



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

“Efectos del resveratrol sobre la expresión de progranulina en líneas celulares derivadas de tumores ováricos y células provenientes de líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario”.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:

MARIA FERNANDA MAYORGA VERGARA

ASESOR(A) DE TESIS:

DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO

CO-ASESOR(A) DE TESIS:

M. en C. MARÍA LUCERO PANIAGUA GARCÍA

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Efectos del resveratrol sobre la expresión de progranulina en líneas celulares derivadas de tumores ováricos y células provenientes de líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario

Que presenta la pasante: **María Fernanda Mayorga Vergara**
Con número de cuenta: **306262560** para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de junio de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.J.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	M. en C. María Lucero Paniagua García	
1er. SUPLENTE	Q.J.B. Nydia Berenice González Angeles	
2do. SUPLENTE	M. en C. Gabriel Arturo Lima Villeda	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/javg

LUGAR EN DONDE SE REALIZÓ EL ESTUDIO

Unidad de investigación Médica en Medicina Reproductiva.

UMAE Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4. Luis Castelazo Ayala.

Instituto Mexicano del Seguro Social.

FINANCIAMIENTO

Este proyecto fue financiado por el Fondo de Investigación en Salud de la

Coordinación de Investigación en Salud. Instituto Mexicano del Seguro Social.

(FIS/IMSS/PROT/G14/1301).

AGRADECIMIENTOS

Quiero dedicar este trabajo en memoria de mi abuelita María del Socorro Villalpando Ávila (q.e.p.d.) porque sus historias fueron mi herencia y a través de mi se cumple lo que hubiera sido su más grande sueño, ser química.

Te extraño siempre.

A Dios.

A mis padres, Alvaro José Mayorga Mayorga y María del Carmen Vergara Villalpando por darme el mayor regalo que se le puede dar a una hija “creer en ella” por su paciencia, amor y apoyo incondicional los amo.

A mi asesora, Dra. Laura Elena Díaz Cueto por su tiempo, paciencia, amabilidad y apoyo invaluable.

No te rindas, por favor no cedas,
Aunque el frío quemé,
Aunque el miedo muerda,
Aunque el sol se esconda y se calle el viento,
Aún hay fuego en tu alma,
Aún hay vida en tus sueños...

-Mario Benedetti

ABREVIATURAS

Ácido bicinconínico	BCA
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido lisofosfatídico	LPA
Ácido ribonucleico mensajero	mRNA
Antígeno de cáncer 125	CA-125
Antígeno de mucina	MUCI
Buffer salino de fosfatos	PBS
Buffer salino-tris	TBS
Buffer salino-tris + Tween 20	TBST
Carcinoma de células claras	CCC
Carcinoma intraepitelial tubárico seroso	STIC
Carcinoma seroso de alto grado	HGSC
Carcinoma seroso de bajo grado	LGSC
Dimetilsulfóxido	DMSO
Dominio de interacción rico en AT de la proteína A1	ARID1A
Epitelio de superficie ovárica	ESO
Epitelio-mesénquima-epitelio	EMT-MET
Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	ELISA
Enzima ciclooxigenasa	COX2
Factor de crecimiento epidermal	EGF
Factor de crecimiento de hepatocitos	HGF
Factor de crecimiento tumoral- β	TGF- β
Factor de necrosis tumoral- α	TNF- α
Factor de crecimiento derivado de células PC	PCDGF
Factor de crecimiento vascular endotelial	VEGF
Factor inducible de hipoxia 1- α	HIF-1 α
Federación Internacional de ginecología y obstetricia	FIGO
Genes supresores "Breast cancer type1-2 "	BRCA 1-2
Glicoproteína 88 KDa	GP-88
Hormona folículo estimulante	FSH
Hormona liberadora de gonadotropina	GnRh
Hormona luteinizante	LH
Matriz extracelular	ECM
Medio Dulbecco's modified Eagle's	DMEM
Medio molecular cellular and developmental biology	MCDB
Medio Roswell Park Memorial Institute	RPMI
Organización Mundial de la Salud	OMS
Precursor de granulinas y epitelinas	GEP
Proepitelina	PEPI
Progranulina	PGNR

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	7
A) EL OVARIO	7
1.- Anatomía del ovario	7
2.- Histología del ovario	9
3.- Funciones del ovario	9
4.- Epitelio de superficie ovárica (ESO)	9
B) CARCINOMA EPITELIAL DE OVARIO	12
1.- Datos epidemiológicos del cáncer de ovario	12
2.- Etiología y factores de riesgo del cáncer epitelial de ovario	13
3.- Clasificación del cáncer epitelial de ovario	16
3.1.- Carcinoma de ovario de tipo seroso	16
3.2.- Carcinoma de ovario de tipo endometroide	17
3.3.- Carcinoma de ovario de células claras	18
3.4.- Carcinoma de ovario de tipo mucinoso	18
C) ASCITIS EN CÁNCER DE OVARIO	18
D) TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE OVARIO	19
1.- El Resveratrol como una alternativa de tratamiento para cáncer	20
E) PROGRANULINA UN NUEVO FACTOR DE CRECIMIENTO	21
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
III. OBJETIVOS	25
IV. HIPÓTESIS	25
V. MATERIAL Y MÉTODOS	26
VI. RESULTADOS	32
VII. DISCUSIÓN	41
VIII. CONCLUSIONES	45
IX. PERSPECTIVAS	46
X. BIBLIOGRAFÍA	47

I. INTRODUCCIÓN

A) EL OVARIO

1.- Anatomía del ovario

Los ovarios son las gónadas femeninas los cuales son órganos pares que se encuentran situados en la pelvis. Están localizados hacia adelante del recto y en forma lateral al mismo. En mujeres nulíparas los ovarios presentan un color blanco rosado con forma ovoide y superficie irregular por el desarrollo de los folículos, miden aproximadamente en centímetros de 2.5 a 4.5 de largo, 2 de ancho y de 0.5 a 1 de espesor. Su tamaño varía de acuerdo con la edad y etapa reproductiva en la que se encuentra la mujer. Las variaciones en la dimensión son resultado de la producción endógena de hormonas, que es diferente con la edad y en cada ciclo menstrual. En la mujer post-menopáusica el tamaño disminuye llegando a medir un cuarto del tamaño de los ovarios de una mujer en etapa fértil (1). Los ovarios están fijos a la cavidad pélvica por la acción de cuatro ligamentos, uno de ellos lo fija a la pared lumbo-pelviana y los tres restantes a otros órganos genitales internos y son los siguientes: 1) el ligamento suspensorio del ovario, también llamado infundíbulo-pélvico es el medio de fijación más importante del ovario, el cual está formado por fibras conjuntivomusculares, los vasos principales y una envoltura peritoneal que lo fija a la fosa ilíaca y al mismo tiempo a la trompa uterina, 2) el mesosálpinx se extiende desde el borde mesovárico, al infundíbulo de la trompa uterina, asegurando un contacto entre la trompa uterina y el ovario, este es un ligamento de coaptación y no de sostén, 3) el ligamento propio del ovario (útero-ovárico) asegura la orientación del ovario, une el borde anterior del ovario con el ángulo del útero, así este ligamento se inserta por detrás y por encima de la trompa uterina al ovario y finalmente 4) el mesovario está formado por la hoja peritoneal posterior del ligamento ancho, con el cual une al ovario (1) (Figura 1).

2.- Histología del ovario

El ovario está formado por dos regiones, la medular y la cortical, las cuales se pueden observar en un corte sagital de este órgano (Figura 1). La región medular o médula, es la región situada en el centro del ovario y está formada por tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios. La región cortical o corteza, está ubicada en la periferia del ovario y por lo tanto rodea a la médula. La corteza contiene a

los folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo y un estroma que rodea a los folículos en donde se encuentran células musculares lisas dispersas. Directamente sobre la corteza se encuentra la túnica albugínea, una cápsula de tejido conectivo denso irregular cubierta por una capa de mesotelio simple, el cual es conocido como epitelio de la superficie ovárica (ESO) (Figura 1) (2).

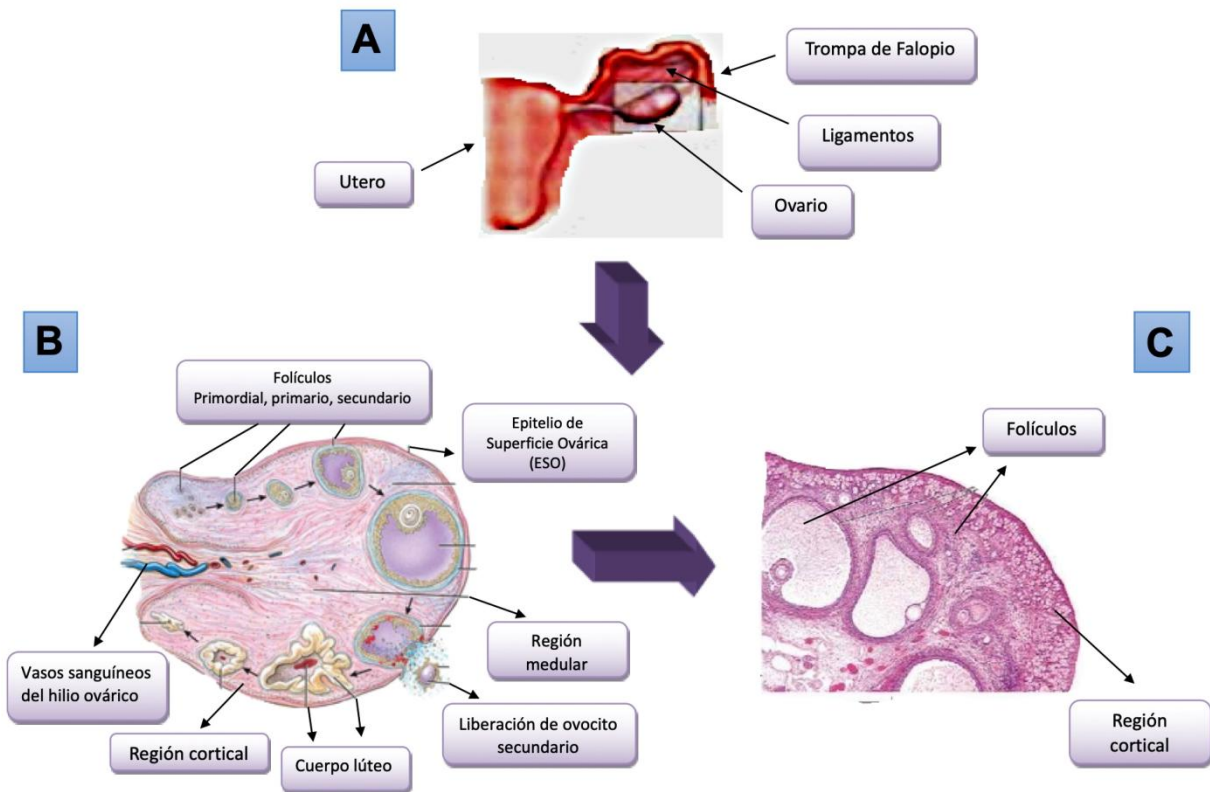


Figura 1. Forma anatómica del ovario y su relación con el útero y la trompa de falopio (A). Corte sagital del ovario, en donde se identifican el Epitelio de Superficie Ovárica (ESO), las regiones cortical y medular, la arteria y vena en el hilio ovárico, los folículos primordial, primario y secundario, la liberación del ovocito secundario (ovulación) y la formación del cuerpo lúteo después de ocurrir la ovulación (B). Corte histológico del ovario, en donde se muestra la región cortical y los folículos primordial, primario y secundario (C). Tomada y modificada de Latarjet, M y cols. 2008 (1).

3.- Funciones del ovario

Los ovarios tienen dos funciones fundamentales. La primera de ellas es la gametogénesis, que consiste en la producción de gametos femeninos u óvulos los cuales están aptos para ser fertilizados. La segunda función, también llamada función endócrina, es la secreción de hormonas esteroideas: estrógenos y progesterona. Ambas hormonas son necesarias para preparar el tracto reproductor femenino para la fertilización y el mantenimiento del embarazo (3).

Desde el comienzo de la pubertad y hasta la menopausia, el ovario produce una serie de secreciones hormonales cíclicas que mediante su acción sobre varios órganos del cuerpo femenino, darán lugar al ciclo menstrual. El ciclo menstrual, se considera un conjunto de cambios hormonales asociados a la maduración de un folículo hasta producir el óvulo. Este ciclo dura alrededor de 28 días y consta de dos fases. La fase preovulatoria o folicular que abarca los primeros 14 días del ciclo y en ella se produce el crecimiento y maduración de un folículo, inicia desde el primer día de la menstruación (descamación del endometrio que se manifiesta como hemorragia) hasta el día de la ovulación. Posterior a la ovulación se encuentra la fase luteínica o lútea, esta fase termina el día antes del primer día del ciclo siguiente y en ella el endometrio es preparado para permitir la implantación del embrión en caso de haber ocurrido fecundación. Si no hay embarazo, se produce la descamación del endometrio. La regulación del ciclo menstrual está dada por la integración de señales estimuladoras e inhibitoras dentro de circuito denominado eje hipotálamo-hipófisis-ovario encargado del control de la función ovárica que es llevado a cabo principalmente por las hormonas gonadotrópicas hipofisarias que incluyen a la Hormona Folículo Estimulante (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) (4).

4.- Epitelio de superficie ovárica (ESO)

El epitelio de superficie ovárica (ESO) surge en una etapa temprana del desarrollo embrionario a partir del epitelio de origen mesodérmico que recubre al ovario y está constituido por una capa simple de células que varían desde el epitelio escamoso al epitelio cuboidal. El epitelio celómico del cual proviene o deriva el ESO durante el desarrollo produce una invaginación lateral para formar el conducto paramesonérfico (del que derivan los epitelios del oviducto, endometrial y cervical llamados también epitelios müllerianos). El epitelio celómico mesodérmico es considerado un epitelio pluripotencial que experimenta numerosos cambios durante el desarrollo prenatal y puede dar lugar a

varios tejidos epiteliales, esta relación entre el origen embrionario del ESO y las estructuras müllerianas podría explicar por qué en ciertos tumores de ovario el ESO adquiere la morfología y las características funcionales de los epitelios müllerianos, ya que los tumores epiteliales serosos presentan características morfológicas similares a las trompas de falopio, los tumores mucinosos al endocervix y finalmente los tumores de tipo endometroide y de células claras se asemejan al endometrio (5, 6)

El ESO se encuentra inmediato a la túnica albugínea del cual se separa por su lámina basal, apicalmente su superficie es continua al mesotelio del mesovario; sin embargo, se distingue de este último por la presencia de microvellosidades y cilios, además de la ausencia de la expresión del antígeno CA-125, principal marcador tumoral del cáncer epitelial de ovario. El ESO cuenta con la presencia de proteínas tales como integrinas y cadherinas las cuales ayudan a mantener la organización en monocapa. En respuesta a los estímulos ambientales, el ESO posee la capacidad de diferenciarse hacia dos tipos celulares, el estromal y el epitelial, tiene además la característica de ser un mesotelio no comprometido por que expresa proteínas típicas de células epiteliales, tales como las queratinas 7, 8, 18 y 19, posee marcadores mesoteliales como la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y el antígeno de mucina (MUCI), y también tiene marcadores mesénquimales como la vimentina, la α -actina y la cadherina N. Dichas características confieren la habilidad de efectuar las transiciones epitelio-mesénquima (EMT) y mesénquima-epitelio (MET) como mecanismos que le permiten moverse durante el proceso de regeneración para reparar la herida después de un daño ocasionado por ruptura folicular. Es decir, una vez ocurrida la ovulación, la superficie del ovario dañada es reparada completamente, el epitelio alrededor de la herida prolifera y secreta matriz extracelular similar a la de fibroblastos, cambia su morfología hacia un estado mesénquimal alterando la expresión de moléculas de adhesión y convirtiéndose en células con un fenotipo migratorio realizando así la EMT. Finalmente, las células retornan a su estado epitelial para cerrar la herida, realizando así la MET. Existe la teoría de que cuando el ESO disminuye la capacidad para producir EMT puede transformarse hacia fenotipos epiteliales complejos, lo cual pudiera ocasionar una deformación metaplásica y posteriormente una transformación maligna (7, 8).

