



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE PROGRANULINA**

**EN CÁNCER DE OVARIO DE CÉLULAS CLARAS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**M. EN C. PÉREZ JUÁREZ CARLOS EDUARDO**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO**

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, IMSS

**COMITÉ TUTOR: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA**

FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

**DR. RAFAEL CAMACHO CARRANZA**

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM

**CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., SEPTIEMBRE, 2020**



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/492/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

**M. en C. Ivonne Ramírez Wence**  
**Directora General de Administración Escolar, UNAM**  
**P r e s e n t e**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **11 de noviembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **PÉREZ JUÁREZ CARLOS EDUARDO** con número de cuenta **511012363** con la tesis titulada **“VÍAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑAL QUE REGULAN LA EXPRESIÓN DE PROGRANULINA EN CÁNCER DE OVARIO DE CÉLULAS CLARAS”**, realizada bajo la dirección de la **DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
Vocal: DR. MAURICIO SALCEDO VARGAS  
Secretario: DRA. ERIKA PATRICIA RENDÓN HUERTA  
Suplente: DR. MARIO VEGA PAREDES  
Suplente: DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA

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

**A T E N T A M E N T E**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 21 de agosto de 2020

**COORDINADOR DEL PROGRAMA**



**DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA**



## **AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por la excelencia académica que ofrece en su programa de Doctorado.

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

Al Fondo de Investigación en Salud del Instituto Mexicano del Seguro Social por el apoyo financiero al proyecto para la realización de esta tesis de doctorado (N° de registro: R-2015-785-030, FIS/IMSS/PROT/G15/1464) y a la Coordinación de Investigación en Salud, IMSS, por la beca otorgada (matrícula de becario: 99095927).

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

A la Dra. Erika Patricia Rendón Huerta, profesora titular B de la Facultad de Medicina (UNAM) y al Dr. Rafael Camacho Carranza, Investigador Titular A del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) por haber conformado el comité tutor.

## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A la Dra. Laura Díaz Cueto por darme la oportunidad de realizar este trabajo de investigación bajo su asesoría, por su invaluable apoyo, por su enorme paciencia y sobre todo por todos sus conocimientos compartidos, no solo durante el doctorado sino durante mi formación profesional ya que ella ha estado presente en cada paso. Por ser un excelente ser humano y por la admiración enorme que me merece ¡Gracias Dra.!. De igual manera, al Dr. Fabián Arechavaleta Velasco por su inigualable forma de enseñarme, por la valiosa ayuda que me ha brindado en todo este camino y por su gran amistad.

A Claudia Cruz Campa, por su paciencia y comprensión, por su apoyo incondicional y sobre todo por su amor y amistad que se convirtieron en un impulso para mejorar muchos aspectos de mi vida. ¡Gracias Claudia “TE AMO”!.

Quiero agradecer también al Dr. Pablo Domínguez López por su constante ayuda, pero sobre todo por su grandiosa amistad.

A mis padres, la señora Jovita Juárez León y el señor Carlos Pérez Blancas, por su apoyo, sus enseñanzas, su educación y por el amor que han impactado mi vida tan grata y positivamente, los amo.

A la Dra. Erika Rendón Huerta y al Dr. Rafael Camacho Carranza por guiarme, aconsejarme y motivarme cada semestre durante los exámenes tutorales.

## DEDICATORIA

*A mis familiares: Josefina Pérez, Guillermo Villegas y Rafael González.*

# ÍNDICE

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS ABREVIATURAS

<b>1</b>	<b>RESUMEN .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>ABSTRACT .....</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1</b>	<b>LA PROGRANULINA.....</b>	<b>5</b>
3.1.1	Identificación y expresión de la progranulina.....	5
3.1.2	Estructura de la progranulina .....	7
3.1.3	Función y regulación de la expresión de progranulina .....	9
3.1.4	La progranulina y el cáncer de ovario.....	12
<b>3.2</b>	<b>CÁNCER DE OVARIO .....</b>	<b>14</b>
3.2.1	Síntomas y detección del cáncer de ovario .....	16
3.2.2	Factores de riesgo y prevención del cáncer de ovario.....	18
3.2.3	Clasificación del cáncer de ovario.....	21
3.2.4	Tratamiento para el cáncer de ovario .....	34
<b>3.3</b>	<b>Vías de transducción de señal oncogénicas utilizadas como blancos terapéuticos en cáncer de ovario.....</b>	<b>36</b>
3.3.1	Vía de transducción de señal de PI3K y cáncer de ovario .....	36
3.3.2	Vía de transducción de señal de MAPK y cáncer de ovario .....	39
3.3.3	Vía de transducción de señal de PKA y cáncer de ovario.....	41
<b>4</b>	<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Objetivos particulares .....</b>	<b>44</b>
<b>6</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>METODOLOGÍA .....</b>	<b>45</b>
<b>7.1</b>	<b>TIPO DE ESTUDIO .....</b>	<b>45</b>
<b>7.2</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>45</b>
7.2.1	Línea Celular .....	45
7.2.2	Inhibidores farmacológicos de las vías de transducción de señal.....	46
7.2.3	Inductor de la expresión de HIF-1 $\alpha$ .....	46
<b>7.3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
7.3.1	Cultivo celular.....	47
7.3.2	Ensayos celulares e inhibición de las vías de transducción de señal.....	47
7.3.3	Ensayo celular e inducción de hipoxia química .....	48
7.3.4	Extracción de proteínas .....	48
7.3.5	Cuantificación de proteínas .....	48
7.3.6	Técnica de Western blot.....	49
7.3.7	Ensayo de proliferación celular .....	51
7.3.8	Ensayo de citotoxicidad .....	51
7.3.9	Análisis estadístico .....	52

<b>8</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>53</b>
<b>8.1</b>	<b>Efecto del inhibidor GDC-0941 en la expresión de la progranulina en las células TOV-21G..</b>	<b>53</b>
<b>8.2</b>	<b>Inhibición de la actividad de mTOR y su efecto en la expresión de la progranulina en las células TOV-21G .....</b>	<b>54</b>
<b>8.3</b>	<b>Efecto de la hipoxia inducida por cloruro de cobalto y altas concentraciones de HIF-1<math>\alpha</math> en la regulación de la expresión de la progranulina .....</b>	<b>55</b>
<b>8.4</b>	<b>Inhibición de la fosforilación de ERK1/2 y su efecto en la regulación de la expresión de la progranulina .....</b>	<b>56</b>
<b>8.5</b>	<b>Efecto del inhibidor de JNK (SP-600125) en la expresión de la progranulina .....</b>	<b>57</b>
<b>8.6</b>	<b>Efecto de la Inhibición de PKA en la expresión de progranulina .....</b>	<b>58</b>
<b>8.7</b>	<b>Efectos de la combinación de los inhibidores de PI3K/mTOR más MEK1/ERK1/2 y MAPK/JNK sobre la reducción de la expresión de la progranulina .....</b>	<b>59</b>
<b>9</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>61</b>
<b>10</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>69</b>
<b>11</b>	<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>70</b>
<b>12</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>71</b>
<b>13</b>	<b>ANEXO 1.....</b>	<b>82</b>
	<b>(Artículo requisito para la obtención del grado) .....</b>	<b>82</b>
<b>14</b>	<b>ANEXO 2.....</b>	<b>91</b>
	<b>(Artículo de revisión) .....</b>	<b>91</b>



## LISTAS DE FIGURAS Y TABLAS

<b>Figura 1.</b> Expresión de la progranulina en cáncer .....	7
<b>Figura 2.</b> Estructura de la progranulina .....	9
<b>Figura 3.</b> Tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de ovario por raza y etnia en EUA .....	16
<b>Figura 4.</b> Principales tipos de carcinomas ováricos .....	22
<b>Figura 5.</b> Diagrama de flujo de los módulos de MAPK .....	41
<b>Figura 6.</b> Micrografías de la línea celular TOV-21G derivada de un carcinoma de ovario de células claras. ....	45
<b>Figura 7.</b> Inhibición de la expresión de progranulina en las células TOV-21G con el inhibidor GDC-0941 .....	54
<b>Figura 8.</b> Expresión de progranulina en las células TOV-21G en presencia del inhibidor Rapamicina. ....	55
<b>Figura 9.</b> Expresión de HIF-1 $\alpha$ y la progranulina en las células TOV-21G bajo condiciones hipóxicas. ....	56
<b>Figura 10.</b> Disminución de la expresión de progranulina en las células TOV-21G con el inhibidor PD-98059 .....	57
<b>Figura 11.</b> Inhibición de JNK reduce los niveles de progranulina en las células TOV-21G .....	58
<b>Figura 12.</b> Inhibición de la expresión de la progranulina en las células TOV-21G con el inhibidor H89 .....	59
<b>Figura 13.</b> Valoración de un efecto aditivo en el porcentaje de reducción de la expresión de la progranulina con la combinación de las dosis más altas de los diferentes inhibidores de vías de señalización en las células TOV-21G .....	60
<b>Figura 14.</b> Esquema de la inhibición de las vías de señalización y su relación con la regulación de la expresión de la progranulina en las células TOV-21G. ....	68
<b>Tabla 1.</b> Epidemiología del cáncer de ovario, comparación de la incidencia y mortalidad a nivel mundial, en EUA y en México. ....	15
<b>Tabla 2.</b> Principales pruebas de detección de cáncer de ovario.....	18
<b>Tabla 3.</b> Clasificación de los carcinomas ováricos epiteliales y sus características epidemiológicas, clínicas, histológicas y moleculares. ....	22
<b>Tabla 4.</b> Características moleculares de los carcinomas ováricos de células claras y sus efectos celulares.....	29
<b>Tabla 5.</b> Estadificación del cáncer de ovario de acuerdo con la FIGO (2014) y la correspondiente clasificación TNM. Adaptada de las referencias [95, 138]. ....	32
<b>Tabla 6.</b> División de los carcinomas ováricos y sus características clinicopatológicas y moleculares.....	34
<b>Tabla 7.</b> Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la identificación de las proteínas por la técnica de western blot.....	50

## ABREVIATURAS

Cinasa dependiente de fosfatidilinositol-3	PI3K
17 $\beta$ -estradiol	E2
Ácido bicinconínico	BCA
Ácido desoxirribonucleico	DNA
Ácido holotransretinoico	ATRA
Ácido lisofosfatídico	LPA
Ácido ribonucleico mensajero	mRNA
Adenosina monofosfato cíclico	cAMP
Administración de alimentos y medicamentos	FDA
Albumina sérica bovina	BSA
Antígeno de Cáncer 125	CA-125
Buffer salino de fosfatos	PBS
Carcinoma de Células Claras	CCC
Carcinoma Intraepitelial Tubárico Seroso	STIC
Carcinoma Seroso de Alto Grado	HGSC
Carcinoma Seroso de Bajo Grado	LGSC
Catenina 1 beta	CTNNB1
Catepsina L	Cat L
Células endoteliales de la microvasculatura dérmica	HMVEC
Células endoteliales de la vena umbilical	HUVEC
Ciclina D1	CCND1
Ciclina E1	CCNE1
Cinasa 1 de la proteína ribosómica S6, p70S6K	S6K1
Cinasa 12 dependiente de ciclina	CDK12
Proteínas cinasas activadas por mitógenos	MAPK
Cinasa de amino (N)-terminal de c-Jun/proteína cinasa activada por estrés	JNK/SAPK
Cinasa de la proteína ribosomal S6	RSK
Cinasa dependiente de fosfoinositido	PDK
Cinasa hepática B1	LKB1
Cinasa similar a Nemo	NLK
Comité Colectivo Americano del Cáncer	AJCC
Complejo 2 de esclerosis tuberosa	TSC2
Demencia frontotemporal	FTLD
Diana de mamíferos para rapamicina	mTOR
Ditiotreitól	DTT
Dominio 1A de interacción rico en AT	ARID1A
Dulbecco's Modified Eagle's Medium	DMEM
Elemento de respuesta a estrógenos	ERE
Elemento de respuesta para el ácido retinoico	RARE
Endotelina 1	ET-1
Epitelio de Superficie Ovárica	OSE
Epitelio de superficie ovárica inmortalizado	IOSE
Error estándar	SEM
Estados Unidos de América	EUA

Factor de Crecimiento Derivado de Células PC	PCDGF
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF- $\alpha$
Factor inducible por hipoxia	HIF
Factor intercambiador de nucleótido guanina	GEF
Factor nuclear de hepatocito 1 beta	HNF-1 $\beta$
Federación internacional de Ginecología y Obstetricia	FIGO
Fluoruro de polivinilideno	PVDF
Forbol-12-miristato-13-acetato	PMA
Fosfatasa tipo II de inositol polifosfato 4	INPP4B
Gen de cáncer de mama	BRCA
Gen supresor de Wilm	WT1
Glicoproteína 88	GP88
Guanosina difosfato	GDP
Guanosina trifosfato	GTP
Homólogo de fosfatasa y tensina	PTEN
Interleucina 6	IL-6
Lactato deshidrogenasa	LDH
Lipoproteína de alta densidad/apolipoproteína A-I	HDL/Apo-I
Metaloproteinasa de matriz	MMP
Múltiples dominios 3 Cub y Sushi	CSMD3
Neurofibromina 1	NF1
Organización Mundial de la Salud	OMS
Precursor de granulinas/epitelinas	GEP
Proepitelina	PEPI
Progranulina	PGRN
Proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción eucariótica 4E	4E-BP1
Proteína 2 de unión a receptor de factor de crecimiento	Grb2
Proteína 4 de epídidimo humano	HE4
Proteína cinasa asociada a muerte	DAPK
Proteína cinasa C	PKC
Proteína cinasa regulada por señal extracelular	ERK
Proteína codificada por el oncogén homólogo a v-akt de timoma	AKT
Proteína inhibidora de proteasas secretada por leucocitos	SLPI
Proteína intercambiadora activada por cAMP	EPAC
Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico	HER2
Receptor 2 tipo A de efrina	EPHA2
Receptor acoplado a proteínas G	GPCR
Receptor con actividad de cinasa de tirosinas	RTK
Receptor de estrógenos	ER
Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos	MET
Receptor del factor de necrosis tumoral	TNFR
Retinoblastoma 1	RB1
Síndrome de cáncer colorectal hereditario sin poliposis,	HNPCC
Subunidad alfa 6 del receptor del ácido gama-aminobutírico	GABRA6
Subunidad catalítica alfa de PI3K	PI3CA

Suero fetal de bovino  
Terapia de reemplazo hormonal  
Transductor de señal y activador de transcripción 3  
Una desintegrina, metaloproteinasa con motivos de  
trombospondina 7

SFB  
HRT  
STAT-3  
ADAMTS-7

# 1 RESUMEN

**Antecedentes:** 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 el segundo lugar de mortalidad de los cánceres ginecológicos. La regulación de la expresión de nuevas proteínas relacionadas con la patogénesis del cáncer de ovario debe explorarse para evaluar su importancia como blancos terapéuticos o biomarcadores en esta malignidad. La progranulina es un factor de crecimiento que se encuentra sobre-expresado en esta patología y participa en la estimulación de la proliferación e invasión celular, la quimioresistencia y reducción de la supervivencia total. Su alta expresión y sus funciones en el cáncer de ovario podrían estar relacionadas con las vías de transducción de señales oncogénicas que tienen un papel esencial en la progresión de este tipo de cáncer. En la presente tesis, exploramos la relación de la vía de la cinasa dependiente de fosfatidilinositol-3 (PI3K/AKT/mTOR), la vía de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK), las subfamilias de cinasas reguladas por señal extracelular (ERK1/2) y la cinasa de amino (N)-terminal de c-Jun (JNK), así como el factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF-1 $\alpha$ ) y la proteína cinasa A (PKA) en la regulación de la expresión de la progranulina en la línea celular TOV-21G derivada del subtipo histológico de carcinoma de ovario de células claras.

**Métodos:** Las células TOV-21G fueron incubadas en presencia de diferentes concentraciones de los inhibidores específicos de las vías de transducción de señal y cloruro de cobalto como inductor de hipoxia. Se utilizaron los inhibidores GDC-0941 para PI3K, rapamicina para mTOR, PD-98059 para MEK1/ERK1/2, SP-600125 para JNK y H89 para PKA. Después de 24 y 48 horas de incubación y por medio de la técnica de Western Blot se valoró la expresión de la progranulina y de las proteínas de las vías de señalización. Incubaciones con combinaciones de los inhibidores también fueron realizadas. La proliferación celular y la viabilidad se analizaron con cada una de las concentraciones de los inhibidores utilizados.

**Resultados:** Nuestro estudio reveló que la inhibición de las vías de transducción de señal con potencial oncogénico PI3K/AKT/mTOR, MEK1/ERK1/2 y JNK reducen significativamente la expresión de la progranulina en un 30% en las células TOV-21G. Por lo tanto, participan en la regulación de la expresión de la progranulina. El aumento del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  no abajó de mTOR después de la incubación de las células con cloruro cobalto no produjo cambios en la expresión de la progranulina. La inhibición de la vía de PKA tampoco modificó la expresión de la progranulina. La combinación de dos inhibidores, GDC-0941 más rapamicina, no aumentó la reducción de la progranulina en comparación con el tratamiento con un solo compuesto.

Las combinaciones de GDC-0941 más PD-98059, y GDC-0941 más SP-600125 dieron como resultado una ligera respuesta aditiva en la reducción de los niveles de la progranulina del 15% y 5% respectivamente.

**Conclusión:** La inhibición de estas importantes vías oncogénicas se encuentra actualmente en diferentes etapas de estudios clínicos, ya sea como agentes únicos o en combinación con la terapia convencional para pacientes con cáncer de ovario. Por lo tanto, la respuesta de la progranulina a los inhibidores farmacológicos sugiere que podría ser un biomarcador para evaluar la efectividad terapéutica después de la inhibición de PI3K, mTOR, ERK1/2 y JNK en ensayos preclínicos y clínicos para el carcinoma de ovario de células claras.

## 2 ABSTRACT

**Background:** Ovarian cancer is the eighth most common malignancy among women, and the second leading cause of cancer death among women with gynecological malignancies worldwide. Regulation of new protein expression related to ovarian cancer pathogenesis needs to be studied to determine—their significance as therapeutic targets or biomarkers in this malignancy. Progranulin is a growth factor overexpressed in this pathology with participation in the stimulation of cell proliferation, invasion, chemoresistance, and shortened overall survival. High levels of progranulin in ovarian cancer could be related to oncogenic signal transduction pathways, which have an essential role in the progression of this cancer. In the present thesis, we explored the relation of phosphatidylinositol-3-kinase pathway (PI3K/AKT/mTOR), mitogen-activated protein kinases (MAPK) subfamilies extracellular signal-regulated kinases (ERK1/2) and c-Jun N-terminal kinase (JNK) as well as hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1 alpha) and the protein kinase A (PKA) in progranulin expression regulation in the TOV-21G cell line derived from clear cell ovarian tumor subtype.

**Methods:** Different concentrations of specific inhibitors of the signal transduction pathways and cobalt chloride as hypoxia inducers were added to the TOV-21G cell. GDC-0941 inhibitor for PI3K, rapamycin for mTOR, PD-98059 for MEK1/ERK1/2, SP-600125 for JNK and H89 for PKA. After 24 and 48 hours of incubation, progranulin and signaling proteins expression were analyzed by western blotting technique. Inhibitors combinations also were performed. Cell proliferation and viability were analyzed with each inhibitor concentrations.

**Results:** Our study revealed that inhibition of signal transduction pathways with oncogenic potential PI3K/AKT/mTOR, ERK1/2, and JNK reduces 30% progranulin expression in the TOV-21G cells in significantly form. Therefore, they are participating in progranulin expression regulation. The mTOR downstream increased transcription factor HIF-1 $\alpha$  after cobalt chloride-cells incubation did not produce changes in progranulin expression. Neither, PKA pathway inhibition modified the expression of progranulin. Combination of two inhibitors GDC-0941 plus rapamycin, not increased progranulin reduction compared to single-agent treatment. GDC-0941 and PD-98059 and GDC-0941 plus SP-600125 combinations did result in a slight additive response 15% and 5% respectively in progranulin levels reduction.

**Conclusion:** The inhibition of these critical oncogenic pathways is currently in different stages of clinical studies, either as single agents or in combinations with conventional therapy for patients with ovarian cancer. Therefore, the response of progranulin to pharmacological inhibitors

suggests that it could be a biomarker to assess therapeutic effectiveness after inhibition of PI3K, mTOR, ERK1/2, and JNK in preclinical and clinical trials for clear cell ovarian carcinoma.



## **3 INTRODUCCIÓN**

### **3.1 LA PROGRANULINA**

#### **3.1.1 Identificación y expresión de la progranulina**

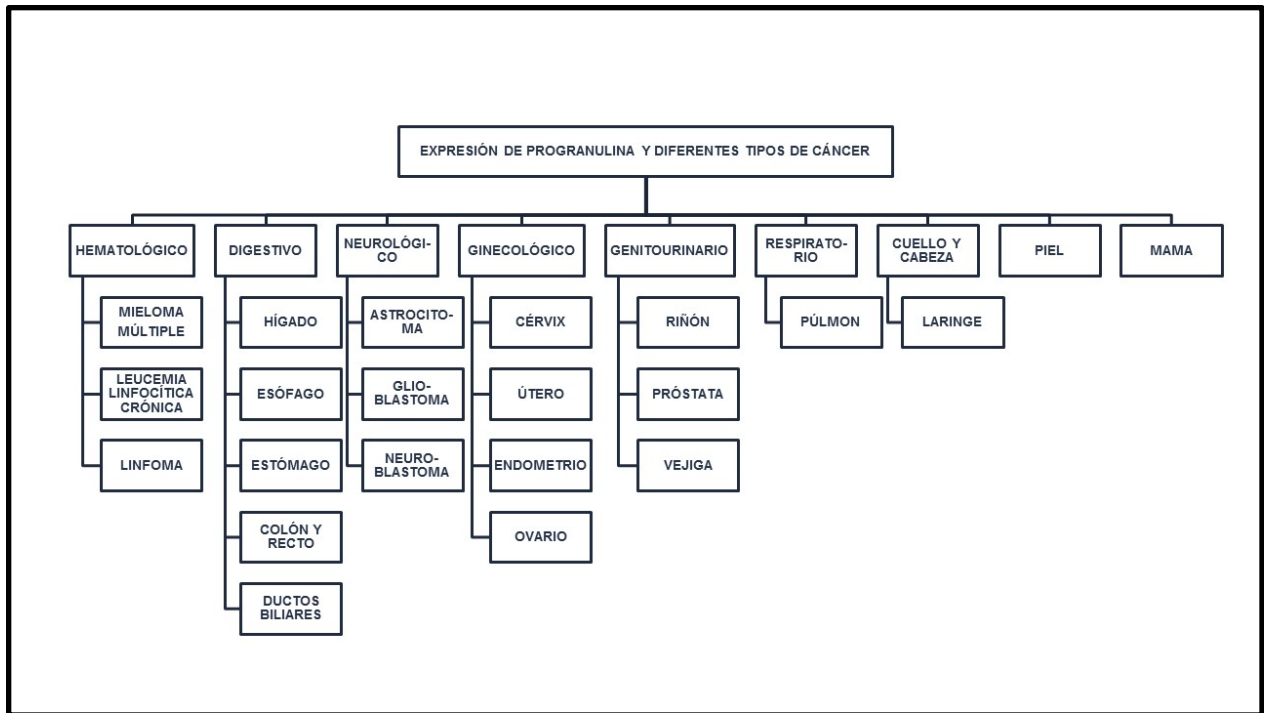
La progranulina (PGRN) es una proteína que fue identificada por Anakwe y Gerton en 1990, a la que inicialmente llamaron “acrogranina” debido a su presencia en forma de gránulos en el acrosoma de espermatozoides de cobayo [1, 2]. Posteriormente se demostró que la acrogranina era la proteína precursora de las epitelinas, también conocidas como granulinas, unas pequeñas proteínas de aproximadamente 6 KDa (Kilodaltones) capaces de modular el crecimiento celular, motivo por lo que fue nombrada como proepitelina (PEPI) y/o progranulina [3-6]. Además, a la progranulina también se le conoce como factor de crecimiento derivado de células PC (PCDGF), ya que Zhou y cols. [7] purificaron dicho factor a partir de las células PC, una línea celular derivada de un teratoma adipogénico y demostraron que era homólogo a la progranulina. Esta proteína también puede ser reconocida como precursor de granulinas/epitelinas (GEP) y glicoproteína de 88 KDa (GP88) [8].

La progranulina se expresa en múltiples tipos celulares, especialmente en células epiteliales, hematopoyéticas y neuronas. Durante el desarrollo embrionario murino se expresa en el epicardio del corazón, en el cartílago de las costillas, en células mononucleares del hígado y en células de sangre periférica, así como en la epidermis, en la placenta y en el endotelio de la microvasculatura, pero no se expresa en grandes estructuras vasculares. En lo que respecta al sistema nervioso, se ha detectado en las células piramidales del hipocampo, la corteza cerebral, la médula espinal y en las células de Purkinje a nivel del cerebelo [9, 10]. En murinos adultos se ha demostrado que el mRNA (Ácido ribonucleico mensajero) de esta proteína es constitutivamente expresado en varias células epiteliales de rápida división, particularmente en la piel (epidermis) y en el tracto gastrointestinal (intestino delgado y colon). En el sistema reproductivo se expresa en el epitelio de los túbulos seminíferos y en el epidídimo, así como, en las espermatogonias y los espermatoцитos. Además, se ha detectado su expresión en el epitelio glandular del útero, en los ovocitos, en las células de la granulosa de los folículos ováricos y en el epitelio glandular de la mama. Igualmente, el riñón, el pulmón, el bazo y la placenta son positivos para su expresión [10]. En células poco proliferativas como fibroblastos y células endoteliales, la expresión de progranulina es baja, sin embargo, cuando estas células

incrementan su proliferación y migración, por ejemplo, durante la cicatrización tisular la expresión de progranulina aumenta en forma considerable [11, 12].

En humanos se ha determinado tanto la expresión del mRNA como de la proteína progranulina en múltiples tipos de células incluyendo: células endoteliales de la microvasculatura dérmica (HMVEC) [11], condrocitos [13], células de músculo liso de la aorta [14], fibroblastos de mama [15] y de colon [16]. Así como, en el epitelio de superficie ovárica inmortalizado (IOSE) [17], células epiteliales de colon, células endoteliales de la vena umbilical (HUVEC) [18], células de músculo liso uterino [19], neuronas corticales y en células de la microglía [20]. También en células del sistema inmune como macrófagos [21], neutrófilos [22], linfocitos B [23] y linfocitos T [24].

La progranulina tiene una participación importante en varios procesos fisiológicos entre los que se encuentran: la biogénesis acrosomal [1], la embriogénesis temprana [25, 26], la cicatrización [11, 22], la inflamación [27, 28], la angiogénesis [11, 29] y el desarrollo del cartílago y el hueso [30, 31]. Además, está involucrada en el desarrollo de procesos patológicos tales como la neurodegeneración, la obesidad, la resistencia a la insulina, la autoinmunidad inflamatoria y en la carcinogénesis [8, 32, 33]. Un incremento en la expresión de la progranulina se ha observado en muchos tipos de tumores [19, 34-52]. Véase la figura 1 [8]. En estos tumores, la progranulina promueve diversos pasos de la cascada de progresión tumoral, como la estimulación de la proliferación celular, aumento de la migración e invasión, crecimiento independiente del anclaje, angiogénesis tumoral, transformación maligna y quimioresistencia [8, 33].



**Figura 1.** Expresión de la progranulina en cáncer. El aumento en la expresión de la progranulina se ha detectado en tumores de diferentes órganos. Adaptada de [8].

### 3.1.2 Estructura de la progranulina

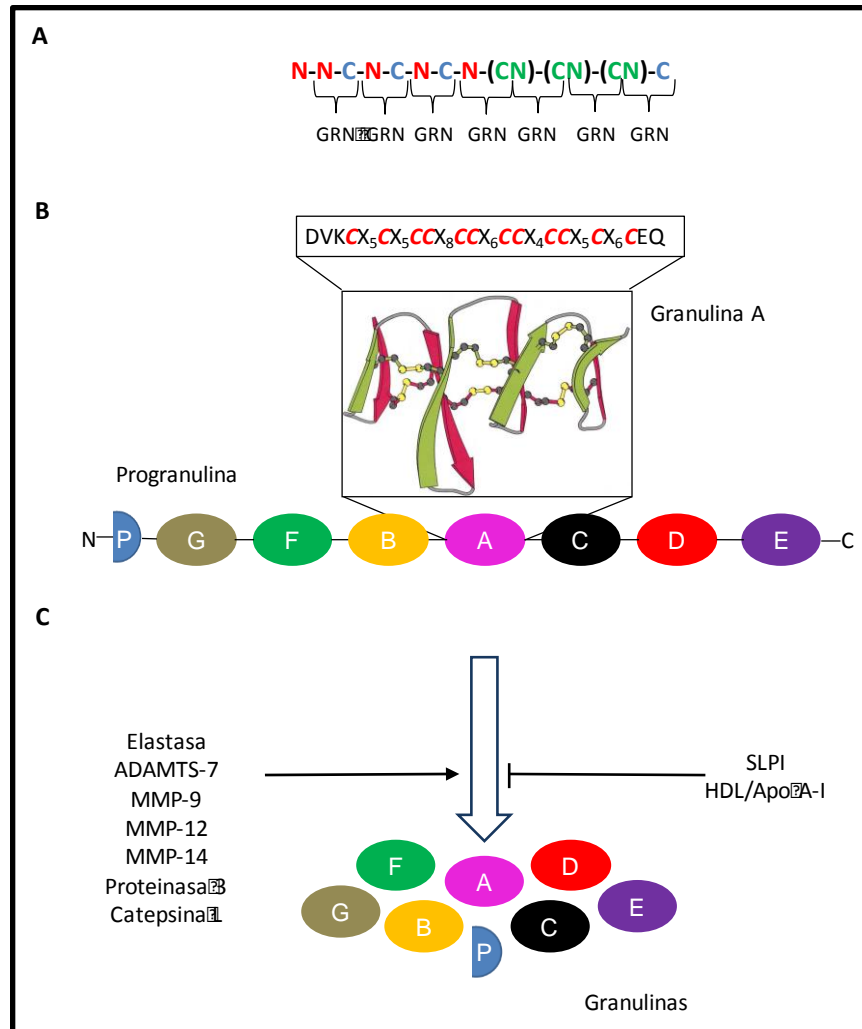
La secuencia de aminoácidos y estructura terciaria de la progranulina difiere de cualquier proteína perteneciente a las diferentes familias de factores de crecimiento conocidas hasta el momento. Es una glicoproteína de secreción que tiene un peso molecular de aproximadamente 68 KDa. Su secuencia consta de 593 residuos de aminoácidos, de los cuales 90 corresponden a residuos de cisteínas que pueden formar 45 puentes disulfuro. Diecisiete residuos de aminoácidos corresponden a su péptido señal y se conocen 5 posibles sitios de N-glicosilación, por lo que puede detectarse por western blot como una proteína de 88 KDa. Su secuencia de aminoácidos forma siete y media repeticiones en tándem de un motivo peptídico sumamente conservado conocido como granulina (GRN) [6].

El gen *GRN* que codifica la progranulina humana contiene 12 exones y se localiza en el brazo largo del cromosoma 17 en la banda citogenética 17q21.23. Mientras que el gen murino se encuentra en el cromosoma 11 [33]. Los módulos de granulinas de mamíferos son codificados por dos exones y pueden existir tres variantes de estos, uno referido como exón N, otro como exón C y el último como exón CN. Los exones tipo C codifican la mitad carboxilo terminal y los exones tipo N codifican la mitad amino terminal de cada módulo de granulina. Un exón CN

codifica la mitad de un dominio de granulina carboxilo terminal separada por una región que no codifica cisteínas y que sirve de enlace con el dominio amino terminal de otra mitad de granulina. Un módulo completo de granulina puede ser formado por el corte y empalme de dos exones CN, un CN y un N, o un exón CN y un exón C (Figura 2A) [53].

