi.org/10.1006/gyno.2001.6172>
2. Attia, G. R., Zeitoun, K., Edwards, D., Johns, A., Carr, B. R., & Bulun, S. E. (2000). Progesterone Receptor Isoform A But Not B Is Expressed in Endometriosis¹. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(8), 2897–2902. <https://doi.org/10.1210/jcem.85.8.6739>
3. Auersperg, N., Wong, A. S., Choi, K. C., Kang, S. K., & Leung, P. C. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocrine Reviews*, 22(2), 255–288. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.2.0422>
4. Baillat, D., Hakimi, M.-A., Näär, A. M., Shilatifard, A., Cooch, N., & Shiekhattar, R. (2005). Integrator, a Multiprotein Mediator of Small Nuclear RNA Processing, Associates with the C-Terminal Repeat of RNA Polymerase II. *Cell*, 123(2), 265–276. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.019>
5. Balasenthil, S., Gururaj, A. E., Talukder, A. H., Bagheri-Yarmand, R., Arrington, T., Haas, B. J., ... Kumar, R. (2007). Identification of Pax5 as a Target of MTA1 in B-Cell Lymphomas. *Cancer Research*, 67(15), 7132–7138. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-0750>
6. Banik, S. S. R., & Counter, C. M. (2004). Characterization of Interactions between PinX1 and Human Telomerase Subunits hTERT and hTR. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 51745–51748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408131200>
7. Bardin, A., Boulle, N., Lazennec, G., Vignon, F., & Pujol, P. (2004). Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocrine-Related Cancer*, 11(3), 537–551. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15369453>
8. Bardin, A., Hoffmann, P., Boulle, N., Katsaros, D., Vignon, F., Pujol, P., & Lazennec, G. (2004). Involvement of Estrogen Receptor in Ovarian Carcinogenesis. *Cancer Research*, 64. Retrieved from <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/64/16/5861.full.pdf>
9. Bautista, S., Vallès, H., Walker, R. L., Anzick, S., Zeillinger, R., Meltzer, P., & Theillet, C. (1998). In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 4(12), 2925–2929. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9865902>
10. Bell, D., Berchuck, A., Birrer, M., Chien, J., Cramer, D. W., Dao, F., ... Thomson, E. (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474(7353), 609–615. <https://doi.org/10.1038/nature10166>

11. Bell, D. A. (2005). Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Modern Pathology*, 18, S19–S32. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800306>
12. Blomquist, C. H., Bonenfant, M., McGinley, D. M., Posalaky, Z., Lakatua, D. J., Tuli-Puri, S., Tremblay, Y. (2002). Androgenic and estrogenic 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase in human ovarian epithelial tumors: evidence for the type 1, 2 and 5 isoforms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 81(4–5), 343–351. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(02\)00117-6](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(02)00117-6)
13. Braem, M. G. M., Onland-Moret, N. C., van den Brandt, P. A., Goldbohm, R. A., Peeters, P. H. M., Kruitwagen, R. F. P. M., & Schouten, L. J. (2010). Reproductive and Hormonal Factors in Association With Ovarian Cancer in the Netherlands Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, 172(10), 1181–1189. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq264>
14. Brinton, L. A., Melton, L. J., Malkasian, G. D., Bond, A., & Hoover, R. (1989). Cancer risk after evaluation for infertility. *American Journal of Epidemiology*, 129(4), 712–722. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2923119>
15. Butler, M. S., Ricciardelli, C., Tilley, W. D., & Hickey, T. E. (2013). Androgen Receptor Protein Levels Are Significantly Reduced in Serous Ovarian Carcinomas Compared with Benign or Borderline Disease but Are Not altered by Cancer Stage or Metastatic Progression. *Hormones and Cancer*, 4(3), 154–164. <https://doi.org/10.1007/s12672-013-0135-0>
16. Cai, M.-Y., Zhang, B., He, W.-P., Yang, G.-F., Rao, H.-L., Rao, Z.-Y., ... Xie, D. (2010). Decreased expression of PinX1 protein is correlated with tumor development and is a new independent poor prognostic factor in ovarian carcinoma. *Cancer Science*, 101(6), 1543–1549. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01560.x>
17. Cardillo, M. R., Petrangeli, E., Aliotta, N., Salvatori, L., Ravenna, L., Chang, C., & Castagna, G. (1998). Androgen receptors in ovarian tumors: correlation with oestrogen and progesterone receptors in an immunohistochemical and semiquantitative image analysis study. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research: CR*, 17(2), 231–237. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9700586>
18. Carlson, B. M. (2014). *Embriología humana y biología del desarrollo*. Elsevier, Madrid.
19. Casagrande, J. T., Louie, E. W., Pike, M. C., Roy, S., Ross, R. K., & Henderson, B. E. (1979). Incessant ovulation and ovarian cancer. *Lancet (London, England)*, 2(8135), 170–173. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/89281>
20. Catasús, L., Bussaglia, E., Rodríguez, I., Gallardo, A., Pons, C., Irving, J. A., & Prat, J. (2004). Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: Similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Human Pathology*, 35(11), 1360–1368. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2004.07.019>