Finalmente una de las funciones importantes del ESO es su capacidad de secretar y transportar sustancias tales como hormonas, factores de crecimiento y citocinas, las cuales están involucradas en su crecimiento y proliferación, además expresa los

receptores específicos para que estas moléculas puedan ejercer su acción (Figura 2). Una alteración en la expresión tanto de los receptores, de las hormonas, de los factores de crecimiento y de las citocinas puede estar presentes y participar en ciertas patologías del ovario como es el cáncer de ovario.

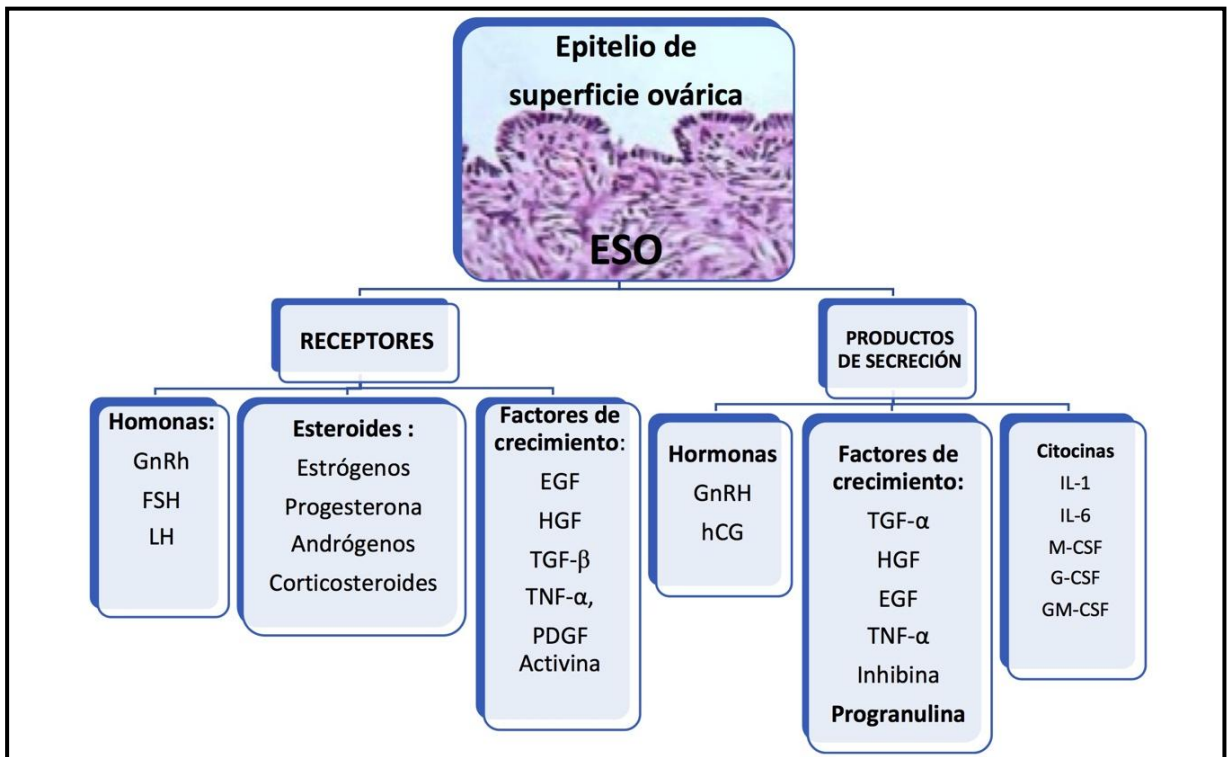


Figura 2. Receptores presentes en el Epitelio de Superficie Ovárica (ESO) tanto para hormonas, esteroides y diferentes factores de crecimiento. También se muestran algunos productos de secreción por parte de este epitelio entre los cuales se encuentra hormonas, factores de crecimiento y citosinas. Tomada y modificada de Auersperg N y cols. 2001 (6).

B) CARCINOMA EPITELIAL DE OVARIO

1.- Datos epidemiológicos del cáncer de ovario

El cáncer epitelial de ovario representa un importante problema de salud pública ya que a nivel mundial ocupa el octavo lugar en incidencia de las neoplasias que se presentan en la mujer y la séptima causa de mortalidad de acuerdo con las estadísticas de GLOBOCAN 2018 (9). La alta mortalidad del cáncer de ovario se debe a que en general el diagnóstico se establece cuando la enfermedad está muy avanzada y a la falta de marcadores para un diagnóstico temprano. En consecuencia, la mayoría de los casos se detectan cuando el cáncer además de haber afectado a los ovarios ha hecho metástasis a órganos abdominales pélvicos y fuera de la cavidad peritoneal considerándose esto como estadios avanzados de la enfermedad (10).

En las últimas dos décadas las tasas de mortalidad mundial por cáncer de ovario se han mantenido o han disminuido en países desarrollados como en EUA y países de la Unión Europea, pero no en los países en vías de desarrollo. Todo esto de acuerdo con un estudio estadístico llamado “*Global trends and predictions in ovarian cancer mortality*” (11). Por el reporte en este estudio de las tendencias mundiales de mortalidad por cáncer de ovario hasta el año 2012 y con base en datos de la organización mundial de la salud se ha podido predecir la mortalidad hasta el año 2020. La razón principal de la disminución de la mortalidad por cáncer de ovario en los países desarrollados al parecer está relacionada con el uso de anticonceptivos orales y la disminución en el uso de terapia de reemplazo hormonal en mujeres menopáusicas. En México el cáncer de ovario representa el sexto lugar en incidencia y el quinto en mortalidad, de acuerdo con las estadísticas de GLOBOCAN 2018 (9). Además, en el último consenso de cáncer de ovario realizado en México, se reportaban más de 2,500 casos nuevos por año (12). Por otro lado, el estudio de Gallardo-Rincón y cols. menciona que el riesgo de una mujer de padecer cáncer ovárico durante el transcurso de su vida es aproximadamente de 1 en 75 y su probabilidad de morir de cáncer ovárico es de aproximadamente 1 en 100 (13).

El carcinoma ovárico de tipo epitelial es el más frecuente y representa el 90% de los casos. Este tipo de cáncer se presenta principalmente en mujeres mayores de 50 años (10). La mayoría de los casos de cáncer de ovario de tipo epitelial se consideran esporádicos, sin embargo, 5-10% de los casos son hereditarios. La mayoría son mujeres

que pertenecen a familias de casos de cáncer de ovario y de mama que se relacionan con mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA 1* y *BRCA 2* (14).

2.- Etiología y factores de riesgo del cáncer epitelial de ovario

En la actualidad se desconocen las causas precisas que originan del cáncer de ovario, sin embargo, se han podido identificar tanto una sobreexpresión de factores que favorecen el desarrollo de este cáncer, así como, una baja expresión de factores o proteínas con efecto protector que evitan su desarrollo (15, 16). Por otro lado, existen varias teorías que tratan de explicar la etiología del cáncer epitelial de ovario espontáneo en el cual no existe un comportamiento hereditario.

La teoría de la ovulación incesante propuesta en 1971 menciona que, durante la ovulación el epitelio ovárico sufre rupturas para dar salida al óvulo, lo cual ocasiona un daño continuo al epitelio, la proliferación subsecuente para sustituir las células y reparar el epitelio fracturado incrementa la posibilidad de que ocurran mutaciones genéticas durante la replicación, lo que genera malignidad del ESO (17, 18). De acuerdo con esta hipótesis las mujeres con mayores episodios de ovulación tienen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario, como son las mujeres nulíparas, mujeres con inicio de menarca temprana y mujeres con una menopausia tardía. Se ha documentado que mujeres con antecedentes de uno o varios embarazos tienen un menor riesgo de padecer carcinoma ovárico en comparación con las nulíparas (Figura 3).

La teoría de las gonadotropinas y los esteroides que explica la posible formación del cáncer de ovario propone que los altos niveles de gonadotropinas circulantes podrían estimular la producción de estrógenos por parte de las células estromales que forman los quistes de inclusión, dichos estrógenos podrían estimular la diferenciación, proliferación y la subsecuente transformación maligna del ESO (19). Los datos que apoyan esta hipótesis son el aumento de la incidencia del cáncer de ovario conforme avanza la edad de las mujeres específicamente en la menopausia, la cual se caracteriza por altas concentraciones circulantes de las hormonas FSH y LH (19). También, de acuerdo con esta teoría las mujeres con terapia de reemplazo con estrógenos durante la menopausia tienen un mayor riesgo de presentar esta patología. La terapia de reemplazo hormonal ha demostrado aumentar el riesgo de desarrollar cáncer de ovario en un 22% con estrógenos y en 10% la combinación con progesterona, por lo que el uso de la terapia de reemplazo

hormonal sólo debe considerarse a las pacientes que tienen síntomas profundos de la menopausia y por un periodo corto de tratamiento (Figura 3) (20).

La teoría de la inflamación propuesta en 1999 es complementaria a la teoría de la ovulación incesante. Esta teoría se propuso para explicar el incremento de la incidencia de cáncer de ovario entre las mujeres que usaban talco o presentaban endometriosis y/o enfermedad pélvica inflamatoria. En la actualidad se sabe que la endometriosis puede originar cáncer ovárico de tipo endometroide y de células claras. La teoría explica que en la reacción inflamatoria aguda que ocurre en la ovulación, el ESO queda expuesto a un ambiente rico en citocinas, interleucinas, metaloproteasas, factores de crecimiento y células inmunes además de un estrés oxidativo. Así, todo este microambiente promueve la iniciación, el desarrollo y la progresión de una degeneración maligna del ESO, el cual una vez transformado desarrolla mecanismos para que las células inmunes y sus mediadores como IL-1, IL-6 y TNF- α estimulen el crecimiento y la progresión maligna de las células (Figura 3) (21).

Además de las teorías ya mencionadas y los factores de riesgo para la génesis del cáncer de ovario, también se han identificado mutaciones en genes supresores de tumor, como mutaciones de *p53* y *ARID*, con lo cual se presenta una evasión de la apoptosis y por lo tanto prevalece la proliferación celular. En los casos de cáncer de ovario de tipo epitelial hereditario (5-10%), la mayoría son mujeres que pertenecen a familias de casos de cáncer de ovario y de mama que se relacionan con mutaciones en los genes supresores de tumores *BRCA 1* y *BRCA 2* (Figura 3) (Tabla 1) (14). Otro tipo de mutaciones que se han observado en cáncer de ovario es en oncogenes y podrían dar lugar a proliferación celular como es el caso de mutaciones en *c-Erb1*, *c-Erb2*, *KRAS*, *c-myc*, *PTEN*, *PI3KCA*, *BRAF* (Figura 3) (Tabla 1) (15).

En cáncer de ovario también se ha visto la participación de factores de crecimiento y sobre todo de su sobreexpresión (22). Entre ellos se puede mencionar al factor de crecimiento epidermal (EGF) y su receptor (EGFR o HER), los cuales promueven la supervivencia, proliferación celular, adhesión, invasión y evasión de la apoptosis. El EGFR ha sido considerado como un blanco de tratamiento en el carcinoma ovárico (23). El factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y su receptor (VEGFR) también participan en este tipo de cáncer estimulando la angiogénesis y la permeabilidad vascular por lo que inducen el crecimiento, progresión e invasión tumoral, así como la acumulación de ascitis.

Por el papel que juega el VEGF/VEGFR en esta patología se han considerado como blancos terapéuticos (24). El ácido lisofosfatídico (LPA), es un factor mitogénico que también se encuentra sobreexpresado en este tipo de cáncer y promueve el crecimiento, supervivencia, motilidad e invasión celular, así como la resistencia a fármacos quimioterapéuticos. Además, es capaz de regular la expresión de otras proteínas como es el caso de la progranulina (25). Esta proteína es un factor de crecimiento que se encuentra altamente expresado en esta patología y participa en varios procesos de la carcinogénesis ovárica (Figura 3) (26).

El tabaquismo y la obesidad se han asociado a un mayor riesgo de carcinomas endometroide y mucinoso por lo que la actividad física y los factores dietéticos disminuyen de 30-60% el riesgo de cáncer de ovario (Figura 3) (10).

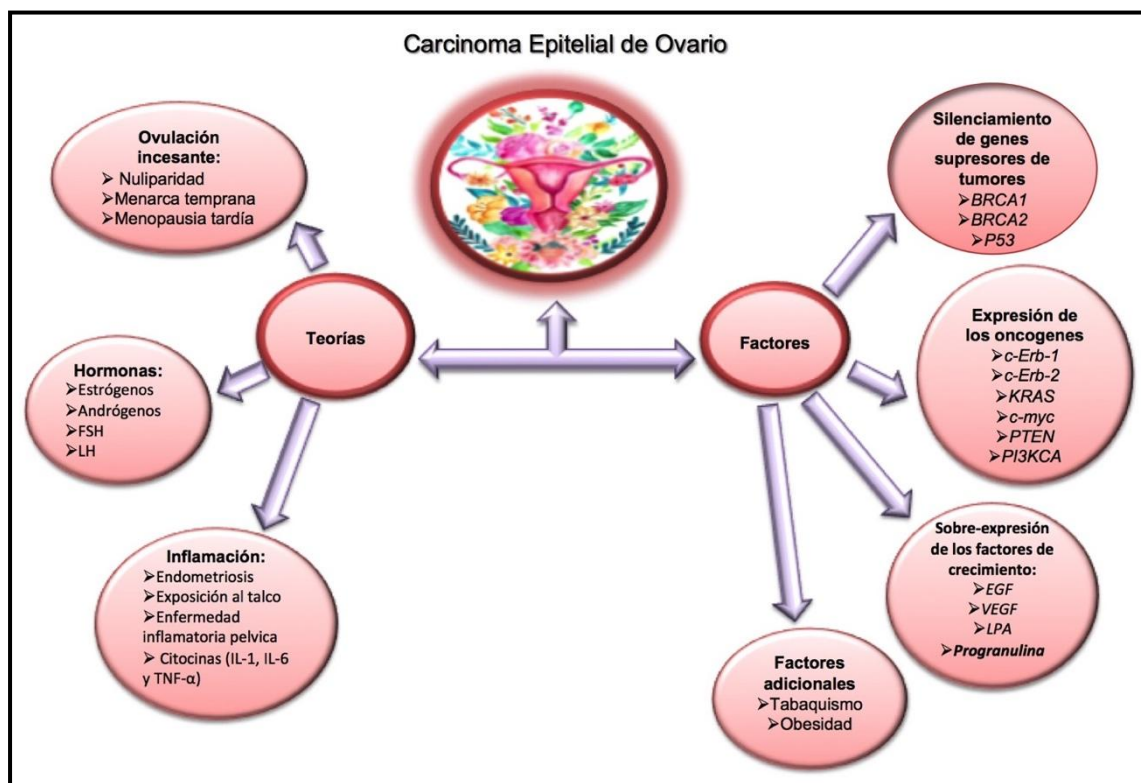


Figura 3. Teorías y factores involucrados en la génesis del carcinoma epitelial de ovario. Elaboración propia.