Las granulinas son un grupo de 7 péptidos cuyas secuencias son casi idénticas entre sí, tienen un peso molecular de 6 KDa y se caracterizan por poseer 6 puentes disulfuro. Cada uno de estos péptidos se ha designado por las letras A-G y la letra P que corresponde a la mitad del motivo de una octava granulina trunca con solo 3 puentes disulfuro (también nombrada paragrulina). Los estudios de resonancia magnética nuclear de la granulina A de humano revelan una estructura globular compacta, el esqueleto peptídico adopta una conformación de cuatro horquillas  $\beta$  en forma de una hélice levógira sobre un eje formado por doce residuos de cisteínas que se entrelazan creando los seis puentes disulfuro. Debido a que las secuencias de los motivos de granulinas son homólogas, todos los módulos de granulinas adoptan estructuras tridimensionales similares, por lo que se sugiere que la progranulina intacta tiene una estructura análoga a un collar de perlas, la secuencia de los módulos de GRN son: P-G-F-B-A-C-D-E [54] (Figura 2B).

La progranulina es una proteína de secreción que puede ser procesada por enzimas proteolíticas para generar las granulinas, esta conversión puede ser mediada por su interacción directa con la elastasa secretada por neutrófilos, la cual corta exclusivamente en las secuencias de enlace entre los dominios de granulinas [22]. Otras proteasas que pueden escindir a la progranulina son: *a)* la proteinasa 3 [28]; *b)* la metaloproteinasa de matriz 9 (MMP-9) [13]; *c)* la MMP-12 [55]; *d)* la MMP-14 [56]; *e)* una desintegrina, metaloproteinasa con motivos de trombospondina 7 (ADAMTS-7) [57]; y *f)* la catepsina L (Cat L) [58]. Contrariamente, la proteólisis de progranulina es bloqueada por la interacción directa con la proteína inhibidora de proteasas secretada por leucocitos (SLPI) que se une a las regiones inter-granulina en la estructura terciaria del precursor, lo que puede evitar la conversión de la progranulina a sus derivados [22]. Por otro lado, la lipoproteína de alta densidad/apolipoproteína A-I (HDL/Apo-AI) también puede proteger a la progranulina de la proteólisis al formar un complejo proteico [21] (Figura 2C).



**Figura 2.** Estructura de la progranulina. **A)** Cada módulo de granulina es codificado por tres variantes de exones, los exones tipo N (color rojo), los exones tipo C (color azul) o los exones tipo CN (color verde). **B)** Los óvalos de colores representan los dominios de granulinas. Se muestra la estructura de la granulina A, en color amarillo los puentes disulfuro formando un eje, en verde y rojo las hojas  $\beta$  plegada y en gris el esqueleto peptídico. En la parte superior se muestra la secuencia parcial de aminoácidos de la granulina A, donde las cisteínas son remarcadas con color rojo. **C)** La progranulina puede ser procesada en motivos de granulina individuales por diversas proteasas, mientras que la unión a otras proteínas inhibe su procesamiento. Adaptada de: [53, 59].

### 3.1.3 Función y regulación de la expresión de progranulina

Los mecanismos moleculares por los cuales la progranulina ejerce sus efectos biológicos no han sido elucidados completamente, sin embargo, existe evidencia que indica que podrían ser mediados a través de receptores membranales de forma similar a otros factores de crecimiento clásicos. Hasta el momento se desconoce el receptor específico de la progranulina, pero se ha demostrado que puede interactuar con diferentes proteínas membranales en distintos tipos celulares. En neuronas puede unirse a la estructura en forma de hélice  $\beta$  enrollada de la

región carboxilo terminal de la sortilina, un receptor transmembranal que tiene afinidad por factores neurotróficos [60]. En condrocitos se ha demostrado que la progranulina se puede unir directamente a los receptores 1 y 2 del factor de necrosis tumoral (TNFR1/2) en sus dominios extracelulares CRD2 y CRD3, además puede antagonizar los efectos biológicos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) [27, 61]. Por último, recientemente se identificó al receptor 2 tipo A de efrina (EPHA2), un receptor con actividad de cinasa de tirosinas (RTK), como un receptor funcional de la progranulina en una línea celular de cáncer de vejiga [62].

Actualmente existen evidencias de los efectos biológicos de la progranulina en distintos tipos celulares, así como, en diferentes patologías, sin embargo se desconocen los mecanismos que regula su expresión especialmente en las diferentes patologías con las cuales está asociada.

La expresión de la progranulina puede ser inducida por diferentes tipos de estrés celular, entre los que se encuentran el estrés del retículo endoplásmico, la acidosis y la hipoxia. El estrés del retículo endoplásmico puede incrementar la expresión de la progranulina endógena en las células ATDC5 (células condrogénicas murinas) e inhibir la apoptosis inducida por dicho estrés. De hecho, las células deficientes de progranulina pierden la capacidad de responder adecuadamente al estrés del retículo endoplásmico [63].

Interesantemente, en las células SK-N-BE (derivadas de neuroblastoma) los niveles de expresión del mRNA y proteína progranulina se elevan significativamente en condiciones de hipoxia, lo que sugiere que la progranulina podría tener un efecto protector en el cerebro contra el estrés hipóxico [43]. Guerra y cols. [12] también demostraron que en condiciones hipóxicas (1% O<sub>2</sub>) existe una sobre-regulación del transcrito de la progranulina, específicamente en fibroblastos dérmicos de rata. Además, observaron que la acidosis extracelular estimula la expresión de la progranulina, pero en menor grado que la hipoxia. Ambas condiciones, acidosis e hipoxia producen un efecto sinérgico en el aumento de la expresión de progranulina. Otra evidencia acerca de la relación entre progranulina e hipoxia es la aportada por Stubert y cols. [64], quienes determinaron la expresión de esta proteína en el trofoblasto vellosos de placentas de pacientes con preeclampsia y restricción del crecimiento fetal, en donde observaron que la expresión de la proteína progranulina, pero no su mRNA, era mayor en los casos de preeclampsia y restricción del crecimiento fetal en comparación con los controles. Además, la expresión de la subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia (HIF-1 $\alpha$ ), uno de los factores clave en la respuesta celular a la hipoxia, se correlacionó con el aumento de la progranulina. Sin embargo, no se determinó si la expresión de la progranulina era inducida por HIF-1 $\alpha$ .

La reducción de la expresión de la progranulina puede provocar neurodegeneración por que se disminuye su actividad neurotrófica y neuroprotectora, ya que su función es proteger a las neuronas de una muerte prematura [29]. Aproximadamente el 5% de los casos de demencia frontotemporal (FTLD) son causados por mutaciones en el gen *GRN*, hasta el momento se han reportado 79 mutaciones somáticas, la mayoría de las cuales son deleciones de un simple nucleótido en la región codificante que causan un cambio en el marco de lectura, la degradación del mRNA y por consiguiente la interrupción de la traducción proteica [65]. En modelos *in vivo* e *in vitro* se ha demostrado que la regulación postranscripcional de los niveles de la progranulina se lleva a cabo a través de microRNAs, incluyendo miR-659-3p, miR-29b-3p y miR-107 que reducen los niveles de progranulina al alterar la traducción o estabilidad de su mRNA [66-70].

Con respecto a los factores que regulan el aumento en la expresión de la progranulina en diferentes tipos de cáncer se ha descrito que el 17 $\beta$ -estradiol (E2) ejerce una regulación positiva sobre la síntesis de este factor de crecimiento en las líneas celulares MCF-7 y T47D de cáncer de mama, ya que la exposición de las células por 12 h a 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-9</sup> M de E2 respectivamente aumentó entre 4 y 5 veces la expresión de la proteína progranulina y su mRNA [34]. En concordancia con estos resultados, Jones y cols. [39] observaron que la expresión de la proteína progranulina incrementa hasta 5 veces en las líneas celulares KLE y HEC-1-A derivadas de cáncer de endometrio al ser cultivadas en presencia de 10<sup>-8</sup> M de E2. El análisis de la región proximal del promotor de *GRN* humano muestra que no contiene elementos de respuesta a estrógenos (ERE), lo que sugiere que cualquier efecto del estrógeno sobre su regulación podría ser de manera indirecta [71]. Otros investigadores han reportado que el ácido holotransretinoico (ATRA) puede incrementar la expresión del mRNA de la progranulina en células mieloides del tipo CD34+ progenitoras, monoblásticas U-937, monocíticas THP-1, progranulocitos HL-60 y macrófagos RAW 264.7. La respuesta difiere entre las células mieloides mencionadas y aparentemente este efecto es específico del linaje, ya que en células no mieloides como las TF-1 (proeritroides), Jurkat (linfoides), SW-13 (epiteliales), fibroblastos primarios y U373-MG (neuroblastos), el ácido holotransretinoico no parece tener efecto sobre las concentraciones del transcrito de la progranulina [72].

Por otra parte, Diaz-Cueto y cols. [73] identificaron que en las líneas celulares NIH-OVCAR-3 y SK-OV-3 de cáncer de ovario, la vía de PKC está involucrada en la regulación de la progranulina, ya que la inhibición de esta vía con el compuesto Calfostin C, un inhibidor general de PKC, disminuyó la síntesis de la progranulina hasta un 50% con respecto a los controles. Sin embargo, la síntesis del mRNA no se modificó por lo que demostraron que la regulación de la

proteína ocurre a nivel post-traducciona. También en líneas celulares de cáncer de ovario, Kamrava y cols. [74] observaron que la inducción de la expresión de la progranulina en respuesta al ácido lisofosfatídico (LPA) y la endotelina 1 (ET-1) se lleva a cabo a través de las vías de transducción de señal de cAMP/EPAC/ERK (adenosina monofosfato cíclico/proteína intercambiadora activada por cAMP/proteína cinasa regulada por señal extracelular), específicamente en las células NIH-OVCAR-3 y HEY-A8. Además, observaron que existe una participación de calcio citosólico, lo que indica que la síntesis de progranulina podría ocurrir río abajo de la vía de señalización de PKC. Todas las evidencias antes mencionadas demuestran que no existe un mecanismo general de regulación de la expresión de la progranulina y cada tipo celular, incluso aquellas de linaje cercano pueden diferir en los mecanismos específicos de su regulación y/o de las vías de transducción de señal que podrían estar involucradas.

#### **3.1.4 La progranulina y el cáncer de ovario**

La progranulina participa de manera importante en el desarrollo del cáncer de ovario. Su sobre-expresión se ha observado en líneas celulares *in vitro*, en modelos murinos *in vivo* y en tejidos tumorales del ovario (*in situ*) y se ha demostrado que existe una asociación entre esta proteína y la estimulación de la proliferación celular, el incremento en la capacidad de invasión y migración, la quimioresistencia a cisplatino y una menor supervivencia de las pacientes.

En cáncer de ovario la expresión de la progranulina es de manera diferencial, su expresión es alta en carcinomas invasivos, pero no en tumores de bajo potencial maligno. Las cantidades del mRNA y la proteína progranulina son mayores en forma significativa en tumores malignos en comparación con tumores benignos y tejidos de ovarios normales. Además, existe una correlación entre la alta expresión del mRNA de esta proteína y una menor supervivencia de las pacientes [75]. En estudios *in vitro* se ha observado que el bloqueo de su función ya sea por DNA (ácido desoxirribonucleico) anti-sentido o anticuerpos neutralizantes reduce la proliferación de las líneas celulares de cáncer de ovario (e.g. A2780), así como, la capacidad de colonización en agar [74, 76]. En forma contraria, su sobre-expresión incrementa la proliferación celular, la formación de colonias celulares en agar semisólido (30%) y la capacidad de migración (42%) e invasión celular (30%) en comparación con los controles [77]. También se ha observado en modelos *in vivo* que la sobre-expresión de la progranulina provoca la transformación maligna de las células IOSE (provenientes del epitelio de superficie ovárica inmortalizado) y promueve la formación de tumores en ratones atímicos inmunocomprometidos inoculados con dichas células [17].



En varias líneas celulares de cáncer de ovario se ha podido observar que la progranulina está asociada a un fenotipo quimioresistente, ya que las células que sintetizan mayores cantidades de esta proteína (células OV202<OV177<OV17) son más resistentes a altas concentraciones de cisplatino. La sobre-expresión de la progranulina al transfectar el gen *GRN* en las células A2780 les confiere una mayor capacidad de proliferar y formar 40% más tumores en ratones inmunodeficientes a pesar de ser tratados con el agente quimioterapéutico cisplatino. El evitar la disminución de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 es uno de los mecanismos por los cuales la progranulina protege a las células de apoptosis [77].

Clínicamente, la progranulina ha sido propuesta como un biomarcador potencial de estadios avanzados y recurrencia de cáncer epitelial de ovario, así como un indicador de la sobrevida libre de enfermedad en las pacientes con esta patología. En mujeres quienes tuvieron recurrencia del cáncer antes de 18 meses, se observó que las concentraciones séricas de progranulina incrementaron después de los primeros tres meses de la remisión clínica completa. Este factor de crecimiento es uno de los pocos biomarcadores independientes que se han asociado con una sobrevida libre de progresión y sobrevida total. La sobrevida libre de enfermedad a 5 años fue prácticamente de 0% en pacientes con concentraciones séricas de progranulina  $\geq 59$  ng/mL, mientras que en mujeres con progranulina  $\leq 59$  ng/mL fue del 60% [78]. Carlson y cols. [79] demostraron que las concentraciones séricas de la progranulina se encuentran significativamente elevadas en pacientes con estadios avanzados de carcinomas epiteliales ováricos (III y IV) a diferencia de los estadios tempranos (I y II) y que estas concentraciones están asociadas con la disminución de la sobrevida total, más aún, la proteína SLPI que protege a la progranulina de degradación, se encuentra elevada en pacientes con cualquier estadio de cáncer epitelial de ovario comparado con tumores benignos. Los datos de estos estudios indican la utilidad de progranulina como probable biomarcador pronóstico.

La importancia de la progranulina en la patogénesis del cáncer de ovario la convierte en un importante blanco terapéutico, desafortunadamente en la actualidad no existen estudios clínicos para valorar su potencial terapéutico en este tipo de tumores. Sin embargo, existen estudios preclínicos *in vivo* e *in vitro* tanto en cáncer de ovario (células HEY-A8 y NIH-OVACAR-3), como de hígado y de mama que demuestran que la inhibición de su función por medio de anticuerpos monoclonales capaces de neutralizarla disminuye o inhibe la tumorigénesis *in vivo* e induce la apoptosis *in vitro* [74, 80, 81].

## 3.2 CÁNCER DE OVARIO

El cáncer de ovario es un importante problema de salud pública, ocupa el octavo lugar en incidencia y también en mortalidad de las neoplasias en la mujer, y es la segunda causa de muerte por cánceres ginecológicos. Cada año se diagnostican aproximadamente 295,000 casos y poco más de 184,000 mujeres pierden la vida por esta causa en todo el mundo (Tabla 1) [82-84]. Las mayores tasas de incidencia de cáncer de ovario se registran en países desarrollados de América del norte y Europa oriental ( $\geq 8$  por 100,000), mientras que en países de Asia se observan las menores tasas ( $\leq 3$  por 100,000) [85, 86].

En la mayoría de los países desarrollados en las últimas cuatro décadas la incidencia y la mortalidad de cáncer de ovario han disminuido paralelamente como consecuencia del uso de anticonceptivos orales y la disminución en la utilización de la terapia hormonal de reemplazo (THR) para aliviar los síntomas de la menopausia, así como, por la introducción de mejores medicamentos como el cisplatino y el paclitaxel para el tratamiento de esta patología. Sin embargo, en países económicamente emergentes de América como Brasil, Colombia, Venezuela y México ambas tasas han incrementado [85-88]. En México la tasa de mortalidad por cáncer de ovario en mujeres entre 35 y 64 años de edad es de 6.6 por 100,000 de acuerdo con las estimaciones del proyecto GLOBOCAN, esta tasa de mortalidad mantuvo un aumento sostenido de 1.4% anual desde 1980 hasta 2011 [89]. En México se diagnostican más de 4000 nuevos casos de cáncer de ovario cada año [90, 91]. Según lo señalado por el Observatorio Global de Cáncer, en el año 2018 se registraron en México 4759 casos nuevos de cáncer de ovario y se reportaron 2765 muertes, por lo que representó la sexta causa de muerte por tumores malignos en las mujeres mexicanas [84].

En los Estados Unidos de América (EUA) la Sociedad Americana de Cáncer estimó que al finalizar el año 2019 se diagnosticarían 24,469 nuevos casos de cáncer de ovario y morirían aproximadamente 14,000 mujeres (Tabla 1) [83, 84, 92]. La tasa de incidencia promedio de cáncer de ovario en este país fue de 11.5 por 100,000 mujeres por año entre 2010 y 2014. Interesantemente se ha observado que la tasa de incidencia es superior para mujeres caucásicas (12 por 100,000), en comparación con las mujeres hispanas (10.3 por 100,000), mujeres afroamericanas (9.4 por 100,000) y las mujeres asiáticas (9.2 por 100,000) (Figura 3) [83]. En general se ha estimado que el riesgo que tiene cualquier mujer de desarrollar cáncer de ovario en algún momento durante su vida es de 1 en 78 (1.3%). Las mayores tasas de incidencia se presentan en mujeres entre 55 y 64 años [83, 93]. Con respecto a la tasa de mortalidad del cáncer

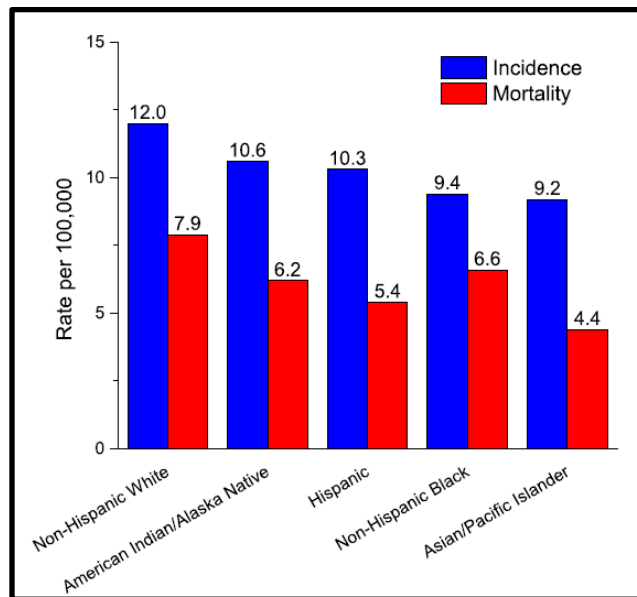
de ovario en EUA, se reportó que disminuyó cerca del 23% en mujeres entre 50-64 años desde 1991 hasta 2011 [87]. Las mujeres caucásicas tuvieron una tasa de mortalidad de 7.9 por 100,000 entre 2010 y 2014, seguida de una tasa de 6.6 muertes por 100,000 mujeres afroamericanas, mientras que para las mujeres asiáticas fue menor, 4.4 por 100,000 (Figura 3) [83, 87, 92]. La mediana de edad de muerte por cáncer de ovario es de 70 años [93].

**Tabla 1.** Epidemiología del cáncer de ovario, comparación de la incidencia y mortalidad a nivel mundial, en EUA y en México.

N°	<u>Mundial</u>		<u>Estados Unidos de América</u>		<u>México</u>	
	<u><i>Incidencia</i></u>	<u><i>Mortalidad</i></u>	<u><i>Incidencia</i></u>	<u><i>Mortalidad</i></u>	<u><i>Incidencia</i></u>	<u><i>Mortalidad</i></u>
1	Mama 2,088,849	Mama 626,679	Mama 234,087	Pulmón 71,116	Mama 27,283	Mama 6,884
2	Colon y recto 823,303	Pulmón 576,060	Pulmón 105,948	Mama 41,904	Tiroides 10,188	Cérvix 4,121
3	Pulmón 725,352	Colon y recto 396,568	Colon y recto 74,269	Colon y recto 25,953	Cérvix 7,869	Hígado 3,507
4	Cérvix 569,847	Cérvix 311,365	Cuerpo del útero 57,004	Páncreas 21,938	Cuerpo del útero 7,266	Colon y recto 3,365
5	Tiroides 436,344	Estómago 269,130	Tiroides 46,348	<b>Ovario 14,008</b>	Colon y recto 7,105	Estómago 2,833
6	Cuerpo del útero 382,069	Hígado 233,256	Linfoma No Hodgkin 33,016	Cuerpo del útero 10,647	<b>Ovario 4,759</b>	<b>Ovario 2,765</b>
7	Estómago 349,947	Páncreas 205,332	Melanoma 29,326	Hígado 9,921	Hígado 3,815	Pulmón 2,652
8	<b>Ovario 295,414</b>	<b>Ovario 184,799</b>	<b>Ovario 24,469</b>	Leucemia 9,709	Estómago 3,625	Páncreas 2,369
9	Hígado 244,506	Esófago 151,395	Páncreas 24,234	Linfoma No Hodgkin 8,900	Pulmón 3,251	Leucemia 2,021
10	Linfoma No Hodgkin 224,877	Leucemia 129,488	Riñón 22,486	Cerebro 7,746	Leucemia 2,863	Vesícula biliar 1,302

Adaptada de: [82, 84, 92].

La sobrevida para las pacientes con cáncer de ovario depende del grado de avance de la enfermedad al momento del diagnóstico y del tipo histológico del tumor maligno de ovario que presenten. En general la tasa de sobrevida relativa a cinco años se encuentra entre 30-40% con un modesto incremento de 2-4% desde el año 1995 [85, 87, 94, 95]. Cuando esta patología es diagnosticada en estadios tempranos, es decir tumores localizados en el ovario, la tasa de sobrevida relativa a 5 años es del 93%. Pero si se diagnostica en estadios avanzados, la sobrevida total a cinco años disminuye hasta el 25-29% [83, 93]. La alta mortalidad de esta enfermedad está asociada al diagnóstico tardío debido a la falta de biomarcadores específicos y a la sintomatología inespecífica que presentan las pacientes.



**Figura 3.** Tasas de incidencia y mortalidad del cáncer de ovario por raza y etnia en EUA. Ambas tasas están ajustadas por edad y por cada 100,000 mujeres de la población norteamericana entre los años 2010 y 2014. Adaptada de: [83].

### 3.2.1 Síntomas y detección del cáncer de ovario

El cáncer de ovario es comúnmente confundido con otras enfermedades antes de su diagnóstico, principalmente se confunde con el síndrome de colon irritable u otras afecciones gastrointestinales. La hinchazón del abdomen causada por acumulación de ascitis es el signo más común de cáncer de ovario avanzado, sin embargo, en etapas tempranas la mayoría de las mujeres experimentan síntomas inespecíficos pero persistentes incluso meses antes del

diagnóstico. Los síntomas más comunes son: dolor abdominal y/o dolor pélvico, indigestión persistente, sensación de saciedad rápida, náusea, estreñimiento, diarrea, incremento en la frecuencia o urgencia para orinar, pérdida del apetito, pérdida de peso y aumento inexplicable del tamaño abdominal. Incluso se han reportado otros síntomas como la fatiga crónica, sangrado vaginal irregular, dolor durante las relaciones sexuales y dolor de espalda [83, 96, 97].

No existen pruebas de detección eficaces para el cáncer de ovario, sin embargo, se considera que los mejores métodos de diagnóstico son el ultrasonido transvaginal (UTV) como técnica de imagen para identificar anomalías en la morfología y tamaño del ovario, y la determinación sérica del marcador tumoral CA-125 (Antígeno de Cáncer 125, mucina 16 [MUC16]). Ambas estrategias tienen limitaciones, en el caso del UTV no se puede distinguir certeramente entre tumores benignos y malignos, en la mayoría de las ocasiones las masas anexiales identificadas son benignas [98]. Con respecto al biomarcador CA-125, las principales limitaciones son su poca especificidad y sensibilidad. El CA-125 se encuentra significativamente elevado ( $\geq 35$  U/mL) en el 50% de los casos de cáncer de ovario diagnosticados en estadios I y II. La principal limitación es que puede estar elevado en pacientes con una variedad de condiciones benignas o malignas que no necesariamente involucran al ovario. En 2009, la FDA (Administración de alimentos y medicamentos, EUA) aprobó la primera prueba con biomarcadores séricos, la Ova1<sup>®</sup>, un panel que combina CA-125, transferrina, microglobulina  $\beta$ -2, apolipoproteína A-I y la transtiretina. Posteriormente se aprobó el algoritmo de riesgo de malignidades ováricas (ROMA) que combinaba el CA-125 y la proteína 4 de epidídimo humano (HE4), sin embargo, más que pruebas de detección temprana, estas se consideran pruebas de referencia o triaje [99]. Existen 4 estudios a gran escala que evalúan la efectividad de los métodos de detección de cáncer de ovario actuales, las evidencias indican que dichos métodos no son efectivos para detectar la enfermedad en estadios tempranos, lo que se refleja en la nula reducción en las tasas de mortalidad (Tabla 2) [100, 101]. Actualmente se continúa con la búsqueda de otros biomarcadores individuales o paneles de biomarcadores para la identificación temprana de este tipo de cáncer [98].

**Tabla 2.** Principales pruebas de detección de cáncer de ovario.

Prueba de tamizaje	Criterio de inclusión	Diseño de estudio	Estrategia de tamizaje	n analizada	Seguimiento	Objetivo	Beneficio reportado
PLCO (EUA)	Mujeres postmenopáusicas asintomáticas (55-74 años)	Prueba controlada aleatorizada	Ultrasonido (principalmente TVU) anual por 4 años y CA-125 por 6 años	68,557	1993-2010 (mediana de seguimiento de 12.4 años)	Determinación de la mortalidad de cáncer de ovario	Negativo, no hay reducción en la tasa de incidencia y mortalidad del tamizaje con CA-125 y TVU comparado con la atención habitual
UKCTOCS (Reino Unido)	Mujeres postmenopáusicas asintomáticas (50-74 años)	Prueba controlada aleatorizada	Brazo 1: Ultrasonido y CA-125 anual (usando el algoritmo ROCA), Brazo 2: Ultrasonido únicamente (principalmente TVU)	202,546	2001-2014 (mediana de seguimiento de 11.1 años)	Determinación de la mortalidad de cáncer de ovario	Negativo, el tamizaje con CA-125 solo o en conjunto con TVU no modifican la tasa de incidencia y mortalidad de cáncer de ovario en comparación con los controles
Prueba de detección Shizuoka (Japón)	Mujeres postmenopáusicas asintomáticas	Prueba controlada aleatorizada	Ultrasonido pélvico y CA-125 anual	82,487	1985-1999 (mediana de seguimiento de 9.2 años)	Detección de cáncer de ovario en estadio I	Negativo, no incrementó el diagnóstico en estadios tempranos comparado con el grupo control. No hay beneficios sobre la mortalidad.
Prueba de detección Kentucky (EUA)	Mujeres postmenopáusicas asintomáticas (mayores de 50 años) y mujeres mayores de 25 años con historia familiar de cáncer de ovario	Prueba no aleatorizada	Únicamente ultrasonido (TVU)	37,293	1987-2011	Detección de cáncer de ovario en estadio I	Positivo, aumento de 20% en la tasa de supervivencia a 5 años en comparación con la cohorte control. No es una prueba controlada aleatorizada, tomar con reserva

PLCO: Prueba de detección de cáncer de pulmón, colorectal y ovárico, UKCTOCS; Prueba colaborativa de detección de cáncer de ovario del Reino Unido. Adaptada de: [100, 101].

### 3.2.2 Factores de riesgo y prevención del cáncer de ovario

El riesgo de una mujer de padecer cáncer de ovario se puede incrementar por diversos factores, entre los que se encuentran los factores genéticos, hormonales, reproductivos y de estilo de vida.

#### 3.2.2.1 Predisposición genética

El 85-90% de los casos de cáncer de ovario se consideran esporádicos, mientras que 5-15% presentan un componente genético. Existe un gran riesgo de desarrollar cáncer de ovario cuando las pacientes tiene antecedentes familiares de cáncer de mama o de ovario (Síndrome mama-ovario). El riesgo aumenta en 50% en las mujeres con familiares en primer grado con cáncer de ovario y 10% en aquellas mujeres quienes tienen un familiar en primer grado con cáncer de mama [83, 91]. Además, se ha observado que hay mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario de tipo seroso (Riesgo relativo [RR, 1.13]) y endometriode (RR, 1.47) [102].

Se estima que el 18% de los tumores epiteliales del ovario, particularmente los de tipo seroso, son causados por mutaciones hereditarias en los genes supresores de tumores *BRCA1* (gen de cáncer de mama 1) y *BRCA2*. El riesgo de desarrollar cáncer de ovario a una edad entre 70-80 años en mujeres portadoras de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* está en el rango de 35-46% y 10-28% respectivamente, en comparación con 1.3% de la población general [103]. En mujeres con síndrome de Lynch (Síndrome de cáncer colorectal hereditario sin poliposis, HNPCC) el riesgo de cáncer de ovario a lo largo de la vida es de 2-15% [91, 100]. Las mutaciones en genes que codifican proteínas involucradas en los mecanismos de reparación del DNA son las más comunes en este síndrome y predisponen principalmente al desarrollo de tumores no serosos. Los principales genes son: *MLH1* (homólogo 1 a *mutL*), *MSH2* (homólogo 2 a *mutS*), *MSH6*, *PMS1* (gen de segregación postmeiótica aumentada 1) y *PMS2* [83].

La salpingo-ooforectomía bilateral se considera la principal estrategia de reducción de riesgo de cáncer de ovario en mujeres con mutaciones en los genes *BRCA*, puede alcanzar hasta un 80% de efectividad y una reducción de la mortalidad del 70% [83, 100, 103].

### **3.2.2.2 Factores hormonales, reproductivos y de estilo de vida**

La nuliparidad e infertilidad están asociadas con incremento de riesgo de cáncer de ovario. Las evidencias indican que dicho efecto es el resultado de la reducción del número de ciclos ovulatorios (Teoría de la ovulación incesante). El uso de la THR, ya sea a base de estrógeno y/o estrógeno-progesterona, se asocia con un incremento de riesgo de cáncer de ovario si su uso es por más de 5 años [91] y se asocia particularmente a los subtipos seroso y endometriode (RR; 1.21 y 1.25 respectivamente). Por otro lado, la endometriosis está asociada significativamente con un aumento en el riesgo de desarrollar tumores de células claras (RR, 2.87) y endometrioides (RR, 2.32), pero no con tumores serosos o mucinosos [102].

Por otra parte, muchos factores como el uso de anticonceptivos orales, embarazo, lactancia y ligación tubárica son factores protectores contra el cáncer de ovario muy bien establecidos. El uso de anticonceptivos orales tiene un efecto protector que es proporcional a la duración, su uso por 5 años está asociado a una disminución de riesgo del 20% y su uso por 10 años reduce cerca del 50% el riesgo de desarrollar esta patología en la población general e incluso en mujeres de alto riesgo (portadoras de mutaciones en los genes *BRCA*). Los datos también muestran que la duración de la protección podría continuar por 30 años después de

interrumpir su uso. Sin embargo, es muy importante considerar el mayor riesgo de desarrollar cáncer de mama con su uso [83, 100, 103].

La paridad disminuye el riesgo cáncer de ovario en un 28%, 43% y 54% con uno, dos o tres embarazos a término respectivamente, en comparación con mujeres nulíparas [104]. La lactancia confiere una reducción de riesgo que depende de su duración, para el tiempo de lactancia menor a seis meses, el riesgo disminuye 21%, entre 6-12 meses la reducción es del 28% y del 33% cuando su duración es mayor o igual a 13 meses comparado con mujeres que nunca lactaron. Ambos eventos tienen un efecto combinado, a diferencia de mujeres nulíparas quienes nunca lactaron, las mujeres con dos nacimientos vivos y por lo menos 6 meses de lactancia, tienen una reducción de riesgo de cáncer de ovario del 50% [104]. Se ha llegado a la conclusión que no hay una asociación entre la lactancia y algún subtipo histológico de cáncer de ovario en particular [102].