21. Chan, K. K. L., Wei, N., Liu, S. S., Xiao-Yun, L., Cheung, A. N., & Ngan, H. Y. S. (2008). Estrogen Receptor Subtypes in Ovarian Cancer. *Obstetrics & Gynecology*, 111(1), 144–151. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000296715.07705.e9>
22. Chen, G., Da, L., Wang, H., Xu, Y., Chen, G., Sun, C., ... Zhao, M. (2011). HIV-Tat-Mediated Delivery of an LPTS Functional Fragment Inhibits Telomerase Activity and Tumorigenicity of Hepatoma Cells. *Gastroenterology*, 140(1), 332–343. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.046>
23. Chen, G., Da, L., Xu, Y., Xu, M., Song, L., Li, T., & Zhao, M. (2010). C-terminal amino acids 290–328 of LPTS/PinX1 confer telomerase inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 398(4), 683–689. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.06.136>
24. Chen, Y.-H., Kim, J. H., & Stallcup, M. R. (2005). GAC63, a GRIP1-Dependent Nuclear Receptor Coactivator. *Molecular and Cellular Biology*, 25(14), 5965–5972. <https://doi.org/10.1128/MCB.25.14.5965-5972.2005>
25. Chen, Y.-L., Capeyrou, R., Humbert, O., Mouffok, S., Kadri, Y. A., Lebaron, S., Henry, Y. (2014). The telomerase inhibitor Gno1p/PINX1 activates the helicase Prp43p during ribosome biogenesis. *Nucleic Acids Research*, 42(11), 7330–7345. <https://doi.org/10.1093/nar/gku357>
26. Cheng, J., Lee, E. J., Madison, L. D., & Lazennec, G. (2004). Expression of estrogen receptor β in prostate carcinoma cells inhibits invasion and proliferation and triggers apoptosis. *FEBS Letters*, 566(1–3), 169–172. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.04.025>
27. Cheung, D. H.-C., Ho, S.-T., Lau, K.-F., Jin, R., Wang, Y.-N., Kung, H.-F., ... Shaw, P.-C. (2017). Nucleophosmin Interacts with PIN2/TERF1-interacting Telomerase Inhibitor 1 (PinX1) and Attenuates the PinX1 Inhibition on Telomerase Activity. *Scientific Reports*, 7, 43650. <https://doi.org/10.1038/srep43650>
28. Cho, K. R., & Shih, I.-M. (2009). Ovarian Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), 287–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246>
29. Choi, H. S., Hwang, C. K., Song, K. Y., Law, P.-Y., Wei, L.-N., & Loh, H. H. (2009). Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 380(3), 431–436. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.01.136>
30. CONAPO (2015) Proyecciones de la población 2010-2015
31. Coste, A., Antal, M. C., Chan, S., Kastner, P., Mark, M., O'malley, B. W., & Auwerx, J. (2006). Absence of the steroid receptor coactivator-3 induces B-cell lymphoma. *The EMBO Journal*, 25(11), 2453–2464. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601106>
32. Danforth, K. N., Eliassen, A. H., Tworoger, S. S., Missmer, S. A., Barbieri, R. L., Rosner, B. A., Hankinson, S. E. (2010). The association of plasma androgen levels with breast, ovarian and endometrial cancer risk factors among postmenopausal women. *International Journal of Cancer*, 126(1), 199–207. <https://doi.org/10.1002/ijc.24709>

33. Daniels, G., Li, Y., Gellert, L. L., Zhou, A., Melamed, J., Wu, X., Lee, P. (2014). TBLR1 as an androgen receptor (AR) coactivator selectively activates AR target genes to inhibit prostate cancer growth. *Endocrine-Related Cancer*, 21(1), 127–142. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0293>
34. Davison, S. L., Bell, R., Donath, S., Montalto, J. G., & Davis, S. R. (2005). Androgen Levels in Adult Females: Changes with Age, Menopause, and Oophorectomy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 90(7), 3847–3853. <https://doi.org/10.1210/jc.2005-0212>
35. Delaunay, F., Pettersson, K., Tujague, M., & Gustafsson, J. A. (2000). Functional differences between the amino-terminal domains of estrogen receptors alpha and beta. *Molecular Pharmacology*, 58(3), 584–590. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10953052>
36. Diep, C., Charles, N., Blake Gilks, C., Kalloger, S., Argenta, P., y Lange, C. A. (2013). Progesterone receptors induce FOXO1-dependent senescence in ovarian cancer cells. *Cell Cycle*, 12(9), 1433–1449. <https://doi.org/10.4161/cc.24550>
37. Dou, H., Mitra, S., & Hazra, T. K. (2003). Repair of Oxidized Bases in DNA Bubble Structures by Human DNA Glycosylases NEIL1 and NEIL2. *Journal of Biological Chemistry*, 278(50), 49679–49684. <https://doi.org/10.1074/jbc.M308658200>
38. Edmondson, R. J., Monaghan, J. M., & Davies, B. R. (2002). The human ovarian surface epithelium is an androgen responsive tissue. *British Journal of Cancer*, 86(6), 879–885. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6600154>
39. Elattar, A., Warburton, K. G., Mukhopadhyay, A., Freer, R. M., Shaheen, F., Cross, P., ... Edmondson, R. J. (2012). Androgen receptor expression is a biological marker for androgen sensitivity in high grade serous epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 124(1), 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2011.09.004>
40. Evangelou, A., Jindal, S. K., Brown, T. J., y Letarte, M. (2000). Down-regulation of transforming growth factor beta receptors by androgen in ovarian cancer cells. *Cancer Research*, 60(4), 929–935. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706107>
41. Evans, R. M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science*, 240(4854), 889–895. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3283939>
42. Feng, Y., Hua, K., Sun, H., Yu, Y., Jin, H., y Feng, Y. (2011). Re-expression of estrogen receptor β inhibits the proliferation and migration of ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *Oncology Reports*, 26(6), 1497–1503. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1430>
43. Fenne, I. S., Helland, T., Flågeng, M. H., Dankel, S. N., Mellgren, G., y Sagen, J. V. (2013). Downregulation of Steroid Receptor Coactivator-2 Modulates Estrogen-Responsive Genes and Stimulates Proliferation of MCF-7 Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, 8(7), e70096. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070096>
44. Foong, K. W., & Bolton, H. (2017). Obesity and ovarian cancer risk: A systematic review. *Post Reproductive Health*, 23(4), 183–198. <https://doi.org/10.1177/2053369117709225>

45. Galtier-Dereure, F., Capony, F., Maudelonde, T., y Rochefort, H. (1992). Estradiol stimulates cell growth and secretion of procathepsin D and a 120-kilodalton protein in the human ovarian cancer cell line BG-1. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 75(6), 1497–1502. <https://doi.org/10.1210/jcem.75.6.1464654>
46. Gaspard, U. J., Romus, M. A., Gillain, D., Duvivier, J., Demey-Ponsart, E., & Franchimont, P. (1983). Plasma hormone levels in women receiving new oral contraceptives containing ethinyl estradiol plus levonorgestrel or desogestrel. *Contraception*, 27(6), 577–590. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6225622>
47. Giguère, V. (1999). Orphan Nuclear Receptors: From Gene to Function 1. *Endocrine Reviews*, 20(5), 689–725. <https://doi.org/10.1210/edrv.20.5.0378>
48. Globocan. (2018) Estimated age-standardized incidence and mortality rates (World) in 2018, worldwide, both sexes, all ages. International Agency for Research on Cancer. World Health Organization
49. Gogoi, R., Kudla, M., Gil, O., & Fishman, D. (2008). The Activity of Medroxyprogesterone Acetate, an Androgenic Ligand, in Ovarian Cancer Cell Invasion. *Reproductive Sciences*, 15(8), 846–852. <https://doi.org/10.1177/1933719108323446>
50. Guglielmi, B., & Werner, M. (2002). The Yeast Homolog of Human PinX1 Is Involved in rRNA and Small Nucleolar RNA Maturation, Not in Telomere Elongation Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35712–35719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205526200>
51. Gururaj, A. E., Singh, R. R., Rayala, S. K., Holm, C., den Hollander, P., Zhang, H., ... Kumar, R. (2006). MTA1, a transcriptional activator of breast cancer amplified sequence 3. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(17), 6670–6675. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601989103>
52. Haning, R. V., Kiggins, A. J., & Leiheit, T. L. (1985). Maternal serum progesterone, 17 β -Estradiol and estriol are increased in pregnancies which follow treatment with human menopausal gonadotropins: Effects of multiple gestation and maternal endocrine status. *Journal of Steroid Biochemistry*, 22(6), 823–829. [https://doi.org/10.1016/0022-4731\(85\)90292-4](https://doi.org/10.1016/0022-4731(85)90292-4)
53. Havrilesky, L. J., McMahon, C. P., Lobenhofer, E. K., Whitaker, R., Marks, J. R., & Berchuck, A. (n.d.). Relationship between expression of coactivators and corepressors of hormone receptors and resistance of ovarian cancers to growth regulation by steroid hormones. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 8(2), 104–113. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11336882>
54. Hope, H., Bogliolo, S., Arkowitz, R. A., & Bassilana, M. (2008). Activation of Rac1 by the guanine nucleotide exchange factor Dck1 is required for invasive filamentous growth in the pathogen *Candida albicans*. *Molecular Biology of the Cell*, 19(9), 3638–3651. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-12-1272>
55. Hoffman, B., Schorage, J., Schaffer, J., Halvorson, L., Bradshaw, K., & Cunningham, F. (2014). *Williams. Ginecologia* (2a ed.). México: McGraw Hill
56. Hua, K., Feng, W., Cao, Q., Zhou, X., Lu, X., & Feng, Y. (2008). Estrogen and progestin regulate metastasis through the PI3K/AKT pathway in human

