



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

DETERMINACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE FAK EN EL CÁNCER DE OVARIO

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. EN C. NOLASCO QUIROGA MANUEL

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA †
DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI IMSS

COMITÉ TUTOR: DRA. LETICIA ROCHA ZA VALETA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

CD. MX., JUNIO, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



OFICIO CPCB/201/2019

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 18 de febrero de 2019, aprobó la ratificación del jurado que le fue asignado en el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 03 de abril de 2017, para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del alumno **NOLASCO QUIROGA MANUEL** con número de cuenta **512026154**, con la tesis titulada **"DETERMINACIÓN DE LAS ISOFORMAS DE FAK EN EL CÁNCER DE OVARIO"**, realizada bajo la dirección del **DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ**:

Presidente: DR. JOSÉ MORENO RODRÍGUEZ
Vocal: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN
Secretario: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA
Suplente: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 18 de febrero de 2019


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Esta tesis fue realizada en el Posgrado en Ciencias Biológicas en la Universidad Nacional Autónoma de México. Se agradece de antemano el apoyo a Conacyt, por el apoyo económico recibido, Este trabajo estuvo bajo la dirección del Dr. Diego Julio Arenas Aranda y el Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez, también se agradece al comité tutor formado por: Dra Leticia Rocha Zavaleta y Dr Emilio Rojas del Castillo

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo está dedicado a la memoria del Dr. Diego Julio Arenas Arana, se agradece toda la atención y la oportunidad de compartir un poco de su tiempo. De antemano agradezco los conocimientos compartidos y el apoyo incondicional tanto en lo académico como en lo personal. Muchas gracias por todo y fue un gran gusto haber coincidido en la vida con una persona como usted Dr. Diego, se le extraña.

Agradezco a mis amigos que siempre me estuvieron apoyando, en especial a María José López Ibarra por su compañía apoyo y complicidad a lo largo de estos años. A mis amigos incondicionales que a pesar de la distancia siempre estuvieron para alentarme a seguir adelante a Ricardo Godínez, Rosita, Ricardo Monroy, Anita Lilia González Herrera y a Marisol Rosas Diaz que a pesar del tiempo seguimos apoyándonos.

Agradezco de forma especial a la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por apoyarme y por abrirme las puertas de su laboratorio ya que gracias a la confianza que me brindo ha sido posible la culminación de este trabajo, también agradezco el interés y el conocimiento compartido con un servidor.

Agradezco de forma especial la Dr Jose Moreno ya que ha estado presente a lo largo de mi vida académica desde la licenciatura, maestría y ahora doctorado, estoy muy agradecido por su confianza y el apoyo durante todos estos años. Muchas gracias

Una persona clave para realización de este trabajo es el Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez al cual le agradezco por todo su apoyo y confianza, así mismo le doy las gracias por su tiempo y por su dedicación para que este proyecto llegara a buen término.

Por último agradezco profundamente el apoyo de mi familia de mi madre Josefina Quiroga Cabrera, de mis hermanos Daniel, Walessa, Celene, Oddet y Soledad que siempre me estuvieron ayudando para que esta parte de mi vida académica llegara a una buena conclusión

ÍNDICE

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ÍNDICE DE FIGURAS

INDICE DE TABLAS Y GRAFICAS

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
1.INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. OVARIOS ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.....	5
1.2. FISIOLÓGÍA DEL OVARIO.....	6
1.3. CÁNCER DE OVARIO (CaO)	7
1.4. CLASIFICACIÓN DEL CaO.....	8
1.5. DESARROLLO DEL CÁNCER DE OVARIO.....	10
1.6. DIAGNÓSTICO Y BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE OVARIO.....	13
1.7. PROTEÍNA FAK, ESTRUCTURA, FUNCIÓN E IMPLICACIONES EN EL CaO.....	14
1.8. VIA DE SEÑALIZACIÓN INTERGINAS-FAK EN EL CAO.....	16
1.9. SPLICING ALTERNATIVO EN EL CÁNCER HE ISOFORMAS DE FAK.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	21
3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	22
4. JUSTIFICACIÓN.....	23
5. OBJETIVO GENERAL.....	24
6. OBJETIVOS PARTICULARES.....	25
7. METODOLOGÍA	26
7.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS.....	26

7.2. UNIVERSO DE TRABAJO.....	26
7.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN.....	26
7.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN.....	27
7.5. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN.....	27
7.6. CONSTRUCCIÓN Y DISEÑO DE LOS MICROARREGLOS DE TEJIDOS.....	27
7.7. INMUNOHISTOQUÍMICA DE FAK	29
7.8. CULTIVOS CELULARES DE SKOV3 Y NIH-OVCA3 E INMUNOCITOQUIMICA DE FAK CINASA Y FAT	30
7.9. CULTIVOS CELULARES Y EXTRACCIÓN DE RNA	31
7.10. SÍNTESIS DE cDNA Y PCR DE ISOFORMAS DE FAK.....	32
8. RESULTADOS.....	33
8.1. MICROARREGLOS DE TEJIDOS DE CÁNCER DE OVARIO.....	33
8.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FAK DOMINIO CINASA Y FAT EN EL CAO..	34
8.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FAK DOMINIO CINASA Y FAT EN LAS LINEAS CELULARES NIH-OVCA3 Y SKOV3.....	41
8.4. EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE FAK EN NIH-OVCA Y SKO.....	42
9. DISCUSIÓN	44
10. CONCLUSIONES	49
11. LITERATURA CITADA.....	50
12. APÉNDICE	57
12.1 ARTICULO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO	57

SIGLAS Y ABREVIATURAS

ANOVA.....	Análisis de varianza
ARP3.....	Proteína Relacionada a Actina
BRCA1.....	Cáncer de Mama 1 (Breast cáncer 1)
c-Met.....	Mesenchymal Epithelial Transition
CA125.....	Antígeno de Carcinoma 125
CA119.....	Antígeno de Carcinoma 119
CaO.....	Cáncer de Ovario
cDNA.....	Ácido Desoxirribonucleico complementario
CMN.....	Centro Médico Nacional
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA.....	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP.....	Desoxinucleótidos trifosfato
EGFR.....	Receptor de Factor de Crecimiento Epidermal
ETK.....	Cinasa de Tirosina Endotelial
FAK	Cinasa de Adhesión Focal
FAT.....	Diana de la adhesión focal (Focal Adhesion Targeting)
FERM.....	Ezrin-Radixin-Moesin
IMSS.....	Instituto Mexicano del Seguro Social
IRS1.....	Sustrato del receptor de insulina
JSAP1	Proteína 1 asociada a la cinasa
JNK/stres.....	c-Jun N-terminal kinase
MAT.....	Microarreglos de Tejidos
MDM1.....	Murine Double Minutes
OMS.....	Organización Mundial de la salud
TP53.....	Proteína tumoral 53
PBS.....	Buffer de Fosfatos Salino
PTK2.....	Proteína Cinasa de Tirosina
RACK1.....	Receptor para Activar la Cinasa C

RNA.....Ácido Ribonucleico
SRC.....Rous sarcoma
SH2.....Src Homology 2
SH3.....Src Homology 3
GRB2.....Growth Factor Receptor Bound Protein 2

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema reproductor femenino y estructura general del ovario	6
Figura 2. Hipótesis de carcinogénesis del ovario.....	12
Figura 3. Dominios e isoformas de FAK	19
Figura 4. Tinción de hetaxilina-eosina.	27
Figura 5. Construcción de MAT e inmunohistoquímica	28
Figura 6. Cultivo celular e inmunocitoquímica de FAK dominio cinasa y FAT	30
Figura 7. Corte histológico de microarreglos de tejidos	23
Figura 8. Criterios de evaluación de la expresión de la proteína FAK.....	33
Figura 9. Expresión de FAK dominio cinasa en el cáncer de ovario seroso y mucinoso...	34
Figura 10. Análisis densitométrico de la expresión de FAK.....	36
Figura 11. Expresión de FAK dominio FAT en el cáncer de ovario seroso y mucinoso.....	38
Figura 12. Presencia de FAK cinasa y FAT en tumores mucinoso.....	40
Figura 13. Expresión de FAK dominio cinasa y FAT.	41
Figura 14. Expresión de isoformas de FAK en líneas celulares de cáncer de ovario.....	42
Figura 15. Determinación de expresión de FAK mediante anticuerpos	43

ÍNDICE DE TABLAS Y GRÁFICAS

Tabla 1. Tumores de ovario: clasificación según su origen y morfología celular	13
Tabla 2: Análisis estadístico de la expresión de FAK.....	35
Gráfica 1. Expresión de FAK dominio cinasa, análisis densitométrico.....	36
Gráfica 2. Expresión de FAK dominio cinasa, análisis densitométrico	36
Tabla 3. Análisis de expresión de FAK dominio FAT.....	37

RESUMEN

Los ovarios como cualquier órgano y tejido están propensos a sufrir cambios que pueden conducir a algún tipo de cáncer. Esta neoplasia es una de las más agresivas dentro de los tumores ginecológicos, ya que más del 70 % de las pacientes fallecen en menos de 5 años. Uno de los mayores problemas de esta neoplasia es que es una enfermedad asintomática en sus primeras etapas y presenta síntomas poco específicos en estados más avanzados. Por esa razón es necesario buscar marcadores de diagnóstico y pronóstico efectivos. Existen diversos estudios que relacionan a la proteína FAK con el desarrollo del cáncer de ovario y ha sido propuesta como marcador y blanco terapéutico.

Esta proteína participa en diversos procesos celulares como proliferación, sobrevivencia y angiogénesis. Se han descrito diferentes isoformas de FAK que están diferencialmente expresadas en diversos tejidos. Una de estas isoformas ha sido especialmente estudiada y se denomina FRNK cuya principal función es la de dominante negativa. FRNK es una isoforma de FAK trunca la cual carece de los dominios FERM y Cinasa, la cual compite con FAK en los contactos focales y por lo tanto no permite la fosforilación y activación de vías de señalización mediada por FAK.

También se han descrito al menos otras 6 isoformas de FAK, sin embargo no se ha estudiado cuál de estas es la que se expresa o se relaciona directamente con el desarrollo del tumor. Debido a esto el objetivo de este estudio fue determinar si se expresaban isoformas en este tipo de neoplasia, mediante dos estrategias: en la primera buscamos si hay diferencia en la expresión de la proteína utilizando dos anticuerpos para diferentes regiones o dominios (cinasa y FAT) y la segunda estrategia fue utilizar diferentes iniciadores de PCR para buscar transcritos alternativos

En este estudio observamos que los tumores serosos tienen una mayor expresión de FAK dominio cinasa y está directamente relacionada con el incremento de la lesión. Para los tumores mucinoso la expresión de FAK dominio cinasa, es de moderada a baja, de tal manera que se observa una expresión diferencial con respecto a los tumores seroso. Para

FAK dominio FAT los tumores serosos mostraron una expresión menor en comparación con el ovario sin lesión, contrario a lo que sucede con el dominio cinasa. Para las lesiones mucinosas los resultados fueron similares a los serosos. Sin embargo, se observó que la ubicación de la proteína es en el núcleo. Nuestros resultados muestran que la ubicación de la proteína FAK depende del tipo de tumor y de los dominios que se expresen. Estos datos nos dan la pauta para inferir la expresión de diferentes isoformas y podrían localizarse en diferentes compartimentos celulares.

Finalmente, mediante el análisis en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario de transcritos alternativos, detectamos la expresión de diferentes transcritos de FAK. Se encontró una isoforma denominada FAK⁰, que corresponde a la isoforma que no contiene los exones 13 y 14; también se encontró una isoforma denominada FAK²⁸ la cual contiene el exon 13 y por último encontramos una isoforma denominada FAK^{28,6} la cual contiene los exones 13 y 14. Estos resultados muestran que en el cáncer de ovario se producen diferentes transcritos para FAK y posiblemente también se generan diferentes isoformas de la proteína.

ABSTRACT

The ovaries are prone to changes that can lead to diseases including cancer. The ovarian cancer is the most aggressive of gynecological tumor and more than 70% of patients die within 5 years. The biggest problem of this disease is that no symptoms in its early stages and presents nonspecific symptoms in its advanced stages. For that reason it is necessary to search for diagnostic and prognostic markers, effective. Several studies have associated the FAK protein with the development of ovarian cancer and It has been proposed as a marker and therapeutic target.

The FAK protein is involved in cellular processes such as proliferation, survival and angiogenesis. Tissue-specific alternative splicing generates several isoforms of FAK with different autophosphorylation rates. The most studied isoform is FRNK and acts as a dominant-negative regulator of FAK kinase activity. This is a truncated protein consisting of only the carboxyl-terminal noncatalytic domain of FAK and can compete with FAK for focal contacts localization.

They have been described at least 6 fak isoform. However they have not been studied in cancer development. The aim of this study was to determine the expression of FAK in ovarian cancer using two strategies: the first look if difference in protein expression using two different antibodies to regions or domains (kinase and FAT) and the second strategy was to use different PCR primers to search for 13 and 14 exons (This exons are eliminated in different isoforms).

This study found that serous tumors has increased FAK kinase domain expression and is directly related to the increase of the lesion. FAK kinasa domain expression in mucinous tumors, is moderate to low, so we observed a differential expression with respect to serous tumors

The expression of FAK FAT domain in serous tumors was lower compared to the ovary without tumor, contrary to what was observed with kinase domain. mucinous tumors exhibit similar behavior to serous, However, it was observed that the location of this protein in the

nucleus. Our results show that the location of the protein FAK depends on the type of tumor and the domains that are expressed. These data give us the guidelines to infer the expression of different isoforms and may be located in different cellular compartments.

Also found expression of alternative transcript of FAK. We found the expression of isoform called FAK⁰, this corresponds to the isoform that does not contain 13 and 14 exons; also we find expressed FAK²⁸, which contains exon 13 and finally we found the expression of FAK2^{8, 6} isoform. These results show the expression of different transcripts for FAK and possibly different isoforms of the protein are also generated.

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario es uno de los tumores ginecológicos más agresivos, en etapas tempranas presenta una sobrevida mayor al 90%, desafortunadamente es un padecimiento asintomático en estas primeras etapas, mientras que en etapas avanzadas se presentan síntomas poco específicos como: molestia abdominal, pérdida de peso, sangrado vaginal y constipación (1,2) . Por estas razones el 75 % de todos los casos son diagnosticados en etapas avanzadas (estados III y IV), cuando el tumor invadió el peritoneo (3). Las pacientes diagnosticadas en etapas avanzadas presentan una sobrevida a 5 años menor al 29%, de tal manera que 70% de las pacientes mueren a causa de este padecimiento (4).

1.1. OVARIOS ESTRUCTURA Y FUNCIÓN

Los ovarios son dos órganos ovalados y aplanados que tiene una longitud aproximada de 2-4 cm y pesan aproximadamente 15 g, éstos se encuentran en la cavidad pélvica del lado izquierdo y derecho. Los ovarios están fijos a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal denominado mesovario. El soporte nervioso, vascular y linfático ocurre a través de dicho pliegue, que junto con otras estructuras mantienen al ovario en su posición en la entrada de las trompas de falopio y unido al útero. En términos generales el ovario es el portador de los gametos femeninos y su función principal es dar origen, almacenar y madurar los óvulos. Sin embargo, a lo largo de su evolución adquirió la propiedad de regular endócrinamente la reproducción, convirtiéndose en un órgano de secreción hormonal, algunas de las hormonas más importantes producidas por los ovarios son: estrógenos, andrógenos y progesterona (5,6).

El ovario puede dividirse en tres componentes principales. El primero se denomina hilio que es la región en la cual los vasos sanguíneos y linfáticos entran y salen del ovario, además es el punto de anclaje entre el mesovario y el ovario. El segundo componentes es la médula y está compuesta por las células estromales. Por último se encuentra la corteza que contiene dos componentes principales: los ovocitos o células productoras de los gametos y las células estromales que forman el estroma cortical, cuyas funciones principales es funcionar como

tejido de sostén así como dar origen a las células de la teca (células que rodean a los folículos en desarrollo) y producir hormonas esteroideas (figura 1) (7).

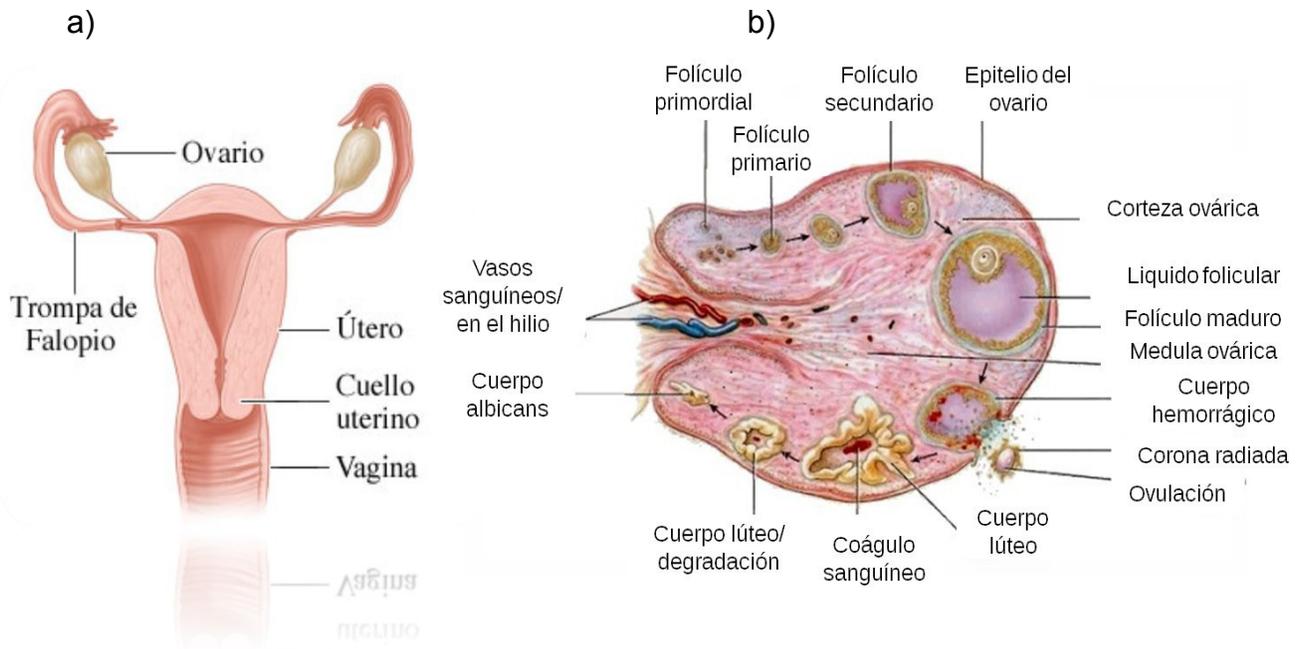


Figura 1. Sistema reproductor femenino y estructura general del ovario. Este sistema está compuesto por diferentes estructuras dentro de las cuales se encuentran los ovarios que se muestran en el panel a. dentro de estas estructuras se encuentran los ovarios que están compuestos por diferentes tejidos y tipos celulares como se muestra en el panel b.

El ovario se encuentra recubierto por un epitelio denominado mesotelio o epitelio de la superficie del ovario, en décadas pasadas este epitelio era conocido como epitelio germinal y se pensaba que daba origen a las células germinales (7,8).

1.2. FISIOLÓGÍA DEL OVARIO

La maduración de los ovocitos ocurre dentro de la corteza de los ovarios en estructuras denominadas folículos. La estructura está formada por una monocapa de células granulosas que contiene al oocito, esta estructura es denominada folículo primordial. Se estima que hay 2 millones de folículos primordiales al momento del nacimiento, pero una gran cantidad se atrofian durante el desarrollo infantil, quedando al momento de la pubertad alrededor de 400

000 folículos primordiales, de estos aproximadamente 400 van a madurar y posteriormente serán ovulados para pasar por las trompas de Falopio para su posible fecundación.

La maduración de los folículos primordiales ocurre en varias etapas. En primera instancia algunos folículos primordiales comienzan su maduración durante la quinta y sexta semana de gestación. Dicha maduración consiste en que la monocapa de células granulosas cambia su morfología de células granulosas alargadas, a células cubicas que comienzan a proliferar formando una capa estratificada de células que cubren al occito, en este punto se denominan folículos primarios. Estos folículos siguen creciendo debido a la proliferación de las células granulares, las cuales secretan diversos mucopolisacáridos que forman una capa traslucida que dará origen a la zona pelúcida. Otro evento importante es que las células estromales sufren cambios importantes y rodean la capa traslucida, dando lugar a células denominadas células de la teca, las células más cercanas a la lámina basal se denominan teca interna y las alejadas forman la teca externa. Toda esta estructura tiene un tamaño aproximado de 150 μm y en esta etapa es nombrado folículo secundario. Las células granulosas y las de la teca siguen proliferando hasta llegar a un tamaño de 200 μm y aparece una cavidad central llena de líquido denominada antro, esta estructura ahora es denominada folículo de graaf. Una vez maduro se produce la ruptura del folículo de graaf y la liberación del ovocito (6–8).

El ovario funciona como un órgano productor de hormonas las cuales son estradiol y progesterona principalmente pero también produce otras hormonas en menor cantidad como andostrediona, testosterona y otras hormonas no esteroideas. Las hormonas esteroideas son producidas por células de la granulosa, de la teca y del cuerpo lúteo.

El ovario es un órgano complejo y dinámico que como cualquier otro tejido es propenso a sufrir alteraciones celulares que podrían conducirlo a algún tipo de cáncer de ovario.

1.3. CÁNCER DE OVARIO (CaO)

El cáncer de ovario puede definirse como un tumor maligno que se origina en cualquier tipo celular de este órgano.

En la actualidad no se han determinado factores etiológicos principales para este tipo de neoplasia. Sin embargo se han encontrado diversos factores de riesgo asociados a su desarrollo. Uno de éstos es el factor genético o hereditario que solo representan del 5 al 10% en donde los genes involucrados son BRCA1 y BRCA2. Se ha identificado una mayor predisposición genética para desarrollar cáncer de ovario cuando hay mutación en estos genes (9,10). En décadas pasadas, el CaO hereditario se subdividía en dos grupos, el cáncer de ovario familiar sitio específico y el cáncer familiar mama-ovario (11,12). Sin embargo, en la actualidad se cree que los dos tipos son producto de un continuo de mutaciones en diversos genes con diferentes grados de penetrancia dentro de una familia.

La mayoría de los tumores de ovario son de origen espontáneo (aproximadamente el 90%), es decir no tiene una relación genética hereditaria, para este tipo de tumores se han encontrado diversos factores de riesgo que alterar los tejidos del ovario y provocar cambios celulares que pueden terminar en un carcinoma. Alguno de los factores de riesgo es la infertilidad, la menarquía temprana, la menopausia tardía, consumo de productos que induzcan la ovulación como gonadotropina, el consumo tabaco y alcohol, entre otros.

1.4. CLASIFICACIÓN DEL CaO

Los tumores de ovario se clasifican en tres categorías de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), estas categorías se basa en el tejido que da origen al tumor y son: tumores de superficie epitelial, tumores de células germinales y tumores de células mesenquimáticas (tabla1)(13).