La ligación tubárica reduce el riesgo de cáncer de ovario entre 13-34% principalmente de los carcinomas de subtipo endometriode (RR, 0.60) y de células claras (RR, 0.35). Aunque existe controversia sobre el efecto protector de la histerectomía y el riesgo de cáncer de ovario, la mayoría de los estudios concuerdan que no existe una asociación, sin embargo, recientemente se reportó que existe una disminución del riesgo de desarrollar carcinoma de células claras (RR, 0.57) [102]. La histerectomía podría considerarse como una cirugía de reducción de riesgo en mujeres con síndrome de Lynch, sin embargo ninguna organización de salud recomienda este procedimiento como una estrategia de prevención [100].

Existe una gran cantidad de estudios en la literatura sobre la asociación de varios factores de estilo de vida, tales como: alcohol, obesidad, tabaquismo, uso de talco, dieta y actividad física con un aumento en el riesgo de padecer cáncer de ovario. Aunque la mayoría de estos factores no tiene un efecto global sobre el riesgo de cáncer de ovario, algunos como el tabaquismo y la obesidad son específicos para un subtipo de tumor. El tabaquismo se asocia únicamente con el desarrollo de carcinomas mucinosos [102]. La obesidad (Índice de masa corporal [BMI] > 35; RR, 1.12) se asocia fuertemente a los carcinomas serosos de bajo grado y endometrioides [105]. Mientras que el consumo de grasas (RR, 1.19) se asocia principalmente a los carcinomas serosos [106].



### **3.2.3 Clasificación del cáncer de ovario**

El cáncer de ovario se considera una enfermedad heterogénea compuesta de distintos tipos de tumores con características clinicopatológicas y moleculares específicas, y se pueden originar de tres tipos celulares: células germinales, células estromales y células epiteliales.

Los tumores de células germinales (teratomas y disgerminomas) representan el 2-3% de los casos y se pueden presentar a cualquier edad, pero son frecuentes en mujeres jóvenes menores de 30 años. El 57% de los casos se diagnostican en estadio I con una supervivencia a 5 años del 99% [83]. Los tumores estromales ováricos, también llamados tumores de los cordones sexuales constituyen aproximadamente el 2-6% de los casos de cáncer de ovario, son diagnosticados en estadio I (64% de los casos) cuando la supervivencia a cinco años es del 98%. Los tumores de los cordones sexuales incluyen a los tumores de células de la granulosa, tumores de células de Sertoli-Leydig, fibromas y tecomas [83, 85, 87, 107]. Los tumores malignos de tipo epitelial son los más comunes y constituyen el 85-90% de los casos.

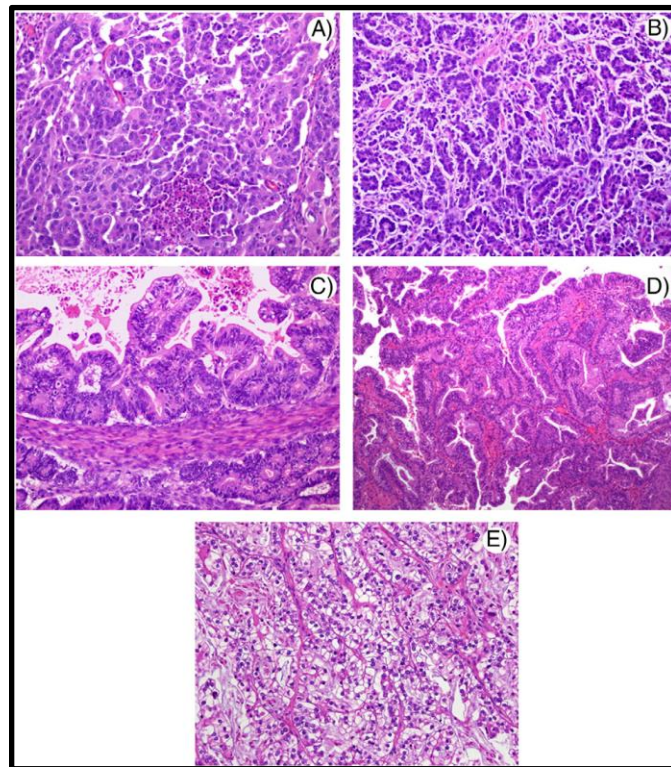
#### **3.2.3.1 Clasificación histológica de los carcinomas epiteliales ováricos**

La clasificación histológica de los cánceres ováricos de tipo epitelial se basa en la morfología de las células tumorales. Actualmente la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los carcinomas epiteliales de ovario en cinco enfermedades principales (Tabla 3) [93, 108], que en conjunto con la clasificación de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) (Figura 4) [109], se han convertido en criterios esenciales para generar mejores tratamientos que proporcionen un pronóstico favorable para las pacientes [95, 110-112].

**Tabla 3.** Clasificación de los carcinomas ováricos epiteliales y sus características epidemiológicas, clínicas, histológicas y moleculares.

Clasificación del tumor	Incidencia	Edad (Mediana)	Factor de Riesgo principal	Lesión Precursora	Anormalidades moleculares	Patrón de diseminación	Quimio-sensibilidad	Pronóstico
Seroso de Alto Grado	70% (90% de los carcinomas serosos)	63		Carcinoma intraepitelial tubárico seroso (STIC)	TP53, BRCA1/2, amplificación de CCNE1, pérdida de RB1 y NF1	Transcelómico	Alta	Pobre
Seroso de Bajo Grado	< 5% (10% de los carcinomas serosos)	55	Tumor limítrofe avanzado Medicamentos inductores de ovulación	Tumor limítrofe seroso	BRAF, KRAS, NRAS, HRAS y NF1	Transcelómico	Intermedia	Intermedio
Mucinoso	35%	45-50	Desconocido	Tumor limítrofe, cistadenoma	KRAS, HER2, TP53 y CDKN2A	Típicamente confinado al ovario	Baja	Favorable
Endometriode	10%	40-50	Síndrome de Lynch	Endometriosis atípica	PIK3CA, ARID1A, TERT y CTNNB1	Típicamente confinado al ovario	Alta	Favorable
Células Claras	5%	55	Síndrome de Lynch	Endometriosis atípica	HNF1beta, PIK3CA, ARID1A, MET, PTEN y CTNNB1, amplificación de AKT2	Típicamente confinado al ovario	Baja	Intermedio

Modificada de: [93, 108].



**Figura 4.** Principales tipos de carcinomas ováricos. **A)** Carcinoma Seroso de Alto Grado; **B)** Carcinoma Seroso de Bajo Grado; **C)** Carcinoma Mucinoso; **D)** Carcinoma Endometriode; y **E)** Carcinoma de Células Claras. Adaptado de: [109].

### 3.2.3.1.1 Carcinoma Seroso de Alto Grado

Los carcinomas serosos de alto grado (HGSC) son los tumores ováricos más comunes, representan el 70% de los carcinomas epiteliales del ovario y entre el 85-90% de todos los carcinomas de tipo seroso, además, son los que tienen el peor pronóstico. Más del 70% de los casos se diagnostican en estadios avanzados (III y IV) [113]. Anteriormente se pensaba que este tipo de tumores se desarrollaban a partir del epitelio de superficie ovárica (OSE), pero actualmente se acepta la hipótesis de que podrían tener su origen en el epitelio de las fimbrias de las trompas de Falopio. La implementación de la salpingo-ooforectomía profiláctica ha demostrado que en el tejido reseado se presenta frecuentemente carcinoma tubárico y carcinoma intraepitelial tubárico seroso (STIC) que podrían ser el origen de los HGSC [114].

Clínicamente los HGSC con frecuencia son bilaterales e invasivos en las membranas del peritoneo. Suelen ser sólidos y quísticos con áreas de hemorragia y necrosis. Las células forman papilas y masas sólidas con atipia nuclear. Este tipo de tumores se caracterizan por presentar inestabilidad genómica y una alta frecuencia de anomalías en el número de copias del DNA, ya sea por pérdidas o por ganancias. Además, suelen tener desregulación de los mecanismos de la reparación del DNA, principalmente exhiben mutaciones del gen supresor de tumores *TP53*. Sin embargo, suelen presentar pocas mutaciones en otros genes (Tabla 3) [93, 110].

Los HGSC presentan mutaciones en *TP53* en el 96% de los casos (mutaciones sin sentido corresponden al 70.4% y las mutaciones del marco de lectura al 12%). Casi la totalidad de los carcinomas ováricos relacionados con mutaciones deletéreas de los genes *BRCA1* (9%) y *BRCA2* (8%) son de este tipo, lo que genera alteraciones en la vía de la recombinación homóloga (Tabla 3) [93]. Por otra parte, los HGSC presentan una baja prevalencia de mutaciones somáticas en genes incluyendo: *CSMD3* (Múltiples dominios 3 Cub y Sushi, 6%), *NF1* (Neurofibromina 1, 4%), *CDK12* (Cinasa 12 dependiente de ciclina, 3%), *GABRA6* (Subunidad alfa 6 del receptor del ácido gamma-aminobutírico, 2%) y *RB1* (Retinoblastoma 1, 2-10%). Las alteraciones en el número de copias de genes incluyen principalmente amplificaciones de *CCNE1* (Ciclina E1) en 14-20% de los casos de HGSC, *CCND2* (Ciclina D2, 19%), *MYC* (Gen de mielocitomatosis, 20%) y *MECOM* (Sitio 1 de integración viral ecotrópico [EVI1] y Síndrome mielodisplásico 1 [MDS1], 20%) [93, 113, 115]. Este tipo de tumores tienen un índice de proliferación Ki67 alto (50-75%) [116].

En el año 2008 un grupo de investigación australiano utilizando microarreglos de 285 tumores de ovario para caracterizar carcinomas serosos y endometrioides, estableció una

subdivisión de los HGSC en 4 subgrupos o subtipos de acuerdo al patrón de expresión genética, siendo estos : *a) mesenquimal*, con marcadores de miofibroblastos activados; *b) inmunoreactivo*, caracterizado por expresión de genes asociados con el sistema inmune; *c) diferenciado*, caracterizado por una baja expresión de genes estromales y *d) proliferativo*, con baja expresión de marcadores de diferenciación. Además, demostraron que el subtipo mesenquimal tenía un peor pronóstico de sobrevida en comparación con los otros subtipos, el grupo inmunoreactivo aparentemente tiene el mejor pronóstico [117]. Esta clasificación no fue aplicada a la atención clínica, aunque podría ser una buena opción para el tratamiento diferencial de los carcinomas serosos de alto grado.

#### **3.2.3.1.2 Carcinoma Seroso de Bajo Grado**

Los carcinomas serosos de bajo grado (LGSC) son poco frecuentes, equivalen al 10-15% de los carcinomas serosos. Las mujeres con este tipo de tumores son diagnosticadas a una edad menor que las mujeres con HGSC (55.5 años vs 62.6 años) y tienen un mejor pronóstico, así la sobrevida media es de 99 meses y la tasa relativa de sobrevida a 10 años es del 70% [108]. Los LGSC generalmente se presentan como masas bilaterales, están compuestos por papilas sin atipia nuclear y se observan menos áreas de proliferación que en los HGSC. Las evidencias sugieren que se desarrollan en una manera secuencial pasando de cistadenomas serosos benignos a tumores serosos limítrofes (SBTs) y posteriormente a carcinoma serosos de bajo grado. Existen las hipótesis de que estos carcinomas se originan de los quistes de inclusión o del epitelio de las trompas de Falopio. Se ha propuesto que las células epiteliales de la tuba se transfieren sobre el OSE, seguido por la formación de un quiste de inclusión y la transformación a un carcinoma seroso [108, 116]. Las mujeres con LGSC raramente tienen una historia familiar que sugiera carcinoma de ovario y/o mama hereditarios. Estos tumores son diploides y genéticamente estables. En comparación con los HGSC, los LGSC presentan baja frecuencia de mutaciones en *TP53*, pero usualmente presentan mutaciones en el oncogén homólogo a v-Ki-ras2 de sarcoma Kirsten de rata (*KRAS*, 20-55%) y en el oncogén homólogo B1 a v-raf de sarcoma murino (*BRAF*, 5%), lo que significa la activación de la vía de transducción de señal de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) (Tabla 3) [115].

#### **3.2.3.1.3 Carcinoma Endometriode**

Los carcinomas endometrioides representan el 10% de todos los carcinomas ováricos y se diagnostican frecuentemente en mujeres con edades perimenopáusicas. El 15-20% de estos carcinomas son bilaterales y se detectan en estadios I y II principalmente, y raramente en estadio

IV (11%). Estos tumores presentan áreas sólidas y quísticas con patrones glandulares que asemejan a las glándulas del endometrio. El 42% de los casos están asociados a la presencia de endometriosis en el ovario y el 15-30% se encuentran asociados a cáncer de endometrio. Se considera que existe una asociación entre el desarrollo de este tipo de tumores y el síndrome de Lynch. La supervivencia general a 5 años de las pacientes con carcinoma endometriode es del 78% en el estadio I y del 6% en el estadio IV [110]. Las características moleculares de los carcinomas endometrioides involucran mutaciones en los genes: *CTNNB1* ( $\beta$ -catenina, 48%), *ARID1A* (Dominio 1A de interacción rico en AT, 30%), *PIK3CA* (Subunidad catalítica alfa de PI3K, 20%) y *PTEN* (Homólogo de fosfatasa y tensina, 20%) (Tabla 3) [115].

#### **3.2.3.1.4 Carcinoma Mucinoso**

Los tumores mucinosos representan el 5% de todos los tumores epiteliales malignos del ovario. La mayoría de los carcinomas de este tipo se diagnostican en estadio I (80%). La supervivencia general a cinco años es del 83% en estadio I; 55% en estadio II; 21% en estadio III y 9% en estadio IV. En el 80-90% de los casos estos tumores suelen ser unilaterales y pueden tener grandes tamaños y a diferencia de otros tumores no suelen presentar altos niveles del marcador CA-125. Son carcinomas que muestran alto contenido de mucina en el citosol de las células epiteliales. Estos carcinomas se asemejan al epitelio de los carcinomas de endocérvix, estómago o intestino, por lo que los estudios inmunohistoquímicos positivos para la citoqueratina 7 (CK7) y la citoqueratina 20 (CK20) ayudan a los patólogos a distinguir entre este tipo de tumor ovárico y los cánceres gastrointestinales más comunes. Las evidencias establecen que los carcinomas mucinosos podrían desarrollarse en una secuencia adenoma-carcinoma, es decir, transformarse de un cistadenoma mucinoso a un tumor mucinoso limítrofe, progresando a un carcinoma intraepitelial y de este a un carcinoma invasivo [116]. En comparación con los HGSC, los carcinomas mucinosos no presentan mutaciones en *TP53*, ya que los defectos genéticos más comunes de este tipo de tumores corresponden a mutaciones en *KRAS* (75-85%) y una alta frecuencia de amplificación de *HER2* (Receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico, 18%) (Tabla 3) [93, 114, 115].

#### **3.2.3.1.5 Carcinoma de Células Claras**

El cáncer epitelial de ovario de células claras (CCC) fue descrito por primera vez en 1939 como una neoplasia constituida histológicamente por células epiteliales cúbicas, aplanadas o en forma de “tachuela” con abundante citoplasma claro debido a la alta cantidad de glucógeno y con un patrón glomerular inmaduro, de ahí que se acuñara el término “mesonefroma” para describirlo.

Fue hasta 1973 que la OMS utilizó el término “Carcinoma Ovárico de Células Claras” [118], y a partir de 2003 los tumores de células claras se describen como neoplasias con crecimiento en patrones sólidos, tubulares o papilares, revestidos por células con forma de tachuela, con núcleos grandes y atípicos que muestran nucléolos también grandes, pero frecuentemente sin pleomorfismo notable [119]. Estas células tienen baja actividad mitótica a pesar de lo que se podría esperar debido a la atipia nuclear y presentan marcadores como el factor nuclear de hepatocito 1 beta (HNF-1 $\beta$ ), HIF-1 $\alpha$ , molécula 1 de lesión renal (KIM-1), napsina A y glipicano-3 (GPC3) que podrían ser considerados para distinguirlos de otros subtipos histológicos [111, 120].

El CCC comprende cerca del 5% de todos los tumores ováricos y en países de Europa y América del Norte su prevalencia se estima alrededor del 10-12%. Sin embargo, su incidencia es mayor en países del este de Asia como en Japón, donde se reportó una incidencia del 15-25% y una tasa de mortalidad de 3.2 por 100,000 en el año 2012 [121-123]. Además, la tasa de incidencia de este tipo de tumor de ovario (1.0 por 100,000) es dos veces mayor en mujeres asiáticas que en cualquier otro grupo étnico que vive en EUA [83].

El CCC en general se diagnostica 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 basada en platinos y taxanos [124, 125]. De acuerdo con estadísticas de EUA, el CCC se presenta a una edad menor que los carcinomas serosos, con una mediana de edad de 55 años al momento del diagnóstico [83, 119]. Las pacientes con CCC tiene características clínicas particulares, generalmente presentan una masa pélvica que se considera grande (15-20 cm) con una arquitectura adenofibromatosa con múltiples quistes y además presentan complicaciones tromboembólicas e hipercalcemia. El diagnóstico se establece cuando está limitado a un ovario y únicamente el 15-30% de los tumores son bilaterales [119]. Aparentemente la historia familiar de cáncer de mama y de ovario no está relacionada a la predisposición de desarrollar este tipo de tumores, pero como se mencionó anteriormente, como factores de riesgo se ha asociado a la endometriosis atípica (21-58% de los casos) y al síndrome de Lynch [118, 120]. Un gran estudio basado en la población japonesa afirma que la endometriosis aumenta 9 veces el riesgo de desarrollar CCC [126], lo que apoya la hipótesis de que este tipo de carcinoma se desarrolla de manera secuencial de una endometriosis atípica a un CCC [121]. Con respecto a los factores de prevención, existe una fuerte reducción en la

incidencia del CCC relacionada con la multiparidad, el uso de THR, ligación tubárica e histerectomía [102, 127].

Se han descrito varias alteraciones genéticas y modificaciones en diferentes vías de señalización en la tumorigénesis de los CCC (Tabla 4) [128, 129]. Las mutaciones somáticas más frecuentes se han descrito en los genes *ARID1A* (46-60%) y *PIK3CA* (33-51%). El primero codifica la proteína BAF250a (un componente del complejo SWI/SNF), la pérdida de su función tiene como consecuencia la desregulación de la remodelación de la cromatina y además puede interactuar con varios factores de transcripción relacionados con hipoxia y citocinas incluyendo HIF y STAT-3 (Transductor de señal y activador de la transcripción 3) [125, 128]. Mientras que el segundo codifica la subunidad catalítica de PI3K y las mutaciones que se presentan incrementan su actividad que está relacionada a procesos de la progresión del cáncer como la proliferación celular, adhesión, apoptosis y transformación maligna [119, 120]. Las mutaciones en *PTEN* se presentan con menos frecuencia en el CCC (~ 5%), aunque la pérdida de su expresión se ha observado en 40% de los casos de CCC, este regulador negativo de la vía de PI3K/AKT/mTOR (cinasa dependiente de fosfatidilinositol-3/oncogén homólogo a v-akt de timoma murino/diana de mamíferos para rapamicina) también puede bloquear la progresión del ciclo celular al inhibir a la ciclina D1 (*CCND1*) y a la proteína p27. Las amplificaciones en *AKT2* han sido descritas en el 24% de este tipo de tumores (Tabla 3) [115]. La mayoría de estas alteraciones también se presentan en la endometriosis sin malignidad y en la endometriosis adyacente a los tumores de células claras lo que sugiere que la vía de señalización de PI3K podría estar involucrada en las etapas tempranas de la patogénesis del CCC y por ende podría convertirse en un blanco con potencial terapéutico para este tipo de tumores [111].

Otras alteraciones genéticas incluyen amplificaciones y sobre-expresión de los genes *MET* (Receptor del factor de crecimiento de hepatocitos), *HER2* y *PPM1D* (proteína fosfatasa 1 delta dependiente de magnesio) en aproximadamente el 22-31%, 14% y 10% de los casos de CCC respectivamente [129]. Además de la sobre-regulación de los genes que codifican HIF-1 $\alpha$ , IL-6 (Interleucina 6), p21 y STAT-3. Es un hecho que el perfil de expresión genética del CCC involucra vías relacionadas con el estrés oxidativo, citocinas e hipoxia. El HIF-1 $\alpha$  se expresa en mayores niveles en el CCC en comparación con otros subtipos histológicos de cáncer de ovario y es fundamental en la angiogénesis inducida por hipoxia [125, 130]. En el 7-20% de los tumores de células claras se han reportado mutaciones en el gen *PPP2R1A* (Subunidad reguladora A de la proteína fosfatasa 2), cuyo producto está involucrado en el control del crecimiento celular [128]. Las mutaciones en *KRAS* han sido reconocidas como unas de las desencadenantes del cambio

maligno de la endometriosis por lo que podrían estar relacionadas con el desarrollo de este tipo de tumores, el 5-17% de los tumores de células claras las presentan, lo que sugiere que la inhibición de la vías de transducción de señal río abajo de RAS podría ser de utilidad en el tratamiento de los CCC, interesantemente mutaciones de *BRAF* son muy raras [129].

Distinto a los tumores serosos de alto grado, los CCC tienen una muy baja frecuencia de mutaciones en *BRCA1* y *BRCA2* [120]. Las mutaciones en *TP53* están notablemente ausentes en los CCC, lo que sugiere que otros mecanismos antiapoptóticos están probablemente implicados en su desarrollo. Se ha reportado que el mediador proapoptótico TMS1 (diana de silenciamiento 1 inducido por metilación) esta frecuentemente silenciado por la metilación de su promotor en el CCC. Además, la sobre-expresión de HNF-1 $\beta$  (80%) también ha sido implicada en la evasión de la apoptosis en varias líneas celulares de CCC, un mecanismo para su sobre-expresión podría ser su silenciamiento epigenético por hipometilación [131, 132], además está involucrado en el metabolismo de glucosa, resistencia a hipoxia y protección de las células al estrés oxidativo [128]. Lo anterior podría indicar dos posibles mecanismos para el escape de la apoptosis y su probable implicación en la resistencia de los tumores de células claras a los quimioterapéuticos [121].

Existe la necesidad de conocer mejor la fisiopatología de este tipo de tumores y optimizar los tratamientos disponibles o establecer nuevas estrategias terapéuticas. Actualmente el manejo del CCC es de la misma manera que los otros subtipos de cáncer de ovario y sin consideraciones especiales. Sin embargo y de acuerdo con las características moleculares del CCC existen varios posibles candidatos que se pueden considerar como blancos terapéuticos. Inhibidores de la vía de transducción de señal de PI3K están siendo probados en estudios preclínicos, e.g. DS-7423 y BEZ235, que son inhibidores duales de PI3K/mTOR, con actividad antitumoral en líneas celulares de CCC [133, 134]. Con respecto a las pruebas clínicas realizadas con el objetivo de demostrar la eficiencia y seguridad de ciertos tratamientos, se ha demostrado que el temsirolimus (Inhibidor de mTOR) tiene beneficios terapéuticos para pacientes con CCC, incluyendo una respuesta parcial que generó un periodo libre de progresión de 14 meses [135]. Sin embargo, otros estudios demuestran que el temsirolimus en combinación con carboplatino y paclitaxel seguido por la consolidación de temsirolimus como terapia de primera línea para el CCC en estadios III y IV no aumenta la sobrevida libre de progresión en comparación con el grupo control [128]. Se ha demostrado que la adición de Irinotecan (Inhibidor de la enzima topoisomerasa I de DNA) y cisplatino a la terapia estándar de carboplatino y paclitaxel para pacientes con el CCC no tiene mayor efectividad que la terapia estándar [136]. Inhibidores de tirosina cinasa (TKI) que



bloquean la proliferación celular y la angiogénesis, tales como el sunitinib o nintedanib, también han sido inefectivos para incrementar el tiempo de supervivencia libre de progresión o la supervivencia total de las pacientes [128].

**Tabla 4.** Características moleculares de los carcinomas ováricos de células claras y sus efectos celulares.

<i>Característica molecular</i>	<i>Frecuencia</i>	<i>Efecto celular</i>
Mutación de <i>ARID1A</i>	46-60%	Pérdida de BAF250a, un componente clave del complejo de remodelación de la cromatina SWI-SNF (cambios transcripcionales)
Sobre-regulación de IL6-STAT3-HIF	Expresión de IL-6 (49%)	Angiogénesis
Sobre-regulación de <i>HNF1B</i> (Hipo-metilación)	> 80%	Escape de la apoptosis Metabolismo de glucosa
Metilación de <i>TMS-1</i>	69%	Escape de la apoptosis
Mutación de <i>PTEN</i>	5-40%	Activación de la progresión del ciclo celular Inhibición de la apoptosis Incremento de la motilidad celular
Mutación de <i>PIK3CA</i>	33-51%	Activación de la progresión del ciclo celular Inhibición de la apoptosis Incremento de la motilidad celular
Amplificación de <i>AKT2</i>	24%	Activación de la progresión del ciclo celular Inhibición de la apoptosis Incremento de la motilidad celular
Amplificación de <i>HER2</i>	14%	Activación de las vías de señalización de PI3K, MAPK y STAT Promoción de la proliferación celular Inhibición de la apoptosis
Amplificación y sobre-regulación de <i>PPM1D</i>	10%	Regulación negativa de p53, p38/MAPK, G2/M (CHK1/2) y ATM
Mutaciones de <i>PPP2R1A</i>	7-20%	Crecimiento celular descontrolado
Mutaciones de <i>KRAS</i>	5-17%	Activación de las vías de señalización de MAPK y PI3K
Mutación de PD-1/PD-L1	2-3%	Aumento de MSI

Adaptada de: [128, 129].

### **3.2.3.1.6 Otros carcinomas epiteliales del ovario**

Los carcinomas ováricos de tipo epitelial menos frecuentes son los tumores de Brenner, los tumores seromucinosos (tumores müllerianos mezclados), los carcinosarcomas y los carcinomas indiferenciados. A pesar de que se pueden presentar carcinomas con características histológicas mezcladas, estos son muy poco frecuentes y se estima que corresponden a menos del 1% de los casos [137].

### **3.2.3.2 Clasificación del cáncer de ovario de acuerdo con el estadio y grado tumoral**

El sistema de estadificación del cáncer de ovario más utilizado en el mundo es el de la FIGO, este se basa en los resultados obtenidos de la cirugía citoreductiva y tiene como propósitos la determinación del pronóstico y el establecimiento de las estrategias terapéuticas. De acuerdo con la FIGO se distinguen cuatro estadios en base a la expansión anatómica del tumor ovárico [95]. El criterio aceptado internacionalmente para la estadificación de diferentes tipos de cáncer es el sistema tumor/nódulo linfático/metástasis (**TNM**) desarrollado por el Comité Colectivo Americano del Cáncer (AJCC). Dicho sistema incluye: 1) El tamaño del tumor y el crecimiento local (**T**, T0-T4); 2) La extensión de metástasis a nódulos linfáticos (**N**, N0-N3); y 3) La metástasis distante (**M**, M0 y M1) [138]. Es importante tomar en consideración ambos sistemas para la estadificación del cáncer de ovario (Tabla 5) [95, 138].

Existen varios sistemas de gradación de cáncer de ovario que emplean diferentes esquemas, pero la mayoría son sistemas ternarios que dividen a los carcinomas serosos de acuerdo con la diferenciación celular, 1) G1: Tumor bien diferenciado o tumor de bajo grado; 2) G2: Tumor moderadamente diferenciado o tumor de grado intermedio; y 3) G3: Tumor pobremente diferenciado o de alto grado [138, 139]. Actualmente dicha gradación está siendo sustituida por un sistema de gradación binario que se basa principalmente en la atipia nuclear y la tasa mitótica. En este sistema, los tumores con atipia (pleomorfismo) nuclear leve o moderada e índice mitótico de hasta 12 mitosis por diez campos de 400X se clasifican como carcinomas serosos de bajo grado, mientras que los tumores con células con pleomorfismo nuclear marcado e índice mitótico mayor de 12 mitosis por diez campos de 400X se clasifican como carcinomas serosos de alto grado [140]. Este sistema de gradación no aplica para todos los tumores epiteliales, en el caso de los carcinomas ováricos endometrioides se utiliza el sistema de la FIGO que se basa en la proporción de estructuras glandulares y papilares relativas al área de crecimiento de tumor sólido y el grado de atipia nuclear. El grado 1 corresponde a un tumor bien

diferenciado con < 5% de crecimiento sólido compuesto predominantemente de glándulas, el grado 2 concierne a un tumor con 5–50% de crecimiento y el grado 3 aplica para los tumores con células pobremente diferenciadas con > 50% áreas sólidas [141]. En el caso de los tumores mucinosos se ha mantenido una subclasificación en dos tipos de acuerdo con el patrón de invasividad: 1) Expansivo/confluyente y 2) Infiltrativo. El patrón de invasión es más importante que el grado para el pronóstico de estos tumores. Finalmente, en el caso de los carcinomas de células claras e indiferenciados, por consenso se consideran de alto grado [140].

**Tabla 5.** Estadificación del cáncer de ovario de acuerdo con la FIGO (2014) y la correspondiente clasificación TNM. Adaptada de las referencias [95, 138].

Estadio	Descripción	Clasificación T/N/M (tumor/nódulo linfático/metástasis)
<b>I</b>	<b><u>Tumor confinado a los ovarios</u></b>	<b>T1-N0-M0</b>
IA	Tumor limitado a un ovario (cápsula intacta), ausencia de tumor en la superficie ovárica, sin células malignas en el líquido de ascitis o en los lavados peritoneales	T1a-N0-M0
IB	Tumor limitado a ambos ovarios (cápsula intacta), ausencia de tumor en la superficie ovárica, sin células malignas en el líquido de ascitis o en los lavados peritoneales	T1b-N0-M0
IC	Tumor limitado a uno o ambos ovarios, con cualquiera de las siguientes características:	T1c-N0-M0
	IC1: Derrame quirúrgico	T1c1-N0-M0
	IC2: Cápsula rota o tumor en la superficie ovárica	T1c2-N0-M0
	IC3: Presencia de células malignas en el líquido de ascitis o en los lavados peritoneales	T1c3-N0-M0
<b>II</b>	<b><u>Tumor que afecta a uno o ambos ovarios con extensión pélvica o cáncer peritoneal primario</u></b>	<b>T2-N0-M0</b>
IIA	Extensión y/o implantes sobre el ovario, el útero y/o trompas de Falopio	T2a-N0-M0
IIB	Extensión a otros tejidos pélvicos intraperitoneales	T2b-N0-M0
<b>III</b>	<b><u>Tumor que afecta a uno o ambos ovarios con implantes peritoneales fuera de la pelvis y/o metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales (confirmados citológica o histológicamente)</u></b>	<b>T1/T2-N1-M0</b>
IIIA1	Positivo en los nódulos linfáticos retroperitoneales (confirmado citológica o histológicamente)	T3a1-N0/N1-M0
	IIIA1(i) Metástasis de hasta 10 mm en su dimensión mayor	
	IIIA1 (ii) Metástasis mayores que 10 mm en su dimensión mayor	
IIIA2	Afectación peritoneal microscópica extrapélvica (sobre el borde pélvico) con o sin nódulos linfáticos retroperitoneales positivos	T3a2-N0/N1-M0
IIIB	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis de hasta 2 cm en la dimensión mayor, con o sin metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales	T3b-N0/N1-M0
IIIC	Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis, más de 2 cm en su mayor dimensión, con o sin metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales (incluye extensión del tumor a la capsula del hígado y bazo sin compromiso parénquimal de	T3c-N0/N1-M0
<b>IV</b>	<b><u>Metástasis distante excluyendo la metástasis peritoneal</u></b>	<b>Cualquier T- Cualquier N- M1</b>
IVA	Presencia de efusión pleural con citología positiva	
IVB	Metástasis parénquimal y metástasis a órganos extra-abdominales (incluyendo nódulos linfáticos inguinales y nódulos linfáticos fuera de la cavidad abdominal)	

### 3.2.3.3 Clasificación de los tumores ováricos de acuerdo con su invasividad

Se ha propuesto un modelo dualista basado en estudios morfológicos, moleculares e inmunohistoquímicos de tumores ováricos, así como las características clínicas de las pacientes y básicamente de acuerdo con la invasividad y agresividad tumoral, así el cáncer epitelial de ovario se clasificó en dos grupos denominados tipo I y tipo II [142-144].