3.-Clasificación del cáncer epitelial de ovario

Los tumores epiteliales malignos de ovario histológicamente se han clasificado en 4 subtipos: tumores de tipo seroso de alto y bajo grado, endometroide de alto y bajo grado, de células claras y mucinosos (Tabla 1). Por los múltiples estudios en este tipo de cáncer se ha logrado identificar y establecer alteraciones moleculares presentes en cada uno de estos diferentes subtipos histológicos. Así, estas características moleculares que definen a cada uno de los subtipos de tumores pudieran brindar la oportunidad de dar a las pacientes una mejor terapia, de detectarlo oportunamente y de establecer una reducción en el riesgo de esta enfermedad (15, 16). En la subdivisión en alto y bajo grado, se dividen así porque los tumores de alto grado se caracterizan por un crecimiento rápido y presentan una anaplasia muy marcada o generalizada. Los tumores de bajo grado muestran un crecimiento o una evolución lenta, están circunscriptos o con límites imprecisos o difusos y tienen células diferenciadas moderadamente (Tabla 1).

3.1.- Carcinoma de ovario de tipo seroso

Los carcinomas serosos representan la mayoría de los tumores malignos (75-80%) que a su vez están divididos en carcinomas serosos de alto y bajo grado. Los de alto grado son los que tienen más índice de mortalidad, generalmente se observa en pacientes de mediana edad y en etapas avanzadas, son genómicamente inestables, aneuploides y aproximadamente el 10% de los pacientes tienen una mutación en los genes *BRCA1* o *BRCA2*. Los tumores de bajo grado son caracterizados por la presencia de la mutación *KRAS* (Tabla1). Hasta hace poco se pensaba que el cáncer de ovario se derivaba del epitelio de superficie ovárica, sin embargo, hallazgos recientes proponen a las trompas de Falopio en un papel fundamental durante la patogenia del cáncer de ovario, lo cual surge como una alteración preneoplásica llamada carcinoma seroso intraepitelial tubárico (STIC) (27). Estudios patológicos en salpingooforectomía bilateral profiláctica en pacientes con mutaciones en el gen *BRCA* muestran que este tipo de carcinoma seroso de alto grado se desarrolla principalmente en los extremos de las trompas de Falopio. Así, en el año de 2003 se planteó una nueva hipótesis que propone que la mayoría de los cánceres ováricos no hereditarios se originan en la trompa de Falopio por descamación y desprendimiento de las células (27). En los últimos años se ha observado que la salpingectomía profiláctica aparentemente previene la propagación metastásica sobre la superficie peritoneal, por lo que es recomendada la salpingectomía

bilateral alrededor de los 40 años, sobretodo en mujeres con paridad satisfecha y con predisposición genética (27).

Tabla 1. Tumores de ovario y sus subtipos histológicos. Características genéticas y opciones de tratamiento de acuerdo con cada uno de los subtipos. Tomada y modificada de Matulonis UA y cols. 2016 (15).

<u>Tumores</u>			
<u>Subtipo Histológico</u>	<u>Hallazgos Clínicos</u>	<u>Características Genéticas</u>	<u>Tipo de Tratamiento</u>
<p>Seroso (Alto grado)</p> <p>Endometrioide (Alto grado)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinomatosis peritoneal puede presentarse con ascitis • Se presenta en etapas avanzadas (>55 años) 	<ul style="list-style-type: none"> • Deficiencia en la combinación homóloga (50% de los tumores) • Asociado con las mutaciones BRCA, p53 y Ciclina E1 	Quimioterapia
<p>Seroso (Bajo grado)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se presenta en pacientes más jóvenes (43-55 años) • Se puede presentar en etapas tempranas o tardías 	<ul style="list-style-type: none"> • Asociado con las mutaciones KRAS y BRAF • Tumores genéticamente estables 	Inhibidores de MEK y terapia hormonal
<p>Endometrioide (Bajo grado)</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Puede estar asociado a endometriosis 	<ul style="list-style-type: none"> • Asociado a mutaciones PTEN, ARID 1A y PI3KCA • Inestabilidad microsatelital 	Posible terapia hormonal
<p>De células claras</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Puede presentarse con metástasis en el hígado y los pulmones o como carcinomatosis peritoneal • Puede estar asociado con hipercoagulabilidad e hipercalcemia 	<ul style="list-style-type: none"> • Asociado a las mutaciones PTEN, ARID 1A y PIK3CA 	Inmunoterapia y quimioterapia
<p>Mucinoso</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Se presenta en pacientes más jóvenes y es típicamente en etapas tempranas 	<ul style="list-style-type: none"> • Asociado a mutaciones KRAS 	Quimioterapia,

Protooncogenes = BRCA, KRAS, BRAF, PTEN, ARID, PI3KCA, MEK.

Gen supresor de tumor = p53

3.2.- Carcinoma de ovario de tipo endometroide

Los carcinomas de tipo endometroide representan el 10% de todos los tipos de tumores de ovario. La mayoría de los carcinomas endometroides de bajo grado (tipo I) son originados por quistes endometriales y la transición desde el quiste hasta el carcinoma requiere la pérdida del gen ARID1A, involucrado en la remodelación de la cromatina. Las mutaciones en este gen aparecen en el 46-30% de los carcinomas de

células claras y endometrioides en contraste con el 0% de los carcinomas serosos de alto grado. Otras mutaciones tales como el homólogo de fosfatasa y tensina PTEN se pueden encontrar en endometriosis atípica en forma significativa (57%) lo que refuerza el vínculo entre carcinomas de células claras y endometrioides (Tabla 1) (28, 29). Los carcinomas endometrioides de alto grado (tipo II) se caracterizan por inestabilidad genética, así como la presencia de mutaciones de *BRCA*, *Tp53* y Ciclina E1, mutaciones no características de los tumores de tipo I (bajo grado) por lo que no es posible que haya una transición de carcinoma endometrioide de bajo grado a alto grado (Tabla 1) (28, 29).

3.3.- Carcinoma de ovario de células claras

Este tipo de tumores corresponde a un 5 a 10% de todos los tumores de ovario. Estos carcinomas en general se diagnostican en estadios tempranos (I-II) y en el 57-81% de los casos cuando la intervención quirúrgica es efectiva para erradicar la enfermedad, las mujeres tienen un pronóstico favorable similar al de los carcinomas serosos en estadio I. Sin embargo, si el diagnóstico se establece en estadios avanzados (III-IV) las mujeres tienen un peor pronóstico en comparación con cualquier otro subtipo por la agresividad que presentan debido a su insensibilidad a la quimioterapia. Las mutaciones somáticas más frecuentes se han descrito en los genes *ARID1A*, *PIK3CA* y *PTEN* (Tabla 1) (30, 30).

3.4.- Carcinoma de ovario de tipo mucinoso

El carcinoma mucinoso de ovario es un tipo de cáncer raro que se caracteriza por tener menos alteraciones génicas que los carcinomas serosos. Suelen presentar mutaciones del gen *KRAS* y no parecen estar asociado a mutaciones *BRCA*. Un desafío del carcinoma mucinoso es determinar si la fuente del tumor es primaria en el ovario o metastásica de otro sitio como de tumores malignos intestinales (Tabla 1) (15, 28).

C) ASCITIS EN CÁNCER DE OVARIO

Por ascitis entendemos a la acumulación de líquido en la cavidad abdominal o peritoneal. La ascitis puede ser clasificada como benigna o maligna, definiéndose como maligna aquella ascitis producida por un cáncer, como en cáncer de colon, de útero, de páncreas, de hígado y cáncer de ovario. En cáncer de ovario la ascitis maligna afecta aproximadamente 10% de las pacientes que presentan una recurrencia y su importancia

radica en que con la ascitis puede haber una mayor diseminación de las células malignas en el área peritoneal y/o el establecimiento de metástasis a distancia.

La ascitis maligna es un fluido constituido por células neoplásicas y no neoplásicas tales como células mesoteliales, fibroblastos, macrófagos, leucocitos y detritus celulares, también están presentes algunas proteínas como lactato deshidrogenasa y albumina (31, 32). La importancia de la ascitis maligna radica en que constituye un reservorio dinámico de factores que estimulan la supervivencia de las células, entre estos factores se encuentran las citocinas, quimiocinas, factores de crecimiento y fragmentos de matriz extracelular (ECM) los cuales en forma individual o en forma combinada afectan el crecimiento del tumor y la progresión de la enfermedad a través de diferentes mecanismos celulares (33-35).

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) y el ácido lipofosfatídico (LPA) son dos factores que están presentes en el líquido de ascitis. Ambos con funciones importantes como migración celular y activación de señales de transducción que llevan a la producción de otros factores como el VEGF (36). El VEGF está en concentraciones altas en el líquido de ascitis y esto correlaciona con aumento en la diseminación de las metástasis y un peor pronóstico de la enfermedad (37). Sin embargo, otras proteínas pudieran estar presentes en el líquido de ascitis y estar participando en la malignidad del cáncer de ovario, por lo que es necesario caracterizarlas. Disminuir la concentración de estas proteínas presentes en este líquido y que cuentan con una actividad estimuladora de carcinogénesis pudiera ser una alternativa en el tratamiento para este tipo de cáncer.

D) TRATAMIENTO DEL CARCINOMA DE OVARIO

Los resultados de las investigaciones a nivel molecular de los diferentes tumores malignos de ovario han permitido implementar la reclasificación y establecer las diferentes etapas de la enfermedad de acuerdo con la FIGO y la OMS, lo cual está teniendo un impacto importante en la terapia de las pacientes, así como en el establecimiento de un pronóstico (29, 38).

El tratamiento de los tumores malignos de ovario inicialmente es quirúrgico. Cualquier sospecha de masa ovárica debe ser eliminada intacta para su evaluación histopatológica y de esta manera establecer el subtipo del tumor. Además, se debe

inspeccionar la cavidad abdominal con especial atención en el tracto gastrointestinal para evaluar un posible foco de cáncer primario o bien de metástasis. Al tratamiento quirúrgico le sigue la terapia a base de quimioterapia seguida o acompañada con inmunoterapia (29, 39). En mujeres con una predisposición genética, la ooforectomía (extirpación quirúrgica del ovario) unilateral o bilateral como tratamiento preventivo reduce un 30% del riesgo de mortalidad. También se ha demostrado que en cualquier mujer la ligadura de las trompas de falopio y la histerectomía se asocian con una reducción del riesgo de cáncer de ovario de tipo seroso, endometroide y de células claras (27).

Con los tratamientos para el cáncer de ovario que existen en la actualidad no se ha logrado disminuir la mortalidad y además las pacientes presentan una resistencia hacia los mismos por lo que es imperativa la búsqueda de nuevas alternativas de tratamiento. Una de ellas podría ser el resveratrol, un compuesto que interfiere en diferentes procesos asociados al cáncer.

1.- El Resveratrol como una alternativa de tratamiento para cáncer

El resveratrol (3,5,4-trihidroxi-trans-estilbeno) es miembro de un grupo de compuestos vegetales llamados polifenoles o fitoalexinas. Estudios en roedores han mostrado que este compuesto tiene efectos antienvjecimiento, antiinflamatorios o anticancerígenos. También, se ha visto que es capaz de disminuir la glucosa y el colesterol, así como producir otros efectos cardiovasculares benéficos (Figura 4) (40, 41).

En lo que respecta a cáncer de ovario, estudios previos han demostrado que el tratamiento con resveratrol de 5 líneas celulares de carcinomas ováricos humanos inhibió la proliferación celular e indujo a la apoptosis, estando esta respuesta asociada con la liberación mitocondrial de citocromo c y la activación de caspasas (42). Además, se ha visto que las células tratadas con este compuesto pueden mostrar cambios indicativos de autofagia, de apoptosis y muerte, sugiriendo que resveratrol puede inducir muerte celular a través de distintas vías (42–44). Otro estudio con células de cáncer de ovario reportó que además de inducir la autofagocitosis en las células, se incrementó la expresión de la enzima ciclooxigenasa 2 (COX2), se fosforiló p53 y se indujo la apoptosis (45). En otro estudio se reportó que resveratrol puede limitar la progresión del cáncer de ovario al inhibir la expresión del factor inducible de hipoxia 1-alfa (HIF-1 α) y del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) (46). Por otro lado, además de los efectos en la modulación de señales de transducción involucradas en proliferación celular, resveratrol

puede producir una modulación de la resistencia a compuestos quimioterapéuticos y esto también se ha visto en células de cáncer de ovario (47). Por otro lado, por estudios previos en células cerebrales (astrocitos) se ha demostrado el efecto antiinflamatorio del resveratrol a través de la reducción de la expresión de ciertas citocinas como TNF- α y IL-1 β (48).

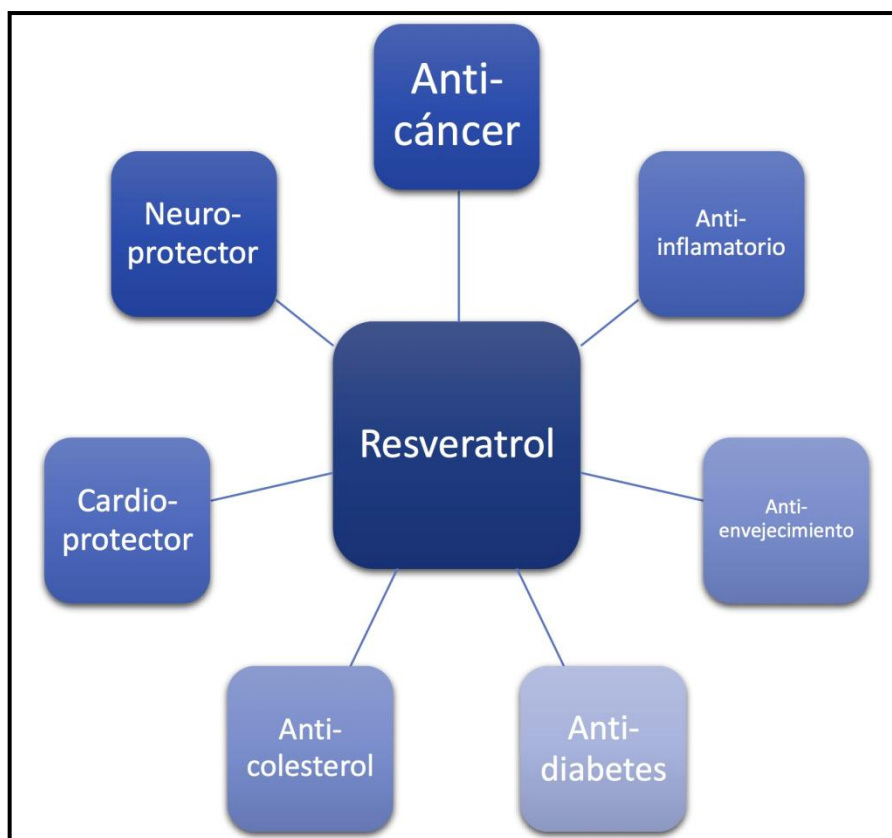


Figura 4. Las diferentes funciones del resveratrol que han sido identificadas en varios sistemas tomada y modificada de Aggarwal BB y cols. (40).