Los tumores de origen epitelial representan el 60% de todos los tumores de ovario y componen el 90% de todos los tumores malignos de ovario, mientras que los tumores de células mesenquimáticas representan el 8% de todos los tumores y el 7% de los tumores malignos de ovario, por último los tumores de células germinales representan aproximadamente el 30% de los tumores de ovario, sin embargo solo ocupa el 3% de los tumores malignos de ovario. Como se puede apreciar los tumores de origen epitelial son los

más abundantes y los más agresivos, por tal motivo en este estudio nos enfocaremos a este tipo de tumores (13,14).

Los tumores de origen epitelial se clasifican de acuerdo a la morfología celular, teniendo los siguientes subtipos: tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometrioides, tumores de células claras, tumores de células de transición (tipo Brenner), tumores de células escamosas, tumores de mezcla epitelial y carcinoma no diferenciado. Esta clasificación se basa en la similitud que presentan las células de los diferentes tipos de tumores con las células de diferentes tejidos. Los tumores de tipo seroso se asemejan a las células del epitelio de las trompas de falopio y secretan un líquido seroso, como lo hacen las células que componen dicho epitelio, los tumores de tipo mucinosos se parecen al tejido del endocervix que es un epitelio prismático simple que secreta un líquido de característica mucosa, mientras que los tumores de tipo endometrioides se asemeja al endometrio (8).

Tabla 1. Tumores de ovario: clasificación según su origen y morfología celular

CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE OVARIO

- **Cáncer de origen epitelial**
 - ✓ Serosos
 - ✓ Mucinosos
 - ✓ Endometrial
 - ✓ Células claras
 - ✓ Tipo brenner
 - ✓ Mezcla epitelial
 - ✓ No diferenciado

- **Cáncer de origen mesenquimáticos**
 - ✓ Tumores de células de la granulosa
 - ✓ Tumores de células de sertoli
 - ✓ Tumores de los cordones sexuales

- ✓ Ginandroblastoma
 - ✓ Tumores de células esteroideas

 - **Cáncer de células germinales**
 - ✓ Teratoma
 - ✓ Disgerminoma
 - ✓ Tumor de saco vitelino
 - ✓ Tumor mixto de células germinales
-

Cada uno de los subtipos antes mencionados, con excepción del carcinoma no diferenciado se subdividen en tres categorías: a) tumores benignos o cistadenomas, b) limítrofes o borderline, con poco potencial cancerígeno y c) tumores malignos. Esta clasificación se basa en la agresividad o potencial oncogénico. Los tumores benignos o cistadenomas son tumores de células con poca proliferación y carentes de propiedades invasoras, estas células producen un líquido el cual está contenido dentro del quiste que forman las células que componen dicho tumor; los tumores de tipo limítrofes tienen una mayor proliferación celular, pero sin llegar a invadir el tejido estromático; por último, los tumores malignos, que son los más agresivos y muestran un comportamiento invasor. En la actualidad no se ha podido determinar si el CaO tiene un desarrollo secuencial, como es el caso de otros tipos de cáncer epitelial. Se han realizado algunos trabajos para identificar si existe esta relación secuencial entre cada uno de los tipos de CaO, sin embargo, no se han aportado pruebas sustanciales de este hecho (14).

1.5. DESARROLLO DEL CÁNCER DE OVARIO

El cáncer de ovario es una neoplasia muy heterogénea, como ya se mencionó en el apartado anterior existen diversos tipos de de origen epitelial. Este hecho complica el definir el desarrollo y origen de esta enfermedad, no obstante existen algunas teorías del origen y desarrollo de esta enfermedad.

Hipótesis de la ovulación incesante: La ovulación provoca una ruptura del epitelio, mismo que tiene que ser reparado. Este proceso involucra una proliferación y reparación de tejido lo cual incrementa el riesgo de daño celular durante la reparación (15). Este mecanismo se lleva a cabo durante toda la vida reproductiva femenina de tal manera que la menarca temprana, la menopausia tardía y la nuliparidad, son factores de riesgo de este tipo de neoplasia, esto se debe a que hay mayor número de ciclos de ovulación durante la vida de las mujeres (16). Por otro lado los estudios muestran que mujeres con mayor número de embarazos y que consumen anticonceptivos orales tiene menor riesgo de padecer esta enfermedad lo que refuerza esta hipótesis (15,16). Esta hipótesis también sugiere que después de la ovulación el epitelio del ovario puede incrustarse en el tejido, estas células sufren una metaplasia para formar los diferentes tipos celulares que darán origen a los distintos tipos de tumor (serosos, mucinosos, tipo endometrial, células claras etc.), estas células pueden sufrir mutaciones que le permitan proliferar y desarrollar el tumor, y posteriormente un carcinoma invasor (figura 2).

Hipótesis de gonadotropinas: Se ha observado que las gonadotropinas afectan directamente el epitelio del ovario lo que podría alterar la célula y provocar la malignidad, también existe un efecto indirecto, en el cual estas hormonas provocan la producción de estrógenos lo cual podría afectar la proliferación. Un factor más que apoya esta hipótesis es el hecho que las gonadotropinas incrementan en mujeres pos-menopausicas, que es el grupo en el que se presentan más casos de este padecimiento, por otro lado el consumo de anticonceptivos orales son factores protectores ya que disminuye los niveles de gonadotropina y la ovulación, de tal manera que estos fenómenos apoyan de manera circunstancial dicha hipótesis. Otro factor de riesgo que concuerda con esto es el hecho de que mujeres que se someten a tratamientos de infertilidad mediante el consumo de gonadotropinas, incrementa el factor de riesgo de padecer esta neoplasia (17).

Hipótesis de inflamación: como ya se había mencionada la ovulación implica un proceso de ruptura del tejido del ovario y por ende un procesos inflamatorio y de reparación en el cual se producen especies reactivas de oxígeno que dañan a las células provocando mutaciones que las llevaran a convertirse en células malignas (15).

Como podemos darnos cuenta el desarrollo de esta patología no está claro, sin embargo se ha debatido ampliamente, y como podemos ver las teorías antes presentadas parecen tener un grado de veracidad, por tal motivo se ha formulado una hipótesis que conjunta las teorías antes mencionadas.

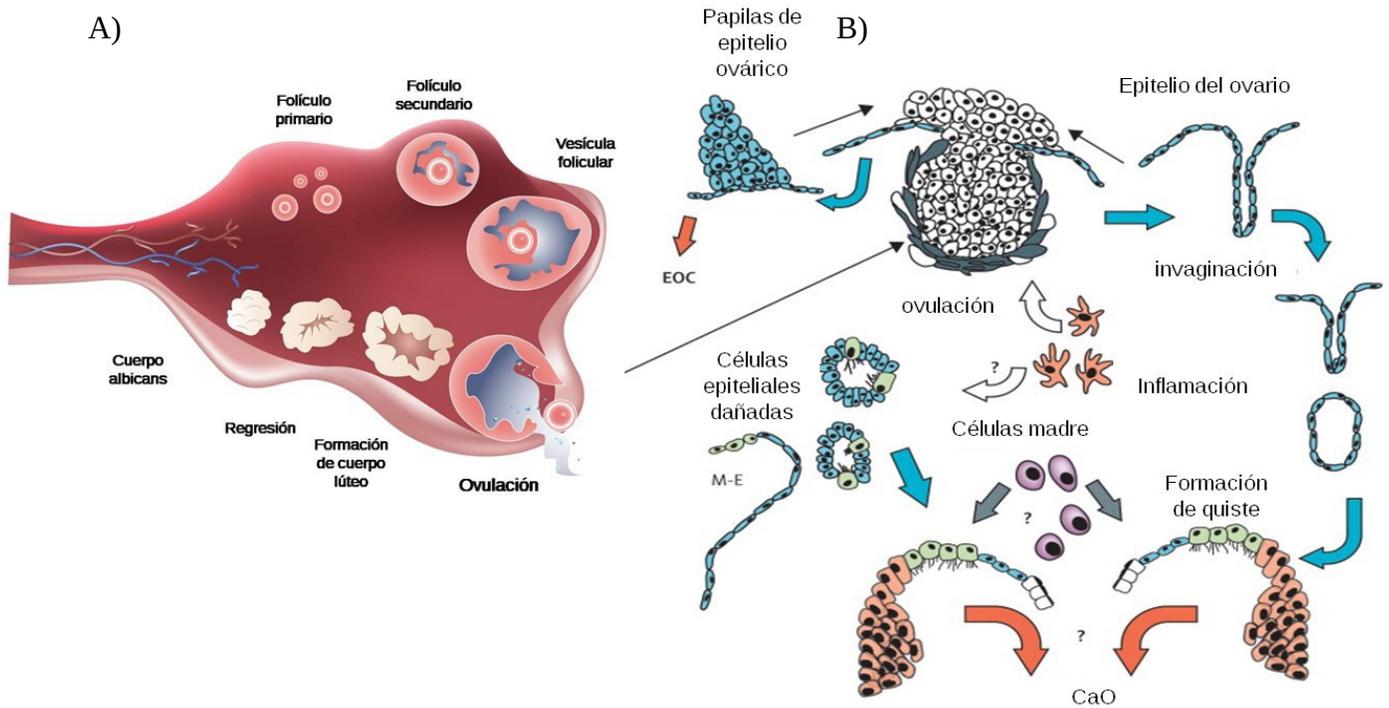


Figura 2. Hipótesis de carcinogénesis del ovario. En todas las hipótesis consideran la ovulación como un factor importante en el desarrollo de esta neoplasia (panel A), así mismo consideran la lesión del epitelio como un factor importante. Sin embargo difieren en algunos procesos posteriores, en el panel B se muestra la hipótesis alternativa en la cual considera factores inflamatorios, invaginación epitelial, células madre y mutación en las células epiteliales incrustadas en el ovario (tomado y modificado de Fleming y col 2005).

La hipótesis clásica postula que los diferentes tipos de tumores de ovario (serosos, mucinoso, endometriodes, células clara, tipo Brenner, tumores de células escamosas, células de mezcla epitelial y no diferenciado) son originados por el tejido epitelial del ovario. Sin embargo tiene varios puntos que se tiene que considerar, por ejemplo el hecho de que un epitelio simple cúbico pudiera sufrir diferentes procesos de metaplasia para dar origen a los tumores con las morfologías celulares antes mencionadas.

Se ha debatido ampliamente la carcinogénesis del ovario y la mayoría de los investigadores concuerdan que un factor de riesgo importantes es la ovulación en la cual se expone el estroma del ovario al romperse el epitelio, sin embargo se ha postulado que el origen de las células tumorales provienen de tejido ajeno al ovario, de tal manera que los tumores seroso y tipo endometrial son derivados de las trompas de falopio y endometrio respectivamente en donde las células de estas estructuras se incrustan el ovario a través de la ruptura del epitelio que dejo la ovulación (14).

Para los tumores mucinosos y tipo Brenner no se ha determinado su origen, pero existen evidencias que apunta a que son originadas por células de Walthard, mismas que son producidas por tejido conectivo de las trompas de falopio.

La células antes mencionadas una vez incrustadas en el ovario están expuestas a las gonadotropinas y a células inflamatorias generan especies reactivas de oxígeno que dañan el DNA de las células del ovario y provocar mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumores y esto puede llevar a una transformación de células normales hacia células tumorales (figura 2) (18).

1.5. DIAGNÓSTICO Y BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE OVARIO

Como en muchos padecimientos el diagnóstico temprano es fundamental para tener una buena respuesta al tratamiento. El CaO es una de las neoplasias ginecológicas más agresivas, desafortunadamente es asintomática en sus etapas tempranas y debido a esto solo el 20% es diagnosticado en estas etapas y presentan una sobrevivencia mayor al 90%. Por otro lado el 80 % de los tumores son diagnosticados en etapas III y IV con una esperanza de vida a 5 años menor al 25 %. En etapas tempranas es una enfermedad asintomática y en las etapas avanzadas tiene síntomas poco específicos como: distensión y dolor abdominal, sensación de saciedad pérdida de peso, sangrado vaginal y constipación (19,20). Goff y colaboradores sugieren que no solo hay que tener en cuenta estos síntomas, además hay que considerar la duración, ya que si estos síntomas son constantes es un factor para considerar cáncer de ovario (19).

El diagnóstico de esta enfermedad se realiza utilizando diferentes herramientas, generalmente el ultrasonido transvaginal es el método inicial para el diagnóstico pero tiene una baja precisión esto es porque no puede diferenciar un quiste benigno de una lesión maligna (21,22). También se utilizan los marcadores como el antígeno de cáncer 125 (CA125) y 19-9 (CA119).

El marcador CA125 exhibe una sensibilidad del 60 % en las etapas tempranas mientras que las pacientes en estados avanzados presentan niveles altos de este marcador en un 90 % de las pacientes (23). Sin embargo es un marcador poco específico ya que a menudo suele dar falsos positivos debido a que es una proteína que se aumenta en procesos inflamatorios (23,24).

Otros marcadores que se utilizan en la clínica mediante la técnica de inmunocitoquímica son PAX8, WT1, CDX8 y han contribuido a un mejor diagnóstico y clasificación del cáncer de ovario (25). En las últimas décadas se han estudiado un gran número de posibles biomarcadores entre los que se encuentran FGF, EGF, EGFR HER-2/nu, b-RAF entre otras (26–29). Muchas de estas proteínas activan vías de señalización como las MAPKs, PI3K y Wnt.

Una proteína que ha sido propuesta como marcador es FAK (por sus siglas en inglés Focal Adhesion Kinase) que es central en la activación de las vías de señalización antes mencionadas, esta proteína está asociada con el mal pronóstico en el cáncer de ovario. Existe un gran número de artículos de FAK y sus implicaciones en el cáncer así como su participación en procesos de angiogénesis invasión y metástasis (30), sin embargo existen pocos trabajos en los que analicen las isoformas, en este trabajo nosotros demostramos la presencia de transcritos alternativos de FAK así como diferencias en la expresión dependiendo los dominios de la proteína analizados.

1.7. PROTEÍNA FAK, ESTRUCTURA, FUNCIÓN E IMPLICACIONES EN EL CaO

La proteína FAK es una cinasa de residuos de tirosina que no es un receptor, esta proteína también es denominada PTK2 (por sus siglas en inglés protein tyrosine kinase 2), tiene un peso de 125 kDa y es codificada por el gen FAK que se encuentra en el cromosoma 8q24. La proteína está conformada por tres dominios principales: un dominio amino terminal FERM (por sus siglas en inglés band four.1-ezrin-radixin-moesin), un dominio cinasa y un dominio carboxilo terminal FAT (por sus siglas en inglés Focal Adhesion Targeting).

El dominio FERM está presente en un gran número de proteínas incluida FAK. Dicho dominio presenta tres sub-dominios (F1, F2 y F3): el sub-dominio F1 consta del residuo 33-127, el sub-dominio F2 va del residuo 128-253 y el sub-dominio F3 que está conformado por los residuos que van de 352-415 (31,32). Una de las funciones que se han descrito para el dominio FERM es inhibir la actividad cinasa de FAK, es decir ejerce un efecto de auto inhibición sobre FAK. Se ha observado que al deletar este dominio FAK muestra una hiperactivación. Por otro lado en un estudio independiente realizado por Cohen y Guan en 2005 encontraron que los sub-dominios F1 y F2 son los responsables de la inhibición (figura 3) (33,34).

El dominio FERM no solo funciona como un dominio de inhibición de FAK, también interacciona con diferentes proteínas como RACK1, ARP3, p53, MDM1, EGFR, c-Met, Erizina, ETK, (PtdIns(4,5)P₂), IRS1, JSAP1 y β -integrinas (34–45). Algunas evidencias que apuntan que el dominio FERM actúan como un conducto entre la señalización de las integrinas y la maquinaria de ensamble de actina en el citoesqueleto, existen diversos estudios acerca de la implicación de FERM y las proteínas antes mencionadas, por citar algunos ejemplos tenemos que la unión de EGFR a FERM no requiere la forma activa de FAK (FAK fosforilada en el residuo Tyr397), sin embargo la formación del complejo EGFR-dominio FERM promueve la fosfofermtilación, Sin embargo no existe mucha información acerca del mecanismo. En el caso de la interacción del dominio FERM con Erizina también promueve la activación de FAK (46). la interacción de FERM con las proteínas antes mencionadas no siempre requieren la forma activa de FAK, pero su interacción puede promover dicha activación.

El dominio FAT se encuentra en el carboxilo terminal de FAK, este dominio contiene diversos sitios de interacción proteína-proteína y son indispensables para la localización de FAK en los contactos focales, FAT interacciona directamente con proteínas del citoesqueleto como talina y paxilina lo que hace a este dominio crucial en la comunicación entre la matriz extracelular y el citoesqueleto ⁵¹. Otra función crucial de este dominio es la participación en la activación de la vía de señalización ERK-MAPK, esto se da cuando FAK es fosforilada en Tyr-397 lo que provoca la interacción con SRC, esta última fosforila la Tyr-925 en el dominio FAT promoviendo la interacción de este dominio con la proteína Grb2 que a su vez induce la cascada de fosforilación hasta activar la vía ERK-MAPK conduce a proliferación y sobrevivencia celular (47,48).

Por último tenemos al dominio cinasa que está flanqueado por los dominios FERM y FAT. Su estructura es similar a otros dominios catalíticos con actividad de cinasa de residuos de tirosina, los cuales cuentan con dos lóbulos: uno con una alfa hélice y el otro con 5 beta plegadas (49,50). El dominio cinasa es el responsable de la activación de vías de señalización y por ende es responsable de los mecanismos de proliferación y la angiogénesis (51). Una parte central de la proteína FAK es la activación del dominio cinasa, el cual se da cuando interaccionan receptores celulares como integrinas, o receptores de factores de crecimiento, esto promueve un re-arreglo intramolecular y se produce la autofosforilación en el residuo Tyr-397 lo cual incrementa la capacidad de fosforilación del dominio cinasa y comienza una cascada de activación de proteínas que culmina en los mecanismos celulares ya mencionados (52).

1.8. VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTERGRINAS-FAK EN EL CAO

FAK es activada por diferentes proteínas, entre ellas se encuentran las denominadas integrinas, éstas son proteínas transmembranales que constan de dos subunidades α y β , en su región extracelular interaccionan con componentes de la matriz extracelular (MEC) como: fibronectina, vitronectina, mientras que en su región intracelular interacciona con FAK formando un complejo con componentes del citoesqueleto, lo que permite que la célula se mantenga unida a la MEC. Existen evidencias experimentales que sugieren que estos

receptores regulan la sobrevivencia y crecimiento celular, así mismo participan en procesos de migración, polaridad y morfogénesis celular (17).

Algunas integrinas como $\alpha_6 \beta_4$ y $\alpha_3 \beta_1$ han sido estudiadas en el cáncer de ovario y se han relacionado con el grado de diferenciación en este tipo de carcinoma (53). Carreiras y colaboradores (1996) reportaron la expresión de $\alpha_v \alpha_3$, α_5 y α_6 en tejido epitelial de ovario normal así como en carcinoma de ovario (54). También determinaron que de acuerdo a su distribución en las células epiteliales, estas proteínas participan en el contactos célula-célula, adicionalmente se observó que vitronectina, que es el ligando de la integrina $\alpha_v \beta_3$, se encuentra distribuida de manera similar a las integrinas.

Se ha observado la expresión de $\alpha_v \beta_3$ en tumor seroso limítrofe de ovario así como en carcinoma seroso, sin embargo, la expresión en tumores limítrofes es menor que en carcinomas y se ha sugerido que esta integrina, podría estar implicada en procesos de invasión y metástasis (55). El mecanismo por el cual vitronectina y $\alpha_v \beta_3$ promueven la progresión del tumor en el ovario todavía no ha sido esclarecido, pero se ha demostrado que estas proteínas presentan un patrón de expresión diferente en el epitelio normal y en el carcinoma de ovario (54).

Las integrinas pueden activar diferentes vías de señalización dentro de las cuales se encuentra la vía MAPK misma que es regulada por FAK. Se ha identificado que el dominio citoplasmático de la integrina α_v se une al dominio SH3 de Src, independiente de FAK. Sin embargo, existen estudios en donde $\alpha_v \beta_3$ promueve la fosforilación de FAK en células normales y en células tumorales (56). Cuando se da la interacción vitronectina- $\alpha_v \beta_3$, la subunidad β_3 se une a FAK lo cual promueve que FAK se autofosforile en la tirosina 397 (Y397), incrementando su actividad y facilitando la unión de otras proteínas como Src (57). Grisarus y colaboradores (2005) encontraron que existen altos niveles de FAK, fosforilada en Y397, en muestras de carcinoma invasor de ovario lo que sugiere que esta vía está sobreactivada en el carcinoma de ovario (58). Asimismo, también se ha observado que la proteína FAK se encuentra sobre-expresada en adenocarcinomas serosos con respecto al epitelio de ovario normal, además de que se ha relacionado con el grado de malignidad en el CaO.

La proteína FAK puede activar varias proteínas como: p130, Src y Grb2, activando diferentes

vías de señalización. La unión del complejo vitronectina $\alpha v \beta 3$ -FAK con Src provoca la fosforilación de Y925 de FAK lo que permite la interacción de FAK con Grb2, dando como resultado la activación de Ras y como consecuencia la activación de la vía MAPK/ERK (59).

Como podemos ver, Src es importante para la activación de la vía MAPK, esta proteína se encuentra sobre-expresada en carcinoma seroso además de encontrarse en su forma activa (para que esta proteína este activa necesita la desfosforilación de la tirosina 350 y la fosforilación de la tirosina 418) (60). La importancia de FAK, en el desarrollo del cáncer de ovario ha sido estudiada por Sood y col. (2004), en donde muestran la expresión de FAK y su influencia en la capacidad de migración e invasión celular en el CaO (61).

FAK activa diferentes vías de señalización como: JNK, DAG-PKC y PIP, estas vías se pueden entrecruzar y activar a ERK 1/2. Steinmetz y colaboradores (2004) demostraron que ERK1 y ERK2 (ERK1/2) están activadas constitutivamente en diferentes líneas celulares de CaO, dicha activación está mediada por MEK y se correlaciona con la sobre-expresión de BRAF, ellos encontraron que la activación de ERK1/2 es independiente de otras vías como p38 MAPK, PI3K y PKC (62).

Es evidente que FAK juega un papel central dentro de las vías de señalización y es de gran relevancia en los procesos carcinogénicos del cáncer de ovario, de ahí la importancia de su estudio. Como ya se menciono existe una gran cantidad de estudios que relacionan a FAK con el CaO incluso se han estudiado las vías de señalización implicadas. Sin embargo hay que tomar en cuenta que existen diferentes isoformas de FAK y hasta la fecha no existen estudios que determine cuál es la isoforma o isoformas que se relaciona directamente con esta enfermedad, es por eso que en este trabajo nos enfocamos a buscar los RNAm alternativos que dan origen a las diferente isoformas de esta proteína.