Los carcinomas ováricos tipo I se pueden subdividir en tres grupos: 1) Tumores relacionados a endometriosis que incluyen a los carcinomas endometrioides, carcinomas de células claras y carcinomas seromucinosos; 2) Carcinomas serosos de bajo grado; y 3) Carcinomas mucinosos y tumores de Brenner. Este tipo de tumores tienen un crecimiento lento, frecuentemente se encuentran confinados al ovario al momento del diagnóstico, son indolentes, son genéticamente estables, tienen relativamente buen pronóstico y se desarrollan de lesiones precursoras bien establecidas, los llamados tumores limítrofes que pueden progresar secuencialmente a carcinomas bien diferenciados. Contrariamente a los tumores tipo I, los tumores tipo II se desarrollan rápidamente, se diagnostican con diseminación fuera de los ovarios, son altamente agresivos, genéticamente inestables y generalmente tienen un pobre pronóstico, este grupo incluye principalmente a los carcinomas serosos de alto grado, y en menor proporción a los carcinosarcomas y a los carcinomas indiferenciados. Se desarrollan *de novo* a partir del OSE o probablemente de un carcinoma intraepitelial de las trompas de Falopio. El 25% de los carcinomas son de tipo I y el 75% del tipo II [137, 145]. Se ha observado que las tasas de incidencia de los carcinomas tipo I son mayores en Asia en comparación con Europa y EUA, mientras que los carcinomas tipo II son más comunes en Europa y EUA en comparación con Asia [116]. Con respecto a la mortalidad, los tumores tipo I representan aproximadamente el 10% de las muertes y los tumores tipo II el 90% de las defunciones (Tabla 6).

**Tabla 6.** División de los carcinomas ováricos y sus características clinicopatológicas y moleculares.

<u>Características</u>	<u>Tipo I</u>	<u>Tipo II</u>
<b>Estadio</b>	Frecuentemente estadio temprano	Casi siempre estadio avanzado
<b>Grado del tumor</b>	Bajo grado	Alto grado
<b>Ascitis</b>	Rara	Común
<b>Respuesta a la quimioterapia</b>	Buena	Buena (con recurrencia posterior)
<b>Progresión y comportamiento</b>	Lenta e indolente	Rápida y agresivo
<b>Inestabilidad genética</b>	Baja	Alta
<b>Mutación de TP53</b>	Infrecuente	Frecuente
<b>Mutación de BRCA1/BRCA2</b>	Bajo	Alto
<b>Índice proliferativo Ki67</b>	Generalmente bajo (10%-15%)	Siempre alto (50%-75%)
<b>Subtipo histológico</b>	LGSC, endometriode, mucinoso, CCC y seromucinoso	HGSC y tumores mixtos müllerianos
<b>Precusores</b>	Quiste benigno y tumores limítrofes	Principalmente displasias tubáricas ( <i>de novo</i> )
<b>Detección temprana</b>	Posible	Difícil
<b>Incidencia</b>	Asia > Europa y EUA	Europa y EUA > Asia

Modificada de: [116, 137].

### 3.2.4 Tratamiento para el cáncer de ovario

El tratamiento estándar para el cáncer de ovario incluye la cirugía citoreductiva completa seguida por la quimioterapia combinada de platinos y taxanos. Generalmente, carboplatino AUC (área bajo la curva) 5-7.5/paclitaxel 175 mg/m<sup>2</sup> en una infusión intravenosa por 3 h cada tres semanas por seis ciclos [91, 146]. En casos donde el paclitaxel no es tolerado se recomienda sustituirlo por docetaxel [147]. Con respecto a las pacientes con tumores tempranos (IA y IB), la quimioterapia puede ser omitida, aunque existe riesgo de recaída por lo que es necesario el uso de la quimioterapia adyuvante. Por otra parte en estadios avanzados (III y IV), cuando la citoreducción completa no es

posible las pacientes deben ser tratadas primero con quimioterapia neoadyuvante por tres ciclos y posteriormente se debe practicar la llamada cirugía de intervalo para finalmente continuar con la quimioterapia por seis ciclos más [147, 148]. La respuesta al tratamiento es evaluada posterior a la quimioterapia de primera línea de acuerdo con el criterio RECIST (Criterio de evaluación a la respuesta en tumores sólidos) y aunque la mayoría de las pacientes responden bien, muchas desarrollan recurrencia con una mediana de tiempo de 16 meses [147]. La metodología para el seguimiento de la respuesta al tratamiento implica la medición de las concentraciones de CA-125 y HE4, el incremento en las concentraciones séricas de estos biomarcadores podría representar un signo temprano de recurrencia de la enfermedad [149]. Los cánceres ováricos que son quimiosensibles y que se encuentran confinados a la superficie de la cavidad peritoneal por mucho tiempo, podrían ser tratados con quimioterapia intraperitoneal (IP), aunque no es recomendable ya que se ha observado que no confiere ventajas al tratamiento en comparación con la quimioterapia administrada vía intravenosa. Como terapia de segunda línea se utilizan regímenes de varios medicamentos, usualmente el carboplatino o cisplatino en combinación con paclitaxel, doxorubicina liposomal pegilada (PLD) o gemcitabina, con o sin bevacizumab (anticuerpo monoclonal contra los receptores del factor de crecimiento del endotelio vascular [VEGF]) [148]. Debido a que las recurrencias resistentes a platinos son extremadamente difíciles de tratar, lo que conlleva a la muerte en un intervalo de tiempo corto, existe la necesidad urgente de mejorar los regímenes terapéuticos para mejorar los resultados clínicos. Actualmente se realizan pruebas clínicas para evaluar la eficiencia de nuevos medicamentos dirigidos contra blancos moleculares y determinar la posibilidad de incorporarlos en la terapia de primera línea. Algunos han mostrado cierta eficiencia incluyendo agentes anti-angiogénicos (e.g., bevacizumab, pazopanib y cediranib), inhibidores de vías de señalización activadas por factores de crecimiento, inhibidores del receptor de folato  $\alpha$  (e.g., farletuzumab), inhibidores de la poliADP-ribosa polimerasa (PARP), e.g., olaparib, niraparib y rucaparib. Así como inhibidores de puntos de control del sistema inmune (e.g., catumaxomab, Ipilimumab y nivolumab). Las más recientes mejoras en el tratamiento del cáncer de ovario son el bevacizumab y el olaparib, el primero aprobado por la agencia de medicina europea (EMA) en 2011 como tratamiento de primera línea junto con la quimioterapia estándar, aunque no ha sido aprobado por la FDA [148]. El segundo, aprobado en 2014 por ambas organizaciones para el tratamiento de pacientes con cáncer de ovario recurrente que presentan mutaciones en *BRCA1/2* [147, 150].

### **3.3 Vías de transducción de señal oncogénicas utilizadas como blancos terapéuticos en cáncer de ovario**

Las vías de transducción de señal son mecanismos que le permiten a las células recibir estímulos externos, transmitirlos a su interior y producir una respuesta biológica específica. Consisten principalmente de una cadena de proteínas que interactúan unas con otras en una secuencia establecida evolutivamente. Las señales externas son mediadas a través de la activación de receptores de superficie celular que a su vez desencadenan una cascada intracelular de reacciones bioquímicas que llevan al núcleo la información para la generación de la respuesta celular específica [151]. Las moléculas que componen estas vías de señalización son: *a)* La señal extracelular, como la ejercida por factores de crecimiento y citocinas, *b)* Los receptores, que detectan la señal en la membrana celular y la transmiten al interior de la célula, *c)* Los transductores, que pasan la señal a moléculas intracelulares, *d)* Los sensores, como por ejemplo la ciclina D1, *e)* Los efectores, como los factores de transcripción, y finalmente *f)* La respuesta celular, como por ejemplo la proliferación, la migración y la invasión celular [151]. La alteración de las vías de señalización puede dar lugar a la aparición de enfermedades como el cáncer. Recientemente se ha puesto interés en aquellas que están involucradas en el desarrollo del cáncer de ovario, particularmente en las vías de transducción de señal con mediadores oncogénicos que puedan considerarse como blancos terapéuticos.

#### **3.3.1 Vía de transducción de señal de PI3K y cáncer de ovario**

La vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR está involucrada en el control de múltiples funciones celulares de forma fisiológica incluyendo la proliferación celular, la traducción de proteínas, la sobrevivencia celular, la migración, la apoptosis, la angiogénesis y el metabolismo. Sin embargo, su activación aberrante contribuye a la carcinogénesis de muchos tipos de tumores malignos. Generalmente, esta vía se activa transitoriamente en respuesta a factores de crecimiento y citocinas, y puede transducir señales intracelulares a través de RTKs, moléculas de adhesión celular y receptores acoplados a proteínas G (GPCR) [152]. Existen alteraciones genéticas que pueden activar la vía de PI3K/AKT/mTOR constitutivamente en ausencia de un estímulo. Puede ser debido a: 1) Mutaciones oncogénicas y amplificación en receptores; 2) Mutaciones o amplificaciones del gen de *PIK3CA*; 3) Mutaciones o amplificaciones en las isoformas de AKT; 4) Mutaciones deletéreas o que inactiven los genes supresores de tumores



*TSC1* o *LKB1* (cinasa hepática B1); 5) Pérdida del regulador negativo *PTEN* por mutaciones que lo inactiven, pérdida del número de copias o hiper-metilación del promotor [153-155].

La familia de PI3K está compuesta de una diversidad de cinasas de lípidos divididas en tres clases dependiendo de su estructura y sustrato. Las enzimas de la Clase I son las más importantes en el desarrollo del cáncer de ovario, estas cinasas son heterodímeros compuestos por las subunidades reguladoras p85 ( $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) y las subunidades catalíticas p110 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$ ). Particularmente, las mutaciones del gen *PIK3CA* (que codifica p110 $\alpha$ ) han sido descritas frecuentemente en los carcinomas endometrioides y en los CCC (10-40%) pero raramente en los subtipos histológicos serosos (2.3%). Contrariamente, las amplificaciones del gen no se restringen a un subtipo específico y se han detectado en el 20-40% de los casos de cáncer de ovario [154]. Mientras que las mutaciones o amplificaciones en *PIK3R1* (p85 $\alpha$ ) se han observado en 3.8% de los casos [156]. Las cinasas tienen una alta especificidad por sustratos únicos y todas inician la señalización río abajo por la fosforilación del grupo hidroxilo de la posición 3' del anillo inositol de los fosfolípidos de inositol en la membrana celular. En ausencia de señales activadoras la subunidad p85 interactúa con la subunidad p110 e inhibe su actividad de cinasa. Posteriormente a la unión de los RTKs o GPCRs a sus ligandos, las PI3K son reclutadas a la membrana plasmática donde son fosforiladas en los residuos de tirosina del dominio SH2 (homólogo 2 a Src) de la subunidad reguladora (p85), son liberadas de su inhibición y la subunidad p110 cataliza la generación del segundo mensajero fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato [PI(3,4,5)P3] a partir del fosfatidilinositol-4,5-bifosfato [PI(4,5)P2]. Este compuesto se une al dominio homólogo de pleckstrina (PH) de proteínas como las cinasas dependientes de fosfoinositido 1 y 2 (PDK1/2) y las isoformas 1, 2 y 3 de AKT, lo que ocasiona su activación y translocación a la membrana plasmática. La amplificación del gen *AKT2* ha sido observada en 18% de HGSC y puede regular la angiogénesis tumoral [154]. La activación del dominio catalítico de AKT es mediada por PDK1 que fosforila el residuo de treonina 308 y por PDK2 a través de la fosforilación del residuo de serina 473. Este proceso es regulado negativamente por los genes supresores de tumor *PTEN* e *INPP4B* (fosfatasa tipo II de inositol polifosfato 4), que convierten [PI(3,4,5)P3] a [PI(4,5)P2], y [PI(3,4)P2] hacia PI(3) respectivamente, reduciendo así la actividad de AKT [152, 157]. Se ha demostrado que la pérdida de la actividad de *PTEN*, ya sea por mutaciones, deleciones o silenciamiento por metilación del promotor ocurre frecuentemente en cáncer de ovario (68%) [154]. El principal blanco de AKT es mTOR, una proteína con actividad de cinasa de serina/treonina que pertenece a la familia de cinasas relacionadas a PI3K. La proteína mTOR puede existir en dos complejos multiproteicos, complejos 1 y 2 de mTOR

(mTORC1 y mTORC2). AKT puede activar a mTOR por dos mecanismos: a) fosforilación directa del residuo de serina 2448 de mTORC1, o indirectamente a través de la inactivación de TSC2 (complejo 2 de esclerosis tuberosa, tuberina) por fosforilación, lo que resulta en la sobre-regulación de la actividad de mTORC1 [152]. El complejo mTORC1 tiene una participación importante en la traducción de proteínas al fosforilar 4E-BPI (proteína 1 de unión al factor de iniciación de la traducción eucariótica 4E) y S6K1 (cinasa 1 de la proteína ribosómica S6, p70S6K). Además de la traducción de proteínas, mTORC1 regula la proliferación, la supervivencia celular y la angiogénesis. Por otra parte, se conoce poco acerca de la señalización mediada por el complejo mTORC2, sin embargo, se sabe que participa en la activación de AKT a través de la fosforilación de su residuo Ser473, que es necesaria para su máxima actividad [152, 157].

Actualmente se están evaluando múltiples compuestos que actúan como inhibidores farmacológicos de la vía de PI3K en pruebas clínicas para el tratamiento del cáncer de ovario, solos y en combinación con la quimioterapia o con otras terapias blanco y han mostrado resultados prometedores ya que aumentan la supervivencia libre de progresión de las pacientes. Estos inhibidores se pueden clasificar en 4 categorías principales: 1) Inhibidores de PI3K; 2) Inhibidores de AKT; 3) Inhibidores de mTOR; y 4) Inhibidores duales de PI3K/mTOR. Los inhibidores de PI3K más estudiados en cáncer de ovario son el BKM120 (Buparsilib), el XL147 y el GDC-0941 (Pictilisib) en pruebas clínicas fase I. Para la inhibición de AKT, el compuesto Perifosina mostró eficiencia en conjunto con docetaxel en un estudio fase I en pacientes con cáncer de ovario recurrente [158]. También se están realizando pruebas clínicas fase I y II con los compuestos MK-2206, GSK690693 y PTX-200 (Triciribine). Entre los inhibidores de mTOR se encuentra la rapamicina (sirolimus) y tres derivados: 1) Temsirolimus (CCI-779); 2) Everolimus (RAD001); y 3) Ridaforolimus (AP23573). Actualmente el temsirolimus y el everolimus son probados en estudios clínicos fase I-II en pacientes con cáncer de ovario, ya sea como agentes únicos o en combinación con la quimioterapia. Como terapia única, el temsirolimus aumentó la supervivencia libre de progresión por 3 meses en 24% de las pacientes con cáncer de ovario recurrente, y el 9.3% experimentó una respuesta parcial [159]. También se está evaluando la efectividad terapéutica de los inhibidores duales de mTOR/PI3K como el XL765 (Vostalisib), GDC-0980 (Apatolisib), GSK2126458 y NVP-BEZ235. Es necesario tomar en consideración la generación de resistencia a estos inhibidores debido a la interacción de esta vía con otras. La inhibición de la vía de PI3K podría ocasionar la sobre-regulación compensatoria de MAPK ya que ambas vías de señalización tienen funciones redundantes y comparten mecanismos de regulación positiva y negativa [153].

### 3.3.2 Vía de transducción de señal de MAPK y cáncer de ovario

Las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) son cinasas de serina/treonina que convierten los estímulos externos en una amplia variedad de respuestas celulares. La familia de las MAPK está compuesta de 14 miembros dispuestos en siete grupos (Figura 5) [160, 161]. Cada grupo comprende una serie de cinasas que actúan secuencialmente en tres niveles. Las vías de señalización consisten de una cinasa regulada por GTPasa (trifosfatasa de guanosina) (MAPKKK), que fosforila y activa una cinasa intermedia (MAPKK), la cual a su vez fosforila y activa una cinasa efectora (MAPK) (Figura 5) [160, 161].

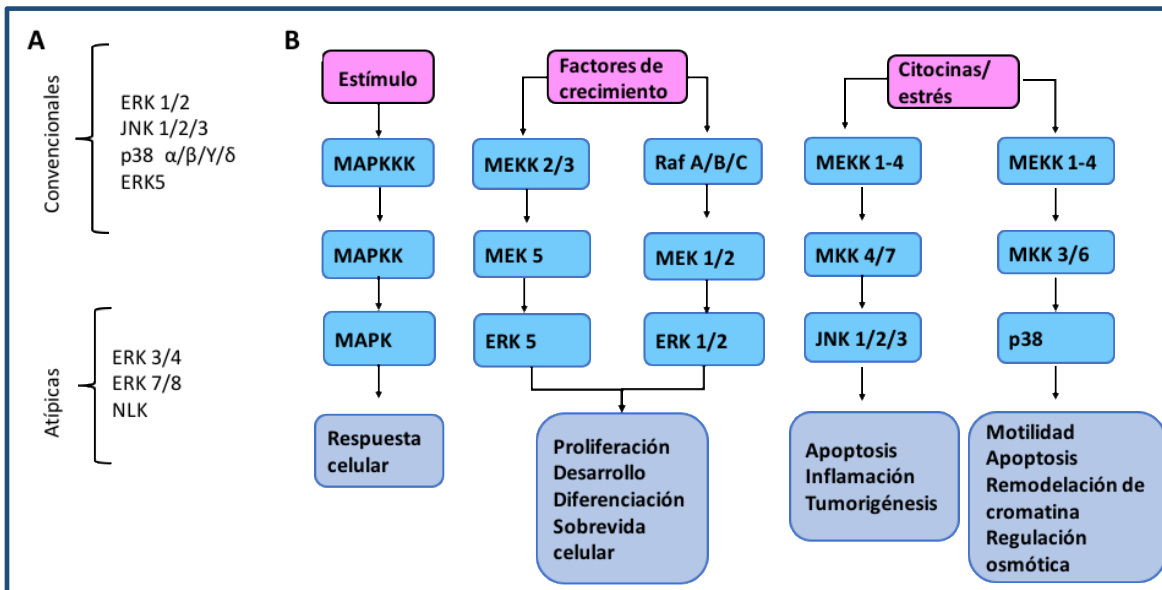
Existen tres módulos principales de MAPKs, las proteínas cinasas reguladas por señal extracelular 1 y 2 (ERK1/2), las cinasas de amino (N)-terminal de c-Jun (JNK1/2/3) y las cinasas p38 ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  y  $\delta$ ). El módulo mejor descrito es el de ERK1/2, está constituido por las MAPKKK, A-Raf, B-Raf y C-Raf/Raf-1. Las MAPKK, MEK1 y MEK2. Finalmente, las MAPK, ERK1 y ERK2. Estas últimas fosforilan sustratos en el citoplasma, en el núcleo y otros asociados con la membrana o al citoesqueleto. Este módulo responde principalmente a factores de crecimiento que actúan a través de receptores RTK y GPCR, también responden a citocinas, estrés osmótico y desorganización de los microtúbulos. ERK1/2 estimulan la transcripción de genes que regulan principalmente la proliferación celular, la adhesión, la migración, la apoptosis y la diferenciación [162].

La cascada de MAPK clásica inicia con la unión de un ligando ya sea factor de crecimiento o citocina a su receptor membranal. La familia de proteínas ras (K-Ras, N-Ras y H-Ras) sirven como un switch intracelular para la transducción de señal río abajo. En su forma activa, Ras recluta proteínas de la familia Raf (A-Raf, B-Raf y C-Raf/Raf-1) a la membrana celular. La unión de Ras-Raf activa la función de cinasa de serina/treonina de Raf, esta fosforila y activa a las cinasas MEK1 y MEK2, que a su vez promueven la fosforilación de las cinasas efectoras ERK1 y ERK2. La activación de ERK1/2 provoca su translocación del citoplasma al núcleo a través de los poros nucleares mediada por importinas. Después de su activación, ERK1/2 fosforilan y activa múltiples sustratos en el citoplasma (e.g. proteína cinasa asociada a muerte (DAPK), TSC2, la familia de cinasas de la proteína ribosomal S6 (RSK, p90S6K) y las cinasas de interacción con MAPK (MNKs)). En el núcleo actúa sobre varios factores de transcripción incluyendo: Sp1, E2F, Elk-1, c-Myc, STAT-3 y AP-1. Otros sustratos de ERK1/2 están asociados a la membrana (CD120a, Syk y calnexina) o al citoesqueleto (neurofilamentos y paxilina) [160, 163].

La activación aberrante de la vía de Ras/Raf/MEK/ERK está asociada al desarrollo de muchos tipos de tumores sólidos incluyendo los carcinomas ováricos. La proteína KRAS es la más frecuentemente mutada en LGSC, se ha observado en 20-55% de los casos y 75-85% de los carcinomas mucinosos, lo cual implica la activación constitutiva de la vía y que su bloqueo con inhibidores podría ser una estrategia relevante para el tratamiento de subtipos histológicos específicos de cáncer de ovario. Múltiples estudios preclínicos han demostrado que la inhibición de esta vía puede disminuir la proliferación celular, la migración e invasión y detener el crecimiento tumoral. Recientemente se han realizado pruebas clínicas con inhibidores de MEK1/2 y se ha demostrado que pueden aumentar la tasa de respuesta total y la supervivencia libre de progresión de pacientes con tumores sólidos, actualmente el trametinib (GSK1120212) y el cobimetinib (GDC-0973, XL518) están aprobados por la FDA y la EMA para el tratamiento de melanomas y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) [164].

Entre los inhibidores de MEK probados para el tratamiento de cáncer de ovario se encuentra el MEK162 (ARRY-438162), trametinib, selumetinib (AZD6244), sorafenib y pimasertib (AS703026), solos o en combinación con otras terapias blanco o la quimioterapia estándar. El selumetinib es uno de los más estudiados ya que las pacientes muestran buena tolerancia al fármaco, una modesta respuesta parcial y una mejor supervivencia libre de progresión en comparación con la quimioterapia tradicional [163]. En referencia a la señalización de JNK, ésta se encuentra activa en una alta proporción de tumores malignos de ovario y la actividad de JNK está más elevada en estadios avanzados de este tipo de cáncer. Además, la actividad de JNK también se ha asociado con quimioresistencia en células de carcinoma ovárico, por lo tanto, la inhibición de su fosforilación sensibiliza a las células a fármacos como cisplatino y paclitaxel [165]. También se ha observado que su inhibición con el compuesto SP-600125 disminuye en forma significativa la proliferación de células de carcinoma hepatocelular [166].

Es importante considerar la interacción que existe entre las vías de transducción de señal de PI3K/AKT/mTOR y Ras/Raf/MEK/ERK, y la posible adquisición de resistencia por parte de las células a los inhibidores de ambas vías. Por lo que se requiere de la combinación de terapias para poder obtener mejores resultados en el tratamiento de las pacientes. También es importante encontrar biomarcadores que demuestren la eficiencia (actividad antitumoral) de los inhibidores en las pacientes y predigan la resistencia a estos. Además de que es esencial reconocer que la síntesis desregulada de factores de crecimiento y sus receptores a través de la activación de las vías de transducción de señal oncogénicas juega un papel importante en el desarrollo del cáncer de ovario.



**Figura 5.** Diagrama de flujo de los módulos de MAPK. **A)** Clasificación de las MAPK. **B)** Módulos de MAPK de tres niveles, la figura muestra el estímulo, la cascada reguladora dentro de cada módulo y varias respuestas celulares controladas por las MAPK. Adaptada de: [160, 161].

### 3.3.3 Vía de transducción de señal de PKA y cáncer de ovario

La proteína cinasa A (PKA, proteína cinasa dependiente de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP)) es un miembro de la super familia de proteínas cinasas de serina-treonina AGC, media la transducción de señales de GPCRs que interactúan con la adenilato ciclasa (AC) para promover la producción o la degradación del segundo mensajero cAMP a partir del trifosfato de adenosina (ATP) [167, 168]. La PKA es una holoenzima que existe como un tetrámero de dos subunidades reguladoras (R) y dos subunidades catalíticas (C) que permanece inactiva hasta que dos cAMP se unen a cada una de las subunidades R lo que provoca su disociación y la liberación de las subunidades C activas que pueden fosforilar sustratos específicos como factores de transcripción de la familia de la proteína de unión a elementos de respuesta a cAMP (CREB) [167-169].

La PKA está involucrada en el control de una amplia variedad de procesos celulares como el metabolismo, la migración, el crecimiento y la diferenciación celular, expresión de genes y apoptosis. Aunque también ha sido implicada en la iniciación y progresión de muchos tumores, entre los que se encuentra el cáncer de ovario. La actividad de la PKA regula la migración e invasión, y por lo tanto la metástasis, de células de cáncer de ovario [170]. Su expresión se correlaciona clínicamente con los estadios avanzados de la enfermedad [171]. Por otra parte, la

vía de PKA interactúa con otras vías de transducción de señal, incluyendo la de RAS/RAF/MEK, cuya interacción juega un papel importante en la biología del cáncer. Entre los inhibidores de PKA utilizados contra el cáncer se encuentra el AT13148, un inhibidor multikinasa AGC, sus blancos son además de PKA, AKT, S6K y ROCK1/2 [172]. Este inhibidor ha demostrado actividad antitumoral para cáncer gástrico y también ha mostrado tener buenos resultados preclínicos para células de melanoma [173, 174].

## **4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

El cáncer de ovario es un importante problema de salud pública a nivel mundial debido a su incidencia y a la alta mortalidad que presentan las pacientes con esta patología. En la actualidad el cáncer de ovario es considerado como un conjunto de enfermedades con base en las diferencias en el comportamiento molecular y clínico que presentan los cinco subtipos histológicos más importantes de los tumores de ovario (serosos de alto grado, serosos de bajo grado, endometriode, mucinoso y de células claras (CCC)). En el proceso de su carcinogénesis los factores de crecimiento juegan un papel muy importante y en los últimos años se ha descrito la participación de la progranulina (PGRN) en cáncer de ovario, en donde su sobre-expresión estimula la proliferación celular, incrementa la capacidad de invasión y migración celular, promueve la quimioresistencia y se asocia a una menor supervivencia de las pacientes. Sin embargo, poco se sabe acerca de cómo se modula su expresión en esta patología.

Previamente en nuestro laboratorio se reportó que la vía de PKC participa en la regulación de la expresión de la progranulina en células derivadas de tumores de ovario serosos. En la presente tesis se propuso evaluar si otras vías de señalización como la PI3K/AKT/mTOR/HIF- $\alpha$ , MAPK (ERK1/2 y JNK) y PKA regulan la concentración de la progranulina en las células TOV-21G derivadas de un carcinoma de ovario de células claras, ya que este tipo de tumores son considerados de los más agresivos por su resistencia a la quimioterapia y por presentar características moleculares muy específicas incluyendo la desregulación de las vías de PI3K y MAPK. El conocer cuáles son las vías de señal de transducción que regulan la expresión de esta proteína nos permitiría conjeturar la posibilidad de utilizarla como un blanco terapéutico o como un marcador en la inhibición de estas vías de señalización al utilizar inhibidores farmacológicos como tratamiento para este subtipo de tumores ováricos.

## **5 OBJETIVOS**

### **Objetivo General**

Determinar el papel de las vías de transducción de señal PI3K/AKT/mTOR/HIF-1 $\alpha$ , MAPK/ERK, MAPK/JNK y PKA en la regulación de la expresión de la progranulina en una línea celular derivada de un carcinoma de ovario de células claras.

### **5.1 Objetivos particulares**

- 3.1.1. Determinar el efecto del inhibidor GDC-0941 en la expresión de la proteína progranulina en la línea celular TOV-21G.
- 3.1.2. Establecer el efecto del compuesto rapamicina en la síntesis de la progranulina.
- 3.1.3. Examinar el efecto de la hipoxia inducida por cloruro de cobalto en las células TOV-21G sobre la síntesis de la progranulina.
- 3.1.4. Evaluar la respuesta sobre la expresión de la progranulina al inhibir las vías de transducción de señal de MAPK, con los inhibidores farmacológicos PD-98059 y SP-600125.
- 3.1.5. Valorar si la Inhibición de la actividad de PKA con el compuesto H89 modifica la síntesis de la progranulina en las células TOV-21G.

## **6 HIPÓTESIS**

Las vías de transducción de señal de PI3K, MAPK (ERK1/2 y JNK) y PKA participan en la regulación de la expresión de progranulina, en las células TOV-21G derivadas de un carcinoma ovárico de células claras.



## 7 METODOLOGÍA

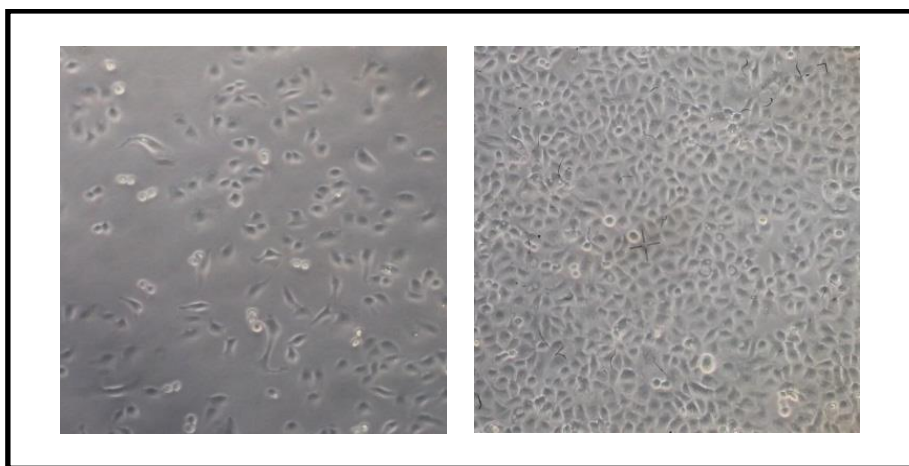
### 7.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio experimental con células

### 7.2 MATERIAL

#### 7.2.1 Línea Celular

La línea celular TOV-21G (ATCC, EUA) proviene de un adenocarcinoma de ovario de células claras y será utilizada en el desarrollo de este proyecto (Figura 6). Como características de estas células se conoce que crecen en monocapa en cultivos *in vitro* y tienen una alta tasa de proliferación con un tiempo de duplicación de 25 h aproximadamente. Son capaces de formar tumores en ratones inmunodeficientes y crecer en agar semisólido. Además, presentan un cambio simple en su cariotipo 47, XX, +10 y una delección del cromosoma 3p24. Esta línea celular se caracteriza por presentar diversas mutaciones en los genes *PIK3CA*, *KRAS*, *CTNNB1*, *ARID1A* y *PTEN*. También se caracterizan por ser quimiosensibles a varias drogas como docetaxel, paclitaxel, carboplatino, cisplatino, oxaliplatino, 5-fluorouracilo, doxorubicina y gemcitabina [175-177].