- ovarian cancer. *International Journal of Oncology*, 33(5), 959–967. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18949358>
57. Hussein, M. R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update*, 11(2), 162–178. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmi001>
 58. Imai, Y., Youn, M.-Y., Inoue, K., Takada, I., Kouzmenko, A., & Kato, S. (2013). Nuclear receptors in bone physiology and diseases. *Physiological Reviews*, 93(2), 481–523. <https://doi.org/10.1152/physrev.00008.2012>
 59. INEGI. (2016) Estadísticas de Mortalidad. Cubos Dinámicos
 60. Ittmann, M. M. (1994). Cell cycle control of the BN51 cell cycle gene which encodes a subunit of RNA polymerase III. *Cell Growth & Differentiation: The Molecular Biology Journal of the American Association for Cancer Research*, 5(7), 783–788. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7947392>
 61. Johnson, F. B. (2011). PinX1 the tail on the chromosome. *Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1242–1244. <https://doi.org/10.1172/JCI57024>
 62. Jönsson, J.-M., Skovbjerg Arildsen, N., Malander, S., Måsbäck, A., Hartman, L., Nilbert, M., & Hedenfalk, I. (2015). Sex Steroid Hormone Receptor Expression Affects Ovarian Cancer Survival. *Translational Oncology*, 8(5), 424–433. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2015.09.002>
 63. Kato, N., Sasou, S., & Motoyama, T. (2006). Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Modern Pathology*, 19(1), 83–89. <https://doi.org/10.1038/modpathol.3800492>
 64. Kelemen, L. E., & Köbel, M. (2011). Mucinous carcinomas of the ovary and colorectum: different organ, same dilemma. *The Lancet Oncology*, 12(11), 1071–1080. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(11\)70058-4](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(11)70058-4)
 65. Killick, S., Eyong, E., & Elstein, M. (1987). Ovarian follicular development in oral contraceptive cycles. *Fertility and Sterility*, 48(3), 409–413. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59407-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59407-2)
 66. Kim, M. S., Kim, S. S., Yoo, N. J., & Lee, S. H. (2012). Somatic mutation of PINX1 gene is rare in common solid cancers. *APMIS*, 120(9), 770–771. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0463.2012.02901.x>
 67. Kohan-Ivani, K., Gabler, F., Selman, A., Vega, M., & Romero, C. (2016). Role of dihydrotestosterone (DHT) on TGF- β 1 signaling pathway in epithelial ovarian cancer cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 142(1), 47–58. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-1998-y>
 68. Kondo, T., Oue, N., Mitani, Y., Kuniyasu, H., Noguchi, T., Kuraoka, K., ... Yasui, W. (2005). Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Oncogene*, 24(1), 157–164. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207832>
 69. Koshiyama, M., Matsumura, N., & Konishi, I. (2017). Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics*, 7(1), 12. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010012>
 70. Kuang, S.-Q., Liao, L., Wang, S., Medina, D., O'Malley, B. W., & Xu, J. (2005). Mice Lacking the Amplified in Breast Cancer 1/Steroid Receptor Coactivator-3 Are Resistant to Chemical Carcinogen-Induced Mammary

- Tumorigenesis. *Cancer Research*, 65 (17), 7993–8002. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1179>
71. Kuffe, D. W., Holland, J. F., Frei, E., & American Cancer Society. (2003). *Cancer medicine* 6. BC Decker
 72. Kühnel, R., de Graaff, J., Rao, B. R., & Stolk, J. G. (1987). Androgen receptor predominance in human ovarian carcinoma. *Journal of Steroid Biochemistry*, 26(3), 393–397. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3495702>
 73. Kurman, R. J. (2013). Origin and molecular pathogenesis of ovarian high-grade serous carcinoma. *Annals of Oncology*, 24 (suppl 10), x16–x21. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt463>
 74. Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2008). Pathogenesis of Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Pathology, PAP* (2), 151–160. <https://doi.org/10.1097/PGP.0b013e318161e4f5>
 75. Kuschal, C., Botta, E., Orioli, D., Digiovanna, J. J., Seneca, S., Keymolen, K., ... Stefanini, M. (2016). GTF2E2 Mutations Destabilize the General Transcription Factor Complex TFIIE in Individuals with DNA Repair-Proficient Trichothiodystrophy. *The American Journal of Human Genetics*, 98(4), 627–642. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.02.008>
 76. Lai, X.-F., Shen, C.-X., Wen, Z., Qian, Y.-H., Yu, C.-S., Wang, J.-Q., ... Wang, H.-L. (2012). PinX1 regulation of telomerase activity and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(1), 12. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-31-12>
 77. Langdon, S. P., Hirst, G. L., Miller, E. P., Hawkins, R. A., Tesdale, A. L., Smyth, J. F., & Miller, W. R. (1994). The regulation of growth and protein expression by estrogen in vitro: a study of 8 human ovarian carcinoma cell lines. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 50(3–4), 131–135. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8049141>
 78. Lanz, R. B., Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2008). Nuclear Receptor Coregulators in Human Diseases. *Nuclear Receptor Coregulators and Human Diseases* (pp. 1–133). https://doi.org/10.1142/9789812819178_0001
 79. Lau, K. M., Mok, S. C., & Ho, S. M. (1999). Expression of human estrogen receptor-alpha and -beta, progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(10), 5722–5727. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10318951>
 80. Le Marchand, L., Seifried, A., Lum-Jones, A., Donlon, T., & Wilkens, L. R. (2003). Association of the Cyclin D1 A870G Polymorphism With Advanced Colorectal Cancer. *JAMA*, 290(21), 2843. <https://doi.org/10.1001/jama.290.21.2843>
 81. Lee, K. R., & Young, R. H. (2003). The distinction between primary and metastatic mucinous carcinomas of the ovary: gross and histologic findings in 50 cases. *The American Journal of Surgical Pathology*, 27(3), 281–292. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12604884>
 82. Lee, P., Rosen, D. G., Zhu, C., Silva, E. G., & Liu, J. (2005). Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer.