1.9. SPLICING ALTERNATIVO EN EL CÁNCER E ISOFORMAS DE FAK

El splicing alternativo es el corte de intrones y empalme de exones, lo que da diferentes variantes de RNA mensajero de un solo gen. Se ha observado que este mecanismo puede

estar alterado en el cáncer, en donde se encuentran expresadas isoformas de proteínas que no deberían estar o puede existir splicing alternativo aberrante que generan nuevas isoformas. Como ejemplo de esto, tenemos que se ha encontrado expresión diferencial de isoformas de proteínas oncogénicas como VEGF en tumores de mama y ovario con respecto al tejido normal (63). En el caso de FAK no existe algún estudio de isoformas de esta proteína en el cáncer. Sin embargo si existen una gran cantidad de estudios que demuestran la existencia de diferentes isoformas. se estima que existen cerca de 22 isoformas, esto de acuerdo a Alternative Splicing Database de EMBL-EBI, de éstas se han descrito experimentalmente diferentes isoformas en las cuales hay splicing de los exones 13 (codifica 28 a.a.), exón 14 (codifica 6 a.a.) y exón 16 (codifica 7 a.a) que se encuentran en el dominio cinasa y también hay splicing en el exón 31 (codifica 3 a.a). Aunque hasta la fecha no se ha establecido una nomenclatura oficial, la proteína FAK⁰ que no contiene ninguno de los exones antes mencionados, es la proteína estándar o nativa (figura 3) (64). Se han descrito la presencia preferencial de las isoformas FAK ex13 (FAK²⁸) y FAK ex14 (FAK⁶) en tejido cerebral de humano adulto (figura 3), mientras que en tejido cerebral embrionario predominan las isoformas FAK⁰, FAK ex14, 16 (FAK^{6, 7}) FAK ex 13, 14, 16 (FAK^{28, 6, 7}), esto concuerda con los resultados previamente encontrados en ratón y en rata en estudios previos (64).

También se ha encontrado una presencia diferencial de estas isoformas en diferentes tejidos como hígado, corazón, riñón y testículo. Algo particularmente interesante es que la presencia del exón 14 y exón 16 incrementa significativamente la tasa de autofosforilación lo que favorece una hiperactivación de las vías de señalización activadas por esta proteína (64).

Por último también se ha descrito una isoforma que solo cuenta con el dominio FAT (no contiene el dominio FERM, ni el dominio cinasa) esta isoforma se denomina FRNK (por sus siglas en inglés FAK-related nonkinase) (figura 3) se ha establecido claramente que es producida por el gen FAK y que es producto de un promotor interno alternativo, se ha observado que la expresión de FRNK inhibe la fosforilación de FAK, lo que sugiere un mecanismo de autorregulación.

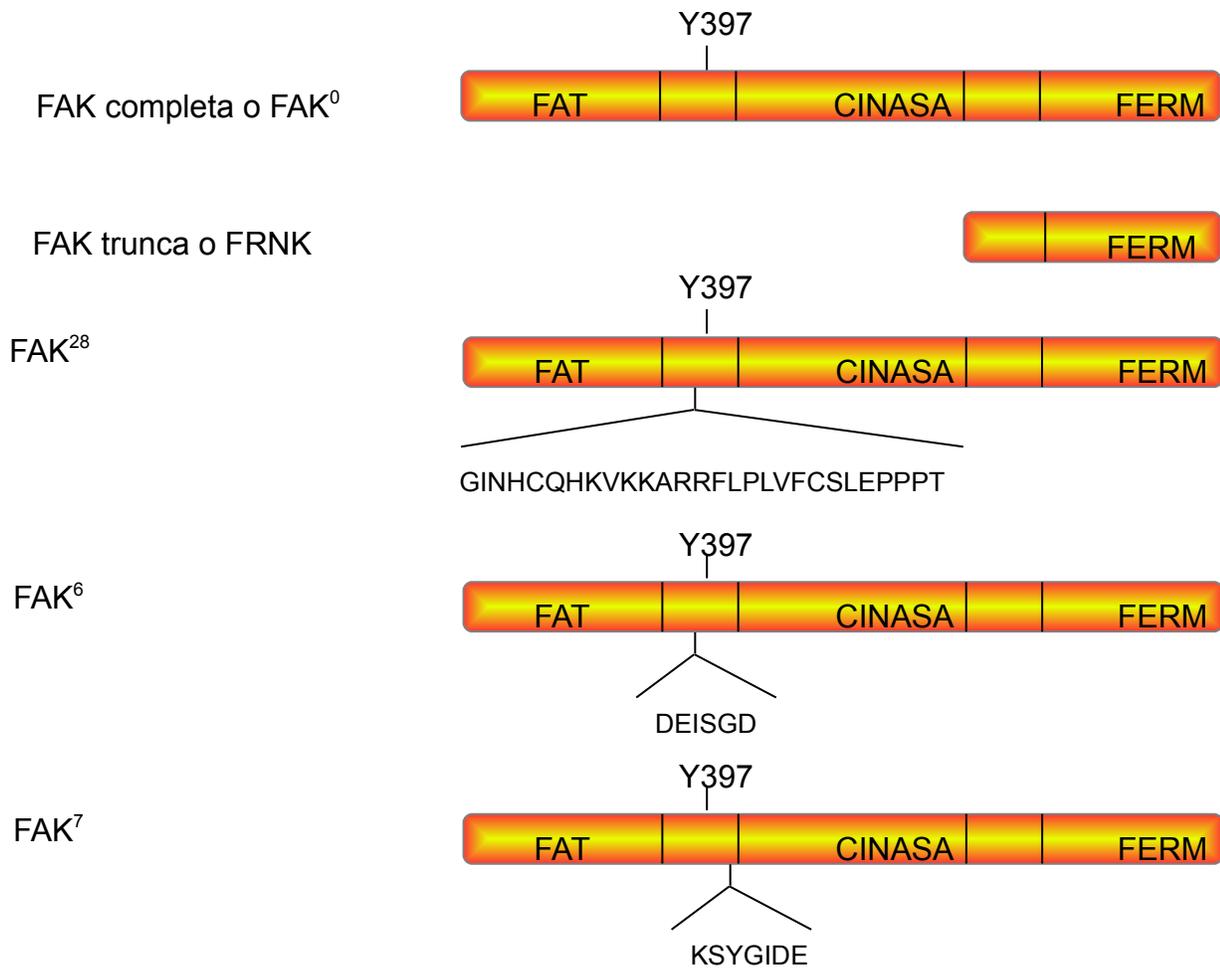


Figura 3. isoformas de FAK. En diversos estudios en ratas y en humanos se han descrito diferentes isoformas de FAK

FAK es una proteína que está estrechamente relacionada con el desarrollo del cáncer de ovario y con la agresividad del mismo. Sin embargo no se ha establecido cual de las isoformas descritas es la que está participando en este tipo de padecimiento. Debido a esto, buscaremos cual o cuales isoformas de FAK se están expresando en diferentes tumores de ovario, lo que permitirá usar estas isoformas como marcadores moleculares o en un futuro como posibles blancos terapéuticos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los problemas en el cáncer de ovario es su carácter asintomático en las primeras etapas del desarrollo de esta enfermedad y los síntomas poco específicos en las etapas avanzadas, debido a esto se han buscado biomarcadores de diagnóstico y pronóstico. Existen marcadores como CA119 sin embargo es poco específico. Por esa razón es importante buscar nuevos y mejores marcadores para este tipo de neoplasias, así mismo es importante seguir investigando las discrepancias entre diferentes tipos de tumores de ovario.

3. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

¿Habrá diferentes isoformas de FAK expresadas en los tumores de ovario seroso?, ¿Cuales serán esas isoformas?, ¿Qué implicaciones resultan de la expresión de cada una de las isoformas de FAK dentro del desarrollo del CaO seroso?

4. JUSTIFICACIÓN

- El cáncer de ovario es una de la neoplasia ginecológica más agresivas con una mortalidad mayor al 70 %, por lo tanto es necesario su estudio para entender los mecanismos que conducen a su agresividad.
- Dado que FAK es una proteína que participa en diversas vías de señalización y se ha reportado como un factor de mal pronóstico en pacientes con cáncer de ovario, además de estar sobre-expresada y sobre-activada, en esta neoplasia. Es necesario buscar y caracterizar las isoformas que se puedan estar expresando en este tumor para determinar cuáles podrían estar participando en procesos de invasión y la agresividad del tumor, de tal manera que estas isoformas puedan ser utilizadas como biomarcador.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de diferentes isoformas de FAK en diferentes tumores de ovario y su relación con diferentes tumores de ovario.

6. OBJETIVOS PARTICULARES.

- 1.- Determinar la presencia de FAK con dominio cinasa en tumores seroso y mucinosos.
- 2.- Determinar la presencia de FAK con dominio FAT en tumores seroso y mucinosos.
- 3.- Determinar la presencia de FAK con dominio cinasa y con dominio FAT en lineas celulares SKOV3 y NIH-OVCA3
- 4.- determinar la expresión de las isoformas FAK⁰, FAK^{28,6} y FAK²⁸, en las lineas celulares SKOV3 y NIH-OVCA3.
- 5.-Comparar las diferencias en la expresión de FAK dominio cinasa y FAK dominio FAT entre ovarios sin lesión, cistadenoma, limítrofes y carcinomas.

7. METODOLOGÍA

7.1. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras utilizadas fueron tejidos incluidos en parafina de los servicios de patología del Hospital de Oncología del Centro Medico Nacional Siglo XXI-IMSS y Clínica de Ginecología Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala” del IMSS con la colaboración con la Dra. Isabel Alvarado y Dr. Alejandro Andrade respectivamente. Todo esto siguiendo los lineamientos de ética de ambos hospitales. Se colectaron 175 muestras de ovario distribuidas de la siguiente manera: 50 muestras de carcinoma seroso, 25 tumores limítrofes serosos, 25 cistadenomas serosos, 5 carcinomas mucinosos, 15 tumores limítrofes mucinosos, 25 cistadenomas mucinosos, 25 muestras control de diferentes tumores (cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, melanoma y cáncer de cervix) y 15 muestras de ovario sin lesión, éstas muestras fueron obtenidas de pacientes que se les realizo una histerectomía radical por razones diferentes y no relacionadas con el cáncer de ovario.

Se consiguieron las líneas celulares SKOV3 y NIH-OVCA3 de la clínica de ginecología obstetricia no. 4, las cuales son derivadas de carcinomas de ovario. Y fueron donadas por el Dr. Fabián Arechavaleta y la Dra. Laura Díaz Cueto.

7.2. UNIVERSO DE TRABAJO

Pacientes adscritas al Instituto Mexicano del Seguro Social que acuden al Hospital de Oncología del CMN Siglo XXI y Clínica de Ginecología Obstetricia No. 4 del IMSS. con diagnóstico establecido de CaO seroso, cistadenoma seroso, tumor seroso limítrofe, para su tratamiento quirúrgico y que sean referidas a este hospital independientemente de su lugar de residencia.

7.3. CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Muestras de tejido ovárico obtenidas de mujeres derechohabientes de cualquier de edad con diagnóstico definitivo de carcinoma seroso de ovario o de cistadenoma, vírgenes a

tratamiento y cuya biopsia incluida en parafina se encuentre disponible. Para el caso de los tumores, se utilizarán solamente aquellas muestras en que al menos 80% de las células sean tumorales. Para los tejidos de ovario normal, se utilizarán ovarios normales que hayan sido removidos por indicación médico-quirúrgica, sin patología que afecte al ovario.

7.4. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

Muestras identificadas como CaO sin diagnóstico especificado, mujeres que hayan recibido algún tratamiento o bien pacientes con CaO secundarios.

7.5. CRITERIOS DE ELIMINACIÓN

Que el material sea insuficiente o inadecuado para la realización del estudio.

7.6. CONSTRUCCIÓN Y DISEÑO DE LOS MICROARREGLOS DE TEJIDOS (MAT)

De las muestras de tejido obtenidas de los archivos de patología e incluidas en bloques de parafina, se realizaron cortes histológicos y tinciones de hematoxilina-eosina para determinar el área de interés (células de epitelio de ovario normal, cistadenoma, limítrofe y carcinoma respectivamente).

Se realizaron cortes de 5 micras en un microtomo de las 175 muestras, las cuales se depositaron en un recipiente que contenía H₂O con grenetina a 60 °C, posteriormente cada corte se colocó en un portaobjetos, por último se dejaron secar por 24 horas. Ya teniendo los cortes se realizó una tinción de hematoxilina-eosina.

Para la tinción de hematoxilina-eosina se colocaron los portaobjetos con los cortes respectivos en un horno a 60 °C por 1 hora para desparafinar el tejido, posteriormente se colocaron en xilol por 15 minutos, se realizó un cambio de xilol por otros 15 minutos, una vez realizado esto, se rehidrataron los tejidos mediante alcoholes graduales (100%, 70%, 30%, and H₂O por 5 minutos cada uno) y se colocaron en PBS 1x 5 minutos. Realizado lo anterior

se incubaron en hematoxilina por 1 minuto., Se lavaron en H₂O y se incubaron en eosina por 30 segundos, y por último se deshidrataron los tejidos en alcoholes graduales (30%, 70% y 100%), se colocaron en xilol, se les adiciono resina y un cubreobjetos. Realizada la tinción se observo en un microscopio óptico y se tomaron fotos representativas del tejido (figura 4) para seleccionar la región de interés y construir los MAT

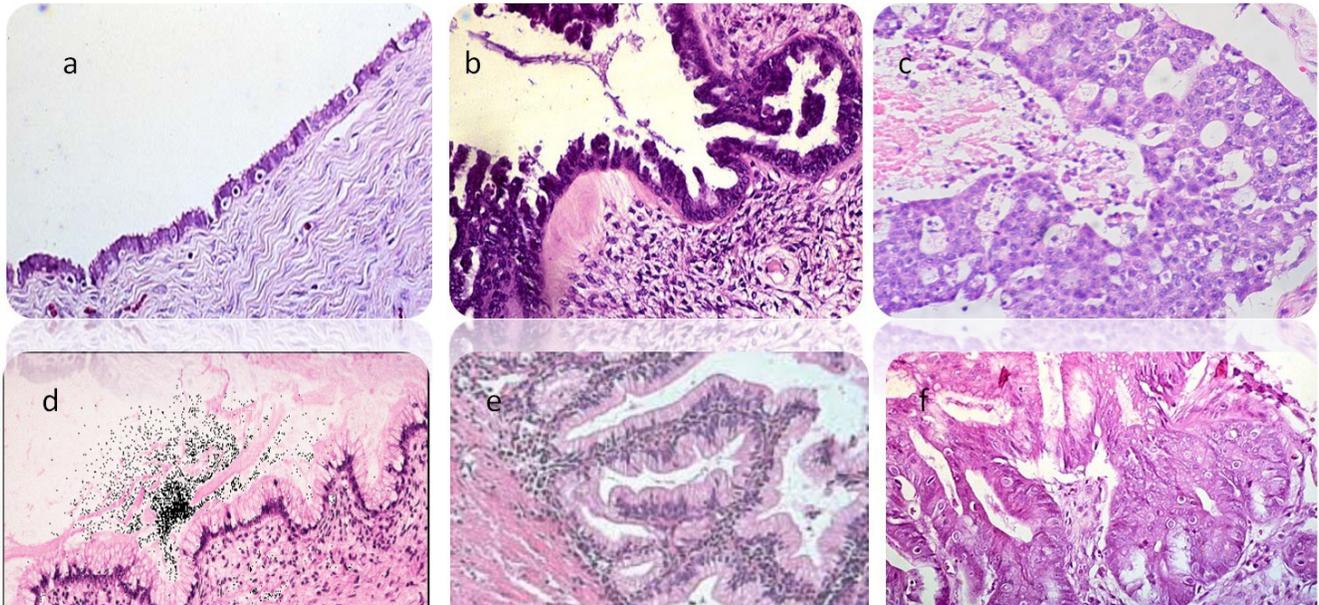


Figura 4 Tinción de hematoxilina-eosina: Esta técnica permite observar las histología del tejido y buscar la zona de interés para el microarreglo de tejidos: epitelio simple cubico para cistadenoma seroso (panel a), tumor limítrofe seroso donde hay proliferación celular sin invasión al estroma (panel b), carcinoma seroso las células proliferan e invaden el estroma (panel c), cistadenoma mucinoso se observa un tejido epitelial simple columnar (panel d), tumor limítrofe mucinoso donde hay proliferación pero no invasión (panel e) y carcinoma mucinoso que se observa invasión al estroma (panel f) aumento 20x.

Para la determinación del área de interés se contó con la colaboración de los patólogos: Dra. Minerva Lazos Ochoa del Servicio de Patología del Hospital General de México, Dra. Isabel Alvarado del Servicio de Patología del Centro Médico Nacional siglo XXI-IMSS y Dr. Alejandro Andrade del Hospital de Ginecología Obstetricia No. 4 del IMSS. Una vez determinada el área de interés se realizó el microarreglo de tejido de la siguiente manera: Con la ayuda de una aguja de biopsia de médula ósea, se tomo el área seleccionada del bloque de parafina de cada muestra, se obtuvo un cilindro de la muestra como “sacabocado”

que fue insertado en un bloque de parafina en blanco, que previamente fue horadado, por último se sellaron los bloques de parafina vertiendo un poco de parafina en la superficie y posteriormente se incubaron a 60°C por 5 minutos (figura 5).

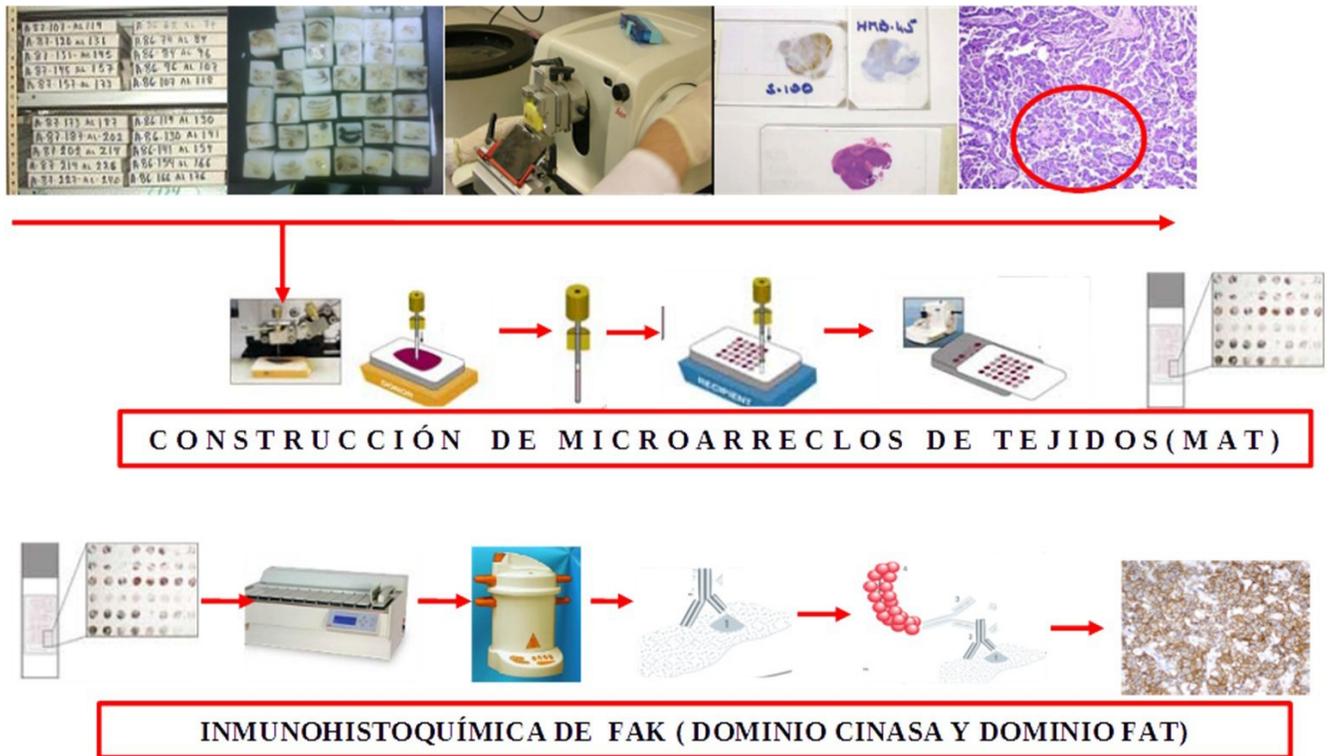


Figura 5 Construcción de MAT e inmunohistoquímica.

Una vez contruidos los microarreglo de tejidos se realizaron cortes histológicos de 5 micras y las respectivas inmunohistoquímicas.

7.7. INMUNOHISTOQUÍMICA DE FAK

Los cortes histológicos de los respectivos microarreglos de tejidos fueron colocados en laminillas cargadas, éstas, se desparafinaron con xilol y se rehidataron en etanol (100, 90, 70, y 30%) y H₂O. Posteriormente se transfirieron a una solución de PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl 4.3 mM Na₂HPO₄, 1.4 mM KH₂PO₄) por 10 minutos. La inactivación de la

peroxidasa endógena se llevó a cabo incubando las muestras en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3% en metanol por 30 minutos a 37 °C. Para evitar reacciones inespecíficas, se bloqueo con suero DAKO Protein Block Serum Free Cat X0909 (Carpintería, Ca) por 30 minutos a 37 °C, posteriormente se incubaron toda la noche a 4 °C con los respectivos anticuerpos primarios de FAK (anti-FAK dominio cinasa Gene Tex Cat. GTX50666 y anti-FAK dominio FAT Gene Tex Cat. GTX 50489). Posteriormente, las laminillas se lavaron con PBS y se incubaron con el segundo anticuerpo unido a la peroxidasa (DAKO Envision System Peroxidase de DAKO, Carpintería, Ca), a temperatura ambiente por 30 minutos, se lavaron y el color se desarrollo con diaminobemzidina al 0.06% en 3% H_2O_2 . Finalmente, las laminillas se lavaron y se contrasto con la tinción de hematoxilina y se montaron con resina. Con todo esto determinaremos la presencia de FAK en los tumores de ovario, cabe destacar que los anticuerpos que se utilizaran reconocen diferentes epitopos que corresponden a diferentes dominios de la proteína (figura 5).

7.8. CULTIVOS CELULARES DE SKOV3 Y NIH-OVCA3 E INMUNOCITOQUIMICA DE FAK CINASA Y FAT

Las líneas celulares fueron cultivadas en el medio DMEM suplementadas con suero fetal bovino al 10 % y 0.1 mg/ml de estreptomycin por 48 horas en placas de cultivo de 24 pozos en la cual se colocaron cubreobjetos en el fondo de los pozos (las células se adhieren en los cubreobjetos) figura 6. Después de esto las líneas fueron lavadas con PBS y tratadas con metanol al 100% frío para fijar las células, posteriormente se lavaron con PBS y se incubaron en el anticuerpo primario anti-FAK dominio cinasa (Gene Tex Cat. GTX50666) y anti-FAK dominio FAT (Gene Tex Cat. GTX 50489) respectivamente, por un periodo de 60 minutos a temperatura ambiente, después se lavaron con PBS y se incubó con bloqueador de peroxidasa inmunosensor blocker (SB Bio 003LH, USA) por 30 minutos, se lavó nuevamente con PBS y se incubó con biotin inmunosensor (SB Bio 003LH, USA) por 30 minutos a temperatura ambiente, después de esto se lavó nuevamente y se incubó en label inmunosensor por 20 min (SB Bio 003LH, USA). Para revelar se utilizó diaminobenzidina al 0.06% en 3% H_2O_2 por 5 minutos y se contrasto con hematoxilina, por último se tomaron los cubreobjetos que contenían la células tratadas y se colocaron en un porta objetos sellándolos

con resina. Para el análisis se observó a un microscopio óptico y se tomaron fotografías (figura 6).