**Figura 6.** Micrografías de la línea celular TOV-21G derivada de un carcinoma de ovario de células claras. Baja confluencia vista con aumento 100X (Izquierda), confluencia alta con aumento 200X (derecha).

## 7.2.2 Inhibidores farmacológicos de las vías de transducción de señal

1) **GDC-0941** (*Pictilisib*) (Abcam plc., Reino Unido): Es un inhibidor potente y altamente selectivo de las cinasas de PI3K clase I. Tiene actividad equipotente sobre las isoformas  $\alpha$  y  $\delta$  de la subunidad p110 de PI3K, y presenta modestos niveles de selectividad contra p110 $\beta$  y p110 $\gamma$ . Por otra parte, el GDC-0941 también puede actuar sobre mTOR, miembro de la familia de PI3K clase IV. El efecto inhibitorio de este compuesto es a través de su acción como un antagonista competitivo de ATP para el sitio catalítico [178].

2) **Rapamicina** (*Sirolimus*) (Cell Signaling Technology, Inc., EUA): Es un inhibidor de mTOR. Este compuesto es un macrólido producido por la bacteria *Streptomyces hygroscopicus* que tiene actividad antifúngica e inmunosupresora. La rapamicina Inhibe indirectamente la actividad catalítica de la cinasa mTOR y forma un complejo con la inmunofilina FKBP12, lo que a su vez tiene como consecuencia la inhibición de mTOR [179-181].

3) **PD-98059** (Calbiochem, EMD Millipore, EUA): Es un flavonoide que funciona como un inhibidor potente y selectivo de la cinasa MEK1 e indirectamente de ERK1/2. El mecanismo de acción es no competitivo con respecto al ATP, ya que este compuesto se une a la forma inactiva de MEK1 y previene la fosforilación de ERK1/2 pero no la fosforilación de las cinasas JNK y p38. Tampoco inhibe otras cinasas como la de Raf, cAMP, PKC, v-Src y PI3K [182, 183].

4) **SP-600125** (Cell Signaling Technology, Inc., EUA): Es un inhibidor selectivo de las isoformas 1, 2 y 3 de la cinasa JNK y por lo tanto inhibe la fosforilación de la proteína c-jun. Este compuesto es una atrapirazolona que actúa como un inhibidor competitivo del ATP [184].

5) **H89** (Calbiochem, EMD Millipore, EUA): Es un compuesto derivado de isoquinolina que actúa como un inhibidor potente y selectivo de la proteína cinasa A (PKA), actuando como antagonista competitivo del ATP en la subunidad catalítica de PKA [185].

## 7.2.3 Inductor de la expresión de HIF-1 $\alpha$

1) **Cloruro de cobalto hexahidratado** ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich Corp., EUA): Este compuesto fue utilizado para inducir hipoxia química *in vitro* (también conocida como hipoxia inducida por metales). Se ha demostrado que los efectos de los metales que mimetizan la hipoxia física, como el caso del cobalto, el níquel y el zinc son similares a aquellos resultantes de la reducción de los niveles de oxígeno [186, 187]. En condiciones normóxicas el HIF-1 $\alpha$  es

expresado constitutivamente, la enzima prolil-4-hidroxilasa es la encargada de regular su degradación por la vía del proteosoma mediada por ubiquitina-pVHL (supresor de tumor von Hippel-Lindau) y por lo tanto actúa como estabilizadora y reguladora de la expresión de este factor. En condiciones de hipoxia el HIF-1 $\alpha$  es el principal factor de transcripción que regula la expresión de varios genes y su hidroxilación es inhibida, lo que conlleva a su estabilización, en forma similar el cloruro de cobalto promueve la estabilidad del HIF-1 $\alpha$  por dos posibles mecanismos de acción: 1) Bloqueando su degradación por la prolil-4-hidroxilasa, ya que la sustitución de Fe<sup>2+</sup> por Co<sup>2+</sup> en las enzimas inhibe su actividad y 2) Evitando que el HIF-1 $\alpha$  hidroxilado sea degradado, ya que al unirse directamente al cobalto evita su unión a pVHL y por lo tanto su proteólisis, manteniendo así una alta expresión del HIF-1 $\alpha$  [186, 187].

## **7.3 MÉTODOS**

### **7.3.1 Cultivo celular**

Las células TOV-21G se cultivaron en botellas de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup> (Corning Inc., EUA) con medio de cultivo DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB), 1 mM de piruvato de sodio y una solución de antibiótico/antimicótico equivalente a 100 U/mL de penicilina G, 100  $\mu$ g/mL de estreptomicina y 0.25  $\mu$ g/mL de amfotericina B (Life Technologies, EUA). Las células se mantuvieron en una incubadora con atmósfera húmeda con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a 37°C. Los pases de las células se realizaron con tripsina al 0.25% p/v y 1 mM de EDTA-4Na en solución salina de Hank 0.85% (Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

### **7.3.2 Ensayos celulares e inhibición de las vías de transducción de señal**

Para estos ensayos, las células fueron sembradas en placas de 12 pozos (Corning Inc., EUA) en 1 mL de medio de cultivo y en una cantidad de 2x10<sup>5</sup> células/pozo. Después de 24 h las células fueron lavadas con buffer salino de fosfatos (PBS, pH 7.4) (Life Technologies, EUA) y el medio fue remplazado por medio sin rojo de fenol suplementado con 5% de SFB más la dosis correspondiente del inhibidor indicado de acuerdo con la vía de transducción de señal en estudio. El período de incubación fue de 24 h. En cada uno de los experimentos las células fueron cultivadas en el medio sin rojo fenol suplementado con 5% de SFB con la intención de mantener las vías de señalización activadas. Así, los controles fueron células cultivadas con este medio en ausencia de inhibidor, así como células cultivadas con el medio en ausencia del inhibidor, pero

en presencia del vehículo dimetilsulfóxido (DMSO) que fue utilizado como diluyente de los inhibidores, cuya concentración final no excedió el 1% v/v.

Las concentraciones de los distintos inhibidores fueron seleccionadas de la literatura y de éstas, las concentraciones óptimas fueron elegidas con base en experimentos previos ejecutados para valorar la viabilidad celular, descartando las dosis tóxicas para las células. Las concentraciones de GDC-0941 utilizadas en este proyecto fueron de 2, 3 y 4  $\mu\text{M}$ , las del PD-98059 fueron de 50, 65 y 80  $\mu\text{M}$  y las del SP-600125 de 5, 10, 20 y 40  $\mu\text{M}$ . Finalmente las concentraciones del H89 fueron de 5, 10 y 20  $\mu\text{M}$ .

### **7.3.3 Ensayo celular e inducción de hipoxia química**

Para este ensayo, también se usaron placas de cultivo de 12 pozos y se sembraron  $2 \times 10^5$  células/pozo en 1 mL de medio de cultivo. Después de 24 h las células fueron lavadas con PBS y el medio fue remplazado por medio sin rojo de fenol y sin SFB. Se adicionaron 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  por 8, 12 o 24 h. En cada uno de los tiempos el medio de cultivo sin rojo de fenol, sin SFB y en ausencia de  $\text{CoCl}_2$  fue utilizado como control. Una vez finalizado el periodo de incubación, se siguió el protocolo para la extracción de proteínas y posteriormente la realización del western blot.

### **7.3.4 Extracción de proteínas**

Una vez concluidos los ensayos, las células fueron lavadas con PBS y lisadas durante 5 minutos con 100  $\mu\text{L}$  de buffer de lisis (Cell Signaling Technology Inc. EUA) el cual contenía 20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ , 1 mM EGTA, Tritón 1%, 2.5 mM pirofosfato de sodio, 1 mM  $\beta$ -glicerofosfato, 1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptina, a pH 7.5. Además de una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete, Mini, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail*, Roche Applied Science, EUA). Posteriormente los lisados fueron centrifugados a 10,000 rpm por 10 minutos a 4°C con la finalidad de remover los restos celulares y coleccionar los sobrenadantes para la cuantificación de proteínas.

### **7.3.5 Cuantificación de proteínas**

La cantidad total de proteínas fue determinada por el ensayo del ácido bicinónico (BCA, Thermo Fisher Scientific, EUA). Dicho método emplea la combinación de la reducción de  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{1+}$  por proteínas en un medio alcalino y la detección colorimétrica del catión cuproso

(Cu<sup>1+</sup>) utilizando el BCA. La intensidad de la coloración purpura producida en la prueba, la cual es el resultado de la quelación de dos moléculas de BCA con un ion cuproso, es proporcional a la concentración de proteínas totales y presenta una fuerte absorbancia a 562 nm. Como proteína estándar se usó la albumina sérica bovina (BSA). Todas las muestras fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento.

### 7.3.6 Técnica de Western blot

La técnica de western blot fue utilizada para determinar la expresión de las diversas proteínas analizadas. La concentración de proteínas totales utilizadas para el desarrollo de esta técnica dependió de la abundancia de la proteína de interés en las células. Para la detección de progranulina,  $\beta$ -actina, Akt total, Akt fosforilada, mTOR total y mTOR fosforilada se utilizaron 5  $\mu$ g de proteínas totales, para ERK1/2 totales y ERK1/2 fosforiladas se requirieron 35  $\mu$ g y para HIF-1 $\alpha$  se usaron 20  $\mu$ g. Una vez establecida la concentración de proteínas totales, a las muestras se les añadieron 5  $\mu$ L de buffer de Laemmli suplementado con 400 mM de ditioneitol (DTT) para desnaturalizar las proteínas al ser calentadas a 90-95°C por 10 minutos. Posteriormente las proteínas fueron separadas por electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida al 10% por un periodo de aproximadamente 3 h. Una vez finalizada la separación de las proteínas, éstas fueron transferidas a membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (GE Healthcare, EUA) a 25 mA por 16 h a 4°C. Después de haber concluido la transferencia las membranas fueron bloqueadas con el buffer salino Tris-Tween-20 0.1% (TBS-T, pH 7.5) más 5% de leche en polvo sin grasa por 1 h a temperatura ambiente y de manera inmediata las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios específicos para cada proteína a una temperatura de 4°C durante 16 h. Los anticuerpos, así como las diluciones utilizadas para cada uno de ellos se muestran en la Tabla 7. Posteriormente las membranas fueron lavadas 3 veces con TBS-T e incubadas con los anticuerpos secundarios correspondientes por 1.5 h a temperatura ambiente (Tabla 7). Una vez finalizados este periodo de incubación las membranas fueron sometidas a varios lavados con TBS-T. Finalmente la expresión de las proteínas fue visualizada usando el estuche de quimioluminiscencia *SuperSignal West Femto Substrate* (Thermo Fisher Scientific, EUA) y el equipo *C-Digit® Blot Scanner* (LI-COR, Inc., EUA).

**Tabla 7.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la identificación de las proteínas por la técnica de western blot.

<b>Anticuerpos primarios</b>				
<b><u>Anticuerpo</u></b> <b>(Blanco)</b>	<b><u>Compañía o Donación</u></b>	<b><u>Origen</u></b>	<b><u>Clonalidad</u></b>	<b><u>Dilución</u></b>
Progranulina	Dr. George Gerton, Universidad de Pensilvania, EUA.	Conejo	Policlonal	1:2000
$\beta$ -actina	Abcam, plc., Reino Unido	Ratón	Monoclonal	1:3000
Akt 1/2/3	Cell Signaling Technology, Inc., EUA	Conejo	Policlonal	1:1000
Akt fosforilada (Ser473)	Cell Signaling Technology, Inc., EUA	Conejo	Policlonal	1:1000
mTOR	Cell Signaling Technology, Inc., EUA	Conejo	Policlonal	1:1000
mTOR fosforilado (Ser2448)	Cell Signaling Technology, Inc., EUA	Conejo	Policlonal	1:1000
p44/42 MAPK (Erk1/2)	Cell Signaling Technology, Inc., EUA	Conejo	Policlonal	1:1000
p44/42 MAPK (Erk1/2) fosforilado (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology, Inc., EUA	Ratón	Monoclonal	1:500
HIF-1 $\alpha$	Cell Signaling Technology, Inc., EUA	Conejo	Policlonal	1:1000
<b>Anticuerpos secundarios</b>				
<b><u>Anticuerpo</u></b>	<b><u>Compañía o Donación</u></b>	<b><u>Origen</u></b>	<b><u>Clonalidad</u></b>	<b><u>Dilución</u></b>
IgG anti-conejo conjugada con HRP	Jackson ImmunoResearch, EUA	Cabra	Policlonal	1:10,000
IgG anti-ratón conjugada con HRP	Jackson ImmunoResearch, EUA	Cabra	Policlonal	1:10,000

### 7.3.7 Ensayo de proliferación celular

El estuche colorimétrico XTT (Roche Applied Science, EUA) se utilizó para determinar el efecto de los inhibidores de las vías de transducción de señal sobre el metabolismo celular y de forma indirecta sobre la proliferación celular. Para estos ensayos se cultivaron  $2 \times 10^4$  células/pozo en placas de 96 pozos (Corning Inc., EUA) en 100  $\mu$ L de medio. Los cultivos celulares e inhibición de las vías de transducción de señal se realizaron como se describió previamente. Una vez transcurridos los tiempos de inhibición, se preparó una mezcla del reactivo de XTT (Na 3'-[1-(fenilaminocarbonil)-3,4-tetrazolio]-bis (4-metoxi-6-nitro) benceno ácido sulfónico hidratado) y 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  $\mu$ L de esta mezcla y se incubaron por 2 h 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 los controles.

### 7.3.8 Ensayo de citotoxicidad

La muerte celular provocada por los inhibidores de las vías de transducción de señal se determinó utilizando el estuche *CytoTox 96 Non-Radioactive* (Promega Corp., EUA). Con este estuche se detecta la enzima citosólica lactato deshidrogenasa (LDH) que es liberada al medio de cultivo por células que perdieron la integridad de su membrana plasmática (muertas). Para esto, se cultivaron  $2 \times 10^4$  células/pozo en placas de 96 pozos en 100  $\mu$ L de medio de cultivo. Después de 16 h, el medio de cultivo fue reemplazado por medio sin rojo de fenol y sin SFB conteniendo las diferentes concentraciones de los inhibidores y por los diferentes periodos de tiempo, como se detalló previamente. Una vez concluidos los cultivos, la mitad del medio de cultivo (50  $\mu$ L) fue separada y transferida a pozos limpios, posteriormente las células fueron lisadas agregando 5  $\mu$ L de una solución de lisis 10X (Tritón X-100 al 9% v/v) e incubadas por 45 min a 37°C. Transcurrido este tiempo tanto a los pozos con las células lisadas como a los pozos que contenían únicamente medio, se les adicionaron 50  $\mu$ L de la solución sustrato, observando un viraje en el color del medio. Esta reacción se detuvo adicionando 50  $\mu$ L de una solución de ácido acético 1 M y se midió la absorbancia a 490 nm. Los resultados se expresaron como porcentaje de viabilidad con respecto a los controles, calculados con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{Liberación experimental de LDH (Densidad óptica 490 nm)}}{\text{Liberación máxima de LDH (Densidad óptica 490 nm)}} \right]$$

### 7.3.9 Análisis estadístico

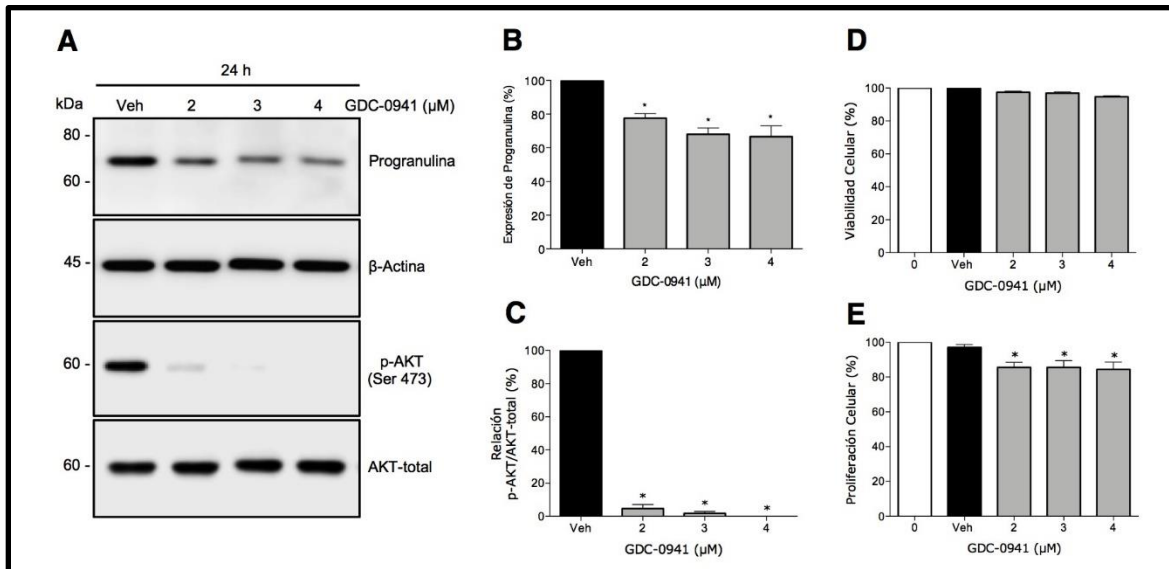
Cada uno de los blots fueron analizados por densitometría utilizando el programa *ImageJ* [188]. Los resultados fueron representados como la relación entre la proteína de interés y  $\beta$ -actina usada como control de carga en la misma muestra. En el caso de las proteínas fosforiladas los resultados fueron representados como la relación entre la proteína fosforilada y la proteína total o no fosforilada en la misma muestra. El resultado de cuatro experimentos independientes se presenta como la media  $\pm$  error estándar (SEM). Un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguida de la prueba de Dunnett fueron utilizadas para valorar las diferencias en la expresión de la proteína de interés entre las diferentes dosis de los inhibidores y el control. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con un valor de  $p < 0.05$ . El análisis estadístico de los datos se realizó utilizando el programa GraphPad Prism versión 5.02, el cual fue utilizado también como graficador.



## 8 RESULTADOS

### 8.1 Efecto del inhibidor GDC-0941 en la expresión de la progranulina en las células TOV-21G

La participación de la vía de transducción de señal de PI3K en la regulación de la expresión de la progranulina en la línea celular de cáncer de ovario de células claras TOV-21G, fue determinada utilizando el compuesto GDC-0941, un inhibidor farmacológico general de PI3K. El análisis semicuantitativo de las bandas de 67 kDa detectadas en el western blot y correspondientes a la progranulina mostraron que la expresión de esta proteína disminuyó en forma significativa ( $p < 0.05$ ) con las concentraciones de 2 a 4  $\mu\text{M}$  de GDC-0941 después de 24 h de tratamiento. Con la concentración más alta de GDC-0941 (4  $\mu\text{M}$ ) el porcentaje de expresión de la progranulina fue de  $66.67\% \pm 6.33\%$  en comparación con las células control (vehículo, considerado como el 100% de la expresión de la progranulina en ausencia de GDC-0941), lo que demuestra una reducción aproximadamente de 33% (Figura 7A y B). Como un control interno de la inhibición de la vía de señalización de PI3K se valoró la proteína AKT, observando una inhibición significativa ( $p < 0.05$ ) de la fosforilación de AKT [p-AKT (ser473)] con las diferentes concentraciones de GD-0941 en comparación con el control-vehículo, la proteína AKT total se mantuvo sin cambios (Figura 7A y C). La viabilidad celular determinada por el ensayo colorimétrico CytoTox 96 mostró una ligera reducción, pero no significativa en las células tratadas por 24 h con la concentración más alta (4  $\mu\text{M}$ ) de GDC-0941 ( $94.70\% \pm 0.62\%$ ) al compararse con el control (100%) (Figura 7D). La proliferación celular determinada por el estuche XTT, disminuyó en forma significativa con las tres concentraciones de GDC-0941 utilizadas a las 24 h de tratamiento como se muestra en la figura 7E.

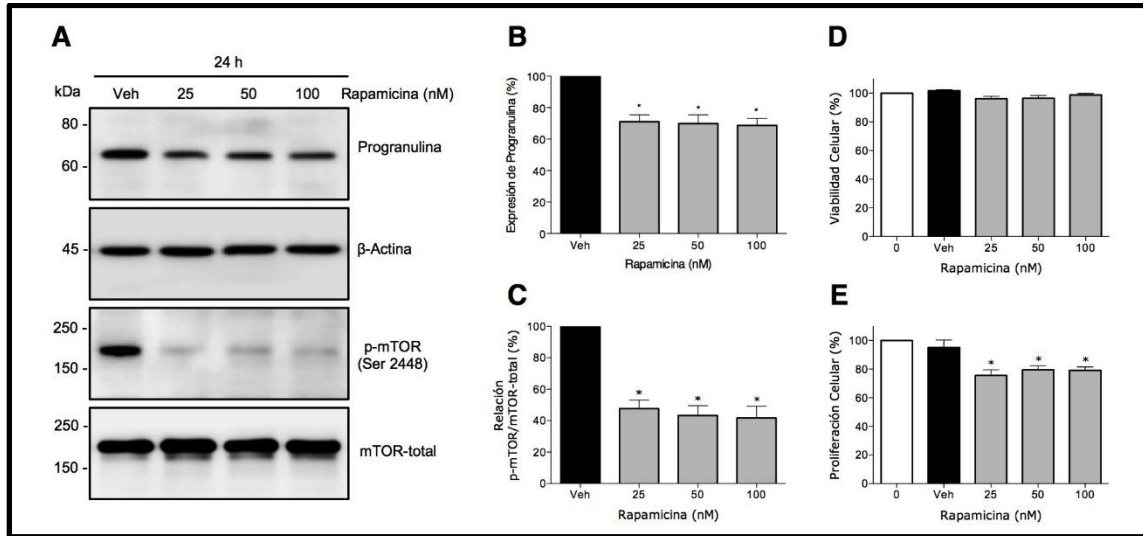


**Figura 7.** Inhibición de la expresión de progranulina en las células TOV-21G con el inhibidor GDC-0941. A) Se muestran los westerns blot representativos para la progranulina y  $\beta$ -actina como control de carga. Como controles de la inhibición de la vía de PI3K se observa AKT fosforilada y AKT total. B) Representación gráfica del análisis de 4 experimentos independientes, los resultados representan la media  $\pm$  error estándar (SEM). Las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) de los tratamientos comparadas con el control (vehículo) se indican con un asterisco. C) Relación de la expresión de la proteína AKT fosforilada y AKT total. D) Porcentaje de viabilidad celular determinada por la liberación de LDH. E) Porcentaje de proliferación celular evaluada por la conversión de XTT.

## 8.2 Inhibición de la actividad de mTOR y su efecto en la expresión de la progranulina en las células TOV-21G

El compuesto farmacológico rapamicina, fue utilizado para determinar la participación de mTOR río abajo de PI3K en la regulación de la expresión de la progranulina en las células TOV-21G. La síntesis de la progranulina disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en las células incubadas durante 24 h con las concentraciones de 25, 50 y 100 nM de rapamicina. El porcentaje de la expresión de esta proteína con 100 nM del inhibidor fue  $68.69 \% \pm 4.39 \%$  en comparación con el control (vehículo, considerado 100% de expresión de progranulina en ausencia de rapamicina), logrando así una reducción de aproximadamente un 32% de su expresión (Figura 8A y B). El bloqueo de la fosforilación de mTOR se utilizó como indicador de la actividad de la rapamicina, observando una inhibición de la fosforilación [p-mTOR (ser2448)] en forma significativa con las 3 concentraciones de rapamicina utilizadas al compararse con las células control (vehículo) y no se presentaron cambios en mTOR total (Figura 8A y C). Como se muestra en la figura 8D la viabilidad celular fue afectada ligeramente con las distintas concentraciones de

rapamicina, mientras que una disminución en forma significativa ( $p < 0.05$ ) se observó en la proliferación celular con las tres concentraciones de rapamicina (Figura 8E).

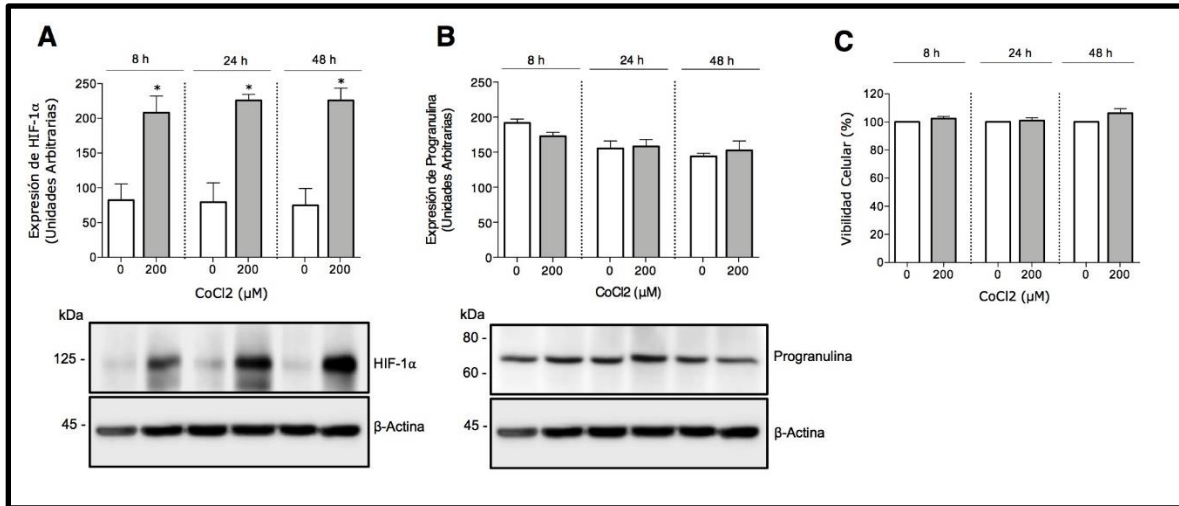


**Figura 8.** Expresión de progranulina en las células TOV-21G en presencia del inhibidor Rapamicina. A) Western blot representativos para la progranulina y  $\beta$ -actina como control de carga. Como controles de la inhibición por Rapamicina se observa mTOR total y mTOR fosforilada. B) Gráfica que representa el porcentaje de expresión de la progranulina comparada con el control (vehículo). C) Relación de la expresión de la proteína mTOR fosforilada y mTOR total. D) Porcentaje de viabilidad celular determinada por la liberación de LDH después de 24 h de cultivo en presencia de Rapamicina. E) Porcentaje de proliferación celular evaluada por la conversión de XTT.

### 8.3 Efecto de la hipoxia inducida por cloruro de cobalto y altas concentraciones de HIF-1 $\alpha$ en la regulación de la expresión de la progranulina

Las células TOV-21G fueron incubadas en presencia de cloruro de cobalto ( $\text{CoCl}_2$ ) para inducir un estado hipóxico *in vitro*. La expresión intracelular de las proteínas HIF-1 $\alpha$  y progranulina fue determinada mediante la técnica de Western blot. Como se muestra en la figura 9A, la cantidad de la proteína HIF-1 $\alpha$  aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) a las 8, 24 y 48 h de incubación con 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  al ser comparados cada uno de los tiempos con su respectivo control (células cultivadas en ausencia de cobalto). Sin embargo, bajo estas mismas condiciones de hipoxia y alta expresión de HIF-1 $\alpha$  no se observaron cambios en la expresión de la progranulina en ninguno de los tiempos de incubación al compararse con su control (Figura 9B). Similares resultados de HIF-1 $\alpha$  y progranulina fueron observados en los cultivos de las células TOV-21G realizados en cámara de hipoxia (1%  $\text{O}_2$ ) por 4, 8, 24 y 48 h al compararse con su control respectivo (células cultivadas en condiciones normóxicas) (datos no mostrados). La viabilidad

celular no se vio afectada en los diferentes periodos de tiempo evaluados con la concentración de 200  $\mu\text{M}$  de  $\text{CoCl}_2$  utilizada. (Figura 9C).

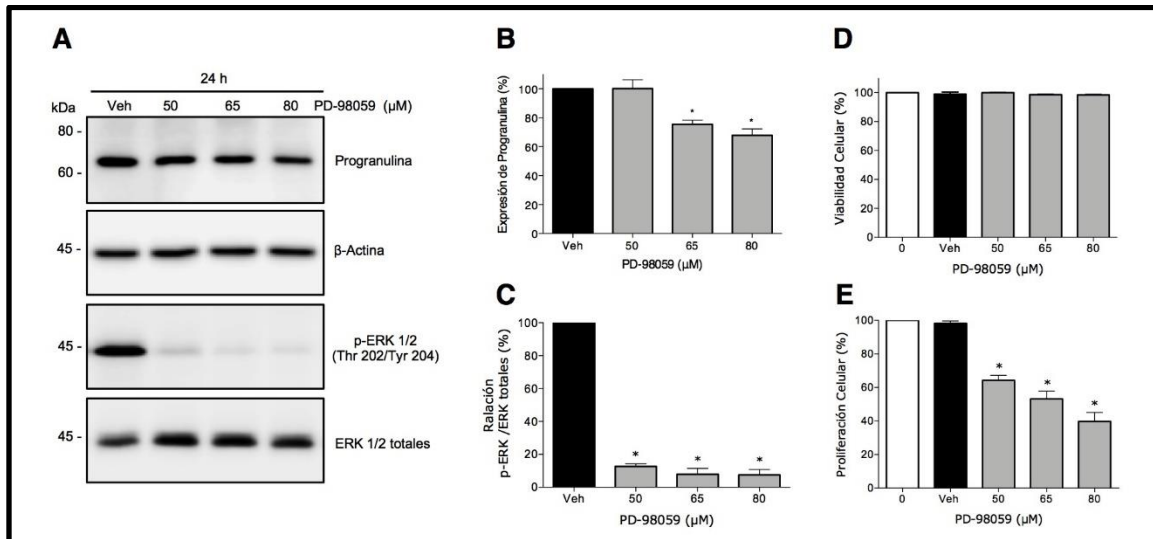


**Figura 9.** Expresión de HIF-1 $\alpha$  y la progranulina en las células TOV-21G bajo condiciones hipóxicas. A) Western blot representativo de la expresión de HIF-1 $\alpha$  en ausencia o presencia de  $\text{CoCl}_2$  durante 8, 24 y 48 horas. B) Expresión de progranulina en condiciones hipóxicas. C) La viabilidad celular fue medida por la liberación de LDH por las células incubadas con  $\text{CoCl}_2$ .

#### 8.4 Inhibición de la fosforilación de ERK1/2 y su efecto en la regulación de la expresión de la progranulina

La participación de la vía de MAPK/ERK en la regulación de la expresión de la progranulina fue analizada con el compuesto PD-98059 un inhibidor específico de MEK1 que a su vez inhibe la fosforilación de ERK1/2. Por el análisis semicuantitativo de la banda inmunoreactiva observada en los western blot se determinó que las concentraciones de 65 y 80  $\mu\text{M}$  de PD-98059 redujeron significativamente ( $p < 0.05$ ) la expresión de la proteína progranulina a las 24 horas de incubación. El porcentaje de expresión de la progranulina con la concentración más alta de PD-98059 fue de  $67.76\% \pm 4.47\%$  en comparación con el control (vehículo), logrando así una reducción de aproximadamente un 33% de su expresión (Figura 10A y B). El efecto del compuesto PD-98059 fue valorado por el bloqueo de la fosforilación de ERK1/2 [p-ERK1/2 (Thr 202/Tyr 204)] el cual fue significativo ( $p < 0.05$ ) con cada una de las concentraciones utilizadas al ser comparadas con el control (vehículo) (10A y C). No se observaron modificaciones en la expresión de ERK1/2 totales (Figura 10A). Las diferentes concentraciones de PD-98059 no

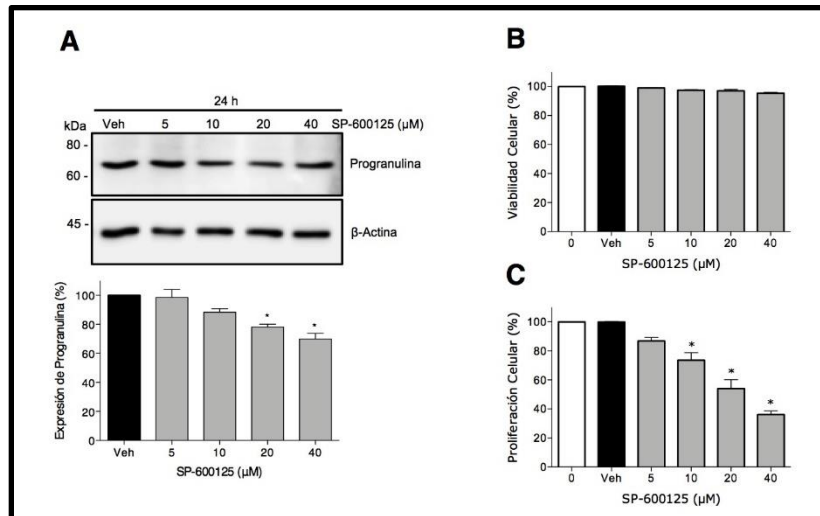
afectaron la viabilidad celular, sin embargo, la proliferación celular sí disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) y de manera concentración-dependiente (Figura 10D y E).