- Gynecologic Oncology*, 96 (3), 671–677.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2004.11.010>
83. Lee, S., Garner, E. I. O., Welch, W. R., Berkowitz, R. S., & Mok, S. C. (2007). Over-expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha in ovarian clear cell carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 106(2), 311–317.
<https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2007.03.041>
84. Li, H.-L., Han, L., Chen, H.-R., Meng, F., Liu, Q.-H., Pan, Z.-Q., ... Zheng, J.-N. (2015). PinX1 serves as a potential prognostic indicator for clear cell renal cell carcinoma and inhibits its invasion and metastasis by suppressing MMP-2 via NF-kB-dependent transcription. *Oncotarget*, 6(25), 21406–21420. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4011>
85. Li, H.-L., Song, J., Yong, H.-M., Hou, P.-F., Chen, Y.-S., Song, W.-B., ... Zheng, J.-N. (2016). PinX1: structure, regulation and its functions in cancer. *Oncotarget*, 7(40), 66267–66275. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11411>
86. Li, J. Y., Daniels, G., Wang, J., & Zhang, X. (2015). TBL1XR1 in physiological and pathological states. *American Journal of Clinical and Experimental Urology*, 3(1), 13–23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26069883>
87. Ligr, M., Patwa, R. R., Daniels, G., Pan, L., Wu, X., Li, Y., ... Lee, P. (2011). Expression and Function of Androgen Receptor Coactivator p44/Mep50/WDR77 in Ovarian Cancer. *PLoS ONE*, 6(10), e26250. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0026250>
88. Lin, J., Jin, R., Zhang, B., Yang, P. X., Chen, H., Bai, Y. X., ... Huang, J. (2007). Characterization of a novel effect of hPinX1 on hTERT nucleolar localization. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(4), 946–952. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.123>
89. Liu, J.-Y., Qian, D., He, L.-R., Li, Y.-H., Liao, Y.-J., Mai, S.-J., ... Xie, D. (2013). PinX1 suppresses bladder urothelial carcinoma cell proliferation via the inhibition of telomerase activity and p16/cyclin D1 pathway. *Molecular Cancer*, 12(1), 148. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-148>
90. Lonard, D. M., Nawaz, Z., Smith, C. L., & O'Malley, B. W. (2000). The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Molecular Cell*, 5(6), 939–948. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10911988>
91. Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2008). SRC-3 Transcription-Coupled Activation, Degradation, and the Ubiquitin Clock: Is There Enough Coactivator to Go Around in Cells? *Science Signaling*, 1(13), pe16-pe16. <https://doi.org/10.1126/stke.113pe16>
92. Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2007). Nuclear Receptor Coregulators: Judges, Juries, and Executioners of Cellular Regulation. *Molecular Cell*, 27(5), 691–700. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.012>
93. Long, L., Wang, W., Cai, X.-D., Cheng, D., Shuai, X., & Peng, Y. (2014). PinX1-siRNA/mPEG-PEI-SPION combined with doxorubicin enhances the inhibition of glioma growth. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 7(5), 1170–1176. <https://doi.org/10.3892/etm.2014.1586>