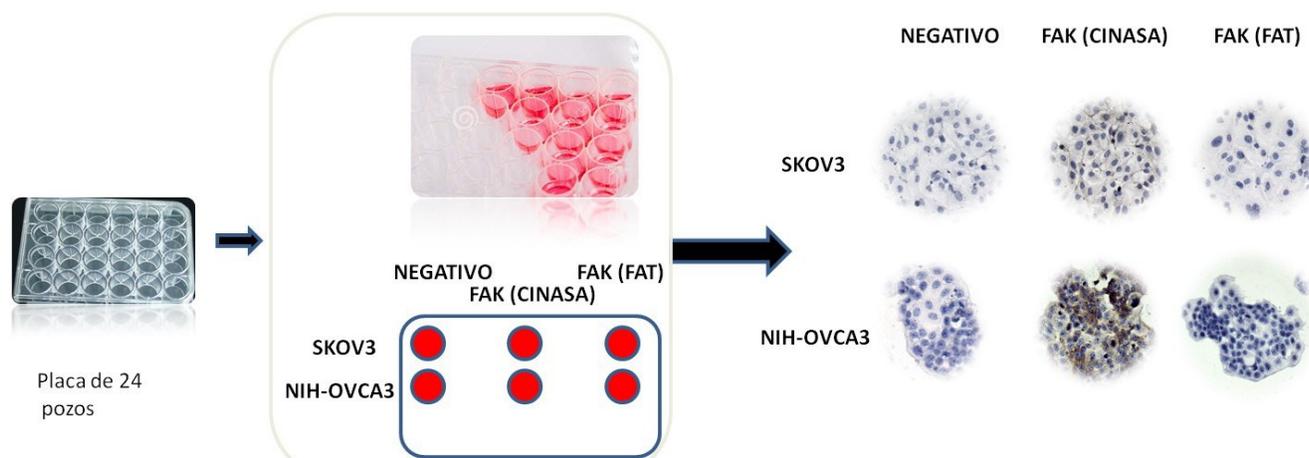


Figura 6. Cultivo celular e inmunocitoquímica de FAK dominio cinasa y FAT.

7.9. CULTIVOS CELULARES Y EXTRACCIÓN DE RNA.

Las líneas celulares SKOV3 y NIH-OVCA3, fueron cultivadas en medio DMEM con suero fetal bovino al 10% y 0.1 mg/ml de estreptomicina. El cultivo se realizó en frascos de cultivo corning de 75 cm² y se dejaron crecer las células hasta una confluencia del 80 %, posteriormente se realizaron lavados con PBS y se trataron con tripsina al 0.5% en PBS por 15 minutos a 37 °C para despegar las células. Las células ahora en suspensión se depositaron en un tubo falcon de 15 ml y se centrifugaron a 4 mil rpm, se recupero el pellet y se lavo con PBS, se centrifugo nuevamente y se recupero el pellet o pastilla.

Para la obtención de RNA, a la pastilla se adiciono 1 ml TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies, Grand Island NY USA), se homogenizo e incubo a temperatura ambiente por 15 minutos en agitación constante. A continuación se agrego cloroformo, se agito la mezcla hasta que quedo homogénea para posteriormente ser centrifugada 15 min a 12,000 g. Para la extracción del RNA se separo la fase superior de la tricapa obtenida del centrifugado y se paso a otro tubo. Se le adiciono 0.5 ml de isopropanol, se mezclo y se dejo incubando por 15 min. Posteriormente se centrifugara de la misma manera que la vez anterior. Se elimino el sobrenadante y la pastilla se lavara con etanol al 75%. Finalmente, el RNA se suspenderá en

20-50 µl de agua MilliQ. El posible DNA contaminante de las muestras se eliminó mediante el tratamiento con DNAsa libre de RNAsa (Ambion Inc. Austin Texas USA).

7.10. SÍNTESIS DE cDNA Y PCR DE ISOFORMAS DE FAK

Una vez obtenido el RNA se procedió a sintetizar el cDNA, se tomaron 500 ng de RNA y se le adiciono 0.5 µg de oligo dT en un volumen de 5 µl con agua libre de nucleasas. Esta mezcla se incubo a 70 °C por 5 minutos, después se dejo en hielo por 5 minutos, se centrifugo por 10 segundos. Posteriormente se adiciono 4 µl de buffer (promega GoScript™ 5X reaction buffer cat. A5000), 2 mM de MgCl₂, 0.5 mM de cada dNTP, 20 unidades de RNasin (inhibidor de ribonucleasa promega A5000), 1.5 unidades de transcriptasa reversa GoScript™ en un volumen de 15 µl de H₂O libre de nucleasas. La mezcla se incubó a 25 °C por 5 min, después se incubó a 42 °C por una hora y finalmente se inactivó la transcriptasa reversa incubando a 70 °C por 15 min.

Una vez sintetizado el cDNA se procedió a hacer las PCR de las isoformas de FAK, se utilizaron los iniciadores reportados por Corsi y colaboradores (64). Los iniciadores están diseñados para amplificar la región entre el exon 12 y el exon 17. Para la región completa (exon 12-17) los primers fueron los siguientes: Forward 5' AGCGAAAAGCAAGGCATGCGG 3' (F2) y reverse 5' CTGACGCATTGTTAAGGCTTC 3' (R2) y se utilizó una T_m de 57 °C, para las demás isoformas se utilizó el mismo reverse, en combinación con diferentes forward: isoforma sin exon 13 y 14 (12[^]15-17) forward 5' TCTCTGTGTCAGAAACAGATGATT 3', isoforma sin exon 14 (13[^]15-17) forward 5' CTCCTTCTACGGAAACATGATT 3'. Para la síntesis de las PCR se utilizó 1.25 unidades de la enzima GoTaq® Flexi DNA polimerasa (M8295) con las condiciones establecidas por el fabricante las cuales fueron las siguientes: primero un ciclo a 95 por 2 min, posteriormente 94°C por 30 seg, 57°C por 30 seg y 68°C por 30 seg todo esto durante 30 ciclos, por último 68°C 2 min. Los productos obtenidos se visualizaron en un gel de agarosa al 1 %.

8. RESULTADOS

8.1. MICROARREGLOS DE TEJIDOS DE CÁNCER DE OVARIO.

Las muestras colectadas se utilizaron para construir los microarreglos de tejidos. La distribución de los tejidos en los MAT se anotaron en una base de datos utilizando un sistema de coordenadas, en donde el eje de las X tiene una secuencia del 1 al 5 y en el eje de las Y una secuencia de A-E (figura 7). Se construyeron 1 MAT de controles (diferentes carcinomas), 1 MAT de ovario sin lesión, 2 MAT cistadenoma seroso, 1 MAT limítrofe seroso, 2 MAT carcinomas seroso, 2 MAT cistadenoma mucinoso y 1 MAT limítrofe con carcinoma mucinoso 20 muestras.

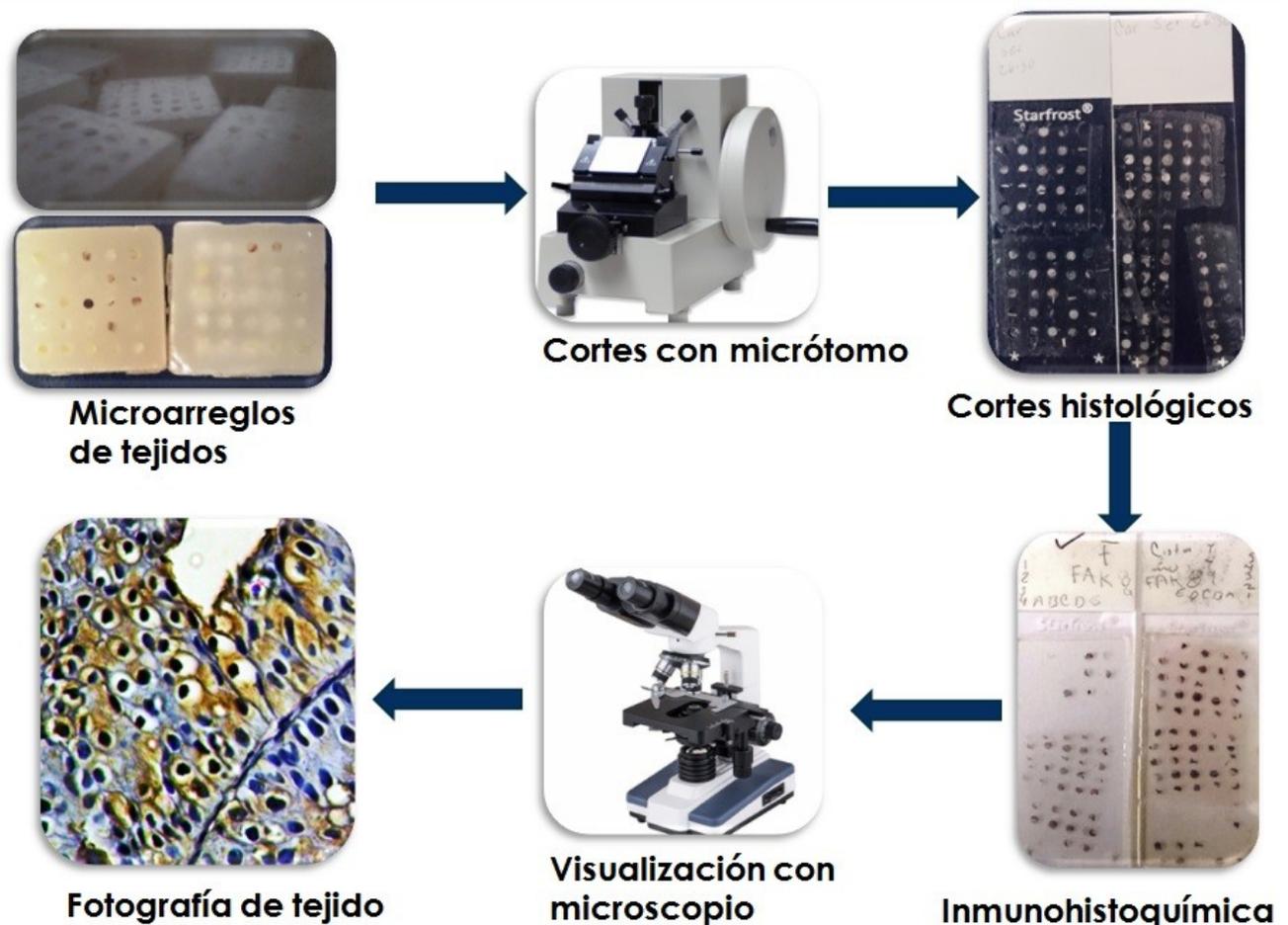


Figura 7. Corte histológico de microarreglos de tejidos. Se observa la distribución de cada uno de los tejidos dentro del microarreglo.

8.2. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FAK DOMINIO CINASA Y FAT EN EL CAO

Para la evaluación de la positividad se realizó con los criterios descritos anteriormente, sin embargo, se muestra un ejemplo de evaluación de tumor limítrofe seroso (figura 8), en el panel A se observa una muestra con reacción negativa para la proteína FAK, en el panel B se muestra una muestra con reacción positiva (+), en donde vemos una ligera reactividad, en el panel C se muestra una reacción positiva (+ +) en donde la intensidad de reacción es moderada, por ultimo en el panel D observamos una muestra positiva (+++) donde se distingue una reactividad fuerte (fig. 8).

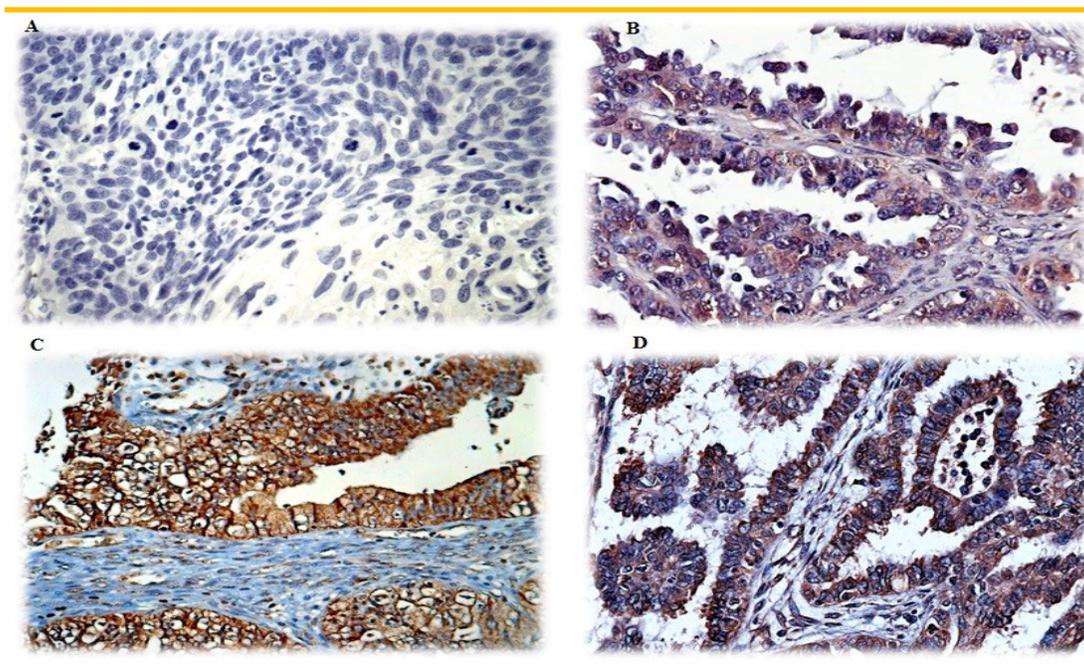


Figura 8. Criterios de evaluación de la expresión de la proteína FAK. A) Muestra con reacción negativa, B) reacción ligeramente positiva (pos+), C) reacción medianamente positiva (pos++) y D) reacción altamente positiva (pos+++). Las flechas indican un precipitado café en donde se encuentra la reacción positiva.

La expresión del dominio cinasa de FAK se muestra en la figura 9 en donde se observó un incremento de la expresión de esta proteína en tumor limítrofe y carcinoma seroso, en el caso de los tumores mucinoso existe expresión sin embargo no hay un incremento significativo con respecto al ovario normal. Al realizar el análisis de la expresión de acuerdo a

Allred y col. encontramos diferencias significativas entre las muestras normales y carcinomas seroso, siendo estos últimos los que presentan una alta expresión de esta proteína buscando el epitopo del dominio cinasa (Tabla 2).

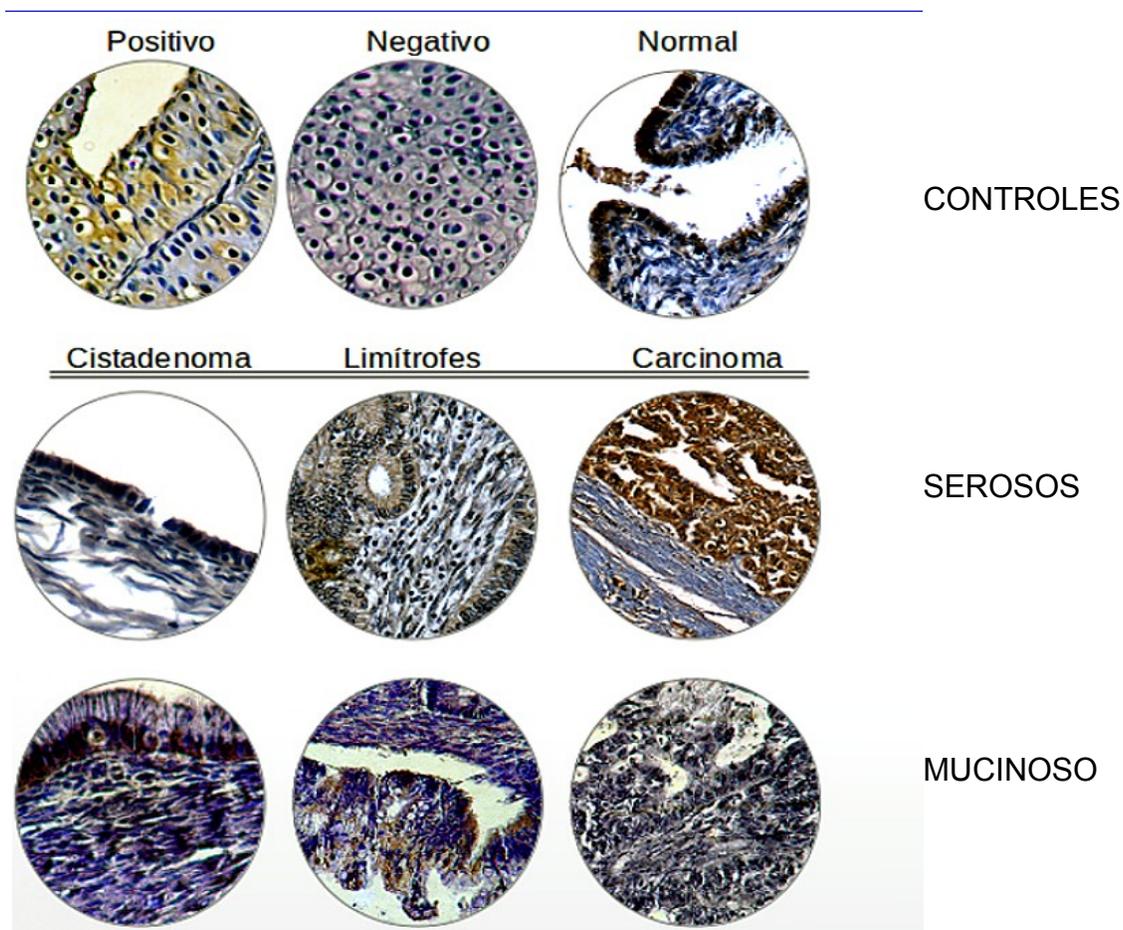


Figura 9. Expresión de FAK dominio cinasa en el cáncer de ovario seroso y mucinoso. Para el análisis de la expresión se realizó una tabla de contingencia y se realizó una ji cuadrada.

Para el análisis densitométrico se tomaron tres fotos de cada spot y se analizaron con el software imagen pro-plus, lo que arrojó los resultados mostrados en la figura 10. De estos datos se tomó la suma de la intensidad y se realizó una ANOVA y prueba Tukey. Este análisis mostró que los carcinomas y limitrofes seroso tienen mayor expresión de FAK dominio cinasa con respecto al ovario normal y a los cistadenomas, en el caso de las lesiones mucinosas la expresión es menor o igual que las muestras normales o cistadenoma (tabla 2 y grafica 1).

EXPRESIÓN DE FAK DOMINIO CINASA						
Subtipo histológico	No. Casos	-	+	++	+++	Valor de p
Ovario	16	2	6	8	0	
Tumores seroso (100)						
Cistadenoma	25	11	10	4	0	<0.05*
Limítrofe	25	0	5	19	1	<0.05*, <0.05**
Carcinoma	50	0	0	13	37	<0.05*, <0.05**, <0.05**
Tumores mucosos (45)						
Cistadenoma	25	7	8	10	0	NS*
Limítrofe	14	2	4	6	2	NS*, NS**
Carcinoma	6	1	3	1	1	NS*, NS**, NS***

Tabla 2.- análisis estadístico de la expresión de FAK. Se observa diferencia significativa entre los grupos analizados. * tumores vs normal, ** cistadenoma vs tumores y *** limítrofes vs carcinoma.

La expresión de FAK (dominio FAT) se muestra en la figura 11, en esta observamos que las lesiones más avanzadas como tumores limítrofes y carcinomas tienen mayor expresión y las lesiones benignas muestran una menor expresión de esta proteína, al realizar en análisis estadístico encontramos que estas diferencias son significativas, sin embargo el epitelio normal de ovario también tiene una alta expresión de FAK (FAT). El análisis densitométrico corrobora lo que se observó con el análisis de ji cuadrada (gráfica 2).

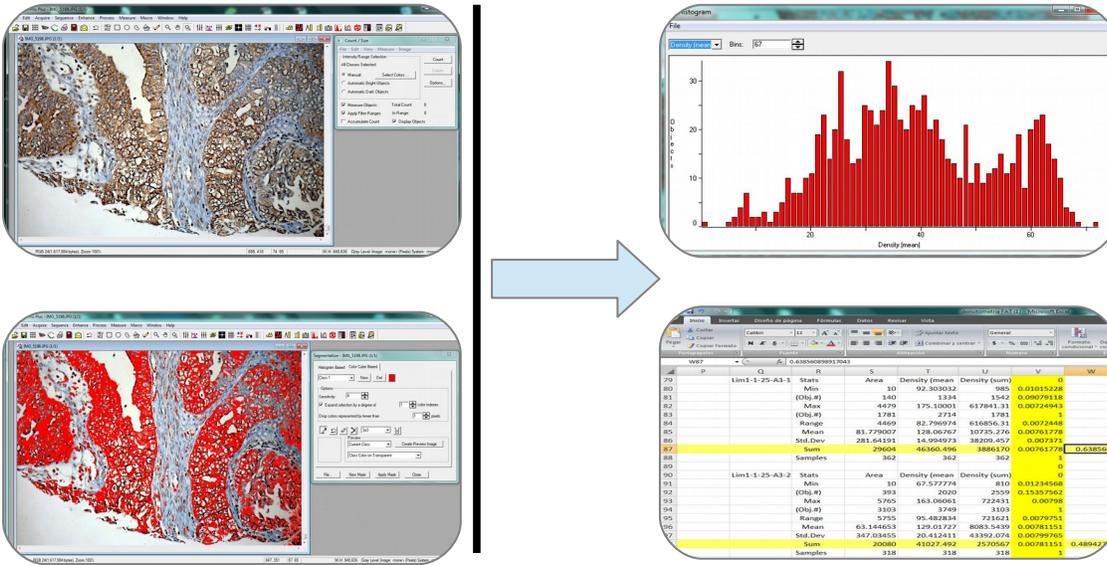


Figura 10. Análisis densitométrico de la expresión de FAK. El análisis densitométrico se realizó en tres fotografías de cada muestra. En estas se seleccionó el color café correspondiente a la señal de la presencia de FAK y nos da un grupo de datos y gráficas que corresponde al número de objetos y densidad del color café.