**Figura 10.** Disminución de la expresión de progranulina en las células TOV-21G con el inhibidor PD-98059. A) Western blot de progranulina y actina. ERK 1/2 total y fosforilada como controles de la inhibición con PD-98059. B) Análisis de la expresión de la progranulina. C) Gráfica que representa la relación ERK fosforilada y ERK total. D) La viabilidad celular después de la incubación de las células TOV-21G por 24 h con el inhibidor PD98059 no se modifica. Sin embargo, la proliferación celular si (E).

### 8.5 Efecto del inhibidor de JNK (SP-600125) en la expresión de la progranulina

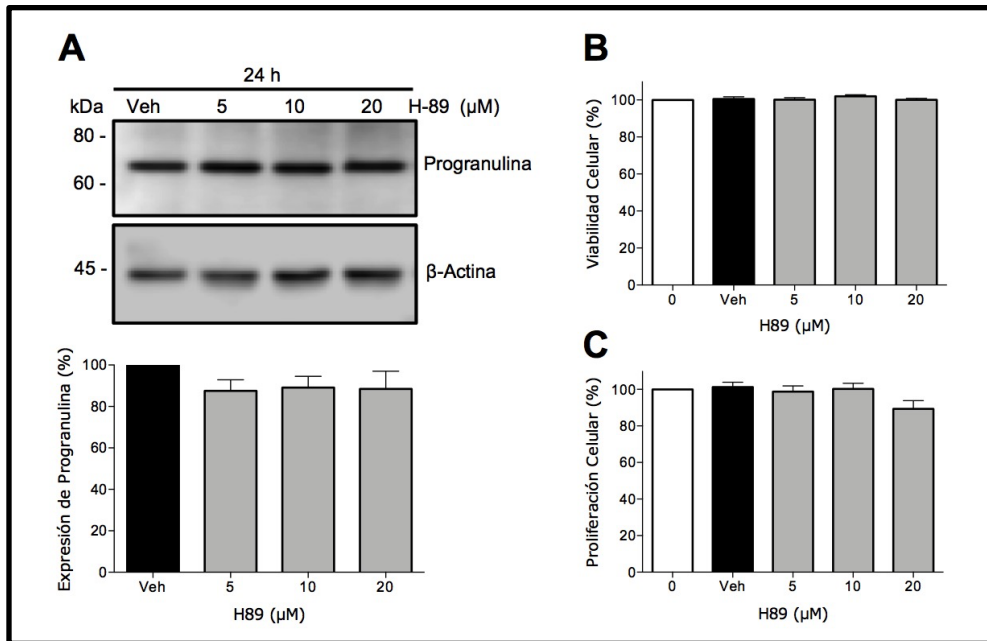
Las células de cáncer de ovario TOV-21G fueron tratadas con varias concentraciones (5,10, 20 y 40 μM) de SP-600125, un inhibidor específico de JNK, para determinar la participación de esta cinasa en la regulación de la expresión de la progranulina. Una reducción en la expresión de la progranulina en forma significativa ( $p < 0.05$ ) fue observada a las 24 h de cultivo en presencia de 20 y 40 μM de SP-600125. El porcentaje de expresión de la progranulina con la concentración más alta del inhibidor fue de  $69.93 \pm 3.78$  al compararse con el control-vehículo, siendo esto un 30% en la reducción de su expresión (Figura 11A). La viabilidad celular determinada por el ensayo colorimétrico CitoTox96 se vio afectada ligeramente con las diferentes concentraciones de SP-600125 (Figura 11B). Sin embargo, la proliferación celular determinada por el kit XTT disminuyó en forma significativa ( $p < 0.05$ ) y de forma concentración-dependiente (Figura 11C).



**Figura 11.** Inhibición de JNK reduce los niveles de progranulina en las células TOV-21G. A) Se muestran los westerns blot de progranulina y actina, así como la relación densitométrica de ambas, las diferencias estadísticas se marcan con asteriscos. B) La inhibición con SP-600125 no modificó la viabilidad celular. C) El porcentaje de proliferación celular disminuyó con respecto al control.

## 8.6 Efecto de la Inhibición de PKA en la expresión de progranulina

El compuesto farmacológico H89, un inhibidor de PKA, fue utilizado para valorar la participación de esta vía de señalización en la regulación de la expresión de la progranulina en las células TOV-21G. En las células tratadas por 24 h con 5, 10 y 20 μM de H89 no se observaron cambios significativos en la expresión de progranulina al compararse con el control-vehículo (considerado 100% de expresión de progranulina en ausencia de H89) (Figura 12A). La viabilidad celular disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) con la concentración más alta (20 μM) del H89 (Figura 12B), con esta concentración también se observó una disminución no significativa de la proliferación celular determinada por el kit XTT (Figura 12C).



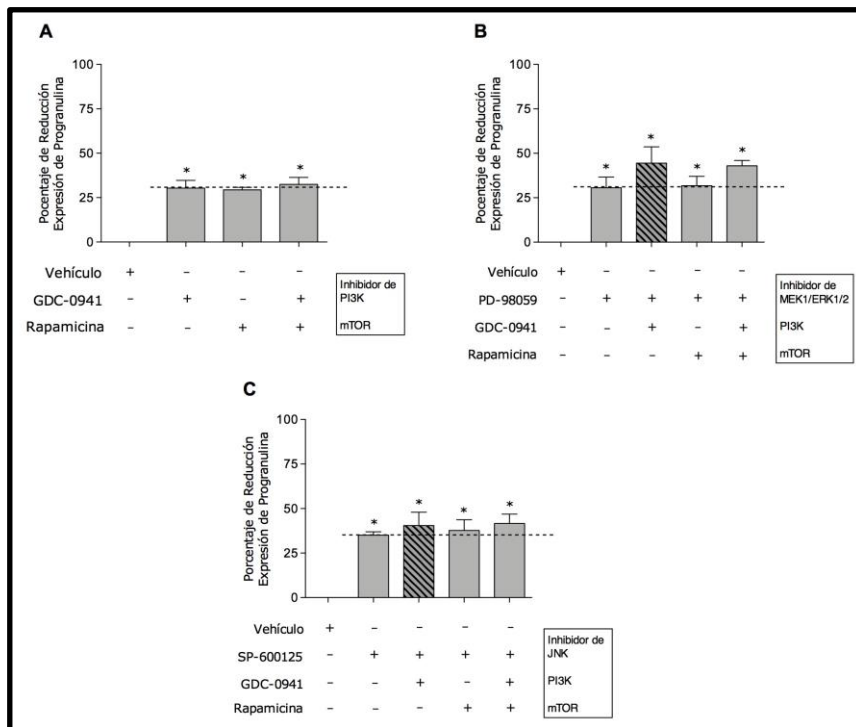
**Figura 12.** Inhibición de la expresión de la progranulina en las células TOV-21G con el inhibidor H89. A) Se muestran los western blot representativos para la progranulina y la  $\beta$ -actina como control de carga y la gráfica del análisis de 4 experimentos independientes, los resultados representan la media  $\pm$  error estándar (SEM). B) Porcentaje de viabilidad celular determinada por la liberación de LDH. C) Porcentaje de proliferación celular evaluada por la conversión de XTT.

## 8.7 Efectos de la combinación de los inhibidores de PI3K/mTOR más MEK1/ERK1/2 y MAPK/JNK sobre la reducción de la expresión de la progranulina

Para valorar si existía un efecto aditivo en la reducción de la expresión de la progranulina al combinar la inhibición de las vías de transducción de señal que están involucradas en su regulación, las células TOV-21G fueron tratadas por 24 h con la mezcla de las concentraciones más altas de cada uno de los inhibidores (Figura 13). Se seleccionó analizar la inhibición de la vía de PI3K (por la importancia de esta vía) combinada con la inhibición de MEK1/ERK1/2, así como con el bloqueo de JNK. Las concentraciones altas de cada uno de los inhibidores en forma individual redujeron la expresión de progranulina en aproximadamente el 30% (Figura 13A, B y C), lo cual fue estadísticamente significativo al compararse con el vehículo (0% de reducción en la expresión de progranulina en ausencia del inhibidor y en presencia de DMSO).

La combinación de la inhibición de PI3K y mTOR empleando los compuestos GDC-0941 (4  $\mu\text{M}$ ) y rapamicina (100 nM), ambas proteínas pertenecientes a la misma vía de señalización,

resultó en un 30% de reducción en la expresión de progranulina (Figura 13A), es decir sin efecto aditivo. La mezcla de los compuestos inhibitorios de dos vías diferentes, el GDC-0941 y el PD-98059 (80  $\mu$ M), inhibidores de PI3K y MEK1/ERK1/2 respectivamente, incrementaron hasta el 45% la reducción de progranulina, mostrando así un ligero incremento de 15% (Figura 13B). La mezcla de los inhibidores GDC-0941 y SP-600125 (40  $\mu$ M) para bloquear PI3K y JNK aumentó solo un 5% la reducción de la expresión de progranulina (Figura 13C). El resto de las combinaciones, incluyendo las triples combinaciones, no produjeron mayores cambios.



**Figura 13.** Valoración de un efecto aditivo en el porcentaje de reducción de la expresión de la progranulina con la combinación de las dosis más altas de los diferentes inhibidores de vías de señalización en las células TOV-21G. Los resultados muestran la media  $\pm$  error estándar (SEM) del porcentaje de reducción de la expresión de progranulina de 4 experimentos. Una reducción en forma significativa se observó con cada inhibidor en forma individual y con la combinación de ellos. Las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) se indican con un asterisco. La combinación de los inhibidores GDC-0941 y rapamicina no mostro cambios en la reducción de la progranulina (A). La combinación de PD-98059 y GDC-0941 redujo 15% más la expresión de progranulina (B). La combinación de SP-600125 y GDC-0941 produjeron una leve respuesta aditiva (5%) (C). La línea punteada marca el 30% de reducción en la expresión de progranulina observada con cada uno de los inhibidores en forma individual.



## **9 DISCUSIÓN**

La progranulina es una proteína pleiotrópica que participa en diferentes procesos fisiológicos, sin embargo, tanto su deficiencia como exceso se han relacionado con diferentes patologías. Particularmente, su sobreexpresión se ha asociado con la carcinogénesis y ha sido documentada en diversos tipos de tumores malignos. En cáncer de ovario la progranulina estimula la proliferación celular y favorece la invasión y la migración de las células. Además promueve procesos como la angiogénesis, el crecimiento independiente de la adhesión celular, la transformación maligna, la quimioresistencia y la evasión de la respuesta inmune [8]. Clínicamente, se ha demostrado que la alta expresión del mRNA de la progranulina en tejidos de tumores malignos de ovario se asocia con una menor supervivencia de las pacientes, y que la expresión del mRNA en estadios avanzados de la enfermedad (III y IV) es mayor que en estadios tempranos (I y II) [75, 79]. También se ha observado en pacientes con cáncer de ovario que altas concentraciones de la progranulina en suero se asocian con una menor supervivencia libre de progresión y una menor supervivencia total de las pacientes, y podrían predecir una recurrencia dentro de los primeros 18 meses después de finalizado el tratamiento de quimioterapia [78]. Por las evidencias antes mencionadas, a la progranulina se le ha considerado como un posible biomarcador en cáncer epitelial de ovario [8].

Las alteraciones o la pérdida de la regulación de las vías de transducción de señal intracelulares tienen una gran importancia como promotoras de la carcinogénesis. Las mutaciones en proteínas clave de las vías de señalización oncogénicas han sido identificadas en diferentes tumores y los que se desarrollan en el ovario no son la excepción. Dichas mutaciones pueden promover una hiperactividad de las vías de transducción de señal involucradas en la transformación oncogénica y pueden generar la inactivación de las vías que controlan los procesos celulares anti-oncogénicos [155]. Actualmente se desarrollan compuestos farmacológicos con fines terapéuticos dirigidos a bloquear algunos componentes de las vías de señalización hiperactivadas como son los inhibidores de cinasas. Estos compuestos están siendo probados en el tratamiento del cáncer de ovario y de diversos tumores malignos [189].

En la actualidad, dentro de los carcinomas del ovario se ha puesto atención al subtipo histológico de células claras por las características particulares que presenta. Los CCC tienen una alta tasa de recurrencia y una insensibilidad a la quimioterapia convencional basada en

platinos y taxanos por lo que tienen el peor pronóstico cuando se diagnostican en estadios III y IV en comparación con otros subtipos [124, 125]. Además, presentan un patrón de expresión génica que difiere de los carcinomas serosos, una característica importante es la hiperactividad de la vía de PI3K/AKT/mTOR como consecuencia de una alta frecuencia de mutaciones en *PIK3CA* (33-51%), mTOR y *PTEN*, así como amplificaciones de *AKT2* (24%) [128, 190]. Por lo tanto, la inhibición de esta vía como blanco terapéutico simple (PI3K) o en combinación (PI3K y mTOR) ofrece una alternativa de tratamiento para este tipo de tumores.

En la presente tesis decidimos determinar si vías de señalización celular como la PI3K/AKT/mTOR, MAPK (ERK1/2 y JNK) y la vía de PKA participan en el control de la expresión de la progranulina en el CCC. Para lo cual utilizamos la línea celular TOV-21G derivada de un tumor sólido de CCC y determinamos cambios en la expresión de la progranulina después de la inhibición de dichas vías de transducción de señal con inhibidores farmacológicos, así como, posterior a la inducción de hipoxia química para incrementar la expresión de HIF-1 $\alpha$ . Además, señalamos la utilidad que la progranulina pudiera tener como un biomarcador para la inhibición de las vías de señalización como tratamiento para los CCC.

Nuestros resultados indican que la vía de señalización de PI3K/AKT/mTOR regula la expresión de la progranulina en las células TOV-21G debido a que una reducción en su expresión (33%) se observó después de la inhibición de PI3K y la subsecuente disminución de la fosforilación de AKT con el compuesto farmacológico GDC-0941. Los datos concuerdan con lo reportado previamente por Yang, D y cols. [191], quienes al bloquear la PI3K con el inhibidor LY294002 en las células MGC-803 y MKN-45 de cáncer gástrico observaron una disminución en la expresión de la progranulina. Sin embargo, difieren de los datos reportados previamente en nuestro laboratorio en donde se utilizaron dos líneas celulares derivadas de carcinomas ováricos de tipo seroso (OVCAR-3 y SKOV-3) y los compuestos LY294002 y wortmanina para la inhibición de PI3K. El efecto del LY294002 sobre la progranulina no pudo ser valorado adecuadamente por efectos de toxicidad y la consecuente reducción de la viabilidad celular. Con respecto a la wortmanina, ésta no afectó la expresión de la progranulina, por lo que se concluyó que la vía de PI3K no participaba en el control de la expresión de la progranulina en dicho tipo de células [73]. Las diferentes respuestas observadas entre las diversas líneas celulares podrían estar relacionadas con el origen de éstas y sus patrones de expresión génica. Específicamente, las células TOV-21G derivadas de un CCC son resistentes a fármacos antitumorales y por lo tanto son menos susceptibles a los efectos tóxicos de las altas concentraciones del GDC-0941 ya que en este estudio presentaron una viabilidad del 94% a las 24 h de tratamiento, lo que nos permitió

valorar adecuadamente la respuesta de la progranulina a este compuesto. Estas células también se caracterizan por presentar mutaciones activadoras en *PIK3CA* (H1047Y) y *KRAS* lo que ocasiona una mayor actividad de la vía de PI3K/AKT/mTOR que podría inducir una elevada expresión de la progranulina [192]. Contrariamente, estas características no las presentan los carcinomas serosos o las líneas celulares derivadas de estos como las OVCAR-3 y SKOV-3, lo que podría explicar que no se observa una disminución en la expresión de progranulina con el uso de los inhibidores de PI3K. Sin embargo, una de las líneas celulares de cáncer gástrico mencionadas previamente, la MKN-45 es portadora de la mutación H1047R en *PIK3CA* y presenta una mayor expresión de PI3K [193], lo que explicaría que disminuya en forma significativa la expresión de la progranulina con la inhibición de PI3K, lo cual concuerda con nuestros resultados.

Por otra parte, el bloqueo de la actividad de mTOR con el compuesto rapamicina determinada por una disminución en la fosforilación de la propia mTOR, redujo también la expresión de la progranulina en forma significativa (30%), confirmando con esto su participación en su regulación. Previamente se ha reportado que, en comparación con otros subtipos histológicos de carcinomas ováricos, los CCC frecuentemente presentan una elevada fosforilación de la cinasa mTOR y una alta expresión del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  (efector de mTOR) independientemente de la concentración de oxígeno. Esta expresión está directamente relacionada con el pobre pronóstico que tiene las pacientes que presentan estos tumores [194-196]. De acuerdo con esta característica de los CCC y tratando de elucidar el mecanismo por el cual mTOR podría controlar la expresión de la progranulina, valoramos como un regulador de la expresión de esta proteína al HIF-1 $\alpha$ , factor que responde a hipoxia. Para esto, el HIF-1 $\alpha$  fue estabilizado a través de la inducción de hipoxia química con CoCl<sub>2</sub> el cual promueve los mismos cambios en la célula que la hipoxia por bajas concentraciones de oxígeno [186]. Nuestros resultados mostraron que el incremento de este factor de transcripción no tuvo efecto sobre la expresión de la progranulina, los cuales difieren de lo que previamente se había reportado, es decir, una correlación entre el aumento de HIF-1 $\alpha$  y el incremento en la expresión de la progranulina en células de trofoblasto veloso de casos de mujeres con preeclampsia y en casos con restricción del crecimiento fetal [64], así como, en suero sanguíneo de pacientes con preeclampsia [197]. Sin embargo, en dichos estudios mencionados no se estableció si el aumento de la progranulina se debía al incremento de HIF-1 $\alpha$  o por el estado de hipoxia *per se*. Nuestros datos también difieren de aquellos que afirman que la hipoxia es una condición que incrementa la expresión tanto del mRNA como la proteína progranulina en fibroblastos y líneas

celulares de neuroblastoma, particularmente en las células SK-N-BE [12, 43, 69]. Tampoco concuerdan con lo observado por Luo L y cols. [198] que demostraron que al inducir hipoxia física con el compuesto hidrosulfito de sodio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) en la línea celular neuronal de hipocampo de ratón HT22, la expresión de la progranulina disminuyó de manera dosis y tiempo dependiente. Sin embargo, estos datos deben tomarse con reserva porque la disminución de la progranulina pudo estar asociada a una disminución de la viabilidad celular causada por la toxicidad del  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  que reportaron los autores.

La variación en la respuesta de la progranulina a la hipoxia o al incremento de HIF-1 $\alpha$  observada en nuestro estudio con células derivadas de cáncer de ovario en comparación con los estudios previos con trofoblastos de pacientes con preeclampsia, con fibroblastos, con células de neuroblastoma y con células neuronales de rata, podrían deberse a una respuesta transcripcional heterogénea a la hipoxia entre diferentes tipos de células o estar relacionada con enfermedades tejido/célula específica. Además, las vías de transducción de señal activadas en cada tipo celular pudieran estar participando en estas variaciones de la respuesta a la hipoxia cómo ha sido descrito previamente por Shafee N y Cols. [199], los investigadores observaron que en dos líneas celulares con alta actividad de PI3K, en una de ellas la HTI0806TG derivada de fibrosarcoma, el incremento en la expresión de HIF-1 $\alpha$  correlacionó con un aumento de la anhidrasa carbónica IX (CAIX). Sin embargo, en las células MCH630 a pesar del incremento del HIF-1 $\alpha$ , la expresión de CAIX disminuyó, por lo que se concluye que los efectos de la estabilización de HIF-1 $\alpha$  a través de la activación de la vía de PI3K son tipo-celular específicos.

Aún falta por establecer el mecanismo por el cual mTOR regula la expresión de la progranulina, ya que mTOR modula el primer paso de la traducción, nosotros proponemos que podría fosforilar e inactivar el inhibidor del factor eucarionte iniciador de la traducción (eIF4E), la proteína de unión 4E (4EBP), y activar la S6K que promueven el ensamble del complejo requerido para la traducción de mRNAs [200]. Como ha sido observado para ciertos factores de crecimiento como el VEGF [200]. Sin embargo, necesitamos realizar más estudios para establecer este mecanismo.

Por la importancia de la vía MAPK/MEK/ERK en oncogénesis se valoró su participación en la regulación de la progranulina en las células TOV-21G. La exposición de las células durante 24 h con el inhibidor de ERK1/2, el PD-98059, redujo la expresión de la progranulina en un 30% con respecto a las células control. Estos resultados concuerdan con los reportes previos que demuestran que el compuesto U0126, inhibidor de ERK, disminuyó la expresión de la

progranulina en las líneas celulares MGC-803 y MKN-45 derivadas de cáncer gástrico [191]. Este inhibidor también disminuyó la síntesis de la progranulina estimulada por la ET-1 en las células de cáncer de ovario de tipo seroso HEY-A8 y OVCAR-3 [74], y la estimulada por la interleucina 6 (IL-6) en las células HepG2 de carcinoma hepatocelular [48, 201]. En las células SK-N-BE de neuroblastoma la inhibición de la actividad de MEK/ERK por el PD-98059 no alteró la expresión del mRNA de la progranulina bajo condiciones normóxicas, sin embargo, el uso de este inhibidor revirtió el aumento del mRNA de la progranulina después de 24 h de incubación en presencia del inhibidor y en condiciones de hipoxia física [43]. Esto podría sugerir que la transcripción del gen *GRN* es activada específicamente por el estímulo hipóxico en este tipo de células ya que su región promotora presenta secuencias consenso repetidas para el factor de transcripción AP-1 [71], un efector de ERK1/2. En la presente tesis no establecimos si se lleva a cabo el control de la expresión de la progranulina en las células TOV-21G de cáncer de ovario a nivel postranscripcional con ninguno de los inhibidores, por lo que se requiere de más experimentos para establecer este nivel de control.

La vía de señalización de la JNK (una subfamilia de MAPK) participa en la regulación de la expresión de la progranulina, debido a que la inhibición de la actividad de JNK con el compuesto SP-600125 redujo la expresión de la progranulina en un 30% en las células TOV-21G en comparación con el control. Esta vía de señalización está altamente activada en una elevada proporción de tumores malignos de ovario y su actividad se asocia con estadios avanzados de este tipo de cáncer y con quimioresistencia, Por lo tanto, la progranulina probablemente participa como una efectora de la JNK, debido a que células que sobre-expresan progranulina muestran resistencia al cisplatino [77, 202], pero más estudios son necesario para establecer esta asociación. Nuestros datos son la primera evidencia de la regulación de la expresión de la progranulina por la vía de JNK, por lo que es necesario la realización de experimentos que ayuden a discernir que efectores de JNK podrían estar involucrados en dicha regulación. Consideramos que JNK podría translocarse al núcleo y regular la transcripción de *GRN* mediante la fosforilación de c-Jun, una subunidad del factor de transcripción AP-1 [71].

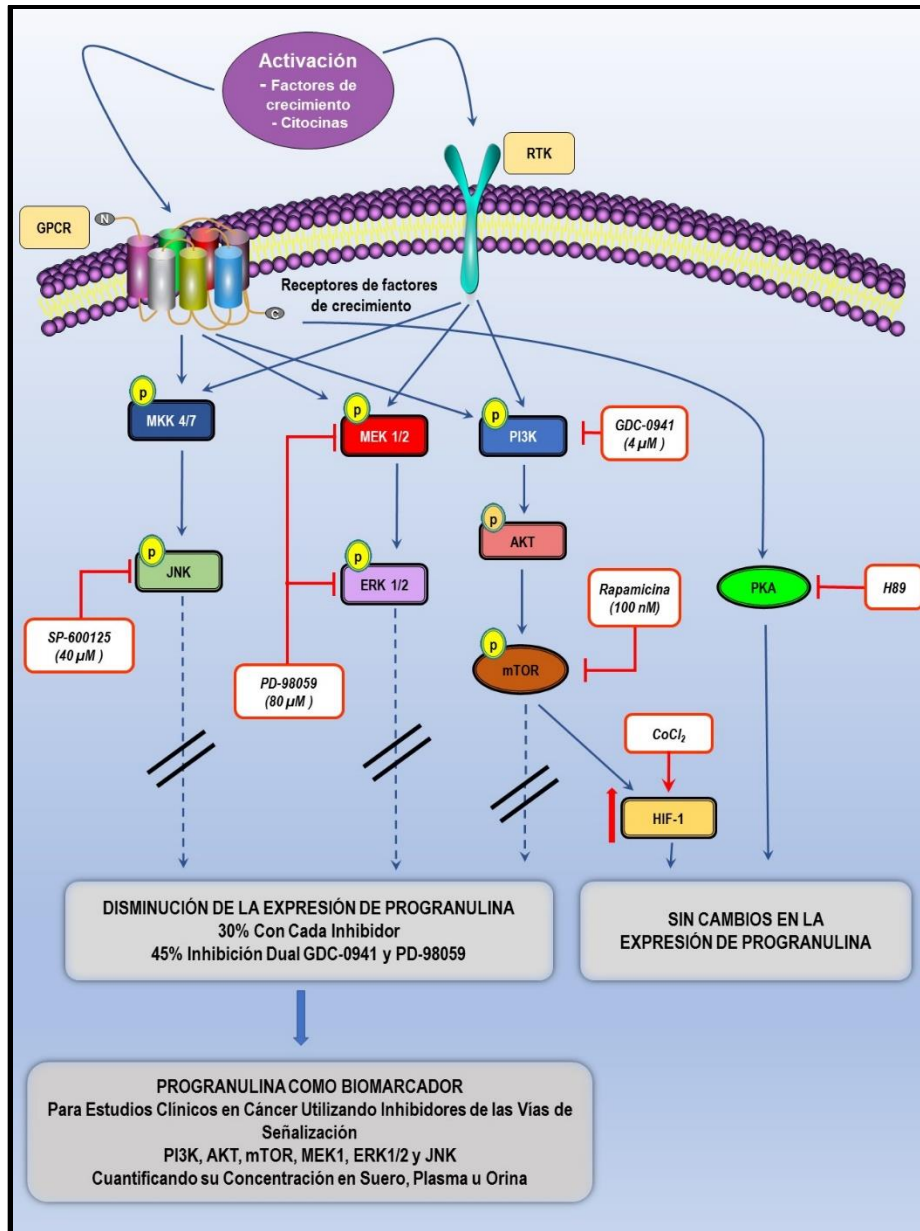
La PKA es una cinasa que no se considera como oncogénica, sin embargo, se sabe que podría realizar funciones importantes en células cancerígenas [169], por lo cual valoramos su participación en la regulación de la expresión de la progranulina en la línea celular TOV-21G. Para esto, bloqueamos su actividad con el compuesto H89 y no se observaron cambios en la expresión de la progranulina, concluyendo que no existen una relación de la vía de PKA y esta proteína.

Una disminución de la proliferación de las células TOV-21G en forma significativa se observó después de bloquear las vías de PI3K/AKT/mTOR y MAPK (ERK1/2 y JNK) con las altas dosis de cada uno de los inhibidores utilizados. Este efecto era esperado pues ambas vías de transducción de señal son indispensables para inducir proliferación celular [155, 192]. Consideramos, que la disminución de la expresión de la progranulina después de la inhibición de estas vías pudiera estar participando en la reducción de la proliferación celular como ha sido demostrado en varias líneas celulares de cáncer de ovario donde la inhibición de la expresión de la progranulina por medio de la transfección de cDNA antisentido disminuyó tanto la proliferación como la invasión celular [203]. Es importante mencionar que no se observó una disminución en la proliferación celular en forma significativa después del bloqueo de la vía de PKA con las altas concentraciones de H89. Existen reportes que demuestran que altas concentraciones o una prolongada exposición de las células a los inhibidores de vías de señalización en general están asociados con toxicidad y muerte celular incluso de células no cancerosas [153, 204]. En nuestro estudio, a las 48 horas de incubación con las altas dosis de los inhibidores observamos muerte celular (datos no mostrados). Por esta razón, decidimos analizar los cambios en la expresión de progranulina solo a las 24 horas de incubación tiempo en el cual la viabilidad celular se mantuvo por arriba de 90% con cualquiera de las dosis de todos los inhibidores farmacológicos.

En la presente tesis decidimos valorar un posible efecto aditivo en la reducción de la progranulina con la combinación de los inhibidores de la vía de PI3K/mTOR en conjunto con los de MAPK (ERK1/2 y JNK). Los resultados mostraron que la concomitante inhibición de las vías de señal de transducción no produjo un efecto aditivo en la reducción (o fue mínimo) de la expresión de la progranulina. A las 24 h de tratamiento de las células TOV-21G con los bloqueadores de las vías de señalización, la progranulina disminuyó un 30% con cada uno de los inhibidores en forma individual. Por lo tanto, nosotros esperábamos alrededor del 60% de reducción en la expresión de esta proteína con la combinación de dos inhibidores. La reducción más alta de un 45% se observó con la concomitante inhibición de PI3K y ERK1/2, de un 35% con la inhibición de PI3K y JNK. El bloqueo de PI3K y mTOR no mostró un efecto aditivo en la reducción de progranulina. El no observar un efecto aditivo en la reducción de la progranulina con la concomitante inhibición de dos vías de señalización en paralelo o en una sola vía con proteínas verticalmente pudiera estar asociado a varios mecanismos: a) A que se activen vías de señalización que usualmente están alteradas en cáncer o también a la activación de varios circuitos de retroalimentación involucrados en mantener la supervivencia de las células. Por ejemplo, la inhibición de una vía activada por oncoproteínas puede generar la inhibición de la

retroalimentación negativa de la propia vía, como ha sido descrito en el caso de la vía de PI3K, se ha observado que la inhibición de mTOR por la rapamicina puede generar la hiperactividad de AKT [205], y b) A la reactivación de los RTKs y su señalización río abajo, así como la activación de vías de señalización paralelas o alternas, como ha sido descrito con la inhibición de la vía de PI3K/AKT/mTOR. Por ejemplo, la inhibición de mTOR con everolimus (compuesto derivado de rapamicina) puede dar lugar a la activación de la vía de señalización ERK que se encuentra río arriba de mTOR [206].