E) PROGRANULINA UN NUEVO FACTOR DE CRECIMIENTO

La progranulina es un factor de crecimiento también conocido como Acrogranina, Precursor de Granulinas y Epitelinas (GEP), Proepitelila (PEPI), Factor Derivado de Células PC (PCDGF) y Glicoproteína 88-kDa (GP88). Esta proteína cuenta con 593 residuos de aminoácidos y su peso molecular es de 68 kDa (26). Varios estudios han demostrado su participación en el desarrollo de embriones murinos preimplantatorios (49), en la embriogénesis temprana (50), en el proceso de cicatrización (51), inflamación (52), angiogénesis (53) y en el desarrollo de hueso y cartílago (54). La progranulina también

está asociada a obesidad, resistencia a la insulina y con enfermedades reumatológicas (55). Por otro lado, esta proteína ha sido considerada como un factor neuroprotector, por lo tanto, pérdida de la función por mutaciones en su gen han sido asociadas con enfermedades neurológicas y neurodegenerativas (56). La sobreexpresión de progranulina se ha observado en diferentes tipos de cáncer y se sabe que participa en el crecimiento y la propagación del tumor, ya que produce proliferación celular, migración, invasión, angiogénesis, transformación maligna, resistencia a quimioterapia y evasión de la respuesta inmune (Figura 5) (26).

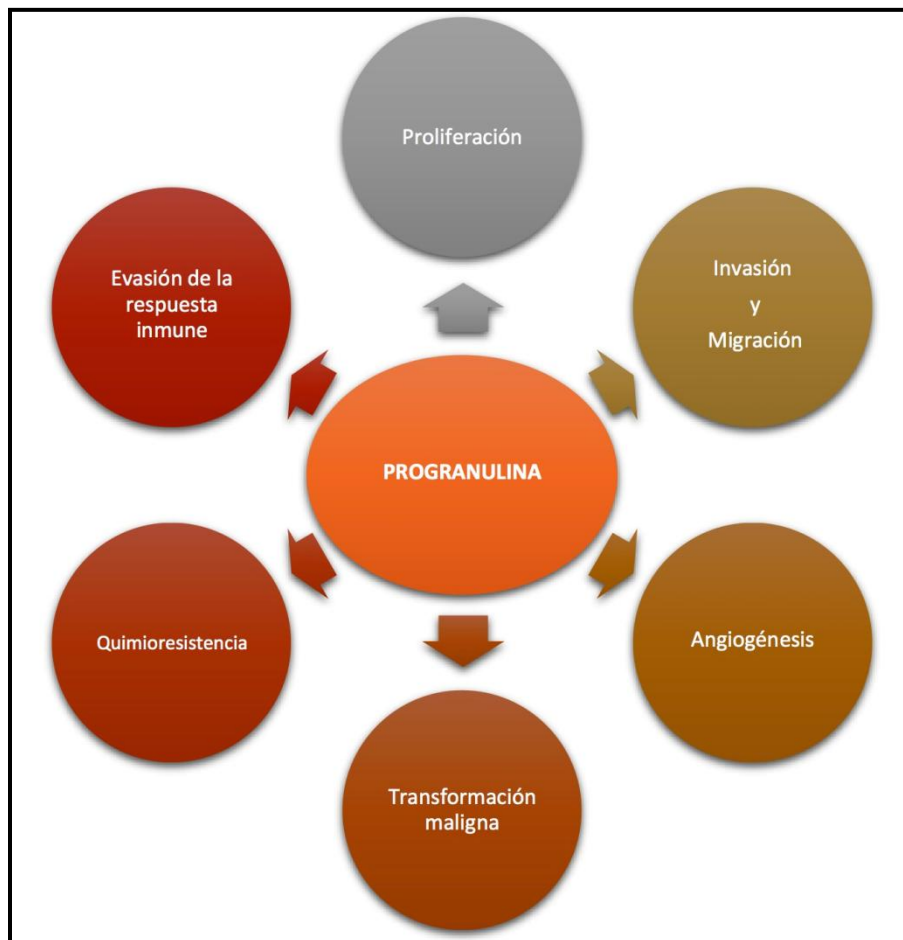


Figura 5. Las diferentes funciones de *progranulina* en *cáncer de ovario*. Tomada y modificada de Arechavaleta-Velasco F y cols. (26).

En el cáncer de ovario se ha observado que la expresión de progranulina tanto de su mRNA como de la proteína es mayor en forma significativa en tumores malignos en comparación con tumores benignos y tejidos de ovario sin patología. Además, de que

existe una correlación entre una alta expresión de su mRNA y una menor sobrevida de las pacientes (57). En estudios *in vitro* la sobreexpresión de progranulina en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario incrementa la proliferación celular, la formación de colonias celulares en agar semisólido y la capacidad de migración e invasión celular en comparación con los controles (58). Además, por modelos *in vivo* se ha observado que la sobreexpresión de progranulina promueve la transformación de células del epitelio ovárico a células con características malignas e induce la formación de tumores en ratones atímicos desnudos inoculados con dichas células (59). Por otro lado, con el bloqueo de su función con DNA antisentido o anticuerpos neutralizantes se reduce la proliferación celular y la capacidad de colonización en agar (60, 61). Por estudios *in vitro* e *in vivo* también se ha visto que la progranulina se asocia a quimioresistencia, ya que la sobreexpresión de esta proteína en las células A2780 les confiere una mayor capacidad de proliferar y formar tumores en ratones desnudos a pesar de ser tratados con el agente quimioterapéutico Cisplatino (58).

Por las evidencias de estudios previos, la progranulina ha sido propuesta como un biomarcador de estadios avanzados y recurrencia del cáncer epitelial de ovario, así como un indicador de la sobrevida libre de enfermedad en las pacientes con esta patología. Además, por su importancia en la patogénesis del cáncer de ovario también se le ha considerado como un blanco terapéutico (26).

Consideramos que la progranulina está presente en el líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario y pudiera estar participando en la carcinogénesis que promueve la presencia de este líquido, ya que previamente hemos observado un incremento de su secreción al medio de cultivo por las células TOV-21G de cáncer de ovario bajo el estímulo de la FSH (datos no publicados), además de las evidencias que demuestran que la progranulina es una proteína secretora con acciones autocrinas y paracrinas (49).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el cáncer de ovario la ascitis es un proceso importante que marca la gravedad de la enfermedad ya que su presencia promueve más su diseminación por la acción de factores de crecimiento y citocinas presentes en este líquido. Hasta el momento los tratamientos existentes contra esta enfermedad no logran disminuir la mortalidad o se presenta una resistencia hacia los mismos en las pacientes (62). El resveratrol es un compuesto con efectos anticancerígenos, por lo que sería de utilidad valorar sus efectos a nivel de proteínas presentes en el líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario.

En el presente trabajo deseamos valorar cuales son los efectos del resveratrol sobre la expresión de progranulina intracelular y la secretada al medio por células derivadas de cáncer de ovario. En sus objetivos la propuesta es original y en lo particular el conocimiento del efecto de dosis bajas de resveratrol sobre la expresión de progranulina intracelular y su secreción al medio de cultivo por líneas celulares derivadas de cáncer de ovario y células provenientes de la ascitis de pacientes con esta patología pudiera ser importante, especialmente si se observa una disminución de la expresión de progranulina y una disminución de la secreción de ésta por parte de las células sin producir su apoptosis. De observarse este efecto, podríamos sugerir que el resveratrol pudiera disminuir la secreción de otras proteínas como citocinas o factores de crecimiento con importantes funciones en la diseminación del carcinoma ovárico. De esta manera, el resveratrol podría ser considerado como una posible alternativa de tratamiento y daría la pauta a realizar valoraciones posteriores en modelos *in vivo* murinos.

III. OBJETIVOS

General

Valorar el efecto de bajas dosis de resveratrol sobre la expresión de progranulina en células derivadas de cáncer de ovario, al ser cultivadas en presencia de este compuesto y de esta manera determinar su posible efecto anticancerígeno en esta patología.

Particulares

- 1) Analizar la expresión de progranulina por medio de la técnica de Western Blot, en lisados de las líneas celulares derivadas de cáncer de ovario OVCAR-3 y TOV-21G, así como de células provenientes de ascitis de pacientes con cáncer de ovario incubadas en presencia de bajas concentraciones de resveratrol.
- 2) Determinar la concentración de progranulina, utilizando la técnica de ELISA, en el medio de cultivo de células provenientes de ascitis de pacientes con cáncer de ovario incubadas en presencia de pequeñas dosis de resveratrol.

IV. HIPÓTESIS

El tratamiento con bajas dosis de resveratrol de las líneas celulares derivadas de cáncer de ovario y de células de ascitis de pacientes con cáncer de ovario disminuirá la expresión de progranulina intracelular, así como su secreción al medio de cultivo por parte de estas células.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A.- Tipo de estudio

Se trató de un estudio de tipo experimental y comparativo al valorar el efecto del resveratrol sobre la secreción de progranulina por las células provenientes de cáncer de ovario. Comparando los efectos éste compuesto en las células tratadas con las células cultivadas en ausencia de resveratrol (controles). El diseño experimental del estudio se encuentra descrito en la Figura 6.

B.- Universo de trabajo

Se utilizaron la línea celular OVCAR-3 (derivadas de un adenocarcinoma seroso de ovario) y la TOV-21G (derivadas de un carcinoma de ovario de células claras). Por otro lado, también se emplearon células de cultivos primarios de líquidos de ascitis de 11 pacientes con cáncer de ovario que fueron sometidas a cirugía entre septiembre de 2014 y diciembre del 2015 en la UMAE Hospital de Ginecobstetricia Luis Castelazo Ayala, IMSS. Todas las pacientes cumplieron con criterios de inclusión y firmaron la carta de consentimiento informado.

El presente proyecto de investigación se consideró como un estudio piloto por lo que se incluyeron tanto los líquidos de ascitis de pacientes de diagnóstico reciente y de pacientes con recurrencia del cáncer de ovario, incluyéndose así las células de líquido de ascitis de todas las pacientes.

C.- Criterios de inclusión

- Pacientes con diagnóstico inicial o recurrencia de cáncer de ovario corroborado por histopatología, que presentaron ascitis.
- De cualquier edad.
- Todas las clasificaciones clínicas de la Federación Internacional de Ginecobstetricia (FIGO) (Estadio I a IV) fueron incluidas.
- Todas las clasificaciones histológicas de la Organización Mundial de la Salud (WHO) (G1 a G3) fueron incluidas.

D.- Criterios de exclusión

- Pacientes con otras patologías agregadas, que pudieran causar ascitis como cirrosis hepática, insuficiencia cardíaca, insuficiencia renal o pancreatitis.

E.- Tamaño de la muestra

Se valoró la expresión de progranulina en dos líneas celulares de cáncer de ovario y en células proveniente de líquido de ascitis de 11 pacientes con cáncer de ovario, después de estar expuestas al tratamiento de resveratrol.

F.- Especificación de variables

Variable dependiente. Expresión de progranulina que fue analizada en los lisados de las células y en los medios condicionados de los cultivos de las células de cáncer de ovario incubadas con resveratrol. Estas variables fueron cuantificadas por el método de Western blot y ELISA respectivamente (Ver técnicas más adelante).

Variable independiente. Las concentraciones del compuesto resveratrol 6.25 y 12.5 μM (Calbiochem, EUA) que se utilizaron como tratamiento de las líneas celulares de cáncer de ovario y de las células derivadas de líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario.

G.- Aislamiento de las células presentes en el líquido de ascitis

Una vez obtenidos los líquidos de ascitis cada 25 mL fueron colocados en frascos de cultivo de 150 cm^3 y se les añadió 25 mL de la combinación de los medios de cultivo 1:1 MCDB 105/199 (nombrado así por su desarrollo en el departamento de Molecular Cellular and Developmental Biology). Este medio fue suplementado con 15% de Suero Fetal Bovino (SFB), 1 mM de piruvato de sodio y con una solución de antibiótico/antimicótico equivalente a 100 U/mL de penicilina G, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomina y 0.25 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B (Life Technologies, EUA). Se dejaron en incubación por 4 días antes del primer cambio de medio. En algunos casos después de este primer cambio de medio las células tumorales fueron despegadas utilizando tripsina y separadas para su crecimiento. En otros casos se requirió de más tiempo. Una característica del medio de cultivo utilizado es que reduce el crecimiento de células estromales y favorece el crecimiento de células epiteliales (células tumorales). Además,

con la técnica utilizada la mayoría de los eritrocitos presentes en los cultivos fueron removidos después del primer cambio de medio, ya que estos no son adherentes. También, por tripsinaciones parciales y repetidas de los cultivos fueron removidos los fibroblastos ya que son menos adherentes que las células epiteliales. Por lo tanto, los experimentos se realizaron dentro de los pases 3 y 6, en donde se documentó la presencia de células epiteliales por la tinción de citokeratina 7 en ellas y se descartó la presencia de otros tipos celulares. Los experimentos se realizaron con un 98% a 100% de células positivas a citokeratina 7 (63).

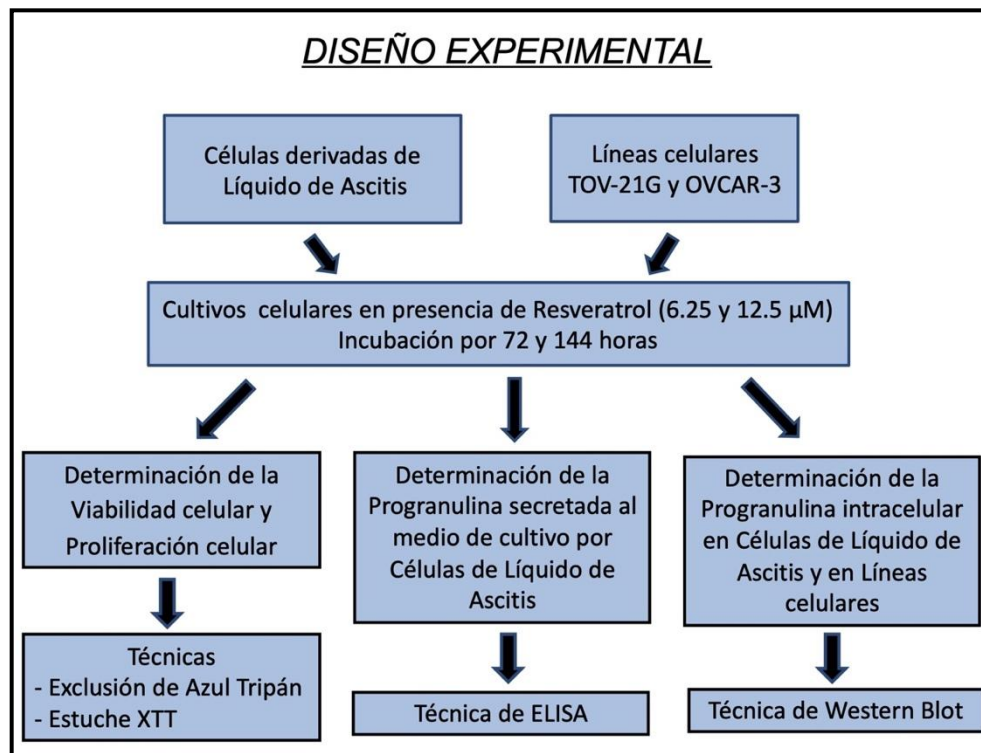


Figura 6. *Diseño Experimental del estudio. Elaboración propia.*

H.- Cultivo de las células en presencia de resveratrol

Las células OVCAR-3 fueron cultivadas en medio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 y las células TOV-21G en medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (Life Technologies, EUA), ambos medios fueron suplementados con 5% de SFB.