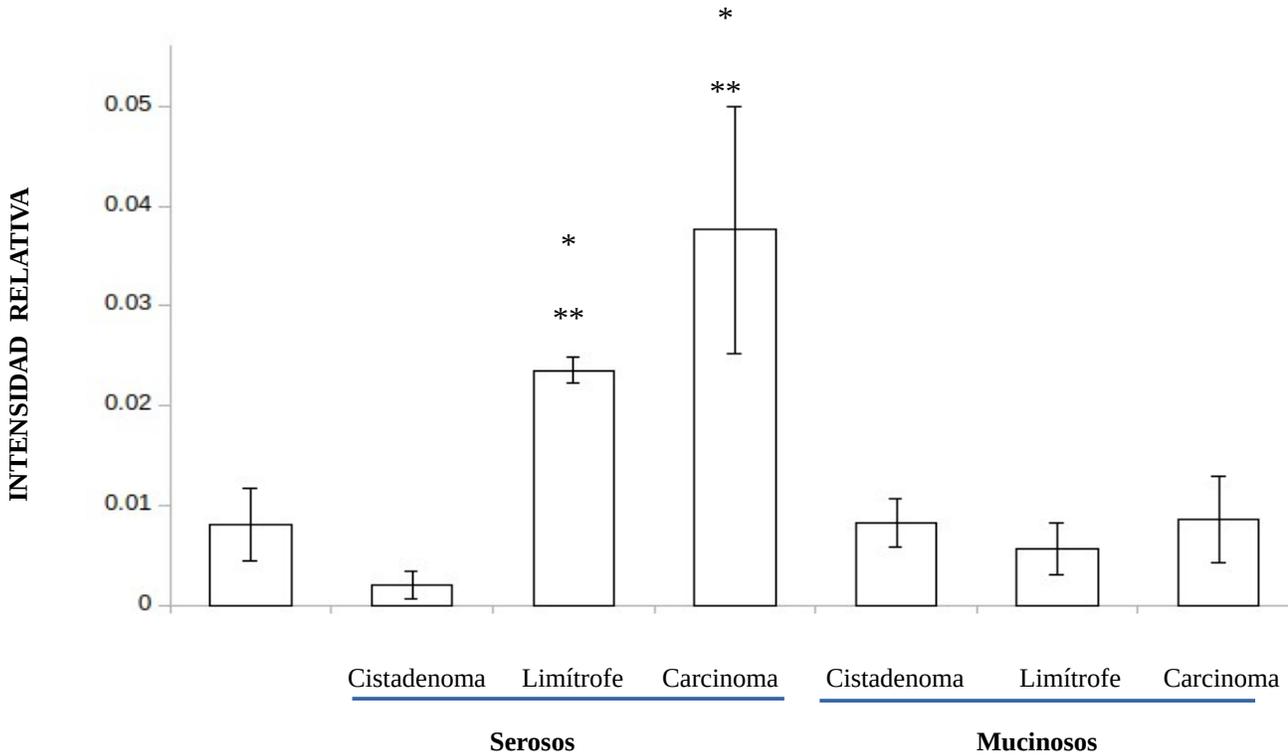


Figura 11. Expresión de FAK dominio cinasa, análisis densitométrico. claramente incrementa en carcinomas seroso y cómo podemos observar es superior en esta lesión comparada con lesiones de menor grado. Análisis estadístico de ANOVA, $p < 0.05$ *normal vs tumores, ** cistadenoma vs tumores

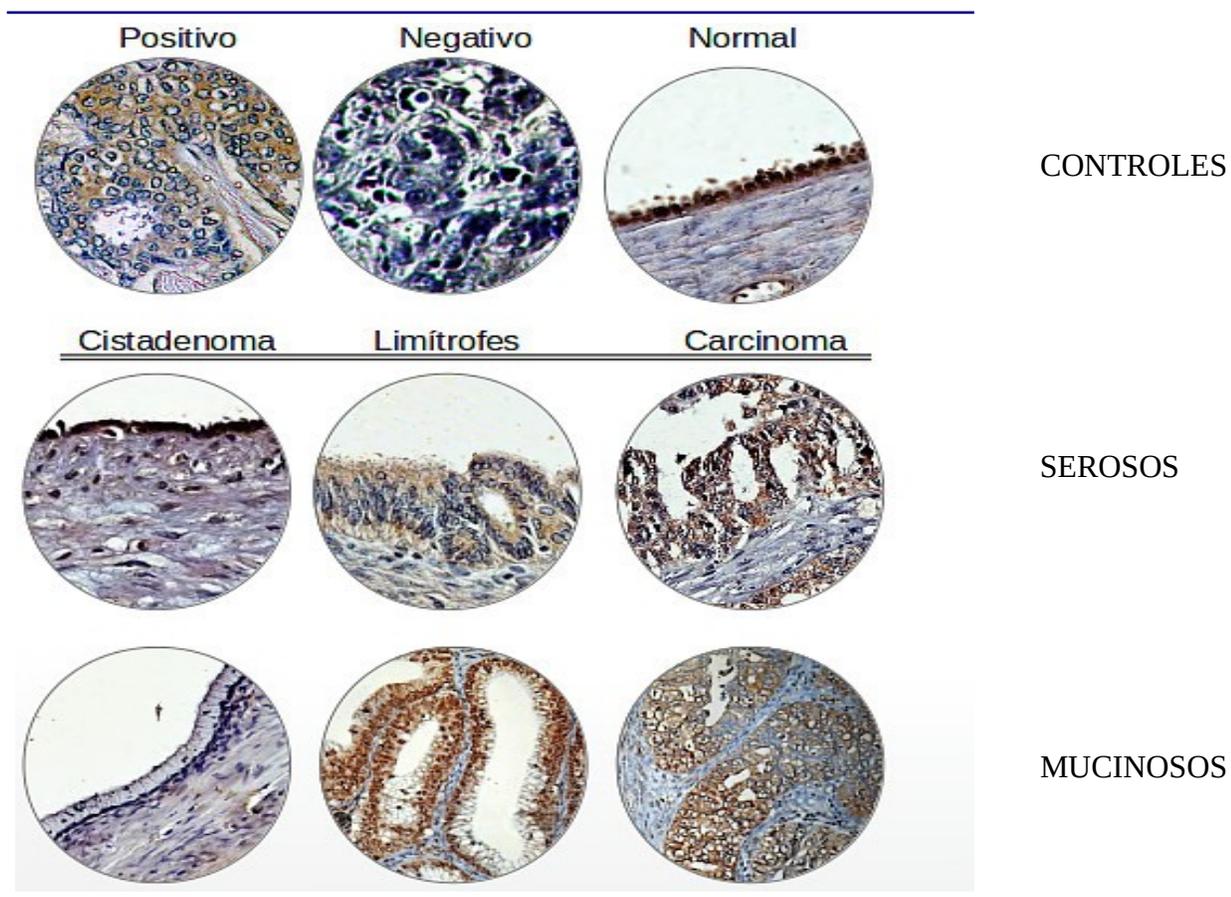


Figura 12. Expresión de FAK dominio FAT en el cáncer de ovario seroso y mucinoso. En el panel a y b observamos los controles positivo y negativo respectivamente el cual corresponde a un carcinoma de mama. El panel c muestra la expresión del ovario sin lesión y se observa una alta expresión de FAK FAT en el epitelio del ovario. Del panel d al f se muestran los tumores seroso y los paneles g, h e i corresponde a los tumores mucinoso.

En este trabajo observamos que la presencia de FAK FAT se encuentra en el citoplasma en tumores serosos. Sin embargo en tumores mucinosos se presenta en el núcleo, haciendo una comparación de la misma muestra con el dominio cinasa pudimos comprobar que la presencia de esta proteína se da solo cuando tiene el dominio FAT.

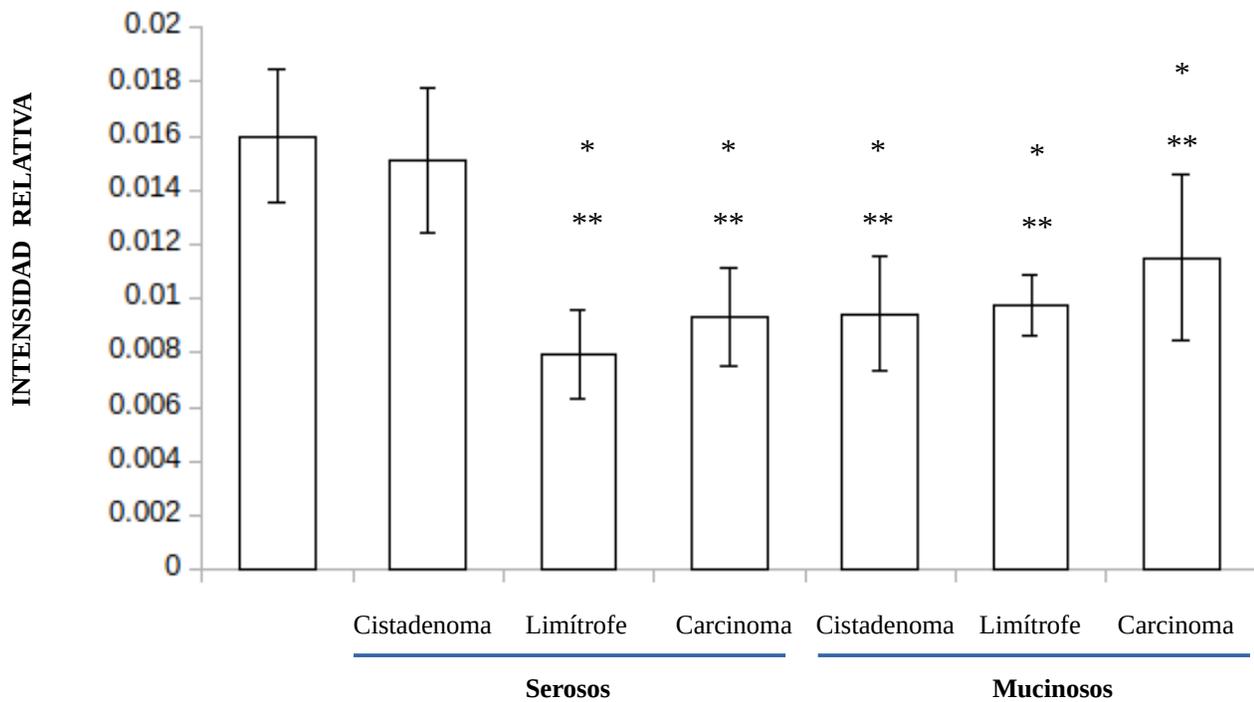


Figura 13. Expresión de FAK dominio FAT, análisis densitométrico. Se observo una mayor expresión en tejido de ovario normal y cistadenoma seroso. *normal vs tumores, ** cistadenoma vs tumores

EXPRESIÓN DE FAK DOMINIO FAT						
Subtipo histológico	No. Casos	-	+	++	+++	Valor de p
Ovario	16	2	6	8	0	
Tumores seroso (100)						
Cistadenoma	25	11	10	4	0	<0.05*
Limítrofe	25	0	5	19	1	<0.05*, NS**
Carcinoma	50	0	0	13	37	NS*,0.02**,0.01***
Tumores mucinosos (45)						
Cistadenoma	25	7	8	10	0	<0.05*
Limítrofe	14	2	4	6	2	NS*, <0.05**
Carcinoma	6	1	3	1	1	NS*, <0.05**, NS***

Tabla 3. Análisis de expresión de FAK dominio FAT. Se observa diferencia significativa entre los grupos analizados. * tumores vs normal, ** cistadenoma vs tumores y *** limítrofes vs carcinoma.

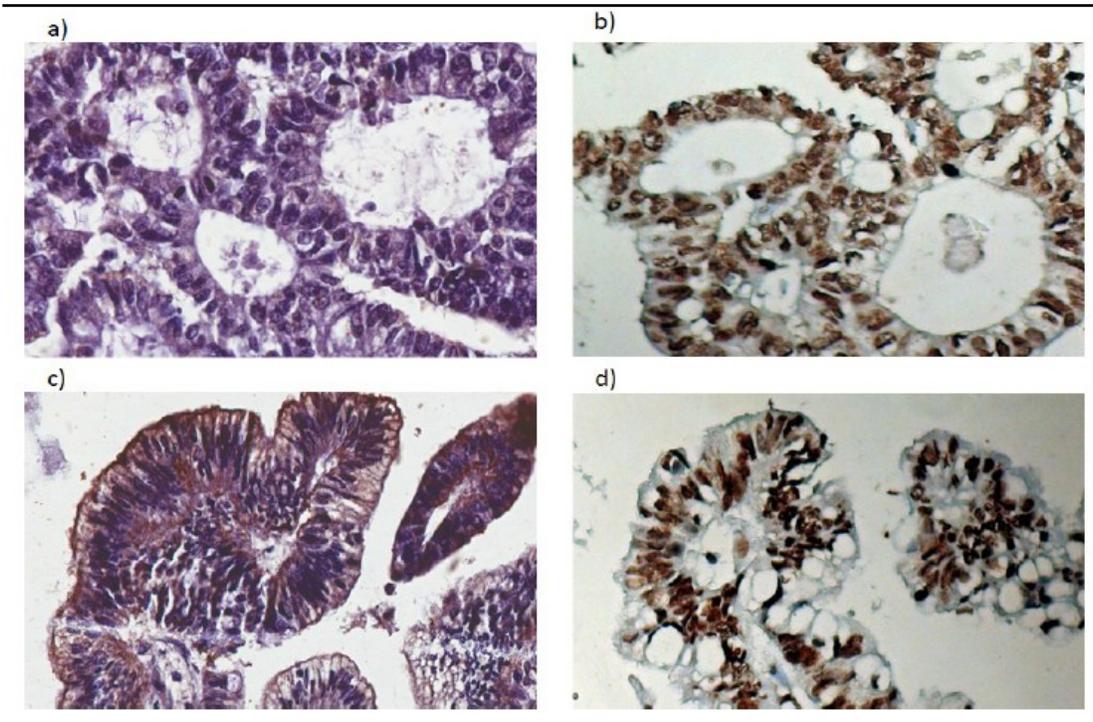


Figura 14. Presencia de FAK cinasa y FAT en tumores mucinoso. La presencia de fak cinasa se muestra en el citoplasma (panel a y c) mientras que en las mismas muestras la presencia de FAK FAT se encuentra en el núcleo, esto da el indicio de que posiblemente la isoforma FRNK (que no contiene el dominio cinasa) es la que se transloca al núcleo en este tipo de neoplasias de ovario.

8.3. EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA FAK DOMINIO CINASA Y FAT EN LAS LINEAS CELULARES NIH-OVCA3 Y SKOV3

La expresión de FAK en las líneas celulares muestra que el dominio cinasa es mayor que la expresión del dominio FAT en las dos líneas celulares. Sin embargo es mayor la expresión en la línea NIH-OVCA3, por otro lado la presencia de la proteína es en citoplasma (panel B, C y E), en el caso del dominio FAT también se observa en la membrana de NIH-OVCA3. Comparando la presencia de FAK en las dos líneas celulares se observa que NIH-OVCA3 tiene una mayor expresión de los dos dominios en comparación con SKOV3 (figura 13).

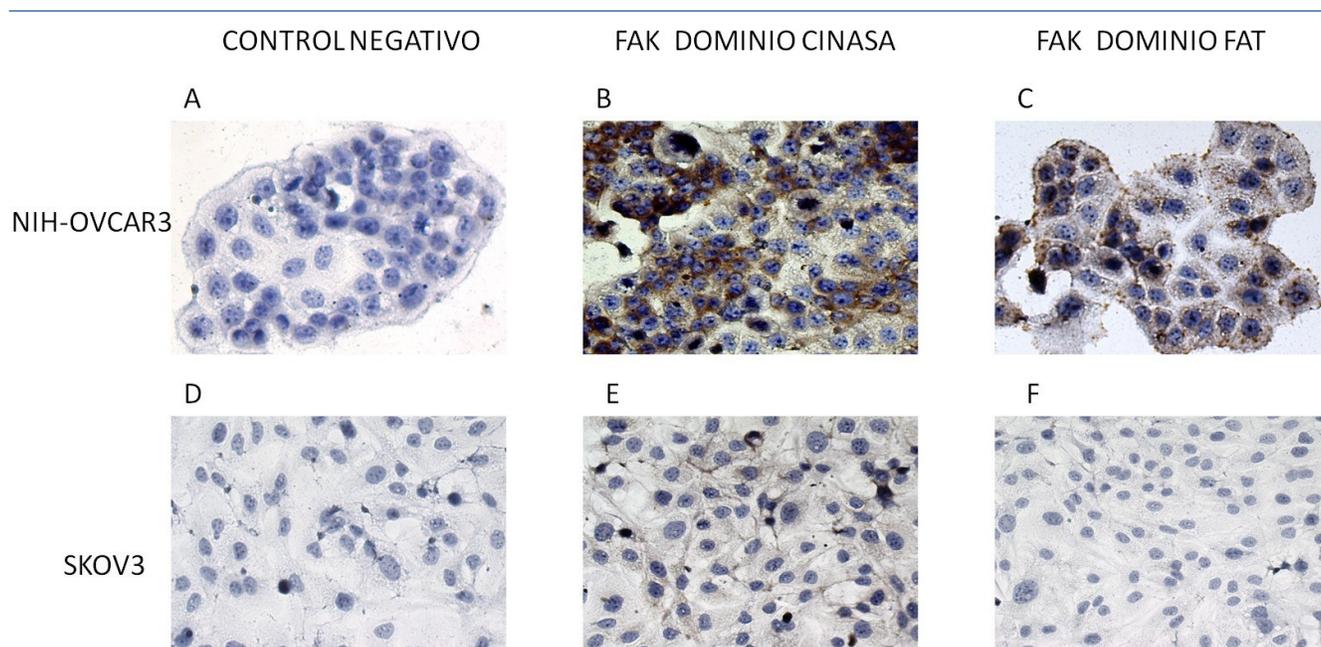


Figura 15. Presencia de FAK cinasa y FAT en líneas celulares de cáncer de ovario. La expresión de FAK (dominio cinasa y FAT) es mayor en la línea NIH-OVCAR3 (paneles A-C) y se observa una mayor expresión del dominio cinasa. En la línea celular SKOV3 se encontró una menor expresión del dominio cinasa (panel E) y una nula expresión del dominio FAT.

8.4. EXPRESIÓN DE TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE FAK EN NIHOVCA Y SKOV3

Para la expresión de los transcritos alternativos de FAK se realizaron las líneas celulares NIH-OVCA3 y SKOV3, se obtuvo el RNA mensajero y se sintetizó el cDNA como ya se describió en los materiales y métodos, posteriormente se realizaron las PCR para determinar si se expresaban los transcritos alternativos. En este trabajo encontramos que se expresan distintos transcritos de FAK (figura 14), se analizó la expresión de fragmentos entre los exones 12 y 17, en este análisis encontramos expresada la isoforma FAK^{28, 6} en las dos líneas celulares (figura 14 a), también encontramos la isoforma FAK⁰ y FAK²⁸ lo que corrobora nuestra hipótesis de la expresión de diferentes isoformas en el cáncer de ovario. Otro hallazgo importante es que en la línea celular SKOV3 la expresión de FAK²⁸ es mayor que FAK⁰ (figura 14 c).

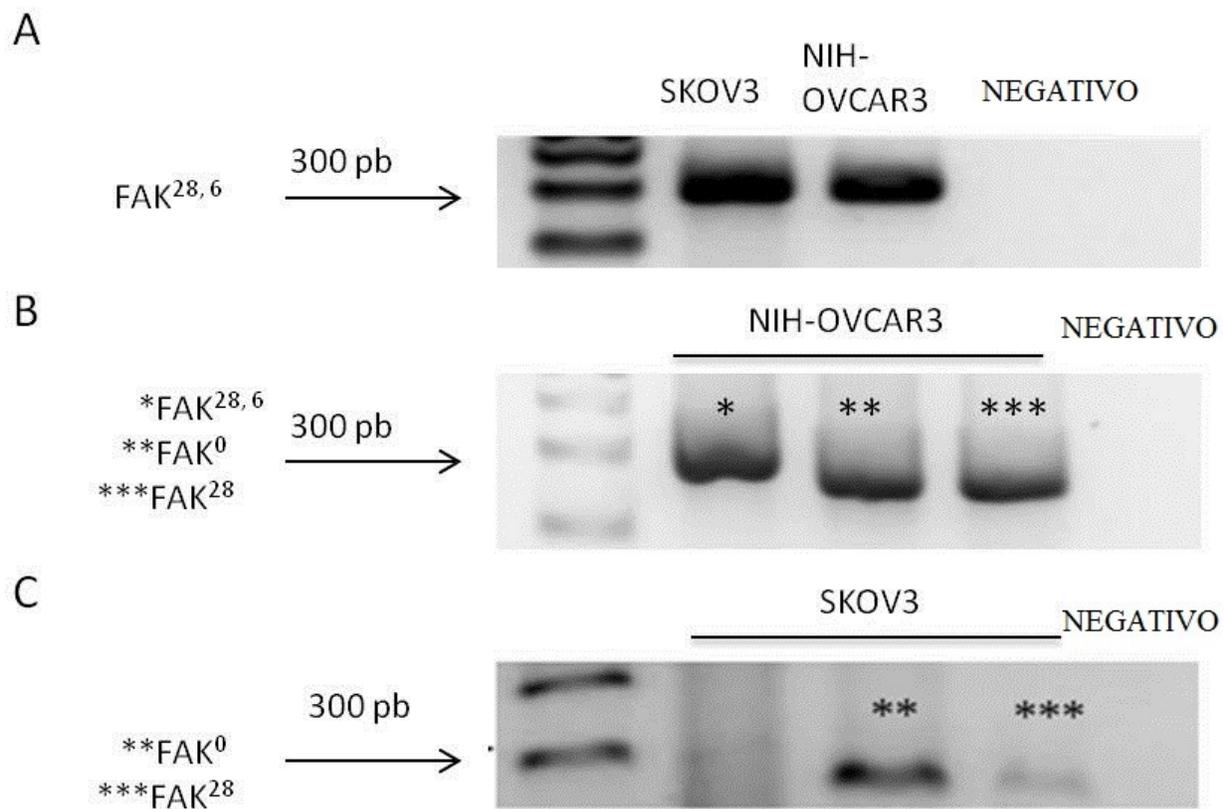


Figura 16 .- Expresión de isoformas de FAK en líneas celulares de cáncer de ovario. El en panel a se muestra la expresión de FAK en donde se amplifica del exon 12 al exon 18 y se observa que en las dos líneas celulares se encuentra el fragmento de 300 pb. En el panel b podemos observar un amplificado de ~300 pb que contiene de los FAK exones 12-18 (NIH1R2), un amplificado de ~250 pb que correspondería FAK exon 15 (NIHR3), un amplificado de ~250 correspondiente a FAK exones 13, 15 (NIHR4), se observa un fragmento tenue de 270 correspondiente a los exones 14, 15 (NIHR5). En todos los fragmentos amplificados incluyen los exones 17 y 18.

9. DISCUSIÓN

La importancia de FAK para el funcionamiento celular y tisular ha sido ampliamente estudiada en las últimas décadas. Por otra parte se ha demostrado la participación de esta proteína en el desarrollo del cáncer. La participación de FAK en el cáncer de ovario también se ha establecido en diferentes estudios, demostrando su influencia en proceso de proliferación, migración, metástasis y agresividad del tumor. Sin embargo no se ha demostrado la presencia de isomorfos de esta proteína en el cáncer de ovario, por tal motivo el objetivo principal de este estudio fue buscar isoformas de FAK. Una de las estrategias utilizadas fue el uso de anticuerpos, mediante la técnica de inmunohistoquímica con la cual observamos expresión diferencial de FAK en tumores serosos y mucinosos. Debido a que no existen anticuerpos para isoformas específicas de FAK decidimos utilizar dos anticuerpos, uno para el dominio cinasa y otro para el dominio FAT, como se muestra en la figura 17.