94. Lu, K. H., Patterson, A. P., Wang, L., Marquez, R. T., Atkinson, E. N., Baggerly, K. A., ... Bast, R. C. (2004). Selection of Potential Markers for Epithelial Ovarian Cancer with Gene Expression Arrays and Recursive Descent Partition Analysis. *Clinical Cancer Research*, *10*(10), 3291–3300. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0409>
95. Lukanova, A., & Kaaks, R. (2005). Endogenous hormones and ovarian cancer: epidemiology and current hypotheses. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *14*(1), 98–107. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668482>
96. Lukanova, A., Lundin, E., Akhmedkhanov, A., Micheli, A., Rinaldi, S., Zeleniuch-Jacquotte, A., ... Toniolo, P. (2003). Circulating levels of sex steroid hormones and risk of ovarian cancer. *International Journal of Cancer*, *104*(5), 636–642. <https://doi.org/10.1002/ijc.10990>
97. Lurie, G., Wilkens, L. R., Thompson, P. J., Shvetsov, Y. B., Matsuno, R. K., Carney, M. E., ... Goodman, M. T. (2011). Estrogen Receptor Beta rs1271572 Polymorphism and Invasive Ovarian Carcinoma Risk: Pooled Analysis within the Ovarian Cancer Association Consortium. *PLoS ONE*, *6*(6), e20703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020703>
98. Ma, Y., Wu, L., Liu, C., Xu, L., Li, D., & Li, J.-C. (2009). The correlation of genetic instability of PINX1 gene to clinico-pathological features of gastric cancer in the Chinese population. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *135*(3), 431–437. <https://doi.org/10.1007/s00432-008-0471-6>
99. Mangelsdorf, D. J., & Evans, R. M. (1995). The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell*, *83*(6), 841–850. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8521508>
100. Marcos-Carcavilla, A., Calvo, J. H., González, C., Moazami-Goudarzi, K., Laurent, P., Bertaud, M., ... Serrano, M. (2008). Structural and functional analysis of the HSP90AA1 gene: distribution of polymorphisms among sheep with different responses to scrapie. *Cell Stress and Chaperones*, *13*(1), 19–29. <https://doi.org/10.1007/s12192-007-0004-2>
101. Mazumdar, A., Wang, R.-A., Mishra, S. K., Adam, L., Bagheri-Yarmand, R., Mandal, M., ... Kumar, R. (2001). Transcriptional repression of oestrogen receptor by metastasis-associated protein 1 corepressor. *Nature Cell Biology*, *3*(1), 30–37. <https://doi.org/10.1038/35050532>
102. McKenna, N. J., Lanz, R. B., & O'malley, B. W. (1999). *Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology*. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/d216/c869cddb7ec696d9332a86a6282985268058.pdf>
103. McKenna, N. J., & O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators. *Cell*, *108*(4), 465–474. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11909518>
104. Meng, Q., Rayala, S. K., Gururaj, A. E., Talukder, A. H., O'Malley, B. W., & Kumar, R. (2007). Signaling-dependent and coordinated regulation of transcription, splicing, and translation resides in a single coregulator, PCBP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 104(14), 5866–5871.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0701065104>
105. Modugno, F., & Edwards, R. P. (2012). Ovarian Cancer. *International Journal of Gynecological Cancer*, 22(8), S45–S57.
<https://doi.org/10.1097/IGC.0b013e31826bd1f2>
 106. Moreno-Bueno, G., Gamallo, C., Pérez-Gallego, L., de Mora, J. C., Suárez, A., & Palacios, J. (2001). beta-Catenin expression pattern, beta-catenin gene mutations, and microsatellite instability in endometrioid ovarian carcinomas and synchronous endometrial carcinomas. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, 10(2), 116–122. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11385321>
 107. Nagaich, A. K., Rayasam, G. V., Martinez, E. D., Becker, M., Qiu, Y., Johnson, T. A., ... Hager, G. L. (2004). Subnuclear Trafficking and Gene Targeting by Steroid Receptors. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1024(1), 213–220. <https://doi.org/10.1196/annals.1321.002>
 108. Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., ... Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, 89(3), 373–380. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9150137>
 109. Ness, R. B., Grisso, J. A., Klapper, J., Schlesselman, J. J., Silberzweig, S., Vergona, R., ... Wheeler, J. E. (2000). Risk of ovarian cancer in relation to estrogen and progestin dose and use characteristics of oral contraceptives. SHARE Study Group. Steroid Hormones and Reproductions. *American Journal of Epidemiology*, 152(3), 233–241. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10933270>
 110. Nezhat, F., Datta, M. S., Hanson, V., Pejovic, T., Nezhat, C., & Nezhat, C. (2008). The relationship of endometriosis and ovarian malignancy: a review. *Fertility and Sterility*, 90(5), 1559–1570. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.08.007>
 111. Noriega-Reyes, M. Y., Rivas-Torres, M. A., Oñate-Ocaña, L. F., Vallés, A. J., Baranda-Avila, N., & Langley, E. (2015). Novel role for PINX1 as a coregulator of nuclear hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 414, 9–18. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.011>
 112. Obeid, J.-P., Zafar, N., & El Hokayem, J. (2016). Steroid Hormone Receptor Coregulators in Endocrine Cancers. *IUBMB Life*, 68(7), 504–515. <https://doi.org/10.1002/iub.1517>
 113. O'Donnell, A. J. M., Macleod, K. G., Burns, D. J., Smyth, J. F., & Langdon, S. P. (2005). Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocrine-Related Cancer*, 12(4), 851–866. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01039>
 114. O'Malley, B. W. (2006). MOLECULAR BIOLOGY: Little Molecules with Big Goals. *Science*, 313(5794), 1749–1750. <https://doi.org/10.1126/science.1132509>
 115. O'Malley, B. W., & Kumar, R. (2009). Nuclear Receptor Coregulators in Cancer Biology. *Cancer Research*, 69(21), 8217–8222. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-2223>

116. Osborne, C. K., Schiff, R., Fuqua, S. A., & Shou, J. (2001). Estrogen receptor: current understanding of its activation and modulation. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(12 Suppl), 4338s–4342s; discussion 4411s–4412s. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11916222>
117. Osborne, C. K., Bardou, V., Hopp, T. A., Chamness, G. C., Hilsenbeck, S. G., Fuqua, S. A. W., ... Schiff, R. (2003). Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(5), 353–361. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12618500>
118. Patel, N., Crider, A., Pandya, C. D., Ahmed, A. O., & Pillai, A. (2016). Altered mRNA Levels of Glucocorticoid Receptor, Mineralocorticoid Receptor, and Co-Chaperones (FKBP5 and PTGES3) in the Middle Frontal Gyrus of Autism Spectrum Disorder Subjects. *Molecular Neurobiology*, 53(4), 2090–2099. <https://doi.org/10.1007/s12035-015-9178-2>
119. Prior, J. C. (2005). Ovarian Aging and the Perimenopausal Transition: The Paradox of Endogenous Ovarian Hyperstimulation. *Endocrine*, 26(3), 297–300. <https://doi.org/10.1385/ENDO:26:3:297>
120. Qian, D., Zhang, B., He, L.-R., Cai, M.-Y., Mai, S.-J., Liao, Y.-J., ... Xie, D. (2013). The telomere/telomerase binding factor PinX1 is a new target to improve the radiotherapy effect of oesophageal squamous cell carcinomas. *The Journal of Pathology*, 229(5), 765–774. <https://doi.org/10.1002/path.4163>
121. Rao, B. R., & Slotman, B. J. (1991). Endocrine Factors in Common Epithelial Ovarian Cancer*. *Endocrine Reviews*, 12(1), 14–26. <https://doi.org/10.1210/edrv-12-1-14>
122. Richardson, G. S. (1966). Ovarian Physiology. *New England Journal of Medicine*, 274(18), 1008–1015. <https://doi.org/10.1056/NEJM196605052741807>
123. Riman, T., Nilsson, S., & Persson, I. R. (2004). Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 83(9), 783–795. <https://doi.org/10.1111/j.0001-6349.2004.00550.x>
124. Rodriguez, G. C., Nagarsheth, N. P., Lee, K. L., Bentley, R. C., Walmer, D. K., Cline, M., ... Hughes, C. L. (2002). Progesterin-induced apoptosis in the Macaque ovarian epithelium: differential regulation of transforming growth factor-beta. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(1), 50–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773282>
125. Rogatsky, I., Zarembek, K. A., & Yamamoto, K. R. (2001). Factor recruitment and TIF2/GRIP1 corepressor activity at a collagenase-3 response element that mediates regulation by phorbol esters and hormones. *The EMBO Journal*, 20(21), 6071–6083. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.6071>
126. Rosenberg, L., Palmer, J. R., Zauber, A. G., Warshauer, M. E., Lewis, J. L., Strom, B. L., ... Shapiro, S. (1994). A Case-Control Study of Oral