Las células derivadas de líquido de ascitis se cultivaron en una mezcla de medio MCDB 105/199 más 15% de SFB. Tanto las líneas celulares como las células provenientes de líquido de ascitis fueron cultivadas en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C. Para los ensayos celulares se colocaron 2X10⁵ células/pozo en placas de 12 pozos y se dejaron en cultivo en presencia de dimetilsulfóxido (DMSO) como control-vehículo y en 6.25 y 12.5 µM de resveratrol por 72 y 144 horas. Una vez finalizados los cultivos los medios condicionados fueron congelados hasta su procesamiento y las células fueron lisadas para ser cuantificadas y analizadas por la técnica de Western blot. En otros cultivos, las células no fueron lisadas para determinar la viabilidad y la proliferación celular, usando los estuches o kits correspondientes.

I.- Determinación de viabilidad celular

La viabilidad celular fue determinada utilizando el método de exclusión de azul de tripán como ha sido descrito previamente (46). Para estos ensayos se cultivaron 2x10⁴ células/pozo en placas de 96 pozos (Corning Inc., EUA) en 100 µL de medio. Los cultivos celulares en presencia de resveratrol se realizaron como se describió previamente. A las 72 y 144 horas de incubación las células fueron tripsinizadas y re-suspendidas en medio de cultivo. Después, se realizó una dilución 1:1 de la suspensión de células con 0.4% de azul tripán. Esta dilución fue puesta sobre una cámara hemocitométrica (o de Neubauer) y se realizó el recuento de las células usando el microscopio, anotando el número de células que excluyeron el azul tripán y el número de células que lo incorporaron (células azules o células muertas). La viabilidad celular fue calculada utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Células viables} = [1.00 - \# \text{ células azules} \cdot / \cdot \# \text{ células totales}] \times 100$$

J.- Determinación de proliferación celular

Para valorar el efecto del resveratrol sobre el metabolismo celular y en forma indirecta sobre la proliferación celular se utilizó el estuche colorimétrico XTT (Roche Applied Science, EUA). Para estos ensayos se cultivaron 2x10⁴ células/pozo en placas de 96 pozos (Corning Inc., EUA) en 100 µL de medio. Los cultivos celulares en presencia de

resveratrol se realizaron como se describió previamente. Una vez transcurridos los tiempos de incubación, se preparó una mezcla con el reactivo de XTT (Na 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis (4-metoxi-6-nitro) benceno ácido sulfónico hidratado) y con el reactivo *electron coupling* (N-metildibenzopirazina metil sulfato) en una proporción 50:1 v/v, y a cada uno de los pozos de cultivo se les añadió 100 µL de esta mezcla y se incubaron por 2 horas a 37°C. Posteriormente se determinó la absorbancia a 450 nm. La coloración fue directamente proporcional al número de células y los resultados se graficaron como porcentaje de proliferación con respecto a control-vehículo.

K.- Cuantificación de proteínas

Para la cuantificación de las proteínas, las células fueron lisadas con buffer de lisis con un pH de 7.4, conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas Complete-Mini-free EDTA, (Roche Applied Science, EUA). El lisado fue centrifugado a 10,000 rpm por 10 min a 4°C. Una vez obtenido el sobrenadante, las proteínas totales fueron cuantificadas utilizando el método de ácido bicinconónico (BCA) [Protein assay Kit, (Thermo Fisher Scientific, EUA)]. Ya cuantificadas las muestras, éstas fueron guardadas a -70°C hasta su procesamiento por la técnica de western blot.

L.- Técnica de Western blot

10 µg de proteínas totales fueron separadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% y posteriormente se transfirieron a una membrana PVDF (GE Healthcare, EUA). Una vez transferidas las proteínas, la membrana fue bloqueada 1 hora a temperatura ambiente con buffer salino-tris (TBS) conteniendo 0.1% de Tween-20 (TBST) y 5% de leche en polvo baja en grasas. Posteriormente las membranas fueron incubadas toda la noche a una temperatura de 4°C con el anticuerpo anti-progranulina en una dilución 1:2000. Como control de carga se valoró a la actina utilizando un anticuerpo anti-β-Actina. Posterior a esto, la membrana fue lavada con TBST y se añadió un segundo anticuerpo, una IgG anti-conejo conjugado con peroxidasa que se utilizó a una dilución de 1:10,000. Después, la membrana fue sometida a varios lavados con TBST y las proteínas fueron detectadas por medio del estuche de quimioluminiscencia y utilizando el aparato LI-COR. Finalmente se realizó el análisis densitométrico de las bandas obtenidas.

M.- Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

Los medios condicionados obtenidos de los cultivos celulares a las 72 y 144 horas de incubación en presencia de dos dosis de resveratrol fueron utilizados para la determinación cuantitativa de progranulina por medio de la técnica de ELISA tipo sándwich. Esta técnica se basa en el reconocimiento de la progranulina por un anticuerpo policlonal específico fijado en los pozos y un anticuerpo unido a la enzima biotina. Para esto se utilizó el estuche de ELISA [Progranulin Human (AdipoGen, Corp, EUA)], en donde 100 μ L de medio condicionado y previamente diluido (1:25) fueron colocados en cada uno de los pozos, incubándose esta reacción por 1 hora a 37 °C. Posteriormente los pozos fueron lavados 3 veces con PBS con Tween 20 y se agregaron 100 μ L del anticuerpo de detección específico para progranulina acoplado a biotina por una hora. Los pozos fueron lavados 3 veces y se adicionaron 100 μ L del conjugado de estreptavidina-peroxidasa por una 1 hora a 37 °C. Nuevamente se lavaron los pozos y el desarrollo del color se realizó incubando las placas con 100 μ L del substrato 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina por 10 minutos y la reacción se detuvo con la adición de 100 μ L de ácido fosfórico. La intensidad del color se midió por espectrofotometría a una absorbancia de 450 nm.

N.- Análisis Estadístico

Para valorar si hubo diferencias en la concentración de progranulina en el medio condicionado entre los controles y las dosis de resveratrol utilizadas se empleó el programa estadístico Stata 11 para Mac (Stata Corp., EUA). Se realizó la prueba ANOVA, seguida de la prueba de comparaciones múltiples contra el grupo control (método de Dunnett). Los resultados se expresan como la Promedio \pm Error Estándar de la Media (EEM). Una probabilidad menor de 0.05 fue considerada como estadísticamente significativa.

VI. RESULTADOS

1) Pacientes incluidas en el estudio y sus características clínicas.

En total se incluyeron 11 pacientes, cuya mediana de edad fue de 52 años, la edad menor de las pacientes fue de 31 años y la edad máxima fue de 72 años, todos estos datos se resumen a continuación en la tabla 2. En cuanto al tipo histológicos de los tumores de ovario que presentaban las pacientes, 2 fueron serosos de bajo grado, 3 serosos de alto grado, 2 endometrioides, 1 de células claras, 1 mucinoso y 2 poco diferenciados, uno de estos últimos se trataba de una recurrencia de la enfermedad en la paciente. De acuerdo con el estadio de la enfermedad, una paciente se encontraba en estadio I y el resto de las pacientes (n=10) en estadio III (Tabla 2). La coloración del líquido de ascitis varió entre las pacientes desde, amarillo claro, sanguinolento, café claro y de apariencia lechosa. Además, la cantidad obtenida fue variable y se dividieron en 15 a 49 ml = n=4, 50 a 100 ml = 2 y >100 ml = 5 pacientes. Cinco de las pacientes han sobrevivido a la enfermedad y 6 ya fallecieron.

Tabla 2. Características clínicas de las pacientes con diagnóstico de cáncer de ovario y del líquido de ascitis obtenido de ellas.

Paciente No	Edad (años)	Diagnóstico (Carcinoma de Ovario)	Líquido de ascitis (Cantidad y aspecto)	Actual
1	46	Poco Diferenciado. E III Segunda recurrencia	150 ml, lechoso	†
2	31	Endometroide. E I	20 ml, sanguinolento	Viva
3	35	Seroso. E III	150 ml, café claro	Viva
4	60	Endometroide. E III	150 ml, café claro	†
5	53	Seroso Alto grado. E III	20 ml, sanguinolento	Viva
6	57	Seroso Alto grado. E III	200 ml, café claro	†
7	63	Seroso. E III	100 ml, sanguinolento	†
8	52	Seroso Alto grado. E III	75 ml, amarillo claro	†
9	43	Células claras. E III	20 ml, sanguinolento	Viva
10	72	Mucinoso. E III	15 ml, amarillo claro	Viva
11	49	Poco Diferenciado. E III	70 ml, amarillo claro	†

E = Estadio del cáncer. † = Defunción

2) Después de 72 horas de tratamiento con resveratrol, no se observaron cambios en la expresión de progranulina intracelular en las células provenientes de líquido de ascitis.

Para valorar los efectos de resveratrol sobre la expresión de progranulina intracelular, así como, la viabilidad y la proliferación de las células, se realizó una determinación a las 72 horas de incubación con este compuesto. En la Figura 7A se muestra un gel representativo con la expresión de la proteína progranulina y de la proteína actina utilizada como control de carga, así como, la gráfica que incluye los datos de los cultivos de las 11 pacientes. Por otro lado, ninguna de las dosis de resveratrol utilizadas afectó la viabilidad celular (Figura 7B). Sin embargo, solo se observó una disminución en forma significativa ($p < 0.05$) de la proliferación celular con la dosis más alta (12.5 μM) de resveratrol (85.56%) al ser comparada con el 100% del control-vehículo (DMSO) en ausencia de resveratrol, ya que con la dosis de 6.25 μM (93.44%) no se encontró una diferencia significativa con respecto al vehículo (Figura 7C). Después del análisis estadístico en el cual se incluyeron los datos de las células provenientes del líquido de ascitis de las 11 pacientes, los resultados mostraron que no hubo una disminución en forma significativa de la expresión de la progranulina intracelular con ninguna de las dos dosis (6.25 y 12.5 μM) de resveratrol utilizadas.

3) La expresión de progranulina intracelular disminuyó en las células provenientes de líquido de ascitis, a las 144 horas de incubación con resveratrol.

A las 144 horas de incubación con resveratrol se realizó una segunda valoración de sus efectos sobre la expresión de progranulina intracelular, así como de la viabilidad y la proliferación celular. Una vez realizado el análisis estadístico ANOVA en donde se incluyeron los datos de las células provenientes del líquido de ascitis de 10 pacientes, ya que no se pudo realizar el cultivo de las células del líquido de ascitis de la paciente No.10 porque las células no lograron adherirse a la caja de cultivo. Los resultados mostraron un cambio en la expresión de la progranulina, la cual disminuyó en forma significativa ($p < 0.05$) con las dos concentraciones (6.25 y 12.5 μM) de resveratrol utilizadas, como se muestra en la Figura 8A. La actina, proteína utilizada como control no mostró cambios. La viabilidad celular no se vio afectada con ninguna de las dosis de resveratrol (Figura 8B). La proliferación celular con la dosis de 6.25 μM fue de 90.34% y con la dosis de 12.5 μM

fue de 77.83%, encontrando una disminución en forma significativa ($p < 0.05$) solamente con la dosis de 12.5 μM con respecto al control-vehículo (77.83 vs 100%) (Figura 8B).

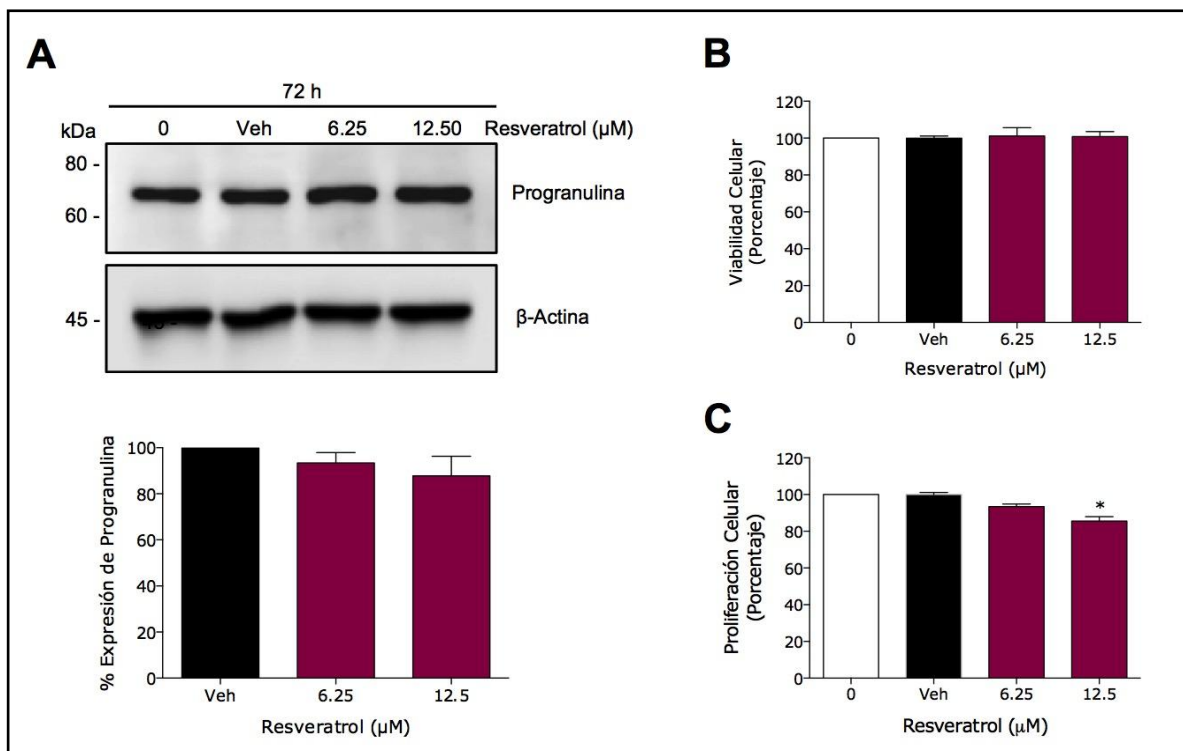


Figura 7. Expresión de progranulina intracelular después de 72 horas de incubación de las células obtenidas del líquido de ascitis de 11 pacientes con cáncer de ovario, en presencia y ausencia de resveratrol. **A)** Western blot representativo con la expresión de progranulina y actina utilizada como control interno. Además, se muestra la gráfica con los resultados después del análisis de los 11 cultivos realizados. Los resultados representan la media \pm EEM. **B)** La viabilidad celular fue determinada con el ensayo de azul tripán y **C)** La proliferación celular fue evaluada por la cuantificación de la conversión de XTT. Como prueba estadística se utilizó una ANOVA y las diferencias significativas ($p < 0.05$) están indicadas por un asterisco.