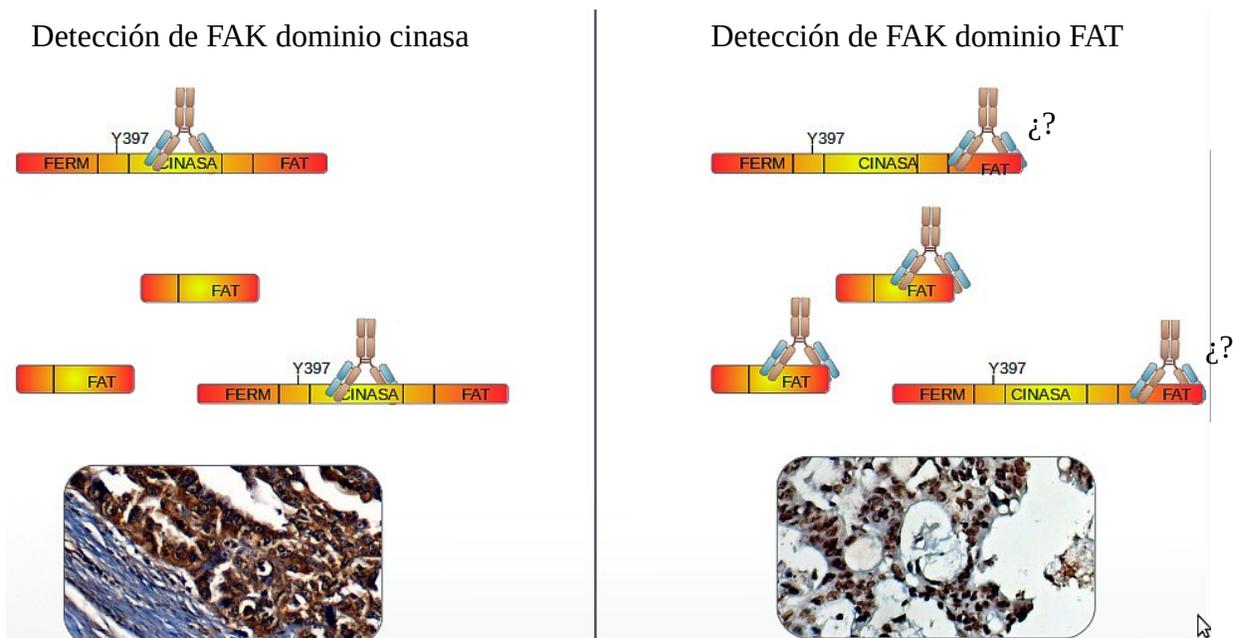


Figura 17. Determinación de expresión de FAK mediante anticuerpos. Se utilizó un anticuerpo anti-cinasa y otro anti-FAT, aunque los dos detectan FAK la especificidad del dominio nos muestra diferencia en la detección de esta proteína. Para el dominio FAT el anticuerpo podría detectar la isoforma completa y la isoforma FRNK, sin embargo la presencia se observa alta en núcleo y una baja o nula presencia en citoplasma, estos resultados

son muy diferentes a los obtenidos con el dominio cinasa lo cual nos da indicios de que el anticuerpo -FAT solo detecta a la isoforma FRNK.

Los resultados para FAK con dominio cinasa muestran un aumento de la expresión de esta proteína en tumores serosos conforme aumenta la agresividad del tumor, estos datos son congruentes con los resultados reportados en otros trabajos, en los cuales se observa un incremento en la expresión de esta proteína en carcinomas serosos. El incremento de la esta proteína con dominio cinasa es importante en el desarrollo del cáncer ya que incrementa la activación de vías de señalización como las MAPK

En el caso de los tumores mucinosos se observa una menor expresión de FAK con dominio cinasa con respecto a las muestras serosas, los resultados mostraron una clara expresión diferencial entre estos tumores de ovario, estas diferencias pueden tomarse como marcador para este tipo de neoplasia de ovario. En otros estudios como los de Judson y col. 1999, también se observó menor expresión de FAK en tumores mucinosos, lo que concuerda con nuestros resultados (65). Una de las diferencias más notables entre tumores serosos y mucinosos es la morfología celular y una de las proteínas implicadas en dicha morfología es FAK. Owen y col. en 1999 demostraron que la región de autofosforilación de FAK Y397 que se encuentra en el dominio cinasa, es necesario para la generación de prolongaciones celulares (spreading), ellos observaron que cuando no se encuentra Y397 las células forman menos prolongaciones celulares (66). En otro estudio realizado por Giannone y col. en 2002 compararon el número de adhesiones focales y prolongaciones celulares cuando se expresa la proteína FAK o FRNK, demostrando que hay menos prolongaciones cuando esta FRNK y observaron diferencia en la morfología celular (67). nuestros resultados presentaron diferencia notables entre un anticuerpo y otro así como entre los tumores serosos y mucinosos, esto podría estar relacionado con la morfología celular de los tumores analizados tal como lo encontraron los trabajos antes citados sin embargo falta realizar pruebas adicionales para demostrar la presencia en el núcleo de FRNK y como afecta la morfología, aunque los estudios antes mencionados y nuestros resultados avalan esta hipótesis.

Aunque todos los resultados obtenidos para el dominio cinasa son congruentes con los resultados mostrados por otros grupos de investigación, los resultados analizando otro dominio de la proteína son muy diferentes, una diferencia muy evidente es que presencia de FAK con dominio FAT es mayor en las muestras de ovario sin lesión y en cistadenoma seroso lo cual se podría ser debido a que FAK que solo tiene este dominio FAT funciona como dominante negativa evitando que se dé la señalización dependiente de FAK manteniendo un equilibrio entre la proliferación de las células epiteliales de ovario, en el caso de las lesiones serosas y mucinosas presentan un patrón de expresión similar, tanto carcinomas como limítrofe presentan más expresión que las lesiones benignas.

La presencia de FAK (FAT) en lesiones mucinosas se observa en el núcleo de las células lo cual contrasta con la FAK (cinasa) que se encontró en citoplasma. En diferentes estudios ya se ha reportado a FAK en el núcleo, nosotros mostramos que posiblemente la dominante negativa FRNK también se encuentra en el núcleo. En un estudio realizado por Yin y colaboradores en 2003, encontraron que FRNK se puede localizar en el núcleo celular de miocitos de rata y la translocación de esta proteína necesita la fosforilación en el residuo Ser217, así mismo reportan que la localización en el núcleo juega un papel importante en la mecanotransducción (68). En un estudio posterior realizado por el mismo grupo de investigación en 2006 encontraron que la translocación de FAK y FRNK depende de diferentes subdominios proteicos, además ellos observaron que la presencia de FAK en el núcleo depende de la proteína Sam68 mientras que FRNK se asocia con la proteína fibrilarina, en dicho estudio, ellos observaron que la translocación de estas proteínas son independientes y por diferentes mecanismos (69). En el caso de el cáncer de ovario mucinosos observamos la presencia de FAK dominio FAT (posible FRNK) se encuentra en el núcleo y posiblemente también es dependiente de fibrilarina por lo que es importantes buscar y definir el mecanismos de traslocación al núcleo de FRNK en tumores mucinosos. En este trabajo encontramos diferencias notables tanto en presencia de isoformas de FAK como en la localización que podrían ser utilizadas como biomarcadores así mismo es muy importante desvelar los mecanismos específicos de tumores serosos y mucinosos de ovario que podrían contribuir a la agresividad de estos tumores. Otra característica que encontramos, es la presencia de FAK tanto en células neoplásicas como en células del mesenquimas como lo

reporta Sang-Taek y colaboradores en 2008, sin embargo esto se tiene que investigar con mayor detenimiento para determinar sus implicaciones en este tipo de tumores (70). Todos los resultados observados utilizando estos anticuerpos nos indican que por lo menos se están expresando dos isoformas diferentes en el cáncer de ovario y estos son congruentes con estudios publicados por otros grupos de investigación, sin embargo es muy importante validar estos resultados con otro tipo de estudios para reafirmar nuestros resultados.

Los resultados con los anticuerpos demostramos la presencia de al menos dos isoformas, sin embargo se han reportado otras isoformas de FAK. Dichas isoformas difieren en regiones correspondientes del exon 12 al exon 17, esta es una región próxima al dominio cinasa y al sitio de fosforilación Tyr397 que es muy importante para la activación de FAK. Estas isoformas fueron descritas en cerebro de ratón y cerebro humano, así como en diferentes tejidos como riñón, musculo, testículo, timo, pulmón e hígado (64). En otro estudio se analizaron las isoformas en pacientes con leucemias y encontraron alteración en la expresión de las isoformas de FAK y dicha alteración se correspondía con un mal pronóstico (71). Como ya se comento con anterioridad, la expresión de FAK en cáncer de ovario tanto en serosos como en mucinosos ya se ha determinado y se ha asociado con un mal pronóstico y con la agresividad del tumor en especial en tumores serosos, sin embargo no se había determinado isoformas de esta proteína en el cáncer de ovario.

Por otro lado al analizar la región del exon 12 al 17 encontramos que existen diferentes transcritos. En estudios anteriores se reportan a FAK como un posible marcador, pero no indican cual isoforma es la que está presente o si todas la isoformas se expresan. Esto es importante ya que de acuerdo a Contestabile y colaboradores en 2003 muestran que las isoformas de esta proteína son tejido dependientes y presentan diferentes tasas de fosforilación. En este trabajo mostramos que existen diferente transcritos de FAK en el cáncer de ovario, debido a esto es necesario en estudios posteriores encontrar si estos transcrito producen sus respectivas proteínas y que impacto tiene en la agresividad del tumor. Los resultados mostrados en este trabajo revelan la expresión de las isoformas FAK⁰, FAK²⁸ y FAK^{28, 6} en líneas celulares SKOV3 y NIH-OVCA3. En un estudio realizado por Toutant y col en 2000, analizaron la expresión de las isoformas antes mencionadas y

encontraron que algunas de están distribuidas de manera diferencial en distintas regiones del cerebro. Posteriormente corisi y colaboradores observaron que la expresión de FAK⁶, FAK²⁸ y FAK^{28, 6} en cerebro adulto y fetal. Tal como sucede en estos estudios en este trabajo observamos expresión de estas isoformas. Aunque no se realizaron análisis de la proteína o su capacidad de fosforilación, es probable que estas isoformas tengan diferentes tasas de fosforilación que ayude a promover mayor tasa de proliferación mediante la mayor activación de vías de señalización.

10.- CONCLUSIONES

En este estudio observamos que la expresión de FAK esta diferencialmente expresada en tumores serosos y mucinosos. Para el dominio cinasa la expresión en tumores serosos fue alta mientras que en tumores mucinoso es de moderada a baja. En el caso del dominio FAT encontramos que la expresión es mayor en epitelio normal y cistadenoma seroso, en contraste con las lesiones tumorales, otro resultado importantes es que el dominio FAT lo encontramos en el núcleo en tumores mucinosos.

Otros resultados importante encontramos expresión de distintos transcritos alternativos, con todos estos resultados podemos concluir que no solo hay una expresión diferencial de FAK sino además existen diferentes isoformas de esta proteína. Estos nuevos hallazgos podrían servir como herramientas de pronóstico o en un futuro como posibles blancos terapéuticos.

11. LITERATURA CITADA

1. Coleman MP, Forman D, Bryant H, *et al.*: Cancer survival in Australia, Canada, Denmark, Norway, Sweden, and the UK, 1995-2007 (the international cancer benchmarking partnership): An analysis of population-based cancer registry data. *Lancet* 377: 127–138, 2011.
2. Siegel RL, Miller KD and Jemal A: Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 67: 7–30, 2017.
3. Rauh-Hain J a, Krivak TC, Del Carmen MG and Olawaiye AB: Ovarian cancer screening and early detection in the general population. *Rev Obstet Gynecol* 4: 15–21, 2011.
4. Karimi-Zarchi M, Reza Mortazavizadeh SM, Bashardust N, Zakerian N, Zaidabadi M, Yazdian-Anari P and Teimoori S: The Clinicopathologic Characteristics and 5-year Survival Rate of Epithelial Ovarian Cancer in Yazd, Iran. *Electron Physician* 7: 1399–1406, 2015.
5. Guyton AC: *Tratado de fisiología médica*. 12th ed. Madrid, 2011.
6. Velázquez Cornejo G: Fisiología De La Reproduccion Humana. *Rev Mex Med la Reprod* 1: 115–130, 2009.
7. Rudmann DG and Foley GL: Female Reproductive System. In: *Fundamentals of Toxicologic Pathology: Third Edition, Third Edit.* Elsevier, pp517–545, 2017.
8. P.B C: *Anatomy and Histology of the Ovary*. Springer. (R.J. K (ed.)). New York, NY, 1987.
9. Ramus SJ and Gayther SA: The Contribution of BRCA1 and BRCA2 to Ovarian Cancer. *Mol Oncol* 3: 138–150, 2009.
10. Levy-Lahad E and Friedman E: Cancer risks among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Br J Cancer* 96: 11–15, 2007.

11. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP and Bishop DT: Genetic Linkage Analysis in Familial Breast and Ovarian Cancer: Results from 214 Families. *AmJ Hum Genet* 52: 678–701, 1993.
12. Narod SA, Madlensky L, Tonin P, Bradley L, Rosen B, Cole D and Risch HA: Hereditary and familial ovarian cancer in southern ontario. *Cancer* 74: 2341–2346, 1994.
13. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H and Hirakawa T: Histological classification of ovarian cancer. *36*: 9–17, 2003.
14. Dubeau L: The cell of origin of ovarian epithelial tumours. *Lancet Oncol* 9: 1191–1197, 2008.
15. Fleming JS, Beaugi CR, Chenevix-trench G and Tan OL: Incessant ovulation , inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis : Revisiting old hypotheses. *247*: 4–21, 2006.
16. Yang-hartwich Y, Gurrea-soteras M, Sumi N, Joo WD and Holmberg JC: Ovulation and extra-ovarian origin of ovarian cancer. *1–12*, 2014.
17. Lee AW, Tyrer JP, Doherty JA, *et al.*: Evaluating the ovarian cancer gonadotropin hypothesis: A candidate gene study. *Gynecol Oncol* 136: 542–548, 2015.
18. Kurman RJ and Shih I-M: The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. *Am J Surg Pathol* 34: 433–443, 2010.
19. Goff BA, Mandel LS, Drescher CW, *et al.*: Development of an Ovarian Cancer Symptom Index Possibilities for Earlier Detection., 2006.
20. Bankhead CR, Collins C, Stokes-lampard H, Rose P, Wilson S, Clements A and Mant D: Identifying symptoms of ovarian cancer : a qualitative and quantitative study. *1008–1014*, 2008.
21. DePriest PD and DeSimone CP: Ultrasound screening for the early detection of ovarian cancer. *J Clin Oncol* 21: 194–199, 2003.
22. Bharwani N, Reznek RH and Rockall AG: Ovarian Cancer Management: The role of imaging and diagnostic challenges. *Eur J Radiol* 78: 41–51, 2011.

23. Pepin K, Carmen M del, Brown A and Dizon DS: CA 125 and Epithelial Ovarian Cancer: Role in Screening, Diagnosis, and Surveillance. *Am J Hematol / Oncol* 10: 22–29, 2014.
24. Canney PA, Moore M, Wilkinson PM and James RD: Ovarian cancer antigen CA125: a prospective clinical assessment of its role as a tumour marker. *Br J Cancer* 50: 765–9, 1984.
25. Tropé CG: Ovarian cancer : diagnostic , biological and prognostic aspects. 10: 519–533, 2015.
26. Tanabe H, Nishii H, Sakata A, Suzuki K and Mori Y: Overexpression of HER-2 / neu is not a risk factor in ovarian clear cell adenocarcinoma. 94: 735–739, 2004.
27. Abe A, Minaguchi T and Ochi H: PIK3CA overexpression is a possible prognostic factor for favorable survival in ovarian clear cell carcinoma ☆. *Hum Pathol* 44: 199–207, 2013.
28. Klotz R, Zeimet AG, Reimer D, Müller-holzner E, Chamson M and Marth C: Activated p38-MAPK and Gemcitabine Sensitivity. 2980: 2975–2980, 2008.
29. Wang J, Zhou J and Wu GS: ERK-Dependent MKP-1 – Mediated Cisplatin Resistance in Human Ovarian Cancer Cells. 11933–11942, 2007.
30. Tai Y, Chen L and Shen T: Emerging Roles of Focal Adhesion Kinase in Cancer. 2015, 2015.
31. Hoefflich KP and Ikura M: Radixin : cytoskeletal adopter and signaling protein. 36: 2131–2136, 2004.
32. Ceccarelli DFJ, Song HK, Poy F, Schaller MD and Eck MJ: Crystal Structure of the FERM Domain of Focal Adhesion. 281: 252–259, 2006.
33. Cohen LA and Guan J: Residues within the First Subdomain of the FERM-like Domain in Focal Adhesion Kinase Are Important in Its Regulation *. 280: 8197–8207, 2005.
34. Cooper LA, Shen T and Guan J: Regulation of Focal Adhesion Kinase by Its Amino-Terminal Domain through an Autoinhibitory Interaction. 23: 8030–8041, 2003.

35. Serrels B, Sandilands E, Serrels A, *et al.*: Report A Complex between FAK , RACK1 , and PDE4D5 Controls Spreading Initiation and Cancer Cell Polarity. *Curr Biol* 20: 1086–1092, 2010.
36. Takino T, Yoshioka K, Miyamori H, Yamada KM and Sato H: A scaffold protein in the c-Jun N-terminal kinase signaling pathway is associated with focal adhesion kinase and tyrosine-phosphorylated. *J Biol Chem* 277: 6488–6497, 2002.
37. Schauer MD and Hill C: Focal Adhesion Kinase and Paxillin Bind to Peptides Mimicking [3 Integrin Cytoplasmic Domains. *J Biol Chem* 270: 1181–1187, 1995.
38. Serrels B, Serrels A, Brunton VG, *et al.*: Focal adhesion kinase controls actin assembly via a FERM-mediated interaction with the Arp2 / 3 complex. *J Biol Chem* 282: 9, 2007.
39. Lim S, Chen XL, Lim Y, *et al.*: Article Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation. *J Biol Chem* 283: 9–22, 2008.
40. Sieg DJ, Hauck CR, Ilic D, Klingbeil CK, Schaefer E, Caroline H and Schlaepfer DD: FAK integrates growth-factor and integrin signals to promote cell migration. *J Biol Chem* 275: 2, 2000.
41. Chen S and Chen H: Direct Interaction of Focal Adhesion Kinase (FAK) with Met Is Required for FAK To Promote Hepatocyte Growth Factor-Induced Cell Invasion †. *J Biol Chem* 281: 5155–5167, 2006.
42. Pouillet P, Gautreau A, Kadare G, Girault J, Louvard D and Arpin M: Ezrin Interacts with Focal Adhesion Kinase and Induces Its Activation Independently of Cell-matrix Adhesion *. *J Biol Chem* 276: 37686–37691, 2001.
43. Chen R, Kim O, Li M, *et al.*: Regulation of the PH-domain-containing tyrosine kinase Etk by focal adhesion kinase through the FERM domain. *J Biol Chem* 276: 3, 439–444, 2001.
44. Cai X, Lietha D, Ceccarelli DF, *et al.*: Spatial and Temporal Regulation of Focal Adhesion Kinase Activity in Living Cells □. *J Biol Chem* 283: 201–214, 2008.
45. Mothe-satney I and Delahaye L: Insulin Receptor Substrate-1 as a Signaling Molecule for Focal Adhesion Kinase pp125 FAK and pp60 src *. *J Biol Chem* 273: 32244–32253, 1998.

46. Frame MC, Patel H, Serrels B, Lietha D and Eck MJ: The FERM domain : organizing the structure and function of FAK. *Nat Publ Gr* 11: 802–814, 2010.
47. Arold ST, Hoellerer MK and Noble MEM: The structural basis of localization and signaling by the focal adhesion targeting domain. *Structure* 10: 319–327, 2002.
48. Schlaepfer DD and Hunter T: Evidence for In Vivo Phosphorylation of the Grb2 SH2-Domain Binding Site on Focal Adhesion Kinase by Src-Family Protein-Tyrosine Kinases. *16*: 5623–5633, 1996.
49. Lietha D and Eck MJ: Crystal Structures of the FAK Kinase in Complex with TAE226 and Related Bis-Anilino Pyrimidine Inhibitors Reveal a Helical DFG Conformation. *3*: 1–7, 2008.
50. Parsons JT: Focal adhesion kinase: the first ten years. *J Cell Sci* 116: 1409–1416, 2003.
51. Wary KK, Kohler EE and Chatterjee I: Focal adhesion kinase regulation of neovascularization. *Microvasc Res* 83: 64–70, 2012.
52. Mitra SK, Hanson DA and Schlaepfer DD: FOCAL ADHESION KINASE : IN COMMAND AND CONTROL OF CELL MOTILITY. *6*: 56–68, 2005.
53. C. Bottini S. Miotti S. Fiorucci P. Facheris S. Ménard M. I. Colnaghi: Polarization of the alpha 6 beta 4 integrin in ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 267: 261–267, 1993.
54. Carreiras F, Denoux Y, Staedel C, Lehmann M, Sichel F and Gauduchon P: Expression and Localization of αv Integrins and Their Ligand Vitronectin in Normal Ovarian Epithelium and in Ovarian Carcinoma. *Gynecol Oncol* 62: 260–267, 1996.
55. Liapis H, Adler LM, Wick MR and Rader JS: Expression of αv , B3 Integrin Is Less Frequent in Ovarian Epithelial Tumors of Low Malignant Potential in Contrast to Ovarian Carcinomas. 443–449.
56. Kuphal S, Bauer R and Bosserhoff AK: Integrin signaling in malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev* 24: 195–222, 2005.
57. Gabarra-Niecko V., Schaller M.D. and Dunty J.M.: FAK regulates biological processes important for the pathogenesis of cancer. *Cancer Metastasis Rev* 22: 16, 2003.