- Contraceptive Use and Invasive Epithelial Ovarian Cancer. *American Journal of Epidemiology*, 139(7), 654–661. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a117055>
127. Shao, Z., Zhang, Y., Tong, X., Yang, Y., & Shao, Z. (2011). Dihydrotestosterone induces p27 degradation via direct binding with SKP2 in ovarian and breast cancer. *International Journal of Molecular Medicine*, 28(1), 109–114. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2011.677>
 128. Shaw, P. A., Rittenberg, P. V. C., & Brown, T. J. (2001). Activation of Androgen Receptor-Associated Protein 70 (ARA70) mRNA Expression in Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology*, 80(2), 132–138. <https://doi.org/10.1006/gyno.2000.6068>
 129. Sheach, L. A., Adeney, E. M., Kucukmetin, A., Wilkinson, S. J., Fisher, A. D., Elattar, A., ... Edmondson, R. J. (2009). Androgen-related expression of G-proteins in ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 101(3), 498–503. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605153>
 130. Shi, M., Cao, M., Song, J., Liu, Q., Li, H., Meng, F., ... Zheng, J. (2012). PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer via suppressing NF- κ B/ MMP-9 signaling pathway. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0332-2>
 131. Shi, R., Zhao, Z., Zhou, H., Wei, M., Ma, W.-L., Zhou, J.-Y., & Tan, W.-L. (2014). Reduced expression of PinX1 correlates to progressive features in patients with prostate cancer. *Cancer Cell International*, 14, 46. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-46>
 132. Shu, X. O., Moore, D. B., Cai, Q., Cheng, J., Wen, W., Pierce, L., ... Zheng, W. (2005). Association of cyclin D1 genotype with breast cancer risk and survival. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 14(1), 91–97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15668481>
 133. Siegel, R., Ward, E., Brawley, O., & Jemal, A. (2011). Cancer statistics, 2011. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61(4), 212–236. <https://doi.org/10.3322/caac.20121>
 134. Sieh, W., Köbel, M., Longacre, T. A., Bowtell, D. D., deFazio, A., Goodman, M. T., ... Ramus, S. J. (2013). Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *The Lancet Oncology*, 14(9), 853–862. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70253-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70253-5)
 135. SSA. (2015) Base de egresos hospitalarios 2013. Procesó el INEGI.
 136. Stadlmann, S., Gueth, U., Baumhoer, D., Moch, H., Terracciano, L., & Singer, G. (2007). Glypican-3 Expression in Primary and Recurrent Ovarian Carcinomas. *International Journal of Gynecological Pathology*, 26(3), 341–344. <https://doi.org/10.1097/pgp.0b013e31802d692c>
 137. Syed, V., Ulinski, G., Mok, S. C., Yiu, G. K., & Ho, S. M. (2001). Expression of gonadotropin receptor and growth responses to key reproductive hormones in normal and malignant human ovarian surface epithelial cells. *Cancer Research*, 61(18), 6768–6776. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559549>

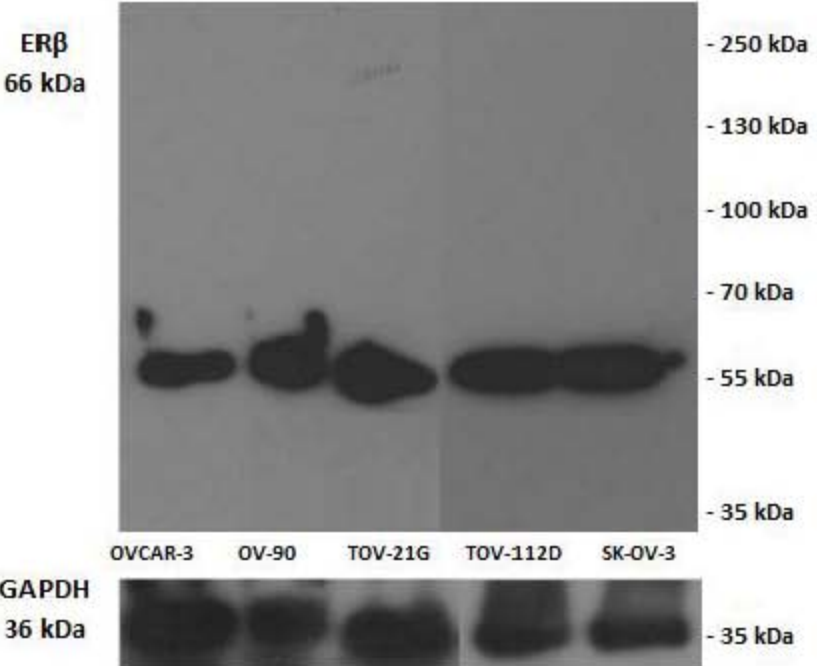
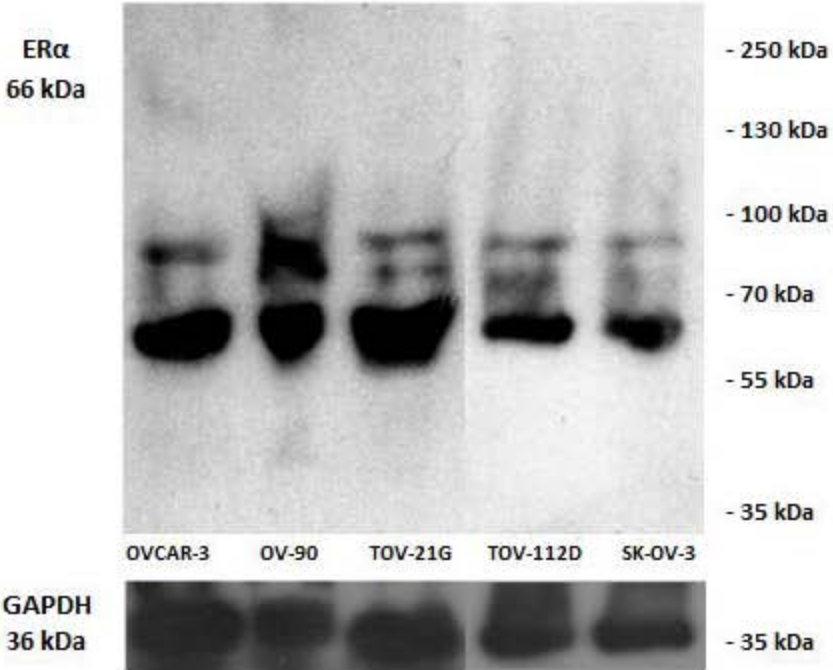
138. Syed, V., Mukherjee, K., Godoy-Tundidor, S., & Ho, S.-M. (2007). Progesterone induces Apoptosis in TRAIL-resistant ovarian cancer cells by circumventing c-FLIPL overexpression. *Journal of Cellular Biochemistry*, *102*(2), 442–452. <https://doi.org/10.1002/jcb.21304>
139. Takahashi, A., Kato, K., Kuboyama, A., Inoue, T., Tanaka, Y., Kuhara, A., ... Wake, N. (2009). Induction of senescence by progesterone receptor-B activation in response to cAMP in ovarian cancer cells. *Gynecologic Oncology*, *113*(2), 270–276. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2008.12.032>
140. Tan, D. S. P., & Kaye, S. (2007). Ovarian clear cell adenocarcinoma: a continuing enigma. *Journal of Clinical Pathology*, *60*(4), 355–360. <https://doi.org/10.1136/jcp.2006.040030>
141. Tanner, M. M., Grenman, S., Koul, A., Johannsson, O., Meltzer, P., Pejovic, T., ... Isola, J. J. (2000). Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *6*(5), 1833–1839. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10815905>
142. Shi, M., Cao, M., Song, J., Liu, Q., Li, H., Meng, F., ... Zheng, J. (2012). PinX1 inhibits the invasion and metastasis of human breast cancer via suppressing NF- κ B/ MMP-9 signaling pathway. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0332-2>
143. Tian, X.-P., Qian, D., He, L.-R., Huang, H., Mai, S.-J., Li, C.-P., ... Xie, D. (2014). The telomere/telomerase binding factor PinX1 regulates paclitaxel sensitivity depending on spindle assembly checkpoint in human cervical squamous cell carcinomas. *Cancer Letters*, *353*(1), 104–114. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.07.012>
144. Treeck, O., Pfeiler, G., Mitter, D., Lattrich, C., Piendl, G., & Ortmann, O. (2007). Estrogen receptor 1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Journal of Endocrinology*, *193*(3), 421–433. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0087>
145. Tsai, M., & O'Malley, B. W. (1994). Molecular Mechanisms of Action of Steroid/Thyroid Receptor Superfamily Members. *Annual Review of Biochemistry*, *63*(1), 451–486. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.63.070194.002315>
146. Tsilidis, K. K., Allen, N. E., Key, T. J., Dossus, L., Lukanova, A., Bakken, K., ... Riboli, E. (2011). Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *British Journal of Cancer*, *105*(9), 1436–1442. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.371>
147. Ueda, T., Mawji, N. R., Bruchovsky, N., & Sadar, M. D. (2002). Ligand-independent Activation of the Androgen Receptor by Interleukin-6 and the Role of Steroid Receptor Coactivator-1 in Prostate Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(41), 38087–38094. <https://doi.org/10.1074/jbc.M203313200>
148. Valladares, M., Corsini, G., & Romero, C. (2014). Asociación entre obesidad y cáncer de ovario. *Revista Médica de Chile*, *142*(5), 593–598. <https://doi.org/10.4067/S0034-98872014000500007>