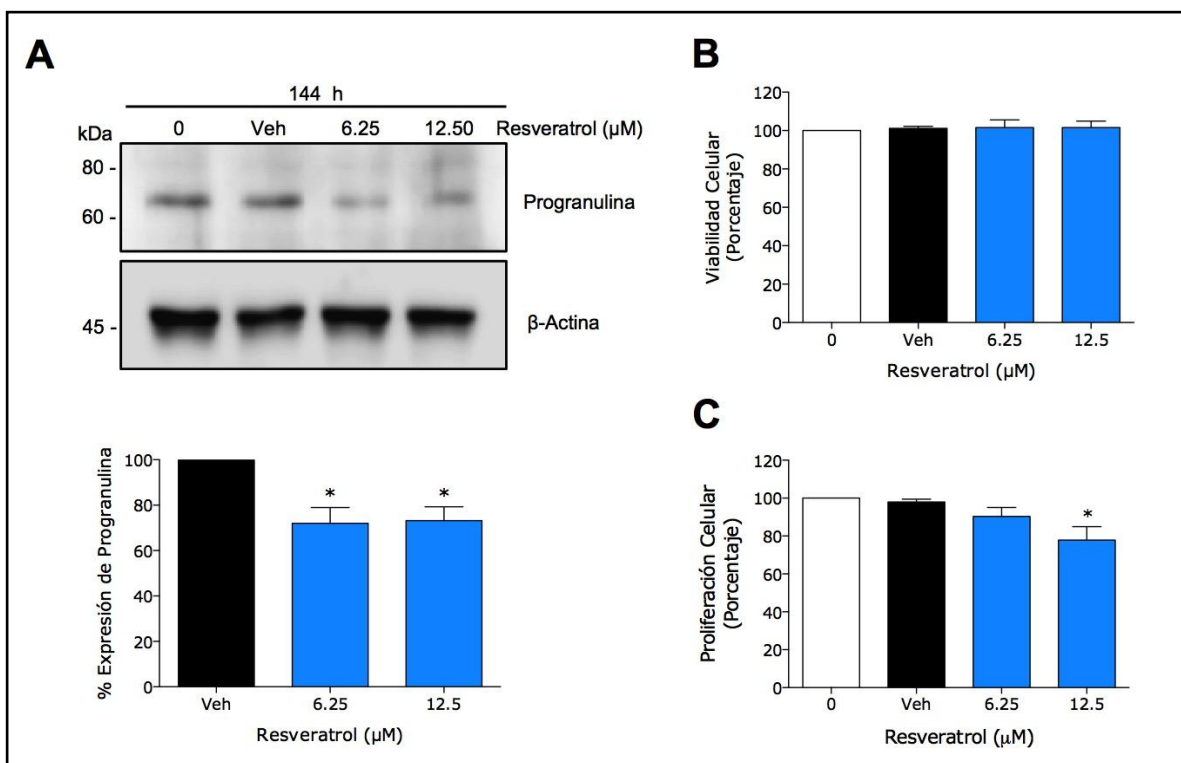


Figura 8. Expresión de progranulina intracelular después de 144 horas de incubación de las células obtenidas del líquido de ascitis de 10 pacientes con cáncer de ovario, en presencia y ausencia de resveratrol. **A)** Western blot representativo con la expresión de progranulina y actina utilizada como control interno. Además, se muestra la gráfica con los resultados después del análisis de los 10 cultivos realizados. Los resultados representan la media \pm EEM. **B)** La viabilidad celular fue determinada con el ensayo de azul tripán y **C)** La proliferación celular fue evaluada por la cuantificación de la conversión de XTT. Como prueba estadística se utilizó una ANOVA y las diferencias significativas ($p < 0.05$) están indicadas por un asterisco.

4) La progranulina secretada por las células provenientes del líquido de ascitis disminuyó en forma significativa con el tratamiento con resveratrol.

La progranulina secretada al medio de cultivo y cuantificada por la técnica de ELISA, disminuyó en forma significativa tanto a las 72 como a las 144 horas de incubación con resveratrol de las células derivadas del líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario. En la Figura 9A se observa cómo con el tratamiento de resveratrol la concentración de progranulina va disminuyendo en forma dosis dependiente en el medio condicionado de las células derivadas del líquido de ascitis de cada una de las 11 pacientes a las 72 horas y en la Figura 10A solo a 10 pacientes a las 144 horas de incubación con el compuesto. Después de haber realizado el análisis estadístico en forma grupal, encontramos la disminución en forma significativa de la concentración de

progranulina en el medio condicionado tanto a las 72 horas (Figura 9B) como a las 144 horas (Figura 10B) de tratamiento y con ambas dosis de resveratrol 6.25 μM vs vehículo = $p < 0.05$ y 12.5 μM vs vehículo = $p < 0.001$.

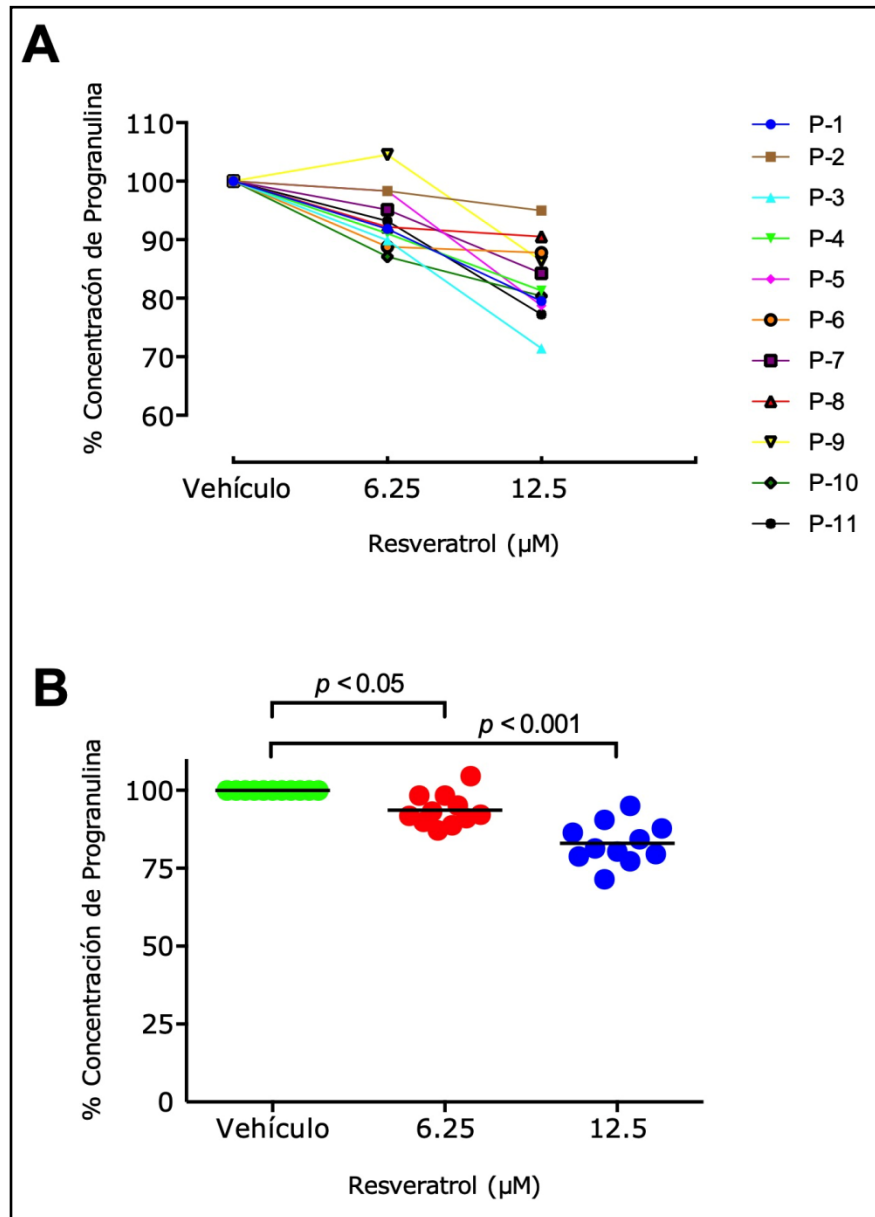


Figura 9. Porcentaje de la concentración de progranulina secretada al medio de cultivo, después de 72 horas de incubación de las células obtenidas del líquido de ascitis en ausencia o presencia de dos dosis de resveratrol. **A)** Se muestran los valores obtenidos en forma individual de los 11 cultivos realizados de las células correspondientes a cada una de las 11 pacientes (P) con cáncer de ovario. **B)** Se muestra la gráfica con el resultado en grupo después del análisis ANOVA realizado. Los resultados representan el promedio.

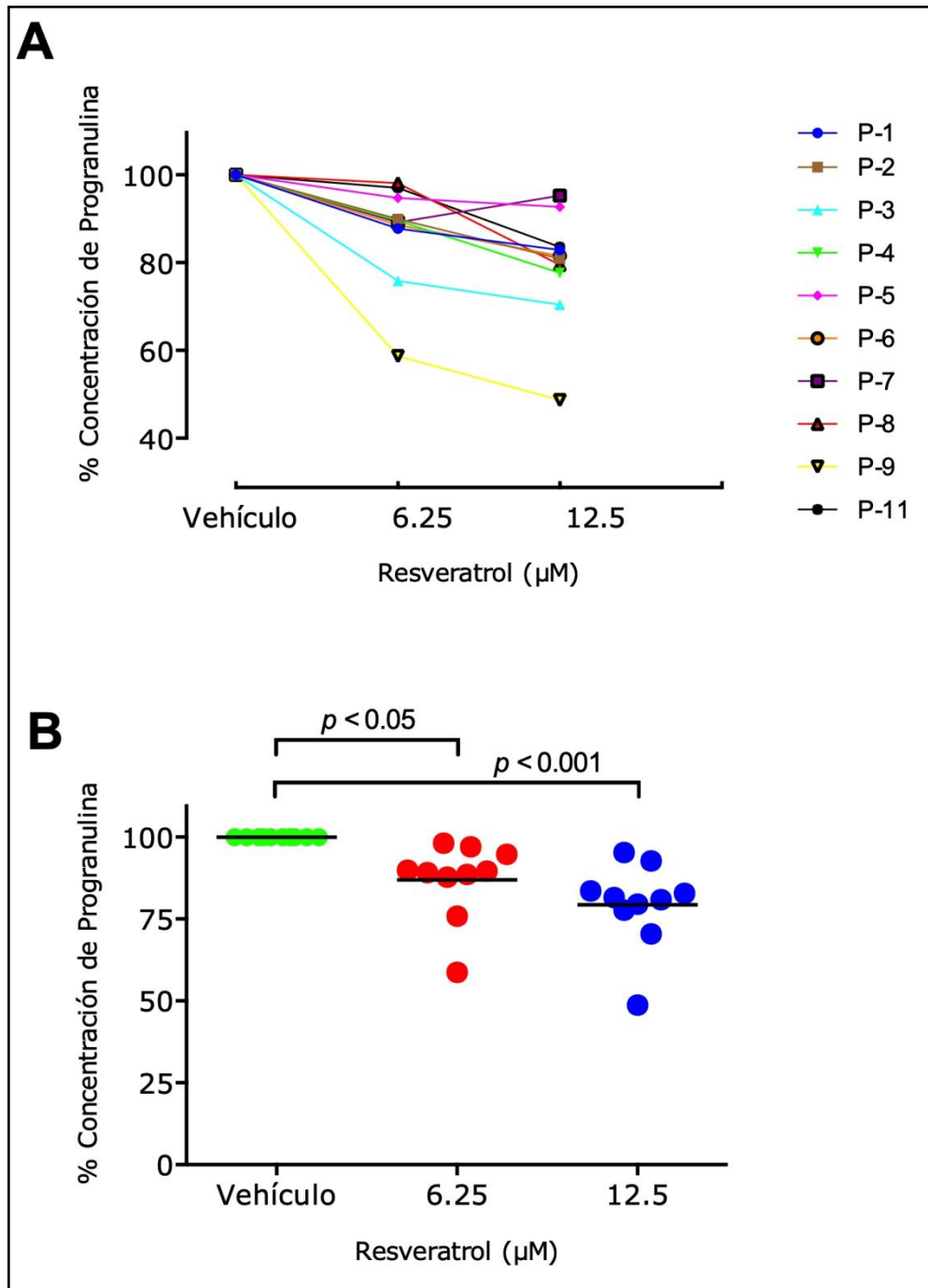


Figura 10. Porcentaje de la concentración de progranulina secretada al medio de cultivo, después de 144 horas de incubación de las células obtenidas del líquido de ascitis en ausencia o presencia de dos dosis de resveratrol. **A)** Se muestran los valores obtenidos en forma individual de los 10 cultivos realizados de las células correspondientes a cada una de las 10 pacientes (P) con cáncer de ovario. **B)** Se muestra la gráfica con el resultado en grupo después del análisis ANOVA realizado. Los resultados representan el valor promedio de las 10 pacientes.

5) La expresión de progranulina intracelular disminuyó en las líneas celulares incubadas en presencia de resveratrol.

La expresión de progranulina disminuyó en forma significativa ($p < 0.05$) a las 72 y 144 horas de tratamiento con resveratrol en ambas líneas celulares estudiadas OVCAR-3 (Figura 11A, B) y TOV-21G (Figura 12A, B). En las células TOV-21G se observaron dos bandas de expresión de progranulina una de aproximadamente 68 kDa y una menor de 50, lo cual es característico en esta línea celular. La viabilidad de las células en ambas líneas celulares no mostró cambios con las dosis de resveratrol como se muestra en las células OVCAR-3 (Figura 11C) y TOV-21G (Figura 12C). En la línea OVCAR-3 se observó una ligera disminución en la proliferación celular pero no en forma significativa ya que se presentaron valores por arriba de 90% (Figura 11D). En las células TOV-21G, una disminución en forma significativa de la proliferación celular se encontró a las 144 horas de tratamiento con resveratrol y con la dosis de 12.5 μ M (Figura 12D).