58. Grisar-Granovsky S, Salah Z, Maoz M, Pruss D, Beller U and Bar-Shavit R: Differential expression of Protease activated receptor 1 (Par1) and pY397FAK in benign and malignant human ovarian tissue samples. *Int J Cancer* 113: 372–378, 2005.
59. Giubellino A, Burke TR and Bottaro DP: Grb2 signaling in cell motility and cancer. *Expert Opin Ther Targets* 12: 1021–1033, 2008.
60. Wiener JR, Windham C, Estrella VC, *et al.*: Activated Src protein tyrosine kinase is overexpressed in late-stage human ovarian cancers. *Gynecol Oncol* 88: 73–79, 2003.
61. Sood AK, Coffin JE, Schneider GB, *et al.*: Biological Significance of Focal Adhesion Kinase in Ovarian Cancer. *Am J Pathol* 165: 1087–1095, 2004.
62. Steinmetz R, Wagoner HA, Zeng P, Hammond JR, Hannon TS, Meyers JL and Pescovitz ORAH: Mechanisms Regulating the Constitutive Activation of the Extracellular Signal-Regulated Kinase (ERK) Signaling Pathway in Ovarian Cancer and the Effect of Ribonucleic Acid Interference for ERK1 / 2 on Cancer Cell Proliferation. 18: 2570–2582, 2016.
63. Stimpfl M, Tong D, Fasching B, Schuster E, Obermair A, Leodolter S and Zeillinger R: Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res* 8: 2253–2259, 2002.
64. Corsi J-M, Rouer E, Girault J-A and Enslin H: Organization and post-transcriptional processing of focal adhesion kinase gene. *BMC Genomics* 7: 198, 2006.
65. Judson PL, He X, Cance WG and Van Le L: Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma. *Cancer* 86: 1551–1556, 1999.
66. Owen JD, Ruest PJ, Fry DW and Hanks SK: Induced focal adhesion kinase (FAK) expression in FAK-null cells enhances cell spreading and migration requiring both auto- and activation loop phosphorylation sites and inhibits adhesion-dependent tyrosine phosphorylation of Pyk2. *Mol Cell Biol* 19: 4806–4818, 1999.
67. Giannone G, Rondé P, Gaire M, Haiech J and Takeda K: Calcium oscillations trigger focal adhesion disassembly in human U87 astrocytoma cells. *J Biol Chem* 277: 26364–26371, 2002.

68. Yi XP, Wang X, Gerdes AM and Li F: Subcellular redistribution of focal adhesion kinase and its related nonkinase in hypertrophic myocardium. *Hypertension* 41: 1317–1323, 2003.
69. Yi XP, Zhou J, Huber L, Qu J, Wang X, Gerdes AM and Li F: Nuclear compartmentalization of FAK and FRNK in cardiac myocytes. *Am J Physiol Circ Physiol* 290: H2509–H2515, 2006.
70. Lim ST, Chen XL, Lim Y, *et al.*: Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation. *Mol Cell* 29: 9–22, 2008.
71. Despeaux M, Chicanne G, Rouer E, *et al.*: Focal adhesion kinase splice variants maintain primitive acute myeloid leukemia cells through altered Wnt signaling. *Stem Cells* 30: 1597–1610, 2012.

12. APÉNDICE

12.1 ARTÍCULO REQUISITO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO

ONCOLOGY LETTERS 17: 4779-4786, 2019

Increased expression of FAK isoforms as potential cancer biomarkers in ovarian cancer

MANUEL NOLASCO-QUIROGA¹, MARISOL ROSAS-DÍAZ², JOSÉ MORENO³,
RICARDO GODÍNEZ-AGUILAR³, MARÍA JOSÉ LÓPEZ-IBARRA¹, PATRICIA PIÑA-SÁNCHEZ⁴,
ISABEL ALVARADO-CABRERO⁵, GERARDO VÁZQUEZ-GÓMEZ⁶, LETICIA ROCHA-ZAVALA⁷,
DIEGO ARENAS-ARANDA^{1*} and FABIO SALAMANCA-GÓMEZ^{1,8}

¹Laboratory of Molecular Genetics, Medical Research Unit, Mexican Social Security Institute, National Medical Center Century XXI, Hospital of Pediatrics, Mexico City 06720; ²Multidisciplinary Academic Unit Reynosa-Aztlan Reynosa, Autonomous University of Tamaulipas, Tamaulipas 88740; ³Direction of Research, Hospital Juárez de México, Mexico City 07760; ⁴Medical Research Unit of Oncologic Diseases; ⁵Department of Anatomy-Pathology, Mexican Social Security Institute, National Medical Center Century XXI, Oncology Hospital, Mexico City 06720; Departments of ⁶Genomic Medicine and Environmental Toxicology, and ⁷Molecular Biology and Biotechnology, National University of Mexico; ⁸Medical Research Coordination, Mexican Social Security Institute, National Medical Center Century XXI, Mexico City 04510, Mexico

Received July 21, 2017; Accepted December 7, 2018

DOI: 10.3892/ol.2019.10147

Abstract. Focal adhesion kinase (FAK) is a non-receptor tyrosine kinase that is expressed in most human cell types (example: Epithelial cells, fibroblasts and endothelial), it serves a key role in the control of cell survival, proliferation and motility. The abnormal expression of FAK has been associated with poor prognosis in cancer, including ovarian cancer. However, although FAK isoforms with specific molecular and functional properties have been characterized, there are a limited number of published studies that examine FAK isoforms in ovarian cancer. The aim of the present study was to analyze the expression level of FAK and its isoforms in ovarian cancer. The expression of FAK kinase and focal adhesion targeting (FAT) domains was determined with immunohistochemistry in healthy ovary, and serous and mucinous cystadenoma, borderline tumor and carcinoma samples. Additionally, the expression of FAK and its isoforms were investigated in three ovarian cancer-derived cell lines with western blotting and reverse transcription-semi-quantitative polymerase chain reaction. An increased expression of FAK kinase domain was determined in serous tumor samples and was associated with advancement of the lesion. FAK kinase domain expression was

moderate-to-low in mucinous tumor samples. The expression of the FAK FAT domain in tumor samples was reduced, compared with healthy ovary samples; however, the FAT domain was localized to the cellular nucleus. Expression of alternative transcripts FAK⁰, FAK^{28,6} and FAK²⁸ was determined in all three cell lines investigated. In conclusion, FAK kinase and FAT domains are differentially expressed among ovarian tumor types. These results indicated the presence of at least two isoforms of FAK (FAK and the putative FAK-related non-kinase) in tumor tissue, which is supported by the cells producing at least three FAK alternative transcripts. These results may support the use of FAK and its isoforms as biomarkers for ovarian cancer.

Introduction

In 2012 ovarian cancer (OCa) is the second most prevalent type of gynecological cancer globally (1,2). Due to OCa being asymptomatic during early stages, the majority of patients are diagnosed in advanced stages, resulting in a notably poor survival rate (3,4). Ovarian tumors are classified into benign, cystadenoma, borderline and malignant lesions (5). A total of ~70-80% of OCa cases are epithelial in origin, and the most common histological type is serous carcinoma (6). The most frequent subtypes are endometrial, clear cells, mucinous and undifferentiated carcinomas (5,7). Currently, only two biomarkers [cancer antigen (CA)125 and CA119] are used for the clinical diagnosis of OCa (8); however, these markers are not increased in all patients with OCa, and they can also be elevated in other cancer types (8,9). Therefore, their decreased sensitivity and specificity limit the merit of these biomarkers as screening tools and increase the requirement for novel diagnostic and prognostic markers.

Focal adhesion kinase (FAK), a non-receptor tyrosine kinase that serves a key role in the integration of signals from activated membrane receptors, the majority of which are

Correspondence to: Dr Fabio Salamanca Gómez, Medical Research Coordination, Mexican Social Security Institute, National Medical Center Century XXI, 330 Avenue Cuauhtemoc, Mexico City 04510, Mexico
E-mail: fabio.salamanca@imss.gob.mx

*Deceased

Key words: isoforms, focal adhesion kinase, biomarkers, ovarian cancer, mucinous, serous

within the integrin family (10), has been proposed as a potential marker of OCa (11-13). FAK is expressed in a wide range of human tissue and cell types, and it has been associated with the control of survival, proliferation and motility via integrin-dependent adhesion and signaling pathways (10,14). FAK consists of the following three domains: An amino-terminal band 4.1, ezrin, radixin, moesin (FERM) domain; a central kinase domain; and a C-terminal focal adhesion targeting (FAT) domain (15). The FERM domain is a non-catalytic motif that binds a number of growth factor receptors, including epidermal growth factor receptor, platelet derived growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2. FAK possesses a nuclear localization sequence and it is able to interact with nuclear proteins, including p53 (16). The kinase domain phosphorylates downstream substrates to convey cellular signals from the aforementioned receptors. The FAT domain contains two proline-rich sequences and is required for localization at the focal adhesions (17).

There are multiple isoforms of FAK, with multiple FAK transcripts resulting from alternative splicing and/or promoters. Schaller *et al* (18) identified a truncated isoform of FAK lacking the kinase domain. This truncated isoform is known as FAK-related non-kinase (FRNK) and functions as a dominant negative regulator of FAK (18). The standard transcript of FAK, lacking exons 13, 14, 16 and 31, is termed FAK⁰. Additional FAK isoforms include FAK⁺, which contains a three-amino acid insertion in the FAT sequence of exon 31. FAK⁶ contains six additional residues inserted following residue 392 (exon 14). FAK⁷ contains seven additional residues in exon 16. FAK^{+6,7} contains all insertions from the former three isoforms. Finally, FAK^{+6,7,28} (exons 13, 14 and 16), which contains 28 additional residues in the vicinity of box 6 (19,20). FAK variants are differentially expressed in various tissues at different stages of maturation and appear to differ in their phosphorylation ability (21).

Alternative splicing also alters the autophosphorylation rate of FAK, with FAK⁺ and FAK⁰ having a low autophosphorylation capacity, while FAK^{+6,7} and FAK^{+6,7,28} display increased autophosphorylation (19). A number of studies have associated FAK with oncological diseases. Additionally, Despeaux *et al* (22) determined that FAK⁶, FAK^{6,7} and FAK^{6,28} are expressed by myeloid leukemia cells and are associated with increased mortality rate of patients.

Increased expression of FAK has been detected in ovarian carcinomas and is associated with a poor prognosis (13,23). Increased levels of the active form of FAK have also been associated with the aggressiveness of the tumor (24). However, to the best of our knowledge, a comprehensive study of the expression of FAK throughout the development of different histological types of ovarian tumor has not been conducted to date; therefore, the aim of the present study was to investigate the FAK expression level in serous and mucinous cystadenoma, borderline tumor and carcinoma samples, along with healthy ovary samples. Additionally, the expression of FAK⁰, FAK²⁸ and FAK^{28,6} isoforms was determined in human OCa-derived cell lines.

Materials and methods

Tissue samples. A total of 161 archival, paraffin-embedded ovarian tissue samples were obtained in 2015 from the

Pathological Oncology Service of the Century XXI National Medical Center (CMN-SXXI), the General Hospital of Mexico and the Hospital of Gynaecology and Obstetrics No. 4 IMSS (Mexico City, Mexico), under approval of the Committee of Ethics of each hospital. The samples were obtained from patients treated in the aforementioned hospitals between January 2010 and December 2013, the samples were from postmenopausal patients prior to treatment and with definitive diagnosis of ovarian cancer. Slides (5- μ m) were obtained, the slides were deparaffinized in an oven at 60°C for 20 min, then incubated in xylene at room temperature for 15 min, and a graded series of ethanol (100, 70 and 30%) for 5 min and rinsed in H₂O. All slides were incubated with hematoxylin for 1 min at room temperature, subsequently slides were then washed with PBS solution and finally were incubated with eosin for 30 sec and evaluated with an optical microscope at x20 magnification by an experienced pathologist. Upon histopathological examination, the samples were classified as follows: 50 serous carcinoma samples; 25 serous borderline tumor samples; 25 serous cystadenoma samples; 6 mucinous carcinoma samples; 14 mucinous borderline tumor samples; 25 mucinous cystadenoma samples; and 16 healthy ovary samples. Additionally, archival, paraffin-embedded 25 tumor samples (5 cervical cancer, 10 breast cancer, 5 colon cancer and 5 prostate cancer) positive for the expression of FAK, were obtained from the Pathological Oncology Service of the CMN-SXXI in 2015, were from patients (men and women) with a definitive diagnosis of cancer, prior to treatment and without an age range and were included as positive controls. These patients were treated at the CMN-SXXI between 2010 and 2013.

Immunohistochemistry for the analysis of FAK expression.

Areas containing tumor tissue were identified in H&E-stained slides from each paraffin-embedded sample. These samples were assembled into a multi-tissue block, according to the methodology reported by Hidalgo *et al* (25). Slices (5 μ m) were cut from the multi-tissue block, placed on glass slides, deparaffinized using xylene in an oven at 60°C for 20 min, and then rehydrated in graded concentrations of ethanol (100, 70 and 30%) and rinsed in H₂O. The slides were incubated in citrate buffer (Biocare Decloaker DIVA; Biocare Medical, LLC, Paheco, CA, USA) at 90°C for 10 min for antigen retrieval, and were then washed with PBS solution. The Mouse/Rabbit Immunodetector HRB/DAB Detection kit (Bio, Sb, 0003LH Santa Barbara, CA, USA) was used for the visualization of the antibody, endogenous peroxidase was inhibited by incubation with Peroxide Immunodetector Blocker (Bio, Sb, 0003LH Santa Barbara) at room temperature for 15 min. Following washing with PBS, the slides were incubated with anti-FAK kinase domain (dilution 1:200, cat. no. GTX50666; GeneTex, Inc., Irvine, CA, USA) and anti-FAT domain (dilution 1:200, cat. no. GTX50489; GeneTex Inc.) primary antibodies for 24 h at 4°C. Following washing with PBS, tissues were incubated with Biotin Immunodetector (Bio, Sb, 0003LH) at room temperature for 20 min, followed by incubation with Label Immunodetector (Bio, Sb, 0003LH Santa Barbara, CA, USA). To detect the reaction, slides were incubated with an Immunodetector DAB Chromogen kit (Bio, Sb, 0003LH Santa Barbara, CA, USA), and then counterstained

with haematoxylin and mounted with resin, according to the manufacturer's protocol. Each sample was studied in assays conducted in triplicate.

Semi-quantitative analysis of the reaction was performed under an optical microscope at 20x magnification, according to the system described by Allred *et al* (26), which considers two criteria: The number of positive cells; and the intensity of the reaction. Visual analysis was conducted by three independent observers. A sample was considered negative when <5% cells exhibited immunostaining. Samples with low reaction intensity and 6-25% positive cells were considered low positive (+), samples with moderate intensity of reaction and 26-75% positive cells were considered intermediate positive (++), and samples with high-intensity reaction and >76% cells exhibiting immunoreaction were considered highly positive (+++). For densitometric analysis, three microphotographs were captured of each sample with an Olympus BX40 optical microscope at 20x magnification. The samples were analyzed using Image-Pro Plus ver. 5.0 software (Media Cybernetics, Inc., Rockville, MD, USA).

Cell lines. Cell lines SKOV3 and NIH-OVCAR3 were donated by Dr. Fabián Arechavaleta-Velasco and Dr. Laura Díaz-Cueto (Hospital of Gynecology and Obstetrics No. 4 IMSS, Mexico City, Mexico). TOV-112D and HeLa cell lines were purchased from American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). The human ovary cancer cell line SKOV3 was derived from the ascites fluid of a 64-year-old Caucasian female with an invasive ovarian adenocarcinoma (27). The SKOV3 cell line exhibits epithelial and adherent morphology. The NIH-OVCAR3 was derived from malignant ascites fluid from a patient with progressive ovarian adenocarcinoma and grown as a cobblestone-like monolayer with multilayered foci (28). The TOV-112D cell line was derived from a primary malignant ovarian adenocarcinoma grade 3, stage III (29). The human cervical cancer-derived HeLa cell line was included as a positive control for the expression of FAK (30). The SKOV3, NIH-OVCAR3, TOV-112D and HeLa cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) and 0.1 mg/ml streptomycin.

Western blot analysis. SKOV3, NIH-OVCAR3 and TOV-112D cells were resuspended in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1% NP40; and 0.25% sodium deoxycholate) containing Complete Protease Inhibitors (Roche Applied Science, Mannheim, Germany). Protein concentration was determined using a DC Protein Assay kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), according to manufacturer's protocol. A total of 30 µg protein was resolved by 10% SDS-PAGE and transferred onto polyvinylidene fluoride membranes (EMD Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were incubated with the anti-FAK kinase domain (cat. no. GTX50666 GeneTex Inc., Irvine, CA, USA) diluted at 1:1,000 or anti-GAPDH (cat. no. PA1-987 Zymed; Thermo Fisher Scientific, Inc.) diluted at 1:20,000 as a control, at 4°C overnight. Membranes were then washed and incubated with the appropriate goat anti-rabbit IgG secondary antibody (horseradish peroxidase-conjugated) diluted at 1:5,000, at

room temperature for 40 min (cat. no. A27036 Zymed; Thermo Fisher Scientific, Inc.). Proteins were detected by chemiluminescence using the Amersham ECL plus Western Blotting Detection System (GE Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA, USA).

RNA extraction and reverse transcription-semi-quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) of alternative transcripts. SKOV3, NIH-OVCAR3 and TOV-112D cells were trypsinized, centrifuged and incubated with 1 ml TRIzol® reagent (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific, Inc.) to obtain the RNA, according to manufacturer's protocols. Following centrifugation at 12,000 x g for 10 min at 4°C, the aqueous phase was recovered, and 500 µl isopropanol was added. Subsequently, an additional centrifugation at 12,000 x g for 10 min at 4°C was performed, and then the pellet was obtained, washed in 70% ethanol and homogenized. Following centrifugation at 7,500 x g for 5 min at 4°C, the pellets were dissolved in 50 µl H₂O. Subsequently, oligoDT cDNA was synthesized with a Promega Reverse Transcription system GoScript™ (cat. no. A5000; Promega Corporation, Madison, WI, USA). A total of 1 µg RNA was incubated at 70°C for 5 min in the presence of 0.5 mg oligoDT, followed by incubation at 4°C for 5 min. Finally, Master mix (Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor and GoScript™ Reverse Transcriptase) was added, according to the manufacturer's protocols, and incubated at 25°C for 5 min and then at 42°C for 30 min, cDNA was stored at -80°C until further use. For amplification of FAK isoforms, the PCR primers reported by Corsi *et al* (21) were employed (primer M-R2, M-F2, M-F3 and M-F4). These primers were designed to amplify the region between exons 12 and 17. The oligonucleotides used for the amplification of the region comprising exons 12 to 17 were: M-R2, Forward, 5'-AGCGAAAAGCAAGGCATGCGG-3', and M-F2 reverse, 5'-CTGACGCATTGTAAAGGCTTC-3' for the isoforma FAK^{28,6}. For amplification of the remaining isoforms, the R2 reverse oligonucleotide was used in combination with different forward primers as follows: M-F3 reverse, 5'-TCTCTG TGTCAGAAACAGATGATT-3' for the isoform FAK⁰ without exons 13 and 14; and M-F4 reverse 5'-CTCCTTCTACGG AAACAGATGATT-3' for the isoform FAK⁸ lacking exon 14. For PCR reactions, 1.25 U GoTaq® Flexi DNA Polymerase (cat. no. M8295 Promega Corporation, Madison, WI, USA) were employed under the following conditions: 95°C for 2 min, then 30 cycles at 95°C for 30 sec, 57°C for 30 sec and 68°C for 30 sec, followed by a final cycle of 68°C for 2 min. Amplification of the ne cycle at 957. For PCR reactions 1.25 U GoTaq follows: 5'-TCGGGTCAGAAGGATTCCTATG-3', and reverse 5'-GGT CTCAAACATGATCTGGG-3' oligonucleotides under the conditions aforementioned for the FAK isoforms. PCR products were visualized on 1% agarose gels stained with ethidium bromide. Band intensities were visualized using the Stratagene Eagle Eye II Gel Imaging System and software EagleSight v3.22 (Stratagene, La Jolla, CA, USA).

Statistical analysis. Data are reported as the means ± standard deviations of three independent experiments. Data from densitometric evaluation were analyzed using one-way analysis of variance test followed by Tukey analysis and Duncan test to compare the level of expression between the experimental groups. In order to compare data from the semi-quantitative

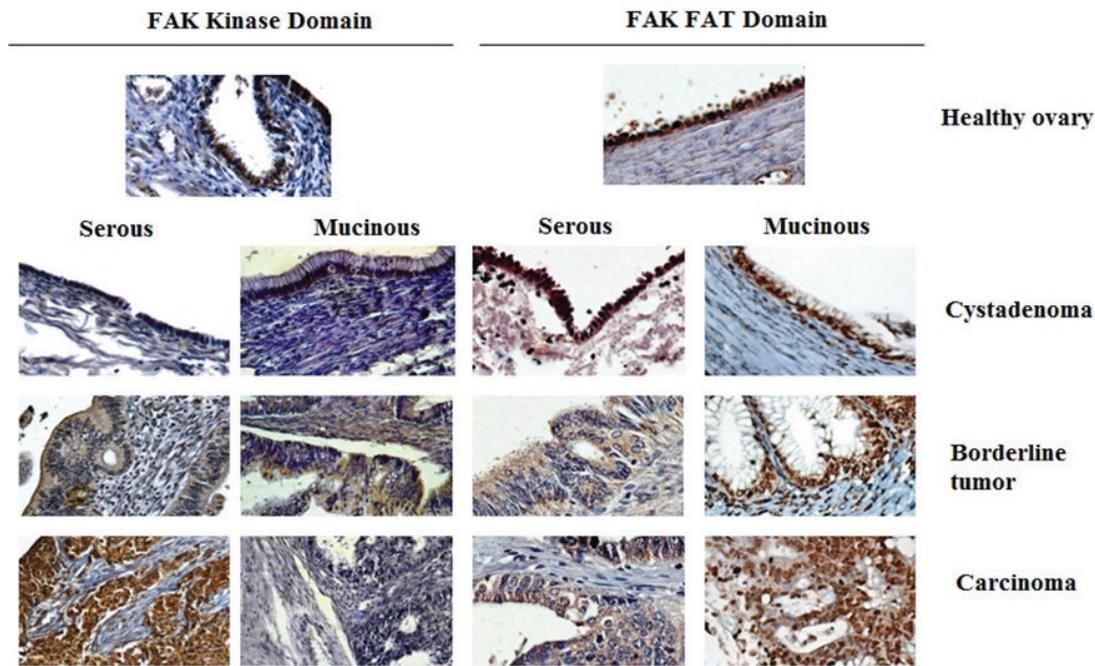


Figure 1. Expression of FAK in ovarian tumor and healthy ovary samples. Expression of FAK kinase and FAT domains was evaluated with immunohistochemistry in serous and mucinous cystadenoma, borderline tumor and ovarian carcinoma samples. A group of healthy ovary samples was included as negative controls. FAT, focal adhesion targeting; FAK, focal adhesion kinase.

analysis, samples showing low, moderate and high expression from each experimental group were grouped together and considered as the overall positive expression group. Then differences among the experimental groups were evaluated using the Kruskal-Wallis test and Bonferroni correction for pairwise comparisons, Allred *et al* (26) and Pizon *et al* (31). $P < 0.05$ was considered to indicate a statistically significant difference.