149. Vang, R., Shih, I.-M., & Kurman, R. J. (2009). Ovarian Low-grade and High-grade Serous Carcinoma. *Advances in Anatomic Pathology*, 16(5), 267–282. <https://doi.org/10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa>
150. Vaughan, S., Coward, J. I., Bast, R. C., Berchuck, A., Berek, J. S., Brenton, J. D., ... Balkwill, F. R. (2011). Rethinking ovarian cancer: recommendations for improving outcomes. *Nature Reviews Cancer*, 11(10), 719–725. <https://doi.org/10.1038/nrc3144>
151. Wada-Hiraike, O., Hiraike, H., Okinaga, H., Imamov, O., Barros, R. P. A., Morani, A., ... Gustafsson, J.-A. (2006). Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta-/- mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(48), 18350–18355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608861103>
152. Wang, H.-B., Wang, W.-Q., Wang, X.-W., Sun, Y.-G., Zhou, G., Yang, S.-M., & Fan, D.-C. (n.d.). PinX1 gene transfection enhances the sensitivity of gastric carcinoma cell line to 5-fluorouracil. *Hepato-Gastroenterology*, 58(106), 682–686. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21661452>
153. Wang, H., Wang, X., Zhou, G., Wang, W., Sun, Y., Yang, S., & Fang, D. (2010). PinX1 Inhibits Telomerase Activity in Gastric Cancer Cells Through Mad1/c-Myc Pathway. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 14(8), 1227–1234. <https://doi.org/10.1007/s11605-010-1253-4>
154. Wang, S., Liao, C., Li, T., & Zhao, M. (2004). Cloning and characterization of the promoter region of human LPTS/PinX1 gene. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1676(3), 261–265. <https://doi.org/10.1016/j.bbaexp.2003.12.002>
155. Wang, Y., Yang, J., Gao, Y., Dong, L. J., Liu, S., & Yao, Z. (2007). Reciprocal regulation of 5alpha-dihydrotestosterone, interleukin-6 and interleukin-8 during proliferation of epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Biology & Therapy*, 6(6), 864–871. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17617741>
156. Wu, G., Liu, D., Jiang, K., Zhang, L., Zeng, Y., Zhou, P., ... Zheng, Y. (2014). PinX1, a novel target gene of p53, is suppressed by HPV16 E6 in cervical cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(2), 88–96. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.01.004>
157. Wu, X., Zhan, Y., Li, X., Wei, J., Santiago, L., Daniels, G., ... Lee, P. (2016). Nuclear TBLR1 as an ER corepressor promotes cell proliferation, migration and invasion in breast and ovarian cancer. *American Journal of Cancer Research*, 6(10), 2351–2360. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27822424>
158. Xu, W., Chen, H., Du, K., Asahara, H., Tini, M., Emerson, B. M., ... Evans, R. M. (2001). A Transcriptional Switch Mediated by Cofactor Methylation. *Science*, 294(5551), 2507–2511. <https://doi.org/10.1126/science.1065961>
159. Yang, F., Xiao-Yan, X., Bi-Liang, C., & Xiangdong, M. (2006). Knockdown of Rab25 expression by RNAi inhibits growth of human