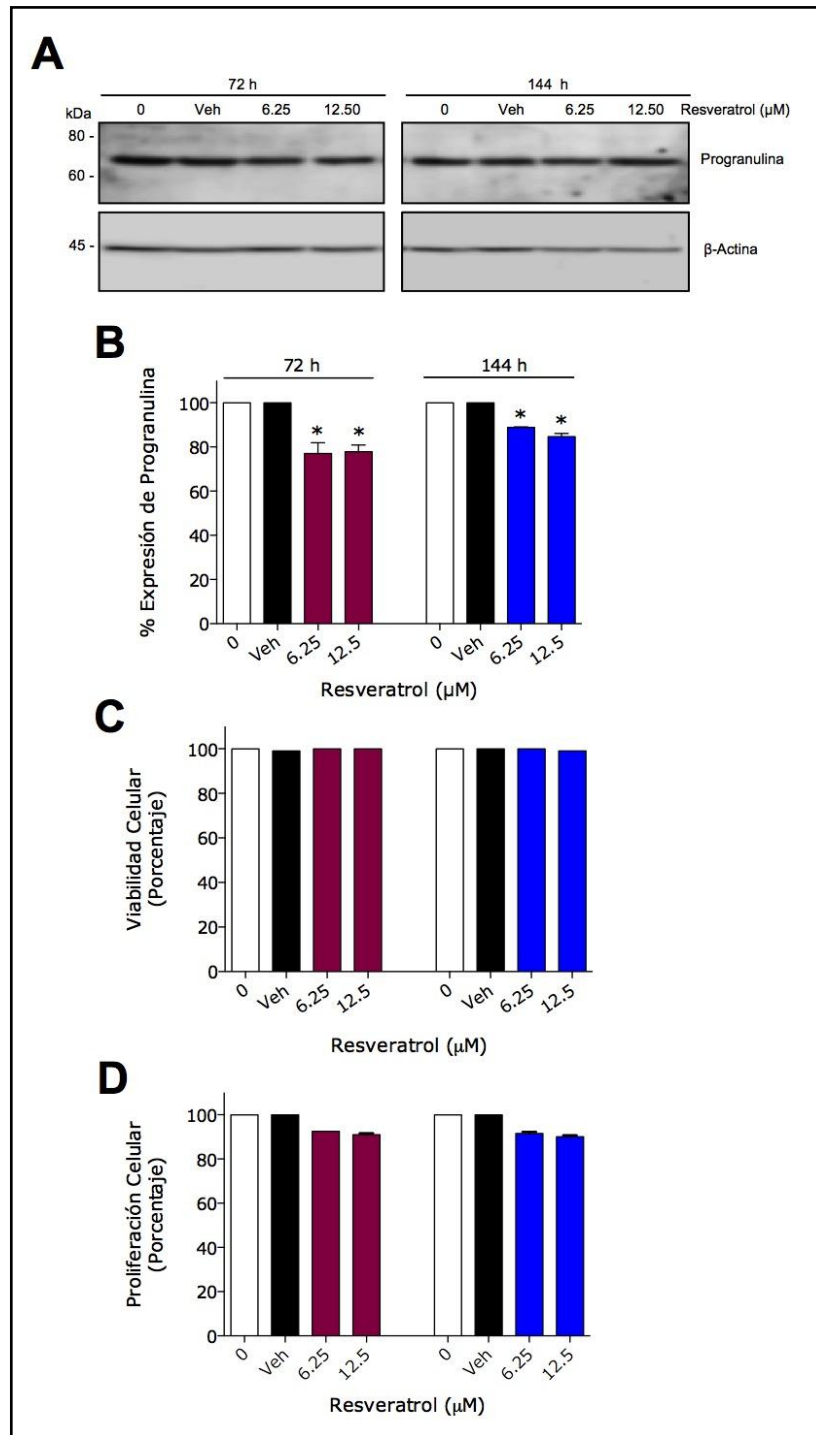


Figura 11.- Expresión de progranulina después de 72 y 144 horas de incubación de las células OVCAR-3 en presencia y ausencia de resveratrol. A) Western blot representativo con la expresión de progranulina y actina utilizada como control interno. B) Gráfica con los resultados después del análisis de 3 experimentos realizados. Los resultados representan la media \pm EEM. C) La viabilidad celular fue determinada con el ensayo de azul tripán y D) La proliferación celular fue evaluada por la cuantificación de la conversión de XTT. Como prueba estadística se utilizó una ANOVA y las diferencias significativas ($p < 0.05$) están indicadas por un asterisco. Las diferencias estadísticamente significativas están indicadas por un asterisco.

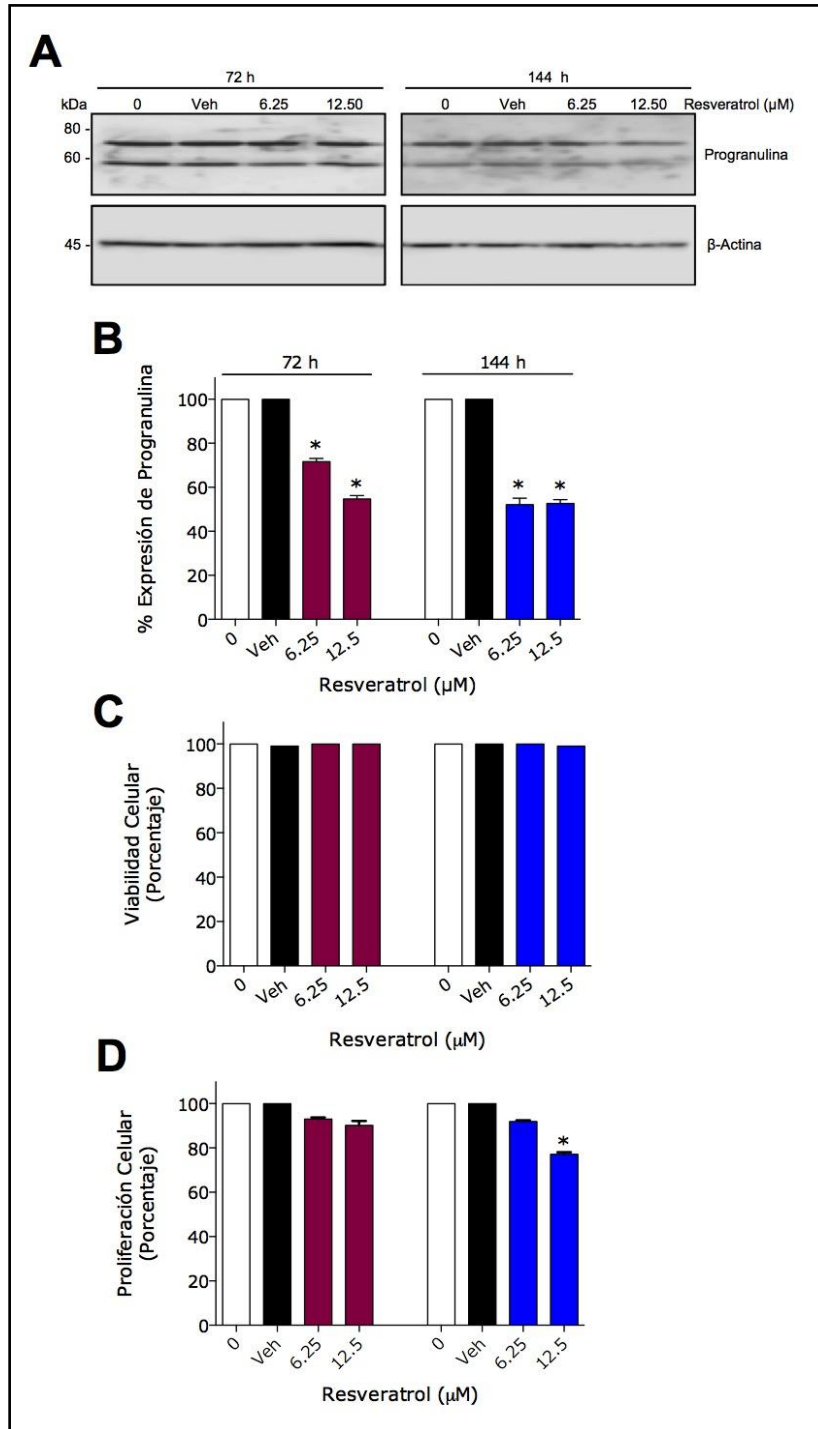


Figura 12. Expresión de progranulina después de 72 y 144 horas de incubación de las células TOV-21G en presencia y ausencia de resveratrol. A) Western blot representativo con la expresión de progranulina y actina utilizada como control interno. B) Gráfica con los resultados después del análisis de 3 experimentos realizados. Los resultados representan la media \pm EEM. C) La viabilidad celular fue determinada con el ensayo de azul tripán y D) La proliferación celular fue evaluada por la cuantificación de la conversión de XTT. Como prueba estadística se utilizó una ANOVA y las diferencias significativas ($p < 0.05$) están indicadas por un asterisco.

VII. DISCUSIÓN

La ascitis presente en cáncer de ovario es la acumulación de líquido en la cavidad abdominal o peritoneal que está constituido por células neoplásicas y no neoplásicas, además de factores de crecimiento, citocinas u otras proteínas que estimulan la supervivencia de las células y promueven la carcinogénesis ovárica (34, 35). La progranulina es un factor de crecimiento con importantes funciones en cáncer de ovario como son la proliferación, migración e invasión celular, transformación maligna y quimioresistencia, efectos que han sido valorados tanto en estudios *in vitro* e *in vivo* (26). Por sus funciones hasta el momento conocidas en esta patología sabemos que la progranulina está presente en el líquido de ascitis y pudiera estar participando en la carcinogénesis que promueve la ascitis.

En la presente tesis valoramos el efecto del resveratrol (miembro de un grupo de compuesto vegetales llamados polifenoles) (64) sobre la expresión de la progranulina intracelular en líneas celulares derivadas de tumores ováricos y en células tumorales derivadas de líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario. Además, de la cuantificación de esta proteína al ser secretada al medio de cultivo por parte de estas últimas células. Esta tesis forma parte de un proyecto en donde también se valoró la secreción al medio de cultivo de citocinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α , IL-6 e IL-8) y otros factores de crecimiento (VEGF y EGF) que se sabe están presentes en la ascitis. Esto surge como una necesidad de buscar nuevas alternativas de tratamiento para esta patología.

Previamente y con la finalidad de encontrar dosis bajas de resveratrol que no fueran tóxicas para las células, nosotros valoramos en líneas celulares derivadas de cáncer de ovario (datos no mostrados) diferentes concentraciones de resveratrol por periodos largos de incubación, de esta manera se seleccionaron las dos dosis utilizadas en el presente proyecto (6.25 y 12.5 μ M). Además, es importante mencionar que en un estudio previo no se observó toxicidad celular al utilizar estas mismas concentraciones (65). Sin embargo, para descartar nuevamente que la disminución de la expresión de la progranulina intracelular o de la secretada al medio de cultivo no fuera debido a una toxicidad del compuesto y/o como consecuencia a una muerte celular, se valoró la viabilidad celular. Se pudo observar que la viabilidad de las células fue adecuada ya que

se mantuvo por encima de un 90% (con respecto al 100% del control) en todos los cultivos por lo que descartamos que la disminución de progranulina sea debido a esto.

Los resultados del presente proyecto mostraron que después del tratamiento con resveratrol, la expresión de progranulina intracelular disminuyó en las líneas celulares OVCAR-3 y TOV-21G desde las 72 horas de tratamiento y con ambas dosis (6.25 y 12.5 μM) del compuesto y esta disminución se mantuvo a las 144 horas de tratamiento en las células OVCAR-3, pero una mayor reducción en la expresión de la progranulina se observó en las células TOV-21G (Figura 11 y 12). En las células tumorales derivadas del líquido de ascitis a las 72 horas de tratamiento con resveratrol no se observó una disminución de la expresión de progranulina, pero este efecto si se presentó a las 144 horas con ambas dosis del polifenol. A pesar de que a las 72 horas de tratamiento en las células derivadas del líquido de ascitis no hubo disminución de la expresión de progranulina intracelular, la secreción de ésta al medio de cultivo si disminuyó en forma significativa con ambas dosis de resveratrol y este efecto se mantuvo en forma similar a las 144 horas de tratamiento (Figura 7 y 8).

Por estudios previos se sabe que el resveratrol disminuye la proliferación celular de diferentes tipos de células y a través de diversos mecanismos (66). En células de cáncer de próstata se ha identificado que el resveratrol frena el ciclo celular en G/S2 lo que sugiere la inhibición de la actividad enzimática responsable de duplicación del DNA (67). En células derivadas de carcinoma nasofaríngeo se ha reportado que este compuesto puede bloquear la vía de señalización pAKT1/p70S6K y la de mTOR, las cuales participan en la inducción de proliferación celular (68, 69). En nuestro laboratorio tenemos datos (en vías de publicación) de que la activación de la vía de PI3K/AKT/mTOR participa en la regulación de la expresión de progranulina aumentando su expresión en células TOV-21G, por lo tanto, consideramos que en el presente trabajo el resveratrol pudiera estar bloqueando esta vía de señalización y ser éste un posible mecanismo por el cual disminuye la expresión de la progranulina intracelular. Sin embargo, son necesarios más estudios para establecer si la reducción de la progranulina participa en la disminución de la proliferación celular observada a las 144 horas de tratamiento con 12.5 μM de resveratrol en la línea celular TOV-21G y en las células derivadas de líquidos de ascitis a las 72 y 144 horas de tratamiento.

La reducción de la expresión de progranulina intracelular o bien la secretada al medio de cultivo pudiera estar relacionada con la disminución en la proliferación celular,

debido a que un menor número de células producen menor cantidad de proteína. No obstante, esto se pudo descartar ya que a pesar de que en las células OVCAR-3 observamos una disminución de la expresión de progranulina con ambas dosis de resveratrol y a las 72 y 144 horas de incubación no hubo disminución de la proliferación celular en forma significativa. Al igual que en las células derivadas de líquidos de ascitis, donde la progranulina disminuyó a las 144 horas de tratamiento con la dosis de 6.25 μ M de resveratrol, pero tampoco se observó una reducción de la proliferación celular. Además, es importante señalar que la proteína actina utilizada como control se mantuvo constante aún en aquellas dosis y tiempo de incubación en los que se presentó disminución de la proliferación celular.

Los datos anteriormente señalados nos hacen pensar que la disminución de la progranulina intracelular y la reducción de la progranulina secretada al medio de cultivo son producto de dos mecanismos independientes. La reducción de esta proteína de forma intracelular pudiera ser secundario al bloqueo de la vía de señalización PI3K/AKT/mTOR que produce el resveratrol y que ha sido descrito previamente en células de carcinoma nasofaríngeo (68, 69) y en células de leucemia mielocítica crónica (70). La vía de PI3K/AKT/mTOR es una de las vías que regulan la expresión de progranulina en la línea celular TOV-21G (datos no publicados, tesis de un alumno de doctorado CEPJ), sin embargo, se requieren más estudios para corroborar que el bloqueo de estas vías sea el mecanismo de su disminución intracelular en las células de cáncer de ovario. La reducción de la secreción de progranulina al medio de cultivo por el resveratrol pudiera estar asociado a otro mecanismo, ya que observamos que la secreción de progranulina por las células derivadas del líquido de ascitis se reduce sin haber una disminución de su expresión intracelular, como ya ha sido descrito para la proteína MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) (71). Una disminución en la actividad de la vía de señalización de NF- κ B producida por el resveratrol (72) pudiera estar asociada a la reducción de la secreción de proteínas al medio de cultivo por parte de macrófagos, como la reducción de la secreción de TNF- α , IL-1 β y óxido nítrico por macrófagos peritoneales de rata (73) o TNF- α por macrófagos RAW 264.7 derivados de ratón (74). Este mecanismo pudiera estar asociado en la disminución de la secreción de la progranulina al medio de cultivo por parte de las células de cáncer de ovario estudiadas en este proyecto y tratadas con resveratrol, ya que previamente se ha observado que la inhibición de NF- κ B en la línea celular HL-60 de leucemia promielocítica induce cambios en la expresión de progranulina (75), sin

embargo, se requieren futuros estudios para confirmar esta asociación en la células derivadas de cáncer de ovario.