En la actualidad existen una variedad de reportes de estudios preclínicos y clínicos en donde están probando diversos inhibidores de las vías de señalización de PI3K/AKT/mTOR y MAPK (MEK y ERK1/2) en el tratamiento del cáncer de ovario, como terapia de segunda línea o combinados con el tratamiento de primera línea como es la quimioterapia [207]. Sin embargo, un punto importante en estos estudios y que se menciona constantemente incluso en los artículos de revisión del tema es que hasta el momento no se cuenta con biomarcadores que ayuden a establecer la eficacia de la terapia, el desarrollo de combinaciones óptimas de tratamientos, de establecer esquemas de dosificación de este tipo de compuestos u orientar hacia la interrupción o la continuidad del tratamiento en las pacientes [208-210]. Los resultados de la presente tesis mostraron que las vías de señalización PI3K/AKT/mTOR, MAPK (ERK1/2 y JNK) participan en la regulación de la expresión de progranulina en CCC. Por lo tanto, consideramos que la progranulina podría ser un biomarcador para los estudios clínicos en donde se valoren los diferentes inhibidores de estas vías de señalización como terapia para este subtipo de cáncer de ovario como se muestra en la Figura 14. Sin embargo, también podría ser útil en todos los tipos de cáncer en donde participa la progranulina. Como un biomarcador, las concentraciones de la progranulina en el suero de pacientes antes, durante y posterior al tratamiento con los inhibidores farmacológicos pudiera ayudar en los puntos antes mencionados, a establecer la eficacia de la terapia, esquemas de dosificación, el desarrollo de combinaciones óptimas de tratamientos, así como, establecer la continuidad o interrupción de la terapia. Además, el no observar un efecto aditivo en la reducción de la expresión de progranulina con el uso concomitante de dos inhibidores indica que el uso de dosis subóptimas de un simple inhibidor aumenta la eficacia y reduce la toxicidad que es frecuente observar en los estudios clínicos en donde se usan concomitantemente dos inhibidores como terapia para CCC.



**Figura 14.** Esquema de la inhibición de las vías de señalización y su relación con la regulación de la expresión de la progranulina en las células TOV-21G. Una vez activados los receptores RTKs y GPCRs se encienden las cascadas de señalización celular y se mantiene constante la expresión de progranulina en las células. La inhibición de las vías de PI3K con el compuesto GDC-0941, mTOR con la Rapamicina, MEK1/ERK1/2 con el PD-98059 y JNK con el SP-600125 redujo la expresión de la progranulina en un 30% en comparación con los controles. La única combinación que mostró un efecto aditivo en la reducción de la expresión de progranulina de un 45%, fue el bloqueo de las vías de PI3K y MEK1/ERK1/2. La inhibición de la vía de PKA con el compuesto H89 y el aumento de la expresión del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  posterior a la hipoxia inducida con cloruro de cobalto no produjeron cambios en la expresión de la progranulina. La progranulina podría ser un biomarcador para los estudios clínicos donde se prueben inhibidores específicos de las vías de señalización (PI3K/AKT/mTOR, MEK1/ERK1/2 y JNK) en el tratamiento para el carcinoma de ovario de células claras como modelo utilizado en este estudio.



## **10 CONCLUSIONES**

1. Nuestros resultados mostraron una disminución en la expresión de la progranulina después de la incubación de las células TOV-21G con los compuestos GDC-0941 y rapamicina y al reducir la fosforilación de AKT y mTOR respectivamente con estos inhibidores. Con el uso de estos compuestos la viabilidad de las células no se afectó, pero si se observó una disminución en la proliferación celular. Por lo tanto, podemos decir que la expresión de progranulina en estas células depende de la activación de PI3K/AKT/mTOR.
2. Las vías de MAPK/ERK y MAPK/JNK también participan en la regulación de la expresión de la progranulina en la línea celular TOV-21G, ya que la inhibición de las cinasas MEK1/ERK1/2 y JNK con los compuestos PD-98059 y SP-600125 respectivamente, redujeron la expresión de la progranulina. El uso de estos inhibidores no afectaron la viabilidad de las células, pero si se observó una disminución de la proliferación celular.
3. La combinación de todos los inhibidores para valorar un posible efecto aditivo en la inhibición de la progranulina, mostraron que solo la inhibición de PI3K/AKT y ERK1/2 en conjunto mostraron un ligero efecto adicional de 15%. Este pequeño efecto sugiere una posible comunicación cruzada entre ambas vías (crosstalk). Por otro lado, la inhibición de la progranulina no mayor a 45% al usar la combinación de GDC-094, rapamicina y PD-98059, sugiere la presencia de otros mecanismos compensatorios o la activación de otras vías que pudieran estar regulando la expresión de progranulina.
4. La inhibición de la vía de PKA con el compuesto H89 y el aumento de la expresión del factor de transcripción HIF-1 $\alpha$  posterior a la hipoxia inducida con cloruro de cobalto, no produjeron cambios en la expresión de la progranulina, por lo tanto, no participan en la regulación de su expresión.
5. Con los resultados obtenidos consideramos que la progranulina podría funcionar como un potencial biomarcador para la respuesta de las pacientes a la terapia con inhibidores de mTOR y ERK como el temsirolimus y sorafenib, compuestos que actualmente están siendo probados en ensayos clínicos para terapia de carcinoma de ovario de células claras.

## **11 PERSPECTIVAS**

Los resultados de la presente tesis dejan varias preguntas por responder y abren varias posibles líneas de investigación que ayudarían a contestarlas. La primera orientada a establecer el mecanismo por el cual mTOR regula progranulina en las células derivadas de carcinoma ovárico de células claras. Para esto es esencial el caracterizar los factores de transcripción río abajo de mTOR que pudieran estar involucrados en esta la regulación. La segunda, valorar los resultados obtenidos en esta tesis en cultivos primarios con células derivadas de tumores de células claras. Tercero, evaluar el uso de progranulina como biomarcador en un modelo *in vivo* en ratones inmunodeficientes, valorando la reducción de la progranulina al inhibir las vías de señalización (mTOR y/o ERK1/2) como tratamiento de tumores de células claras generados previamente en los ratones. Finalmente, su evaluación directa en la clínica como biomarcador, al determinar las concentraciones de progranulina en orina o en suero de pacientes con carcinoma de ovario de células bajo tratamiento con inhibidores de las vías de señalización de PI3K/AKT/mTOR y MAPK-ERK1/2.

## **12 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Anakwe, O.O. and G.L. Gerton, *Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis*. Biol Reprod, 1990. **42**(2): p. 317-28.
2. Baba, T., et al., *Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins, and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ cells*. Mol Reprod Dev, 1993. **34**(3): p. 233-43.
3. Bateman, A., et al., *Granulins, a novel class of peptide from leukocytes*. Biochem Biophys Res Commun, 1990. **173**(3): p. 1161-8.
4. Shoyab, M., et al., *Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(20): p. 7912-6.
5. Plowman, G.D., et al., *The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth*. J Biol Chem, 1992. **267**(18): p. 13073-8.
6. Bhandari, V., R.G. Palfree, and A. Bateman, *Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1715-9.
7. Zhou, J., et al., *Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 10863-9.
8. Arechavaleta-Velasco, F., et al., *Progranulin and its biological effects in cancer*. Med Oncol, 2017. **34**(12): p. 194.
9. Daniel, R., et al., *Progranulin (acrogranin/PC cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) is expressed in the placenta, epidermis, microvasculature, and brain during murine development*. Dev Dyn, 2003. **227**(4): p. 593-9.
10. Daniel, R., et al., *Cellular localization of gene expression for progranulin*. J Histochem Cytochem, 2000. **48**(7): p. 999-1009.
11. He, Z., et al., *Progranulin is a mediator of the wound response*. Nat Med, 2003. **9**(2): p. 225-9.
12. Guerra, R.R., et al., *Progranulin is a stress-response factor in fibroblasts subjected to hypoxia and acidosis*. Growth Factors, 2007. **25**(4): p. 280-5.
13. Bai, X.H., et al., *ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor*. Mol Cell Biol, 2009. **29**(15): p. 4201-19.
14. Kojima, Y., et al., *Progranulin expression in advanced human atherosclerotic plaque*. Atherosclerosis, 2009. **206**(1): p. 102-8.
15. Elkabets, M., et al., *Human tumors instigate granulin-expressing hematopoietic cells that promote malignancy by activating stromal fibroblasts in mice*. J Clin Invest, 2011. **121**(2): p. 784-99.
16. Dong, T., et al., *PGRN promotes migration and invasion of epithelial ovarian cancer cells through an epithelial mesenchymal transition program and the activation of cancer associated fibroblasts*. Exp Mol Pathol, 2016. **100**(1): p. 17-25.
17. Miyanishi, M., et al., *Immortalized ovarian surface epithelial cells acquire tumorigenicity by Acrogranin gene overexpression*. Oncol Rep, 2007. **17**(2): p. 329-33.

18. Yang, D., et al., *Progranulin promotes colorectal cancer proliferation and angiogenesis through TNFR2/Akt and ERK signaling pathways*. Am J Cancer Res, 2015. **5**(10): p. 3085-97.
19. Matsumura, N., et al., *Oncogenic property of acrogranin in human uterine leiomyosarcoma: direct evidence of genetic contribution in in vivo tumorigenesis*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(5): p. 1402-11.
20. Ryan, C.L., et al., *Progranulin is expressed within motor neurons and promotes neuronal cell survival*. BMC Neurosci, 2009. **10**: p. 130.
21. Okura, H., et al., *HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins*. J Atheroscler Thromb, 2010. **17**(6): p. 568-77.
22. Zhu, J., et al., *Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair*. Cell, 2002. **111**(6): p. 867-78.
23. Chen, J., et al., *Serum progranulin unrelated with Breg cell levels, but elevated in RA patients, reflecting high disease activity*. Rheumatol Int, 2016. **36**(3): p. 359-64.
24. Wei, F., et al., *Progranulin facilitates conversion and function of regulatory T cells under inflammatory conditions*. PLoS One, 2014. **9**(11): p. e112110.
25. Diaz-Cueto, L., et al., *Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor)*. Dev Biol, 2000. **217**(2): p. 406-18.
26. Qin, J., et al., *Effects of progranulin on blastocyst hatching and subsequent adhesion and outgrowth in the mouse*. Biol Reprod, 2005. **73**(3): p. 434-42.
27. Tang, W., et al., *The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice*. Science, 2011. **332**(6028): p. 478-84.
28. Xu, S.Q., et al., *A novel role for drebrin in regulating progranulin bioactivity in bladder cancer*. Oncotarget, 2015. **6**(13): p. 10825-39.
29. Toh, H., et al., *Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond*. J Mol Neurosci, 2011. **45**(3): p. 538-48.
30. Feng, J.Q., et al., *Granulin epithelin precursor: a bone morphogenic protein 2-inducible growth factor that activates Erk1/2 signaling and JunB transcription factor in chondrogenesis*. FASEB J, 2010. **24**(6): p. 1879-92.
31. Xu, K., et al., *Cartilage oligomeric matrix protein associates with granulin-epithelin precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation*. J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11347-55.
32. De Muynck, L. and P. Van Damme, *Cellular effects of progranulin in health and disease*. J Mol Neurosci, 2011. **45**(3): p. 549-60.
33. Bateman, A. and H.P. Bennett, *The granulin gene family: from cancer to dementia*. Bioessays, 2009. **31**(11): p. 1245-54.
34. Lu, R. and G. Serrero, *Stimulation of PC cell-derived growth factor (epithelin/granulin precursor) expression by estradiol in human breast cancer cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **256**(1): p. 204-7.
35. Liao, L.M., et al., *Identification of a human glioma-associated growth factor gene, granulin, using differential immuno-absorption*. Cancer Res, 2000. **60**(5): p. 1353-60.
36. Jones, M.B., M. Spooner, and E.C. Kohn, *The granulin-epithelin precursor: a putative new growth factor for ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2003. **88**(1 Pt 2): p. S136-9.
37. Wang, W., et al., *PC cell-derived growth factor (granulin precursor) expression and action in human multiple myeloma*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(6): p. 2221-8.

38. Cheung, S.T., et al., *Granulin-epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(22): p. 7629-36.
39. Jones, M.B., et al., *The granulin-epithelin precursor is a steroid-regulated growth factor in endometrial cancer*. J Soc Gynecol Investig, 2006. **13**(4): p. 304-11.
40. Monami, G., et al., *Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex*. Cancer Res, 2006. **66**(14): p. 7103-10.
41. Kong, W.J., et al., *PC cell-derived growth factor overexpression promotes proliferation and survival of laryngeal carcinoma*. Anticancer Drugs, 2007. **18**(1): p. 29-40.
42. Chen, X.Y., et al., *Expression of PC cell-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma and their clinicopathologic significance*. Chin Med J (Engl), 2008. **121**(10): p. 881-6.
43. Piscopo, P., et al., *Hypoxia induces up-regulation of progranulin in neuroblastoma cell lines*. Neurochem Int, 2010. **57**(8): p. 893-8.
44. Demorrow, S., *Progranulin: a novel regulator of gastrointestinal cancer progression*. Transl Gastrointest Cancer, 2013. **2**(3): p. 145-151.
45. Edelman, M.J., et al., *GP88 (progranulin): a novel tissue and circulating biomarker for non-small cell lung carcinoma*. Hum Pathol, 2014. **45**(9): p. 1893-9.
46. Wei, Z., et al., *Elevated expression of secreted autocrine growth factor progranulin increases cervical cancer growth*. Cell Biochem Biophys, 2015. **71**(1): p. 189-93.
47. Pan, C.X., et al., *PC cell-derived growth factor expression in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(4): p. 1333-7.
48. Frampton, G., et al., *Interleukin-6-driven progranulin expression increases cholangiocarcinoma growth by an Akt-dependent mechanism*. Gut, 2012. **61**(2): p. 268-77.
49. Huang, K., et al., *Significance of PC cell-derived growth factor and cyclin D1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma*. Clin Exp Dermatol, 2012. **37**(4): p. 411-7.
50. Donald, C.D., et al., *Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium*. Anticancer Res, 2001. **21**(6A): p. 3739-42.
51. Yamamoto, Y., et al., *Association between increased serum GP88 (progranulin) concentrations and prognosis in patients with malignant lymphomas*. Clin Chim Acta, 2017. **473**: p. 139-146.
52. Gobel, M., et al., *Progranulin is a novel independent predictor of disease progression and overall survival in chronic lymphocytic leukemia*. PLoS One, 2013. **8**(8): p. e72107.
53. Palfree, R.G., H.P. Bennett, and A. Bateman, *The Evolution of the Secreted Regulatory Protein Progranulin*. PLoS One, 2015. **10**(8): p. e0133749.
54. Tolkathev, D., et al., *Structure dissection of human progranulin identifies well-folded granulin/epithelin modules with unique functional activities*. Protein Sci, 2008. **17**(4): p. 711-24.
55. Suh, H.S., et al., *Regulation of progranulin expression in human microglia and proteolysis of progranulin by matrix metalloproteinase-12 (MMP-12)*. PLoS One, 2012. **7**(4): p. e35115.
56. de la Encarnacion, A., et al., *Progranulin Deficiency Reduces CDK4/6/pRb Activation and Survival of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells*. Mol Neurobiol, 2015. **52**(3): p. 1714-25.

57. Guo, F., et al., *Granulin-epithelin precursor binds directly to ADAMTS-7 and ADAMTS-12 and inhibits their degradation of cartilage oligomeric matrix protein*. *Arthritis Rheum*, 2010. **62**(7): p. 2023-36.
58. Lee, C.W., et al., *The lysosomal protein cathepsin L is a progranulin protease*. *Mol Neurodegener*, 2017. **12**(1): p. 55.
59. Bateman, A. and H.P. Bennett, *Granulins: the structure and function of an emerging family of growth factors*. *J Endocrinol*, 1998. **158**(2): p. 145-51.
60. Zheng, Y., et al., *C-terminus of progranulin interacts with the beta-propeller region of sortilin to regulate progranulin trafficking*. *PLoS One*, 2011. **6**(6): p. e21023.
61. Liu, C.J. and X. Bosch, *Progranulin: a growth factor, a novel TNFR ligand and a drug target*. *Pharmacol Ther*, 2012. **133**(1): p. 124-32.
62. Neill, T., et al., *EphA2 is a functional receptor for the growth factor progranulin*. *J Cell Biol*, 2016. **215**(5): p. 687-703.
63. Li, M., et al., *Progranulin is required for proper ER stress response and inhibits ER stress-mediated apoptosis through TNFR2*. *Cell Signal*, 2014. **26**(7): p. 1539-48.
64. Stubert, J., et al., *Trophoblastic progranulin expression is upregulated in cases of fetal growth restriction and preeclampsia*. *J Perinat Med*, 2012. **40**(5): p. 475-81.
65. Cruts, M., J. Theuns, and C. Van Broeckhoven, *Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases*. *Hum Mutat*, 2012. **33**(9): p. 1340-4.
66. Rademakers, R., et al., *Common variation in the miR-659 binding-site of GRN is a major risk factor for TDP43-positive frontotemporal dementia*. *Hum Mol Genet*, 2008. **17**(23): p. 3631-42.
67. Jiao, J., et al., *MicroRNA-29b regulates the expression level of human progranulin, a secreted glycoprotein implicated in frontotemporal dementia*. *PLoS One*, 2010. **5**(5): p. e10551.
68. Wang, W.X., et al., *miR-107 regulates granulin/progranulin with implications for traumatic brain injury and neurodegenerative disease*. *Am J Pathol*, 2010. **177**(1): p. 334-45.
69. Piscopo, P., et al., *Reduced miR-659-3p Levels Correlate with Progranulin Increase in Hypoxic Conditions: Implications for Frontotemporal Dementia*. *Front Mol Neurosci*, 2016. **9**: p. 31.
70. Chen, L., et al., *MiR-29b-3p promotes chondrocyte apoptosis and facilitates the occurrence and development of osteoarthritis by targeting PGRN*. *J Cell Mol Med*, 2017. **21**(12): p. 3347-3359.
71. Bhandari, V., et al., *Structural and functional analysis of a promoter of the human granulin/epithelin gene*. *Biochem J*, 1996. **319** ( Pt 2): p. 441-7.
72. Ong, C.H., et al., *Regulation of progranulin expression in myeloid cells*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2006. **291**(6): p. R1602-12.
73. Diaz-Cueto, L., et al., *PKC signaling is involved in the regulation of progranulin (acroganin/PC-cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) protein expression in human ovarian cancer cell lines*. *Int J Gynecol Cancer*, 2012. **22**(6): p. 945-50.
74. Kamrava, M., et al., *Lysophosphatidic acid and endothelin-induced proliferation of ovarian cancer cell lines is mitigated by neutralization of granulin-epithelin precursor (GEP), a prosurvival factor for ovarian cancer*. *Oncogene*, 2005. **24**(47): p. 7084-93.

75. Cuevas-Antonio, R., et al., *Expression of progranulin (Acrogranin/PCDGF/Granulin-Epithelin Precursor) in benign and malignant ovarian tumors and activation of MAPK signaling in ovarian cancer cell line*. *Cancer Invest*, 2010. **28**(5): p. 452-8.
76. Jones, M.B., et al., *The granulin-epithelin precursor/PC-cell-derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(1): p. 44-51.
77. Pizarro, G.O., et al., *Prosurvival function of the granulin-epithelin precursor is important in tumor progression and chemoresponse*. *Int J Cancer*, 2007. **120**(11): p. 2339-43.
78. Han, J.J., et al., *Progranulin is a potential prognostic biomarker in advanced epithelial ovarian cancers*. *Gynecol Oncol*, 2011. **120**(1): p. 5-10.
79. Carlson, A.M., et al., *Utility of progranulin and serum leukocyte protease inhibitor as diagnostic and prognostic biomarkers in ovarian cancer*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2013. **22**(10): p. 1730-5.
80. Ho, J.C., et al., *Granulin-epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma*. *Hepatology*, 2008. **47**(5): p. 1524-32.
81. Lu, R. and G. Serrero, *Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000. **97**(8): p. 3993-8.
82. Bray, F., et al., *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(6): p. 394-424.
83. Torre, L.A., et al., *Ovarian cancer statistics, 2018*. *CA Cancer J Clin*, 2018. **68**(4): p. 284-296.
84. IARC, *Global cancer observatory*. 2020.
85. Reid, B.M., J.B. Permuth, and T.A. Sellers, *Epidemiology of ovarian cancer: a review*. *Cancer Biol Med*, 2017. **14**(1): p. 9-32.
86. Torre, L.A., et al., *Global Cancer in Women: Burden and Trends*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2017. **26**(4): p. 444-457.
87. Sopik, V., et al., *Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part I. Incidence*. *Gynecol Oncol*, 2015. **138**(3): p. 741-9.
88. Sopik, V., et al., *Why have ovarian cancer mortality rates declined? Part II. Case-fatality*. *Gynecol Oncol*, 2015. **138**(3): p. 750-6.
89. Torres-Sánchez, L., *Tendencias en la mortalidad por cáncer en México de 1980 a 2011*. *Salud Pública de México*, 2014. **56**(5): p. 473-491.
90. Gallardo-Rincon, D., et al., *Epidemiological overview, advances in diagnosis, prevention, treatment and management of epithelial ovarian cancer in Mexico*. *Salud Publica Mex*, 2016. **58**(2): p. 302-8.
91. Gallardo-Rincón, D., et al., *Tercer Consenso Nacional de Cáncer de Ovario 2011. Grupo de Investigación en Cáncer de Ovario y Tumores Ginecológicos de México "GICOM"*, in *Tercer Consenso Nacional de Cáncer de Ovario 2011. Grupo de Investigación en Cáncer de Ovario y Tumores Ginecológicos de México "GICOM"*, G. Gamboa, Editor. 2011, *Revista de Investigación Clínica: Queretaro, Qro.* p. 665-702.
92. Siegel, R.L., K.D. Miller, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2019*. *CA Cancer J Clin*, 2019. **69**(1): p. 7-34.
93. Testa, U., et al., *Ovarian Cancers: Genetic Abnormalities, Tumor Heterogeneity and Progression, Clonal Evolution and Cancer Stem Cells*. *Medicines (Basel)*, 2018. **5**(1).

94. Matulonis, U.A., et al., *Ovarian cancer*. Nat Rev Dis Primers, 2016. **2**: p. 16061.
95. Prat, J., *FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication*. J Gynecol Oncol, 2015. **26**(2): p. 87-9.
96. Goff, B., *Symptoms associated with ovarian cancer*. Clin Obstet Gynecol, 2012. **55**(1): p. 36-42.
97. Lim, A.W., et al., *Predictive value of symptoms for ovarian cancer: comparison of symptoms reported by questionnaire, interview, and general practitioner notes*. J Natl Cancer Inst, 2012. **104**(2): p. 114-24.
98. Henderson, J.T., E.M. Webber, and G.F. Sawaya, *Screening for Ovarian Cancer: Updated Evidence Report and Systematic Review for the US Preventive Services Task Force*. JAMA, 2018. **319**(6): p. 595-606.
99. Ueland, F.R., *A Perspective on Ovarian Cancer Biomarkers: Past, Present and Yet-To-Come*. Diagnostics (Basel), 2017. **7**(1).
100. Menon, U., C. Karpinskyj, and A. Gentry-Maharaj, *Ovarian Cancer Prevention and Screening*. Obstet Gynecol, 2018. **131**(5): p. 909-927.
101. Lowry, K.P. and S.I. Lee, *Imaging and Screening of Ovarian Cancer*. Radiol Clin North Am, 2017. **55**(6): p. 1251-1259.
102. Wentzensen, N., et al., *Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium*. J Clin Oncol, 2016. **34**(24): p. 2888-98.
103. Tschernichovsky, R. and A. Goodman, *Risk-Reducing Strategies for Ovarian Cancer in BRCA Mutation Carriers: A Balancing Act*. Oncologist, 2017. **22**(4): p. 450-459.
104. Sung, H.K., et al., *The Effect of Breastfeeding Duration and Parity on the Risk of Epithelial Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis*. J Prev Med Public Health, 2016. **49**(6): p. 349-366.
105. Poole, E.M., P.A. Konstantinopoulos, and K.L. Terry, *Prognostic implications of reproductive and lifestyle factors in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2016. **142**(3): p. 574-87.
106. Qiu, W., et al., *Dietary fat intake and ovarian cancer risk: a meta-analysis of epidemiological studies*. Oncotarget, 2016. **7**(24): p. 37390-37406.
107. Young, R.H., *Ovarian sex cord-stromal tumours and their mimics*. Pathology, 2018. **50**(1): p. 5-15.
108. Kaldawy, A., et al., *Low-grade serous ovarian cancer: A review*. Gynecol Oncol, 2016. **143**(2): p. 433-438.
109. Prat, J., *Pathology of cancers of the female genital tract*. Int J Gynaecol Obstet, 2015. **131 Suppl 2**: p. S132-45.
110. Prat, J., *Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features*. Virchows Arch, 2012. **460**(3): p. 237-49.
111. Devouassoux-Shisheboran, M. and C. Genestie, *Pathobiology of ovarian carcinomas*. Chin J Cancer, 2015. **34**(1): p. 50-5.
112. Meinhold-Heerlein, I., et al., *The new WHO classification of ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer and its clinical implications*. Arch Gynecol Obstet, 2016. **293**(4): p. 695-700.
113. Kohn, E.C. and S.P. Ivy, *Whence High-Grade Serous Ovarian Cancer*. Am Soc Clin Oncol Educ Book, 2017. **37**: p. 443-448.
114. Jayson, G.C., et al., *Ovarian cancer*. Lancet, 2014. **384**(9951): p. 1376-88.



115. Palmirotta, R., et al., *Ovarian cancer: Novel molecular aspects for clinical assessment*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **117**: p. 12-29.
116. Koshiyama, M., N. Matsumura, and I. Konishi, *Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening*. Diagnostics (Basel), 2017. **7**(1).
117. Tothill, R.W., et al., *Novel molecular subtypes of serous and endometrioid ovarian cancer linked to clinical outcome*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(16): p. 5198-208.
118. Tan, D.S. and S. Kaye, *Ovarian clear cell adenocarcinoma: a continuing enigma*. J Clin Pathol, 2007. **60**(4): p. 355-60.
119. Improta, G., et al., *Ovarian Clear Cell Carcinoma: From Morphology to Molecular Biology*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2018.
120. del Carmen, M.G., M. Birrer, and J.O. Schorge, *Clear cell carcinoma of the ovary: a review of the literature*. Gynecol Oncol, 2012. **126**(3): p. 481-90.
121. Zannoni, G.F., et al., *Clinicopathologic and immunohistochemical features of ovarian clear cell carcinomas in comparison with type I and type II tumors*. Int J Gynecol Pathol, 2012. **31**(6): p. 507-16.
122. Ji, J.X., et al., *Clear cell carcinomas of the ovary and kidney: clarity through genomics*. J Pathol, 2018. **244**(5): p. 550-564.
123. Yamagami, W., et al., *Clinical statistics of gynecologic cancers in Japan*. J Gynecol Oncol, 2017. **28**(2): p. e32.
124. Kuo, K.T., et al., *DNA copy numbers profiles in affinity-purified ovarian clear cell carcinoma*. Clin Cancer Res, 2010. **16**(7): p. 1997-2008.
125. Anglesio, M.S., et al., *Clear cell carcinoma of the ovary: a report from the first Ovarian Clear Cell Symposium, June 24th, 2010*. Gynecol Oncol, 2011. **121**(2): p. 407-15.
126. Kobayashi, H., et al., *Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan*. Int J Gynecol Cancer, 2007. **17**(1): p. 37-43.
127. Mallen, A., et al., *Surgical prevention strategies in ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2018. **151**(1): p. 166-175.
128. Oda, K., et al., *Genomics to immunotherapy of ovarian clear cell carcinoma: Unique opportunities for management*. Gynecol Oncol, 2018.
129. Tan, D.S., R.E. Miller, and S.B. Kaye, *New perspectives on molecular targeted therapy in ovarian clear cell carcinoma*. Br J Cancer, 2013. **108**(8): p. 1553-9.
130. Anglesio, M.S., et al., *IL6-STAT3-HIF signaling and therapeutic response to the angiogenesis inhibitor sunitinib in ovarian clear cell cancer*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(8): p. 2538-48.
131. Yamaguchi, K., et al., *Identification of an ovarian clear cell carcinoma gene signature that reflects inherent disease biology and the carcinogenic processes*. Oncogene, 2010. **29**(12): p. 1741-52.
132. Shen, H., et al., *Epigenetic analysis leads to identification of HNF1B as a subtype-specific susceptibility gene for ovarian cancer*. Nat Commun, 2013. **4**: p. 1628.
133. Kashiwara, T., et al., *Antitumor activity and induction of TP53-dependent apoptosis toward ovarian clear cell adenocarcinoma by the dual PI3K/mTOR inhibitor DS-7423*. PLoS One, 2014. **9**(2): p. e87220.
134. Oishi, T., et al., *The PI3K/mTOR dual inhibitor NVP-BEZ235 reduces the growth of ovarian clear cell carcinoma*. Oncol Rep, 2014. **32**(2): p. 553-8.

135. Takano, M., et al., *Weekly administration of temsirolimus for heavily pretreated patients with clear cell carcinoma of the ovary: a report of six cases*. *Int J Clin Oncol*, 2011. **16**(5): p. 605-9.
136. Sugiyama, T., et al., *Randomized Phase III Trial of Irinotecan Plus Cisplatin Compared With Paclitaxel Plus Carboplatin As First-Line Chemotherapy for Ovarian Clear Cell Carcinoma: JGOG3017/GCIG Trial*. *J Clin Oncol*, 2016. **34**(24): p. 2881-7.
137. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded*. *Am J Pathol*, 2016. **186**(4): p. 733-47.
138. Telloni, S.M., *Tumor Staging and Grading: A Primer*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1606**: p. 1-17.
139. Silverberg, S.G., *Histopathologic grading of ovarian carcinoma: a review and proposal*. *Int J Gynecol Pathol*, 2000. **19**(1): p. 7-15.
140. Malpica, A., *Grading of ovarian cancer: a histotype-specific approach*. *Int J Gynecol Pathol*, 2008. **27**(2): p. 175-81.
141. Benedet, J.L., et al., *FIGO staging classifications and clinical practice guidelines in the management of gynecologic cancers. FIGO Committee on Gynecologic Oncology*. *Int J Gynaecol Obstet*, 2000. **70**(2): p. 209-62.
142. Shih Ie, M. and R.J. Kurman, *Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis*. *Am J Pathol*, 2004. **164**(5): p. 1511-8.
143. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications*. *Int J Gynecol Pathol*, 2008. **27**(2): p. 151-60.
144. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm*. *Hum Pathol*, 2011. **42**(7): p. 918-31.
145. Kurman, R.J. and M. Shih Ie, *The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory*. *Am J Surg Pathol*, 2010. **34**(3): p. 433-43.
146. Hennessy, B.T., R.L. Coleman, and M. Markman, *Ovarian cancer*. *Lancet*, 2009. **374**(9698): p. 1371-82.
147. Ayen, A., et al., *Recent Progress in Gene Therapy for Ovarian Cancer*. *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(7).
148. Cortez, A.J., et al., *Advances in ovarian cancer therapy*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2018. **81**(1): p. 17-38.
149. Montagnana, M., M. Benati, and E. Danese, *Circulating biomarkers in epithelial ovarian cancer diagnosis: from present to future perspective*. *Ann Transl Med*, 2017. **5**(13): p. 276.
150. Kim, J.Y., C.H. Cho, and H.S. Song, *Targeted therapy of ovarian cancer including immune check point inhibitor*. *Korean J Intern Med*, 2017. **32**(5): p. 798-804.
151. Valdespino-Gomez, V.M., P.M. Valdespino-Castillo, and V.E. Valdespino-Castillo, *[Cell signaling pathways interaction in cellular proliferation: Potential target for therapeutic interventionism]*. *Cir Cir*, 2015. **83**(2): p. 165-74.
152. Hassan, B., et al., *Targeting the PI3-kinase/Akt/mTOR signaling pathway*. *Surg Oncol Clin N Am*, 2013. **22**(4): p. 641-64.
153. Cheaib, B., A. Auguste, and A. Leary, *The PI3K/Akt/mTOR pathway in ovarian cancer: therapeutic opportunities and challenges*. *Chin J Cancer*, 2015. **34**(1): p. 4-16.
154. Li, H., J. Zeng, and K. Shen, *PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer*. *Arch Gynecol Obstet*, 2014. **290**(6): p. 1067-78.