- epithelial ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Pathology*, 38(6), 561–567. <https://doi.org/10.1080/00313020601024037>
160. Yoo, J. E., Oh, B.-K., & Park, Y. N. (2009). Human PinX1 Mediates TRF1 Accumulation in Nucleolus and Enhances TRF1 Binding to Telomeres. *Journal of Molecular Biology*, 388(5), 928–940. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.02.051>
161. Yoshihara, K., Tajima, A., Komata, D., Yamamoto, T., Kodama, S., Fujiwara, H., ... Tanaka, K. (2009). Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates *ZEB2* in tumor progression and prognosis. *Cancer Science*, 100(8), 1421–1428. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01204.x>
162. Yuan, K., Li, N., Jiang, K., Zhu, T., Huo, Y., Wang, C., ... Yao, X. (2009). PinX1 Is a Novel Microtubule-binding Protein Essential for Accurate Chromosome Segregation. *Journal of Biological Chemistry*, 284(34), 23072–23082. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.001990>
163. Zaino, R. J., Brady, M. F., Lele, S. M., Michael, H., Greer, B., & Bookman, M. A. (2011). Advanced stage mucinous adenocarcinoma of the ovary is both rare and highly lethal. *Cancer*, 117(3), 554–562. <https://doi.org/10.1002/cncr.25460>
164. Zhang, B., Bai, Y. X., Ma, H. H., Feng, F., Jin, R., Wang, Z. L., ... Huang, J. J. (2009). Silencing PinX1 Compromises Telomere Length Maintenance As Well As Tumorigenicity in Telomerase-Positive Human Cancer Cells. *Cancer Research*, 69(1), 75–83. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1393>
165. Zhang, L., Jiang, Y., Zheng, Y., Zeng, Y., Yang, Z., Huang, G., ... He, F. (2011). Selective killing of Burkitt's lymphoma cells by mBAFF-targeted delivery of PinX1. *Leukemia*, 25(2), 331–340. <https://doi.org/10.1038/leu.2010.261>
166. Zhang, R., Zhao, J., Wang, X., Wang, L., Xu, J., & Song, C. (2014). PinX1 without the G-patch motif suppresses proliferation, induces senescence, but does not inhibit telomerase activity in colorectal cancer SW480 cells. *Oncology Reports*, 32(1), 286–292. <https://doi.org/10.3892/or.2014.3199>
167. Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., & Reinberg, D. (1999). Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes & Development*, 13(15), 1924–1935. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444591>
168. Zhao, C., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J.-Å. (2008). Estrogen Receptor β : An Overview and Update. *Nuclear Receptor Signaling*, 6(1), nrs.06003. <https://doi.org/10.1621/nrs.06003>
169. Zhao, T., Zhang, Z.-N., Rong, Z., & Xu, Y. (2011). Immunogenicity of induced pluripotent stem cells. *Nature*, 474(7350), 212–215. <https://doi.org/10.1038/nature10135>
170. Zhou, X. Z., & Lu, K. P. (2001). The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell*, 107(3), 347–359. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11701125>

171. Zhou, X. Z. (2011). PinX1: a sought-after major tumor suppressor at human chromosome 8p23. *Oncotarget*, 2(10), 810–819. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.339>
172. Zuo, J., Wang, D.-H., Zhang, Y.-J., Liu, L., Liu, F.-L., & Liu, W. (2013). Expression and mechanism of PinX1 and telomerase activity in the carcinogenesis of esophageal epithelial cells. *Oncology Reports*, 30(4), 1823–1831. <https://doi.org/10.3892/or.2013.2649>

Figuras Suplementarias



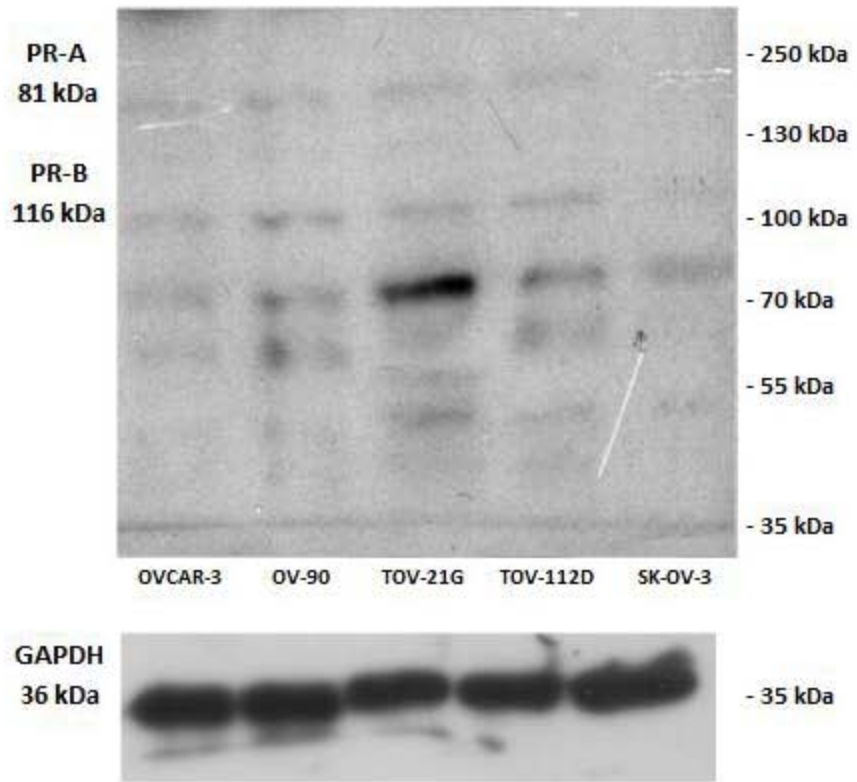
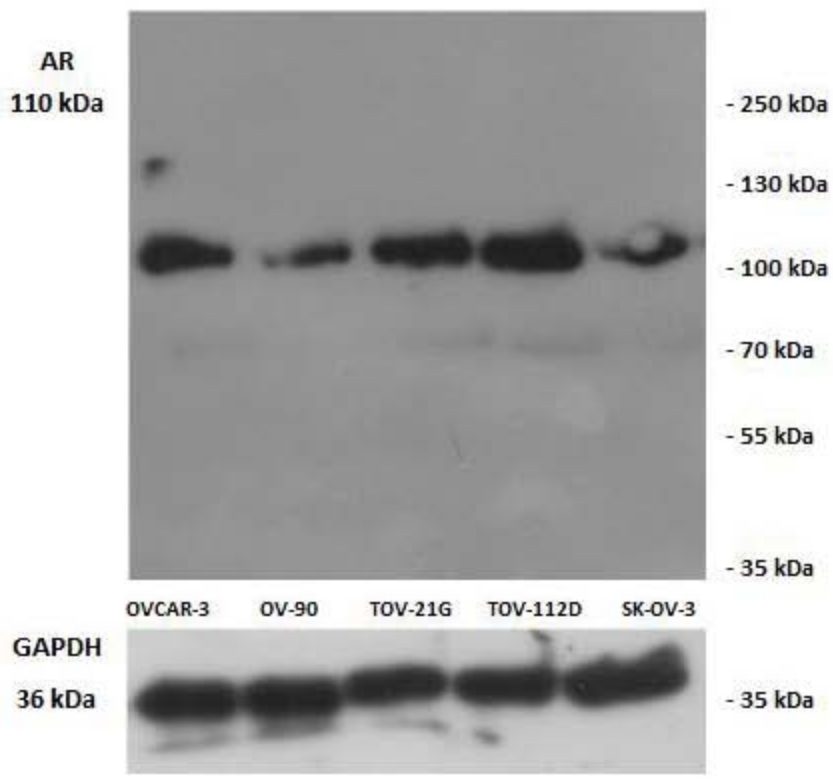


Fig. suplementaria 1. Caracterización de los receptores nucleares ER α , ER β , AR, PR-A y PR-B a nivel de proteína mediante Western Blot en las líneas celulares OVCAR-3, OV-90, TOV-21G, TOV-112D y SK-OV-3.