Por los efectos conocidos de la progranulina en cáncer de ovario, su disminución intracelular y la secretada al medio de cultivo observada en las células de cáncer de ovario tratadas con resveratrol, son una evidencia más de los efectos que tiene este compuesto como anticancerígeno (64, 66, 76). Por lo tanto, estas evidencias ayudan a proponer al resveratrol como una posible alternativa de tratamiento en pacientes con ascitis y cáncer de ovario.

VIII. CONCLUSIONES

1. Las células tumorales presentes en el líquido de ascitis de pacientes con cáncer de ovario secretan el factor de crecimiento progranulina hacia este líquido.
2. El resveratrol reduce la expresión de la progranulina intracelular en las líneas celulares derivadas de tumores ováricos y en las células neoplásicas obtenidas del líquido de ascitis.
3. Las células neoplásicas derivadas del líquido de ascitis reducen la secreción de progranulina al medio de cultivo al ser tratadas con bajas dosis de resveratrol y este efecto parece ser independiente de la reducción de su expresión intracelular.
4. Los efectos del resveratrol sobre la expresión y secreción de progranulina, sugieren que este compuesto pudiera tener los mismos efectos sobre otros factores de crecimiento o citocinas presentes en el líquido de ascitis. Además, la inhibición de la expresión y secreción de progranulina pudiera representar un mecanismo en el efecto anticancerígeno del resveratrol.

IX. PERSPECTIVAS

1. El resveratrol pudiera ser una alternativa de tratamiento para tratar de frenar la carcinogénesis inducida por el líquido de ascitis en cáncer de ovario. Para corroborar esto, como una segunda fase del proyecto se pretende realizar un estudio in vivo en ratones para determinar si el efecto de este compuesto sobre la progranulina se mantiene en un modelo de cáncer de ovario y ascitis.
2. Creemos que el resveratrol en un futuro podría coadyuvar a la terapia de pacientes con cáncer de ovario para evitar una reincidencia de carcinogénesis una vez que el paciente haya tomado su ciclo de quimioterapia.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Latarjet, M y Ruiz Liard, A., Anatomía Humana, Volumen 2. 4 ed. 2008, Buenos Aires: Médica Panamericana.
2. Eynard, A.R., Valentich, R.A. and Rovasio, R.A., Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares. 4ed. 2008, Buenos Aires: Médica Panamericana.
3. Ross, M.H. y Pawlina W., Histología. Texto y Atlas con Biología Celular y Molecular. 5 ed. 2007, México: Médica Panamericana.
4. Fernández-Tresguerres J., Ariznavarreta C., Cachofeiro V., Cardinali D., Escrich E., Gil-Lozaga P., Lahera V., Mora Teruel F., Romano M, and Tamargo J. Fisiología Humana. 4 ed. 2010, Ciudad de México: McGraw-Hill Interamericana.
5. Wong AS, Auersperg N. Normal ovarian surface epithelium. *Cancer Treat Res.* 2002; 107:161-183.
6. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev.* 2001; 22:255-288.
7. Ahmed N, Thompson EW, Quinn MA. Epithelial-mesenchymal interconversions in normal ovarian surface epithelium and ovarian carcinomas: an exception to the norm. *J Cell Physiol.* 2007; 213:581-588.
8. Vergara D, Merlot B, Lucot JP et al. Epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer. *Cancer Lett.* 2010; 291:59-66.
9. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018; 68:394-424.
10. Hunn J, Rodriguez GC. Ovarian cancer: etiology, risk factors, and epidemiology. *Clin Obstet Gynecol.* 2012; 55:3-23.
11. Malvezzi M, Carioli G, Rodriguez T, Negri E, La Vecchia C. Global trends and predictions in ovarian cancer mortality. *Ann Oncol.* 2016; 27:2017-2025.
12. Gallardo-Rincón D, Cantú-de-León D, Alanís-López P et al. [Third National Ovarian Consensus. 2011. Grupo de Investigación en Cáncer de Ovario y Tumores Ginecológicos de México "GICOM"]. *Rev Invest Clin.* 2011; 63:665-702.
13. Gallardo-Rincón D, Espinosa-Romero R, Muñoz WR et al. Epidemiological overview, advances in diagnosis, prevention, treatment and management of epithelial ovarian cancer in Mexico. *Salud Publica Mex.* 2016; 58:302-308.
14. Lynch HT, Casey MJ, Snyder CL et al. Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol Oncol.* 2009; 3:97-137.
15. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers.* 2016; 2:16061.

16. Matulonis UA. Ovarian Cancer. *Hematol Oncol Clin North Am* 2018;32(6): xiii.
17. Fathalla MF. Incessant ovulation--a factor in ovarian neoplasia. *Lancet*. 1971; 2:163.
18. Fathalla MF. Incessant ovulation and ovarian cancer - a hypothesis re-visited. *Facts Views Vis Obgyn*. 2013; 5:292-297.
19. Cramer DW, Welch WR. Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst*. 1983; 71:717-721.
20. Beral V, Million WSC, Bull D, Green J, Reeves G. Ovarian cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2007; 369:1703-1710.
21. Nash MA, Ferrandina G, Gordinier M, Loercher A, Freedman RS. The role of cytokines in both the normal and malignant ovary. *Endocr Relat Cancer*. 1999; 6:93-107.
22. Witsch E, Sela M, Yarden Y. Roles for growth factors in cancer progression. *Physiology (Bethesda)*. 2010; 25:85-101.
23. Gui T, Shen K. The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol*. 2012; 36:490-496.
24. Burger RA, Brady MF, Bookman MA et al. Incorporation of bevacizumab in the primary treatment of ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2011; 365:2473-2483.
25. Ye X, Chun J. Lysophosphatidic acid (LPA) signaling in vertebrate reproduction. *Trends Endocrinol Metab*. 2010; 21:17-24.
26. Arechavaleta-Velasco F, Perez-Juarez CE, Gerton GL, Diaz-Cueto L. Progranulin and its biological effects in cancer. *Med Oncol*. 2017; 34:194.
27. Dietl J. Revisiting the pathogenesis of ovarian cancer: the central role of the fallopian tube. *Arch Gynecol Obstet*. 2014; 289:241-246.
28. Prat J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch*. 2012; 460:237-249.
29. Meinhold-Heerlein I, Fotopoulou C, Harter P et al. The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications. *Arch Gynecol Obstet*. 2016; 293:695-700.
30. Mabuchi S, Sugiyama T, Kimura T. Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. *J Gynecol Oncol*. 2016; 27: e31.
31. Nagy JA, Herzberg KT, Dvorak JM, Dvorak HF. Pathogenesis of malignant ascites formation: initiating events that lead to fluid accumulation. *Cancer Res*. 1993; 53:2631-2643.
32. Press JZ, Reyes M, Pitteri SJ et al. Microparticles from ovarian carcinomas are shed into ascites and promote cell migration. *Int J Gynecol Cancer*. 2012; 22:546-552.

33. Matte I, Lane D, Laplante C, Rancourt C, Piché A. Profiling of cytokines in human epithelial ovarian cancer ascites. *Am J Cancer Res.* 2012; 2:566-580.
34. Mills GB, May C, McGill M, Roifman CM, Mellors A. A putative new growth factor in ascitic fluid from ovarian cancer patients: identification, characterization, and mechanism of action. *Cancer Res.* 1988; 48:1066-1071.
35. Mills GB, May C, Hill M, Campbell S, Shaw P, Marks A. Ascitic fluid from human ovarian cancer patients contains growth factors necessary for intraperitoneal growth of human ovarian adenocarcinoma cells. *J Clin Invest.* 1990; 86:851-855.
36. Hu YL, Tee MK, Goetzl EJ et al. Lysophosphatidic acid induction of vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *J Natl Cancer Inst.* 2001; 93:762-768.
37. Santin AD, Hermonat PL, Ravaggi A, Cannon MJ, Pecorelli S, Parham GP. Secretion of vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 1999; 0:177-181.
38. Prat J, FIGO COGO. FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J Gynecol Oncol.* 2015; 26:87-89.
39. Monk BJ, Pujade-Lauraine E, Burger RA. Integrating bevacizumab into the management of epithelial ovarian cancer: the controversy of front-line versus recurrent disease. *Ann Oncol.* 2013;24 Suppl 10:x53-x58.
40. Aggarwal BB, Bhardwaj A, Aggarwal RS, Seeram NP, Shishodia S, Takada Y. Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies. *Anticancer Res.* 2004; 24:2783-2840.
41. Vang O. What is new for resveratrol? Is a new set of recommendations necessary. *Ann N Y Acad Sci.* 2013; 1290:1-11.
42. Opipari AW, Tan L, Boitano AE, Sorenson DR, Aurora A, Liu JR. Resveratrol-induced autophagocytosis in ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64:696-703.
43. Jang JH, Surh YJ. Protective effects of resveratrol on hydrogen peroxide-induced apoptosis in rat pheochromocytoma (PC12) cells. *Mutat Res.* 2001; 496:181-190.
44. Niles RM, McFarland M, Weimer MB, Redkar A, Fu YM, Meadows GG. Resveratrol is a potent inducer of apoptosis in human melanoma cells. *Cancer Lett.* 2003; 190:157-163.
45. Lin C, Crawford DR, Lin S et al. Inducible COX-2-dependent apoptosis in human ovarian cancer cells. *Carcinogenesis.* 2011; 32:19-26.
46. Cao Z, Fang J, Xia C, Shi X, Jiang BH. trans-3,4,5'-Trihydroxystibene inhibits hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor expression in human ovarian cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2004; 10:5253-5263.

47. Vergara D, Simeone P, Toraldo D et al. Resveratrol downregulates Akt/GSK and ERK signalling pathways in OVCAR-3 ovarian cancer cells. *Mol Biosyst.* 2012; 8:1078-1087.
48. Bellaver B, Souza DG, Souza DO, Quincozes-Santos A. Resveratrol increases antioxidant defenses and decreases proinflammatory cytokines in hippocampal astrocyte cultures from newborn, adult and aged Wistar rats. *Toxicol In Vitro.* 2014; 28:479-484.
49. Díaz-Cueto L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM, Gerton GL. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). *Dev Biol.* 2000; 217:406-418.
50. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J of Histochemistry Cytochemistry.* 2000; 48:999-1009.
51. He Z, Ong CHP, Halper J, Bateman A. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nature medicine.* 2003; 9:225-229.
52. Tang W, Lu Y, Tian QY et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science.* 2011; 332:478-484.
53. Toh H, Chitramuthu BP, Bennett HP, Bateman A. Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond. *J Mol Neurosci.* 2011; 45:538-548.
54. Feng JQ, Guo FJ, Jiang BC, Zhang Y, Frenkel S. Granulin epithelin precursor: a bone morphogenic protein 2-inducible growth factor that activates Erk1/2 signaling and JunB transcription factor in chondrogenesis. *The FASEB Journal.* 2010; 24:1879-1892.
55. Abella V, Pino J, Scotece M et al. Progranulin as a biomarker and potential therapeutic agent. *Drug Discov Today.* 2017; 22:1557-1564.
56. Kao AW, McKay A, Singh PP, Brunet A, Huang EJ. Progranulin, lysosomal regulation and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci.* 2017; 18:325-333.
57. Cuevas-Antonio R, Cancino C, Arechavaleta-Velasco F et al. Expression of progranulin (Acrogranin/PCDGF/Granulin-Epithelin Precursor) in benign and malignant ovarian tumors and activation of MAPK signaling in ovarian cancer cell line. *Cancer Invest.* 2010; 28:452-458.
58. Pizarro GO, Zhou XC, Koch A et al. Prosurvival function of the granulin-epithelin precursor is important in tumor progression and chemoresponse. *Int J Cancer.* 2007; 120:2339-2343.
59. Miyanishi M, Mandai M, Matsumura N et al. Immortalized ovarian surface epithelial cells acquire tumorigenicity by Acrogranin gene overexpression. *Oncol Rep.* 2007; 17:329-333.

60. Jones MB, Michener CM, Blanchette JO et al. The granulin-epithelin precursor/PC-cell-derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9:44-51.
61. Kamrava M, Simpkins F, Alejandro E, Michener C, Meltzer E, Kohn EC. Lysophosphatidic acid and endothelin-induced proliferation of ovarian cancer cell lines is mitigated by neutralization of granulin-epithelin precursor (GEP), a prosurvival factor for ovarian cancer. *Oncogene.* 2005; 24:7084-7093.
62. Kipps E, Tan DS, Kaye SB. Meeting the challenge of ascites in ovarian cancer: new avenues for therapy and research. *Nat Rev Cancer.* 2013; 13:273-282.
63. Thériault BL, Portelance L, Mes-Masson AM, Nachtigal MW. Establishment of primary cultures from ovarian tumor tissue and ascites fluid. *Methods Mol Biol.* 2013; 1049:323-336.
64. Ko JH, Sethi G, Um JY et al. The Role of Resveratrol in Cancer Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;18.
65. Gambini J, Inglés M, Olaso G et al. Properties of Resveratrol: In Vitro and In Vivo Studies about Metabolism, Bioavailability, and Biological Effects in Animal Models and Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2015; 2015:837042.
66. Tomé-Carneiro J, Larrosa M, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA, García-Conesa MT, Espín JC. Resveratrol and clinical trials: the crossroad from in vitro studies to human evidence. *Curr Pharm Des.* 2013; 19:6064-6093.
67. Hsieh TC, Wu JM. Differential effects on growth, cell cycle arrest, and induction of apoptosis by resveratrol in human prostate cancer cell lines. *Exp Cell Res.* 1999; 249:109-115.
68. Zhang M, Zhou X, Zhou K. Resveratrol inhibits human nasopharyngeal carcinoma cell growth via blocking pAkt/p70S6K signaling pathways. *Int J Mol Med.* 2013; 31:621-627.
69. Cai Y, Zhao L, Qin Y, Zhang M, He Y. Resveratrol inhibits proliferation and induces apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cell line C666-1 through AMPK activation. *Pharmazie.* 2015; 70:399-403.
70. Sui T, Ma L, Bai X, Li Q, Xu X. Resveratrol inhibits the phosphatidylinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway in the human chronic myeloid leukemia K562 cell line. *Oncol Lett.* 2014; 7:2093-2098.
71. Cullen JP, Morrow D, Jin Y et al. Resveratrol, a polyphenolic phytoestrogen, inhibits endothelial monocyte chemoattractant protein-1 synthesis and secretion. *J Vasc Res.* 2007; 44:75-84.
72. Ren Z, Wang L, Cui J et al. Resveratrol inhibits NF- κ B signaling through suppression of p65 and I κ B kinase activities. *Pharmazie.* 2013; 68:689-694.
73. Ma ZH, Ma QY, Wang LC, Sha HC, Wu SL, Zhang M. Effect of resveratrol on NF- κ B activity in rat peritoneal macrophages. *Am J Chin Med.* 2006; 34:623-630.

74. Palacz-Wrobel M, Borkowska P, Paul-Samojedny M et al. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the gene expression and protein secretion of tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and interleukin-10 (IL-10) in RAW-264.7 macrophages. *Biomed Pharmacother.* 2017; 93:1205-1212.
75. Ong CH, He Z, Kriazhev L, Shan X, Palfree RG, Bateman A. Regulation of progranulin expression in myeloid cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 291: R1602-12.
76. Han Y, Jo H, Cho JH, Dhanasekaran DN, Song YS. Resveratrol as a Tumor-Suppressive Nutraceutical Modulating Tumor Microenvironment and Malignant Behaviors of Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019; 20.