Results

Expression of the kinase and FAT domains of FAK in OCa. Expression of FAK kinase and FAT domains was analyzed in healthy ovary, cystadenoma, borderline tumor and ovarian carcinoma tissue samples, which were assembled into a multi-tissue block by immunohistochemistry. The expression of FAK kinase domain was observed in 14 out of 16 samples of healthy ovaries, but immunostaining was low or moderate, with none of the samples exhibiting a high positive expression (Table I). A similar pattern of expression was detected in serous cystadenoma samples, with 56% of samples exhibiting low or moderate expression and again, with no samples exhibiting a high positive expression. In contrast, all borderline serous tumor samples were positive for expression of the kinase domain, but only one exhibited high positivity. Similarly, all serous carcinoma samples were positive for the expression of the FAK kinase domain, but 74% of these exhibited high positive expression; additionally, no samples exhibited low positive staining (Table I). The proportion of samples exhibiting expression of the kinase domain in serous cystadenoma, borderline tumor and carcinoma samples was significantly increased, compared with healthy ovary samples ($P < 0.05$; Table I) and a significant difference

between borderline tumors and carcinomas was observed ($P < 0.05$). The expression of the FAK kinase domain was exclusively cytoplasmic in all positive serous samples (Fig. 1). In contrast, none of the mucinous tumor groups exhibited a significantly increased proportion of positive expression of the kinase domain, compared with the healthy ovary samples (Table I). However, it is notable that the staining detected in positive samples was also cytoplasmic (Fig. 1). In agreement with the semi-quantitative analysis, densitometric evaluation demonstrated a significantly increased expression of FAK kinase in borderline tumor and carcinoma samples, compared with healthy ovary samples ($P < 0.05$; Fig. 2). In contrast, no significant difference was detected in mucinous lesions (Fig. 2A).

However, the expression of the FAT domain was observed in 85% of healthy ovary samples (Fig. 1). Additionally, a high positive expression was detected in 11/16 healthy ovary samples (Table II). There were 88% of serous cystadenoma samples that exhibited positive expression of the FAT domain, and the difference between this group and the healthy ovary samples was statistically significant ($P < 0.05$; Table II). All serous borderline tumor samples were positive for expression of the FAT domain, exhibiting low-to-high levels of expression (Table II). Similarly, all serous borderline tumor samples analyzed expressed the FAT domain, with 68% of samples exhibiting moderate-to-high expression (Table II). The proportion of carcinoma samples expressing the FAT domain was significantly increased compared with the serous borderline samples ($P < 0.01$; Table II). For the mucinous tumor samples, it was observed that 68% of cystadenoma samples expressed low-to-moderate levels of the FAT domain, while all borderline and carcinoma samples demonstrated positive staining, with levels of positivity ranging from low to high (Table II).

Table I. Expression of focal adhesion kinase kinase domain in healthy ovary, serous and mucinous samples.

Histological type	No. of cases	Negative expression (-)	Low expression (+)	Moderate expression (++)	High expression (+++)	P-value
Healthy ovary samples	16	2	6	8	0	
Serous tumor types						
Cystadenoma	25	11	10	4	0	<0.05 ^a
Borderline	25	0	5	19	1	<0.05 ^{a,b}
Carcinoma	50	0	0	13	37	<0.05 ^{a-c}
Mucinous tumor types						
Cystadenoma	25	7	8	10	0	NS ^a
Borderline	14	2	4	6	2	NS ^{a,b}
Carcinoma	6	1	3	1	1	NS ^{a-c}

^avs. normal ovaries; ^bvs. cystadenoma; ^cvs. borderline. P-values were calculated using the Kruskal-Wallis Test. NS, not significant.

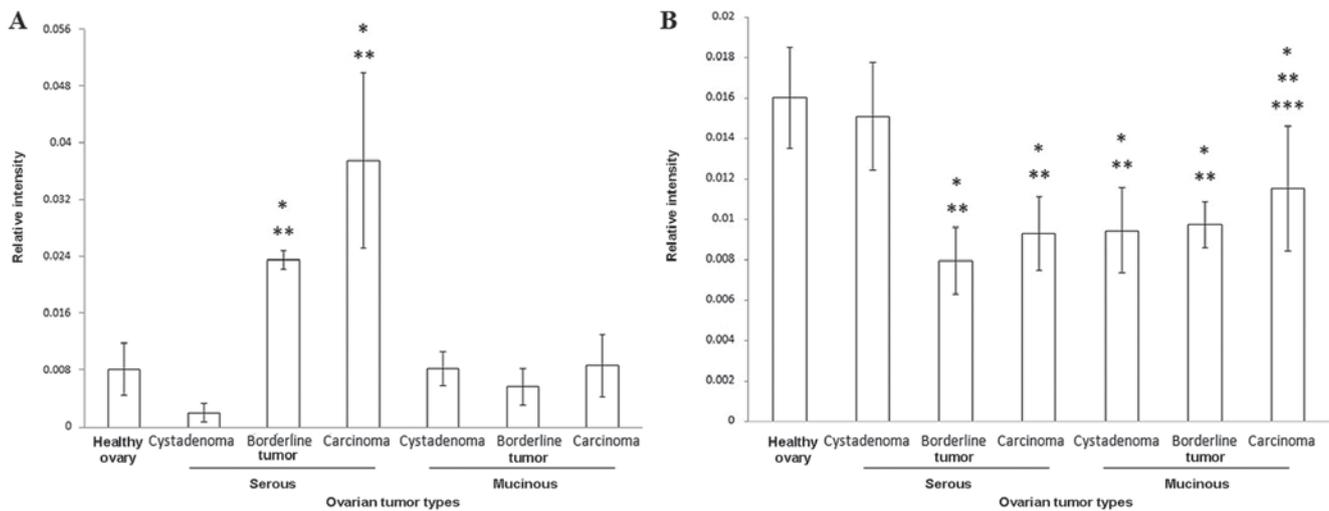


Figure 2. Densitometric analysis of FAK expression in ovarian cancer and healthy ovary samples. Following immunohistochemistry staining, three microphotographs were captured for each serous and mucinous cystadenoma, borderline tumor and ovarian carcinoma samples. Healthy ovary samples were included as negative controls. The samples were analyzed as described in the Materials and methods section. Relative intensity of (A) FAK kinase and (B) FAT domain immunostaining are depicted. Error bars represent the standard deviation of the mean. Differences were calculated using the analysis of variance test, considering a value of $P < 0.05$ as significant difference. * $P < 0.05$, compared with healthy ovary samples; ** $P < 0.05$, compared with cystadenoma samples; *** $P < 0.05$, compared with borderline serous tumor samples. FAT, focal adhesion targeting; FAK, focal adhesion kinase.

Unlike the kinase domain, the FAT domain exhibited a nuclear and cytoplasmic localization (Fig. 1). Densitometric analysis demonstrated that the expression of FAT was significantly increased in healthy ovary samples, compared with serous and mucinous samples ($P < 0.05$; Fig. 2B).

Expression of FAK kinase and alternative transcripts in OCa cell lines. The present results demonstrated the expression of FAK in OCa biopsies. In order to evaluate whether FAK is expressed in OCa-derived cell lines, the expression of FAK kinase domain in SKOV3, NIH-OVCAR3 and TOV-112D cells was evaluated with western blotting, with HeLa cells included as a FAK expression control. Incubation with the anti-FAK kinase domain antibody demonstrated the presence of a band of a molecular weight similar to that observed in the positive control. The present results indicated that all three cell

lines tested expressed FAK (Fig. 3A). Additionally, to address whether OCa cells expressing different FAK isoforms, the three cell lines were analyzed with RT-qPCR. As depicted in Fig. 3B, three different transcripts were detected. A 300-bp fragment was observed in all cell lines, this transcript corresponds to FAK^{28,6} isoform. Amplification of the FAK⁰ isoform was also detected in all cell lines. Finally, the FAK²⁸ fragment was detected in all cell lines. However, SKOV3 cells demonstrated a very weak expression of FAK⁰ compared with that observed in NIH-OVCAR3 and TOV-112D cells (Fig. 3B).

Discussion

FAK has been considered an important kinase for the development of tumor types due to it participating in the processes of angiogenesis, proliferation and cell migration (14). Although

Table II. Expression of focal adhesion kinase focal adhesion targeting domain in healthy ovary, serous and mucinous samples.

Histological type	No. of cases	Negative expression (-)	Low expression (+)	Moderate expression (++)	High expression (+++)	P-value
Healthy ovary samples	16	1	2	2	11	
Serous tumor types						
Cystadenoma	25	3	7	9	6	<0.05 ^a
Borderline	25	0	8	14	3	<0.05 ^a
Carcinoma	50	0	10	18	22	NS ^b
						NS ^a
						0.02 ^b
						0.01 ^c
Mucinous tumor types						
Cystadenoma	25	8	11	6	0	<0.05 ^a
Borderline	14	0	3	8	3	NS ^a
Carcinoma	6	0	1	3	2	<0.05 ^b
						NS ^a
						<0.05 ^b
						NS ^c

^avs. normal ovaries; ^bvs. cystadenoma; ^cvs. borderline. P-values were calculated using the Kruskal-Wallis Test. NS, not significant.

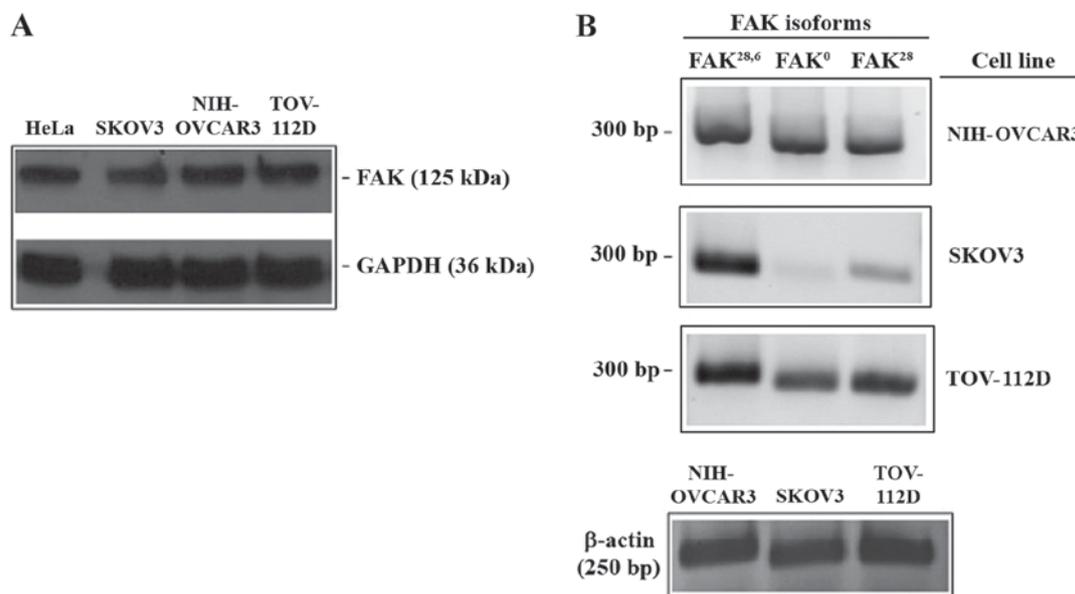


Figure 3. Expression of FAK kinase and alternative transcripts in ovarian cancer cell lines. (A) Expression of FAK was assessed in SKOV3, NIH-OVCAR3 and TOV-112D ovarian cancer-derived cells with western blotting using an anti-FAK kinase domain antibody. HeLa cells were included as a FAK expression control. Detection of GAPDH was used as loading control. (B) Expression of FAK^{28,6}, FAK⁰, and FAK²⁸ alternative transcripts were investigated in SKOV3, NIH-OVCAR3 and TOV-112D cells with reverse transcription-semi-quantitative polymerase chain reaction. Expression of the β -actin gene was included as an internal control. Amplified fragments from each cell line were analyzed in separate agarose gels. FAK, focal adhesion kinase.

numerous studies have examined the functions of FAK (15), there are, to the best of our knowledge, limited data evaluating the expression of FAK isoforms in OCa (13).

In the present study, the expression of FAK in serous and mucinous ovarian tumor samples was evaluated with two antibodies (anti-FAK kinase domain and anti-FAK FAT domain). It was observed that the expression of FAK, as demonstrated by positive immunostaining of the kinase domain, was increased

in more advanced tumor samples. This observation is consistent with data reported by other research groups, in which FAK increases in advanced stages of serous tumor cases (10,11,22-24). In contrast, when the expression of FAT domain was analyzed, an increased level of expression was observed in healthy ovary samples compared with carcinoma samples. Sood *et al* (13) determined that the endogenous inhibitor FRNK negatively regulates the phosphorylation of FAK. In the present study, it

was observed that kinase domain is increased, but FAT domain is reduced, in carcinoma samples; it has previously been demonstrated that the FAK COOH-terminal region, containing the FAT domain, reduces the tyrosine phosphorylation of FAK, inducing apoptosis and loss of adhesion of cancer cells (32). Thus, our observation of a reduction of FAT domain expression in ovarian cancer may be in line with the hypothesis that FAT is negative regulator of FAK activity.

FAK is a cytoplasmic protein, and it is activated and localized in focal adhesions (33). Accordingly, a cytoplasmic expression of FAK kinase domain was observed in serous and mucinous tumor samples; however, the FAT domain was located in the cytoplasm of serous tumor samples and also in the nucleus of mucinous tumor samples. Previous studies demonstrated that nuclear FAK has the ability to modify gene expression (16), providing kinase-independent survival signals to cells; additionally, it is associated with poor prognosis in colorectal cancer (34). The result of the present study indicated that the FRNK isoform is localized in the nucleus of OCa cells.

In addition, the present study determined the expression of alternative FAK transcripts in OCa, which may originate different isoforms of the protein. A limitation of our study was that the evaluation of the FAK isoforms was not carried out simultaneously with that of an internal control. Although this is not standard practice, the expression of β -actin was demonstrated in samples from the same RNA used for the study of the FAK isoforms, but in an independent reaction. This might cause variability among gels, however, all samples showed the expression of the internal control gene (β -actin), and in addition they demonstrated different levels of expression for the three isoforms analyzed. It was observed that all cell lines tested exhibited a high expression of FAK^{28,6}. In an extensive molecular analysis, Corsi *et al* (21) determined that the expression of FAK 28 and 6 boxes is strongly conserved among vertebrates, indicating an important function for the FAK^{28,6} isoform. Notably, it has been proposed that the inclusion of box 6 is associated with increased autophosphorylation of FAK (35), indicating that in OCa, this may produce hyperactivation of multiple downstream signaling pathways. This protein has been proposed as a prognostic marker and as a potential therapeutic target in numerous types of tumor; however, novel evidence of FAK isoforms opens up new questions and perspectives in the treatment of OCa.

Acknowledgements

The authors would like to thank to Dr. Fabián Jesús Arechavaleta-Velasco and Dr. Laura Díaz-Cueto from the Hospital of Gynecology and Obstetrics No. 4 IMSS, Mexico City, Mexico for their academic support. Additionally, the authors would like to thank Cecilia Aguilar-Zacarias from the department of Molecular Biology and Biotechnology, Institute of Biomedical Research, National University of Mexico, Mexico City, for their technical assistance.

Funding

The present study was supported by a grant from IMSS (grant no. R-2011-785-066). The present study was performed in partial fulfillment of the requirements of the Programa de

Doctorado en Ciencias Biológicas of Manuel Nolasco-Quiroga at the Universidad Nacional Autónoma de México, with doctoral fellowships from CONACyT (Reg: 211158), COMECyT (Grant no. 15BEPD0036-II), and IMSS (Grant no. 087-2013). The authors would like to thank Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, Mexico, for academic support.

Availability of data and materials

The datasets used during the present study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' contributions

MNQ performed the experiments, analyzed and interpreted data, and wrote the manuscript. MRD, JM, RGA, MJLI, PPS, IAC, GVG performed RT-qPCR analysis of cell lines. MNQ, MRD, MJLI, AIC, PPS constructed tissue microarrays, determined FAK on microarrays and evaluated cellular stains. LRZ designed the experiments using cell lines, analyzed and interpreted data. DAA made substantial contributions to the conception of the study. FSG designed the experiments on tissue samples and wrote the manuscript.

Ethics approval and consent to participate

Ethical approval was awarded collectively by Committee of Ethics of the Century XXI National Medical Center, the General Hospital of Mexico, and the Hospital of Gynecology and Obstetrics No. 4 IMSS (approval no. R-2011-785-066) (Mexico City, Mexico).

Patients consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Coward JI, Middleton K and Murphy F: New perspectives on targeted therapy in ovarian cancer. *Int J Womens Health* 7: 189-203, 2015.
2. Iyoke CA and Ugwu GO: Burden of gynaecological cancers in developing countries. *World J Obstet Gynecol* 2: 1-7, 2013.
3. Rauh-Hain JA, Krivak TC, Del Carmen MG and Olawaiye AB: Ovarian cancer screening and early detection in the general population. *Rev Obstet Gynecol* 4: 15-21, 2011.
4. Goff B: Symptoms associated with ovarian cancer. *Clin Obstet Gynecol* 55: 36-42, 2012.
5. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y, Ohishi Y, Kobayashi H, Hirakawa T and Nakano H: Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc* 36: 9-17, 2003.
6. Leong HS, Galletta L, Etemadmoghadam D, George J: Australian Ovarian Cancer Study, Köbel M, Ramus SJ and Bowtell D: Efficient molecular subtype classification of high-grade serous ovarian cancer. *J Pathol* 236: 272-277, 2015.
7. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, McKinney S, Mehl E, Palmer C, Leung S, Bowen NJ, Ionescu DN, Rajput A, *et al*: Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: Implications for biomarker studies. *PLoS Med* 5: e232, 2008.
8. Canney PA, Moore M, Wilkinson PM and James RD: Ovarian cancer antigen CA125: A prospective clinical assessment of its role as a tumour marker. *Br J Cancer* 50: 765-769, 1984.

9. Pepin K, Carmen MD, Brown A and Dizon DS: CA 125 and epithelial ovarian cancer: Role in screening, diagnosis, and surveillance. *Am J Hematol Oncol* 10: 22-29, 2014.
10. Mitra SK and Schlaepfer DD: Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. *Curr Opin Cell Biol* 18: 516-523, 2006.
11. Judson PL, He X, Cance WG and Van Le L: Overexpression of focal adhesion kinase, a protein tyrosine kinase, in ovarian carcinoma. *Cancer* 86: 1551-1556, 1999.
12. Li M, Hong LI, Liao M and Guo G: Expression and clinical significance of focal adhesion kinase and adrenomedullin in epithelial ovarian cancer. *Oncol Lett* 10: 1003-1007, 2015.
13. Sood AK, Coffin JE, Schneider GB, Fletcher MS, DeYoung BR, Gruman LM, Gershenson DM, Schaller MD and Hendrix MJ: Biological significance of focal adhesion kinase in ovarian cancer: Role in migration and invasion. *Am J Pathol* 165: 1087-1095, 2004.
14. Zhao X and Guan JL: Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 610-615, 2011.
15. Hall JE, Fu W and Schaller MD: Focal adhesion kinase : Exploring Fak structure to gain insight into function. *Int Rev Cell Mol Biol* 288: 185-225, 2011.
16. Lim ST: Nuclear FAK: A new mode of gene regulation from cellular adhesions. *Mol Cells* 36: 1-6, 2013.
17. Dixon RD, Chen Y, Ding F, Khare SD, Prutzman KC, Schaller MD, Campbell SL and Dokholyan NV: New insights into FAK signaling and localization based on detection of a FAT domain folding intermediate. *Structure* 12: 2161-2171, 2004.
18. Schaller MD, Borgman CA and Parsons JT: Autonomous expression of a noncatalytic domain of the focal adhesion-associated protein tyrosine kinase pp125FAK. *Mol Cell Biol* 13: 785-791, 1993.
19. Toutant M, Costa A, Studler J, Kadaré G, Carnaud M and Girault JA: Alternative splicing controls the mechanisms of FAK autophosphorylation. *Mol Cell Biol* 22: 7731-7743, 2002.
20. Contestabile A, Bonanomi D, Burgaya F, Girault JA and Valtorta F: Localization of focal adhesion kinase isoforms in cells of the central nervous system. *Int J Dev Neurosci* 21: 83-93, 2003.
21. Corsi JM, Rouer E, Girault JA and Enslin H: Organization and post-transcriptional processing of focal adhesion kinase gene. *BMC Genomics* 7: 198, 2006.
22. Despeaux M, Chicanne G, Rouer E, De Toni-Costes F, Bertrand J, Mansat-De Mas V, Vergnolle N, Eaves C, Payrastra B, Girault JA and Racaud-Sultan C: Focal adhesion kinase splice variants maintain primitive acute myeloid leukemia cells through altered Wnt signaling. *Stem Cells* 30: 1597-1610, 2012.
23. Grisarú-Granovsky S, Salah Z, Maoz M, Pruss D, Beller U and Bar-Shavit R: Differential expression of protease activated receptor 1 (Par1) and pY397FAK in benign and malignant human ovarian tissue samples. *Int J Cancer* 113: 372-378, 2005.
24. Lark AL, Livasy CA, Dressler L, Moore DT, Millikan RC, Geradts J, Iacocca M, Cowan D, Little D, Craven RJ and Cance W: High focal adhesion kinase expression in invasive breast carcinomas is associated with an aggressive phenotype. *Mod Pathol* 18: 1289-1294, 2005.
25. Hidalgo A, Piña P, Guerrero G, Lazos M and Salcedo M: A simple method for the construction of small format tissue arrays. *J Clin Pathol* 56: 144-146, 2003.
26. Allred DC, Harvey JM, Berardo M and Clark GM: Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol* 11: 155-168, 1998.
27. Fogh J: Human tumor cells in vitro. Plenum Press New York: pp115-141, 1975
28. Hamilton TC, Young RC, Mckoy WM, Grotzinger KR, Green JA, Chu EW, Whang-Peng J, Rogan AM, Green WR and Ozols RF: Characterization of a human ovarian carcinoma cell line (NIH:OVCA-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Res* 43: 5379-5389, 1983.
29. Provencher DM, Lounis H, Champoux L, Tétrault M, Manderson EN, Wang JC, Eydoux P, Savoie R, Tonin PN and Mes-Masson AM: Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36: 357-361, 2000.
30. McCormack SJ, Brazinski SE, Moore JL Jr, Werness BA and Goldstein DJ: Activation of the focal adhesion kinase signal transduction pathway in cervical carcinoma cell lines and human genital epithelial cells immortalized with human papillomavirus type 18. *Oncogene* 15: 265-274, 1997.
31. Pizon M, Schott DS, Pachmann U and Pachmann K: B7-H3 on circulating epithelial tumor cells correlates with the proliferation marker, Ki-67, and may be associated with the aggressiveness of tumors in breast cancer patients. *Int J Oncol* 53: 2289-2299, 2018.
32. Xu LH, Yang X, Craven RJ and Cance WG: The COOH-terminal domain of the focal adhesion kinase induces loss of adhesion and cell death in human tumor cells. *Cell Growth Differ* 9: 999-1005, 1998.
33. Parsons JT: Focal adhesion kinase: The first ten years. *J Cell Sci* 116: 1409-1416, 2003.
34. Albasri A, Fadhil W, Scholefield JH, Durrant LG and Ilyas M: Nuclear expression of phosphorylated focal adhesion kinase is associated with poor prognosis in human colorectal cancer. *Anticancer Res* 34: 3969-3974, 2014.
35. Toutant M, Studler JM, Burgaya F, Costa A, Ezan P, Gelman M and Girault JA: Autophosphorylation of Tyr397 and its phosphorylation by Src-family kinases are altered in focal-adhesion-kinase neuronal isoforms. *Biochem J* 348: 119-128, 2000.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0) License.