155. Sever, R. and J.S. Brugge, *Signal transduction in cancer*. Cold Spring Harb Perspect Med, 2015. **5**(4).
156. Bregar, A.J. and W.B. Growdon, *Emerging strategies for targeting PI3K in gynecologic cancer*. Gynecol Oncol, 2016. **140**(2): p. 333-44.
157. Fresno Vara, J.A., et al., *PI3K/Akt signalling pathway and cancer*. Cancer Treat Rev, 2004. **30**(2): p. 193-204.
158. Fu, S., et al., *Perifosine plus docetaxel in patients with platinum and taxane resistant or refractory high-grade epithelial ovarian cancer*. Gynecol Oncol, 2012. **126**(1): p. 47-53.
159. Behbakht, K., et al., *Phase II trial of the mTOR inhibitor, temsirolimus and evaluation of circulating tumor cells and tumor biomarkers in persistent and recurrent epithelial ovarian and primary peritoneal malignancies: a Gynecologic Oncology Group study*. Gynecol Oncol, 2011. **123**(1): p. 19-26.
160. Cargnello, M. and P.P. Roux, *Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases*. Microbiol Mol Biol Rev, 2011. **75**(1): p. 50-83.
161. Cowan, K.J. and K.B. Storey, *Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress*. J Exp Biol, 2003. **206**(Pt 7): p. 1107-15.
162. Katz, M., I. Amit, and Y. Yarden, *Regulation of MAPKs by growth factors and receptor tyrosine kinases*. Biochim Biophys Acta, 2007. **1773**(8): p. 1161-76.
163. Miller, C.R., K.E. Oliver, and J.H. Farley, *MEK1/2 inhibitors in the treatment of gynecologic malignancies*. Gynecol Oncol, 2014. **133**(1): p. 128-37.
164. Cheng, Y. and H. Tian, *Current Development Status of MEK Inhibitors*. Molecules, 2017. **22**(10).
165. Kidger, A.M., J. Siphthorp, and S.J. Cook, *ERK1/2 inhibitors: New weapons to inhibit the RAS-regulated RAF-MEK1/2-ERK1/2 pathway*. Pharmacol Ther, 2018. **187**: p. 45-60.
166. Cicens, J., et al., *JNK, p38, ERK, and SGK1 Inhibitors in Cancer*. Cancers (Basel), 2017. **10**(1).
167. Sapio, L., et al., *Targeting protein kinase A in cancer therapy: an update*. EXCLI J, 2014. **13**: p. 843-55.
168. Skalhegg, B.S. and K. Tasken, *Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. Differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA*. Front Biosci, 2000. **5**: p. D678-93.
169. Turnham, R.E. and J.D. Scott, *Protein kinase A catalytic subunit isoform PRKACA; History, function and physiology*. Gene, 2016. **577**(2): p. 101-8.
170. McKenzie, A.J., S.L. Campbell, and A.K. Howe, *Protein kinase A activity and anchoring are required for ovarian cancer cell migration and invasion*. PLoS One, 2011. **6**(10): p. e26552.
171. McDaid, H.M., et al., *Increased expression of the RIalpha subunit of the cAMP-dependent protein kinase A is associated with advanced stage ovarian cancer*. Br J Cancer, 1999. **79**(5-6): p. 933-9.
172. Yap, T.A., et al., *AT13148 is a novel, oral multi-AGC kinase inhibitor with potent pharmacodynamic and antitumor activity*. Clin Cancer Res, 2012. **18**(14): p. 3912-23.
173. Xi, Y., et al., *AT13148, a first-in-class multi-AGC kinase inhibitor, potently inhibits gastric cancer cells both in vitro and in vivo*. Biochem Biophys Res Commun, 2016. **478**(1): p. 330-336.

174. Sadok, A., et al., *Rho kinase inhibitors block melanoma cell migration and inhibit metastasis*. *Cancer Res*, 2015. **75**(11): p. 2272-84.
175. Domcke, S., et al., *Evaluating cell lines as tumour models by comparison of genomic profiles*. *Nat Commun*, 2013. **4**: p. 2126.
176. Provencher, D.M., et al., *Characterization of four novel epithelial ovarian cancer cell lines*. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 2000. **36**(6): p. 357-61.
177. Beaufort, C.M., et al., *Ovarian cancer cell line panel (OCCP): clinical importance of in vitro morphological subtypes*. *PLoS One*, 2014. **9**(9): p. e103988.
178. Folkes, A.J., et al., *The identification of 2-(1H-indazol-4-yl)-6-(4-methanesulfonyl-piperazin-1-ylmethyl)-4-morpholin-4-yl-t hieno[3,2-d]pyrimidine (GDC-0941) as a potent, selective, orally bioavailable inhibitor of class I PI3 kinase for the treatment of cancer*. *J Med Chem*, 2008. **51**(18): p. 5522-32.
179. Xie, J., X. Wang, and C.G. Proud, *mTOR inhibitors in cancer therapy*. *F1000Res*, 2016. **5**.
180. Arriola Apelo, S.I. and D.W. Lamming, *Rapamycin: An InhibiTOR of Aging Emerges From the Soil of Easter Island*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2016. **71**(7): p. 841-9.
181. Lamming, D.W., *Inhibition of the Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-Rapamycin and Beyond*. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2016. **6**(5).
182. Dudley, D.T., et al., *A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1995. **92**(17): p. 7686-9.
183. Akella, R., T.M. Moon, and E.J. Goldsmith, *Unique MAP Kinase binding sites*. *Biochim Biophys Acta*, 2008. **1784**(1): p. 48-55.
184. Bennett, B.L., et al., *SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001. **98**(24): p. 13681-6.
185. Lochner, A. and J.A. Moolman, *The many faces of H89: a review*. *Cardiovasc Drug Rev*, 2006. **24**(3-4): p. 261-74.
186. Maxwell, P. and K. Salnikow, *HIF-1: an oxygen and metal responsive transcription factor*. *Cancer Biol Ther*, 2004. **3**(1): p. 29-35.
187. Srinivasan, S. and J.F. Dunn, *Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in buffer containing cobalt chloride for Western blot analysis*. *Anal Biochem*, 2011. **416**(1): p. 120-2.
188. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-5.
189. Petrillo, M., et al., *Targeting the hallmarks of ovarian cancer: The big picture*. *Gynecol Oncol*, 2016. **142**(1): p. 176-83.
190. Mabuchi, S., T. Sugiyama, and T. Kimura, *Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives*. *J Gynecol Oncol*, 2016. **27**(3): p. e31.
191. Yang, D., et al., *Clinical implications of progranulin in gastric cancer and its regulation via a positive feedback loop involving AKT and ERK signaling pathways*. *Mol Med Rep*, 2017. **16**(6): p. 9685-9691.
192. Sheppard, K.E., et al., *Synergistic inhibition of ovarian cancer cell growth by combining selective PI3K/mTOR and RAS/ERK pathway inhibitors*. *Eur J Cancer*, 2013. **49**(18): p. 3936-44.
193. Zhou, X.K., et al., *RNAi knockdown of PIK3CA preferentially inhibits invasion of mutant PIK3CA cells*. *World J Gastroenterol*, 2011. **17**(32): p. 3700-8.

194. Harasawa, M., et al., *Analysis of mTOR inhibition-involved pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma*. Acta Histochem Cytochem, 2011. **44**(2): p. 113-8.
195. Miyazawa, M., et al., *Therapeutic strategy targeting the mTOR-HIF-1alpha-VEGF pathway in ovarian clear cell adenocarcinoma*. Pathol Int, 2009. **59**(1): p. 19-27.
196. Yasuda, M., et al., *Expression of hypoxia inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and glucose transporter-1 (GLUT-1) in ovarian adenocarcinomas: difference in hypoxic status depending on histological character*. Oncol Rep, 2008. **19**(1): p. 111-6.
197. Alici Davutoglu, E., et al., *Evaluation of maternal serum hypoxia inducible factor-1alpha, progranulin and syndecan-1 levels in pregnancies with early- and late-onset preeclampsia*. J Matern Fetal Neonatal Med, 2018. **31**(15): p. 1976-1982.
198. Luo, L., et al., *Effects of hypoxia on progranulin expression in HT22 mouse hippocampal cells*. Mol Med Rep, 2014. **9**(5): p. 1675-80.
199. Shafee, N., et al., *PI3K/Akt activity has variable cell-specific effects on expression of HIF target genes, CA9 and VEGF, in human cancer cell lines*. Cancer Lett, 2009. **282**(1): p. 109-15.
200. Masvidal, L., et al., *mTOR-sensitive translation: Cleared fog reveals more trees*. RNA Biol, 2017. **14**(10): p. 1299-1305.
201. Liu, F., et al., *Interleukin-6-stimulated progranulin expression contributes to the malignancy of hepatocellular carcinoma cells by activating mTOR signaling*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21260.
202. Eckhoff, K., et al., *The prognostic significance of Jun transcription factors in ovarian cancer*. J Cancer Res Clin Oncol, 2013. **139**(10): p. 1673-80.
203. Liu, Y., et al., *Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF)/granulin-epithelin precursor (GEP) decreased cell proliferation and invasion through downregulation of cyclin D and CDK4 and inactivation of MMP-2*. BMC Cancer, 2007. **7**: p. 22.
204. Zhang, J., Y.H. Chen, and Q. Lu, *Pro-oncogenic and anti-oncogenic pathways: opportunities and challenges of cancer therapy*. Future Oncol, 2010. **6**(4): p. 587-603.
205. Chandarlapaty, S., *Negative feedback and adaptive resistance to the targeted therapy of cancer*. Cancer Discov, 2012. **2**(4): p. 311-9.
206. Maira, S.M., et al., *PI3K inhibitors for cancer treatment: where do we stand?* Biochem Soc Trans, 2009. **37**(Pt 1): p. 265-72.
207. Raghavendra, N.M., et al., *Dual or multi-targeting inhibitors: The next generation anticancer agents*. Eur J Med Chem, 2018. **143**: p. 1277-1300.
208. Janku, F., *Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: From laboratory to patients*. Cancer Treat Rev, 2017. **59**: p. 93-101.
209. Janku, F., *Bringing target-matched PI3K from the bench to the clinic*. Cell Cycle, 2013. **12**(12): p. 1817-8.
210. Janku, F., T.A. Yap, and F. Meric-Bernstam, *Targeting the PI3K pathway in cancer: are we making headway?* Nat Rev Clin Oncol, 2018. **15**(5): p. 273-291.

## **13 ANEXO 1**

**(Artículo requisito para la obtención del grado)**



# Inhibition of PI3K/AKT/mTOR and MAPK signaling pathways decreases progranulin expression in ovarian clear cell carcinoma (OCCC) cell line: a potential biomarker for therapy response to signaling pathway inhibitors

Carlos Eduardo Perez-Juarez<sup>1,2</sup> · Fabian Arechavaleta-Velasco<sup>1</sup> · Moises Zeferino-Toquero<sup>3,6</sup> · Lourdes Alvarez-Arellano<sup>4</sup> · Isaias Estrada-Moscoso<sup>5</sup> · Laura Diaz-Cueto<sup>1</sup>

Received: 4 September 2019 / Accepted: 22 October 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Patients with advanced stage ovarian clear cell carcinoma (OCCC) have a poor prognosis due to resistance to conventional platinum chemotherapy. Recent studies have demonstrated that PI3K/AKT/mTOR and ERK1/2 signaling pathways are involved in this chemoresistance. Progranulin (PGRN) overexpression contributes to cisplatin resistance of epithelial ovarian cancer cell lines. Also, PGRN expression is regulated by AKT/mTOR and ERK1/2 signaling pathways in different cell types. Thus, the present study was designed to identify if PGRN expression is regulated by AKT, mTOR, and ERK1/2 signaling pathways in the OCCC cell line TOV-21G. Cultured TOV-21G cells were incubated with different concentrations of pharmacological cell signaling inhibitors. PGRN expression and phosphorylation of ERK1/2, AKT, and mTOR were assessed by Western blotting. Inhibition of AKT, mTOR, and ERK1/2 significantly reduced PGRN expression. Cell viability was not affected, while cell proliferation significantly decreased with all inhibitors used in this study. These observations demonstrated that inhibition of PI3K/AKT/mTOR and ERK1/2 signaling pathways reduces PGRN expression in TOV-21G cells. Thus, PGRN could be considered as a candidate for explaining the high resistance to platinum-based treatment and a potential biomarker for therapy response to cell signaling inhibitors in patients with OCCC.

**Keywords** Progranulin · Ovarian clear cell carcinoma · Signal transduction pathways · Pharmacological inhibitors · Biomarker

## Introduction

Ovarian cancer is the eighth most common malignancy among women, and the second leading cause of cancer death among women with gynecological malignancies worldwide

[1, 2]. It is a heterogeneous disease, including various histological subtypes with different molecular characteristics, genetic risk factors, and clinical behaviors. The four major histological subtypes include serous adenocarcinoma,

✉ Laura Diaz-Cueto  
ldiazcueto@gmail.com

<sup>1</sup> Unidad de Investigacion Medica en Medicina Reproductiva, UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Rio Magdalena No. 289, Sexto piso, Tizapan San Angel, 01090 Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>2</sup> Posgrado en Ciencias Biologicas, Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>3</sup> Departamento de Oncologia Ginecologica, UMAE Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>4</sup> CONACYT-Hospital Infantil de Mexico Federico Gomez, Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>5</sup> Departamento de Patologia, UMAE Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, IMSS, Ciudad de Mexico, Mexico

<sup>6</sup> Present Address: Departamento de Cirugia Oncologica, Hospital de Gineco-Obstetricia No.3, Centro Medico Nacional La Raza, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de Mexico, Mexico

endometrioid adenocarcinoma, mucinous adenocarcinoma, and clear cell carcinoma [3, 4].

Ovarian clear cell carcinoma (OCCC) represents approximately 4–12% of all ovarian carcinomas worldwide, whereas in Japan, its incidence increases to 20–25% of all ovarian tumors. Also, the OCCC is diagnosed twice as frequently among Asian women living in the USA when compared with Caucasian women. According to the World Health Organization, the OCCC is a distinct histological subtype of epithelial ovarian cancer (EOC) because it has intrinsic resistance to platinum-based chemotherapy. In consequence, patients with advanced stage OCCC have a worse prognosis and a lower 5-year survival compared to patients with high-grade serous carcinoma.

Several mechanisms of cisplatin resistance in OCCC have been proposed, including overexpression of the multidrug resistance-associated protein 3 (ABCC3), annexin-A4 (AnxA4), glutathione peroxidase-3 (GPx3), galectin-3, and nucleotide excision DNA repair (NER) system genes [5–9]. Also, altered signal pathways that can compensate cisplatin-induced apoptosis has been implicated in the cisplatin resistance phenotype. For example, activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) is more frequent in OCCC than in other histological subtypes. Moreover, it has been described that 86.6% of OCCC has the mTOR pathway activated. This increased activity could be a consequence of somatic mutations in *PI3KCA* gene that has been estimated to occur in 40% [7, 9]. On the other hand, gain-of-function mutations in the *KRAS* gene, which result in the activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway, has been associated with advanced stage OCCC platinum-based drug resistance [9]. Activation of these signaling pathways increases the expression of several target genes involved in the platinum-based chemotherapy resistance in EOC. However, genes regulated by mTOR or ERK1/2 that contribute to cisplatin resistance of OCCC have not been fully investigated.

Progranulin (PGRN) is a rich cysteine protein with pleiotropic functions including cell proliferation, migration, and invasion as well as tumorigenesis. It is also known as acrogranin, PC cell-derived growth factor (PCDGF), granulin-epithelin precursor (GEP), proepithelin (PEPI), and 88 kDa glycoprotein (GP88), and is frequently expressed in different types of cancer including ovarian, breast, lung, and prostate cancer [10]. Regarding ovarian cancer, overexpression of PGRN in malignant ovarian tumors compared with benign and healthy ovarian tissues [11] has been demonstrated. Moreover, differential expression was observed between invasive ovarian and serous low malignant potential tumors. Clinical studies have independently associated PGRN levels with progression-free survival (PFS) and overall survival. Also, an association between increased PGRN levels and decreased overall survival was observed in advanced stage

EOC [12, 13]. Finally, it has been shown that overexpression of PGRN contributes to cisplatin resistance of epithelial ovarian cancer cell lines, liver cancer cells, and urothelial carcinoma-derived human cells [10, 14, 15].

PGRN expression is regulated by several signaling pathways including AKT, mTOR, mitogen-activated protein kinase (MAPK), ERK1/2, and protein kinase C (PKC) in different cell types. For example, hypoxia stimulates PGRN secretion via the MAPK/ERK1/2 signaling cascade in two human neuroblastoma cell lines [16]. Also, interleukin (IL)-6 upregulates PGRN expression in hepatocellular carcinoma via the mTOR signaling pathway [17], while in four human cholangiocarcinoma cell lines IL-6-induced PGRN expression occurs through the activation of ERK1/2 [18]. Interestingly, in gastric cancer, PGRN expression is regulated in an autocrine manner through the AKT and ERK signaling pathways [19]. Finally, constitutive activation of PKC induces the expression of PGRN in two EOC cell lines [20].

Despite this information, the signaling pathways that regulate PGRN expression in OCCC cells have not been elucidated; therefore, the present study was designed to identify if PGRN expression is regulated by mTOR, ERK1/2, and PI3K/AKT signaling pathways in the OCCC cell line TOV-21G.

## Materials and methods

### Cell culture

The ovarian clear cell carcinoma cell line TOV-21G (ATCC® CRL-11730™), which expresses PGRN, was purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were grown in high glucose Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Life Technologies, Grand Island, NY) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS), 1.0 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, and an antibiotic-antimycotic solution (100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin, and 0.25 mg/mL amphotericin B) at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

### Cell treatment

Cells were seeded in 12-well tissue culture plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well. After 24 h, media were replaced by fresh phenol red-free medium supplemented with 5% FBS containing different concentrations of GDC-0941 (2–4 μM) (Abcam plc., Cambridge, UK), PD-98059 (50–80 μM) (Calbiochem, Merck, Millipore, DE), and Rapamycin (25–100 μM) (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA) or all combinations of the three signaling pathways inhibitors at their highest concentration. After an additional



24 h of incubation, intracellular proteins were obtained and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed. Pharmacological inhibitors doses were selected from previous studies [21–23]. Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to cultures at a final concentration not greater than 0.01% as solvent control.

### Cell viability assay

The cytotoxic effect of the different inhibitors compounds was analyzed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) leakage into the medium using the CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega Corp., San Diego, CA), according to the manufacturer's instructions. Briefly,  $2 \times 10^4$  cells were seeded in a 96-well tissue culture plate in triplicate and incubated in DMEM with 5% FBS for 24 h. Thereafter, cells were exposed to DMSO or different doses of inhibitors in phenol red-free medium with 5% FBS for 24 h. At the end of incubation time, LDH activity in cell supernatants was measured by spectrophotometry at 490 nm. Maximal LDH release was determined from cells lysed with 1% Triton X-100. Cells cultured in DMEM alone were used as controls for the spontaneous release of LDH. The percentage of viability was calculated as  $\% \text{viability} = 100 \times [1 - (\text{spontaneous release of LDH}/\text{maximum release of LDH})]$ .

### Cell proliferation assay

Inhibition of cell proliferation by the different pharmacological cell signaling inhibitors was analyzed by measuring the mitochondrial dehydrogenase activity using the cell proliferation kit II (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN), following the manufacturer's instructions. Briefly, cells were seeded in 96-well tissue culture plate ( $2 \times 10^4$  cells per well) in triplicate and incubated for 24 h. Then, cells were exposed to DMSO or different doses of inhibitors in phenol red-free medium with 5% FBS for 24 h. At the end of incubation time, 50  $\mu\text{L}$  of XTT solution were added to each well, and conversion of XTT to formazan was measured at 450 nm by spectrophotometry after 1 h of incubation.

### Protein sample preparation

Protein extracts were prepared by resuspending the cells in  $1 \times$  lysis buffer containing cOmplete-mini<sup>TM</sup> (EDTA-free) protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN) and incubated on ice for 5 min. Lysates were centrifuged for 10 min at 10,000 rpm, and the supernatants were analyzed for PGRN and total and phosphorylated mTOR, ERK1/2, and AKT by Western blotting. Total protein concentration of whole cell lysates was measured by Pierce BCA Assay (Pierce, Rockford, IL), following the manufacturer's instructions.

### Western blot analysis

Protein extracts (5  $\mu\text{g}$  for PGRN, actin, mTOR, and AKT or 35  $\mu\text{g}$  for ERK1/2) were separated by 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to Hybond-P PVDF membranes. Non-specific binding was minimized by blocking the membrane for 1 h at room temperature with blocking buffer (5% powdered skim milk in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20, pH 7.5). Blocked PVDF membranes were incubated with the following dilutions of primary antibodies overnight at  $4^{\circ}\text{C}$ : PGRN (1:2000), actin (1:2500), AKT (1:1000), p-AKT (1:1000), mTOR (1:1000), p-mTOR (1:1000), ERK1/2 (1:1000), and p-ERK1/2 (1:500). Then, primary antibodies were detected using goat anti-rabbit IgG or goat anti-mouse IgG horseradish peroxidase conjugates at 1:10,000 dilution, and the blots were developed using the SuperSignal West Femto chemiluminescent substrate. The intensity of the resulting bands was measured by densitometry using the ImageJ software. Levels of PGRN were normalized against  $\beta$ -actin; while phosphorylated proteins were normalized against their respective total protein levels.

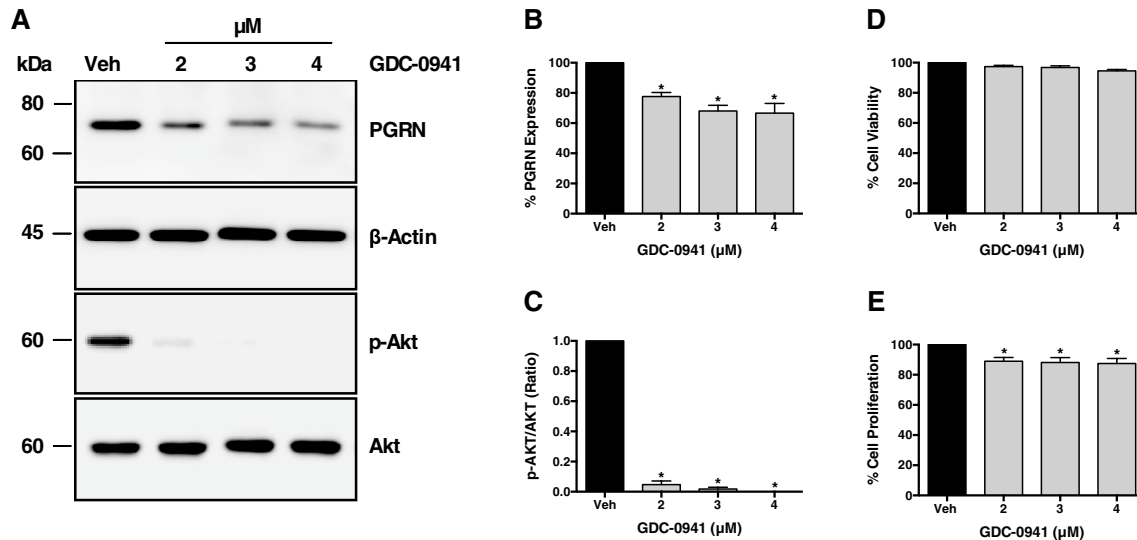
### Statistical analysis

All statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics for Mac version 23 (IBM Corp., Armonk, NY, USA). Results are presented as mean  $\pm$  SEM of relative protein levels or percent of vehicle-treated cells. Multiples comparisons between groups were performed by using the Kruskal–Wallis test followed by Dunnett's test. A *P* value of  $<0.05$  was considered as statistically significant. All experiments were repeated at least four times for evidence of reproducibility.

## Results

### PGRN expression is dependent on the PI3K/AKT pathway in TOV-21G cells

Incubation of TOV-21G cells with different concentrations of GDC-0941, a PI3K inhibitor, resulted in a significant dose-dependent decrease in PGRN expression with a maximum inhibition of  $\sim 33\%$  with the highest dose (4  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 1a, b). AKT phosphorylation was used as an internal control of PI3K inhibition by GDC-0941. As expected, incubation of TOV-21G cells with GDC-041 significantly inhibited AKT phosphorylation (Fig. 1a, c). Cell viability determined by the CitoTox96 colorimetric assay was not affected by the concentrations of GDC-0941 used in these experiments (Fig. 1d). In contrast, cell proliferation was slightly but significantly reduced after GDC-0941 treatment for 24 h (Fig. 1e).



**Fig. 1** Progranulin expression in TOV-21G cells after inhibition of the PI3K/AKT signaling pathway. Cells were incubated in the presence or absence of GDC-0941 for 24 h. PGRN and total and phosphorylated AKT levels were detected by Western blotting (a). Quantitation of protein levels was performed by densitometry (b, c).  $\beta$ -actin was used as protein loading control for PGRN levels, while levels of p-AKT were normalized against total AKT. The values are expressed

as percent or relative densitometric units with respect to control. Cell viability was determined by measuring LDH leakage into the medium (d), while cell proliferation was evaluated by quantifying XTT conversion (e). The results represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated by an asterisk compared with the control, as determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's test

### PGRN expression requires mTOR activation in TOV-21G cells

Rapamycin was used to investigate whether the mTOR pathway is involved in the regulation of PGRN expression. Levels of PGRN significantly decreased when cells were incubated with 25, 50, and 100 nM of rapamycin for 24 h. Western blot analysis showed a  $\sim 32\%$  reduction in PGRN levels with all doses of rapamycin (Fig. 2a, b). mTOR phosphorylation was used as an indicator of rapamycin efficacy. Significant inhibition of mTOR phosphorylation was observed with the three doses of rapamycin as compared to the control (Fig. 2a, c). Cell viability was not affected by the different concentrations of rapamycin, while cell proliferation significantly decreased with the three doses of rapamycin used in this study (Fig. 2d, e).

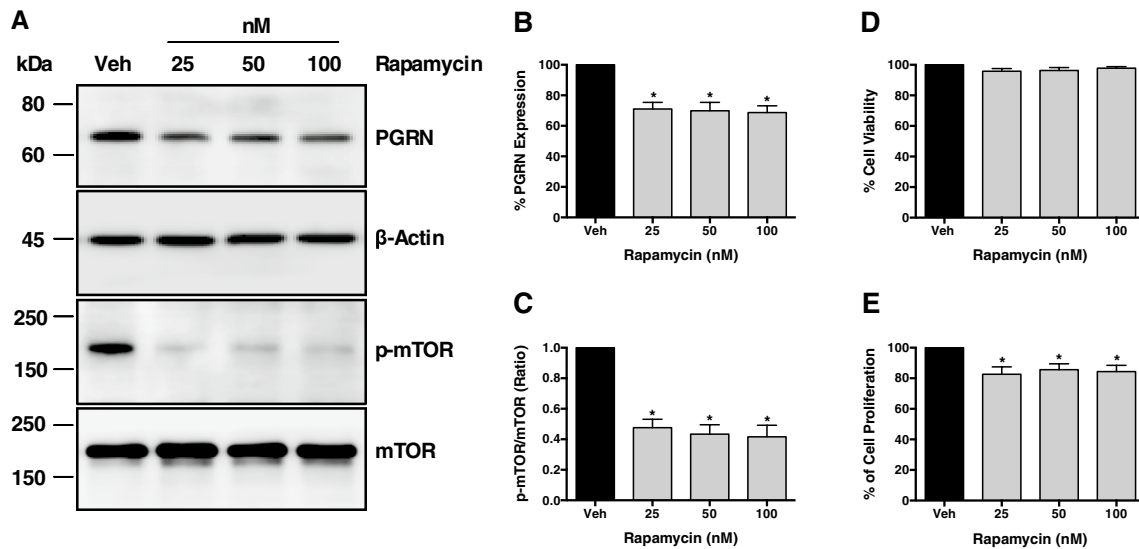
### Inhibition of ERK1/2 decreases PGRN expression in TOV-21G cells

The role of ERK1/2 in the regulation of progranulin expression in TOV-21G cells was investigated using PD-98059, a pharmacological inhibitor of MEK-1, the upstream kinase of ERK1/2. After incubation of TOV-21G cells in the presence of different concentrations of PD-98059, a significant dose-dependent decrease in PGRN expression was observed. Similarly to the other inhibitors, PGRN levels were reduced in  $\sim 33\%$  with the highest

dose (80  $\mu$ M) (Fig. 3a, b). Incubation of TOV-21G cells with PD-98059 resulted in a significant dose-dependent inhibition of ERK1/2 phosphorylation. These results demonstrate that PD-98059 effectively inhibited ERK1/2 activation (Fig. 3a, c). PD-98059 treatment did not affect cell viability (Fig. 3d). In contrast, cell proliferation decreased in a significant dose-dependent manner (Fig. 3e).

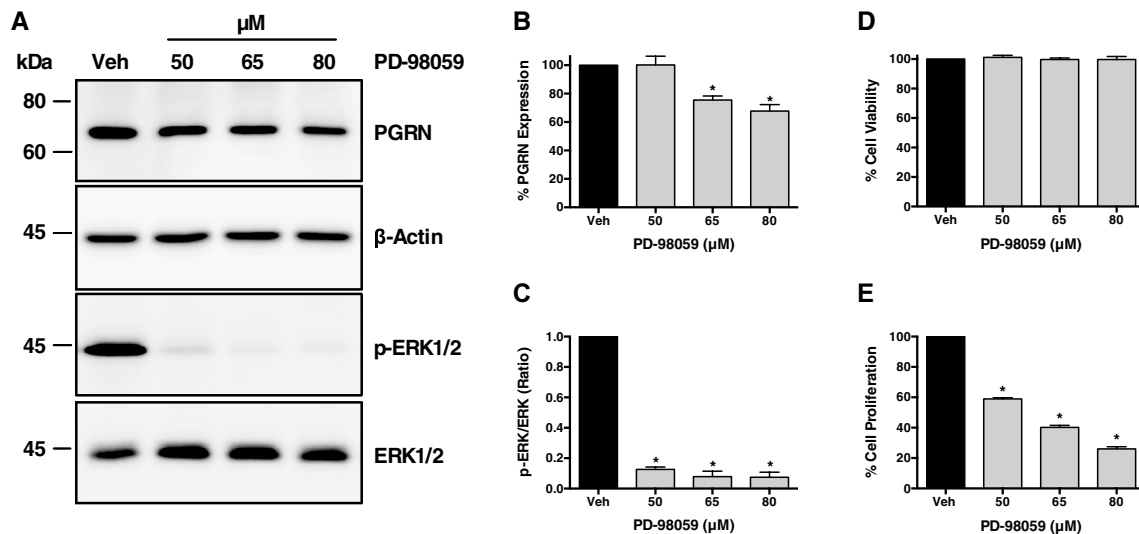
### Enhanced inhibition of PGRN expression by the combination of the different signaling pathways inhibitors

To examine whether the combination of GDC-0941, rapamycin, or PD-98059 could additively or synergistically inhibit PGRN expression, the highest concentration of each inhibitor was used. Treatment of TOV-21G cells for 24 h with GDC-0941, rapamycin, or PD-98059 resulted in a significantly decreased progranulin expression of 30.07%, 30.08%, and 30.68%, respectively (Fig. 4). The combination of GDC-0941 and PD-98059 resulted in a slightly but not significant additive effect, showing a reduction of an additional 16.87% on PGRN expression (Fig. 4). All other combinations did not result in an additive inhibitory effect on PGRN expression. Finally, combination of all three inhibitors had the same effect observed with the combination of GDC-0941 and PD-98059 (Fig. 4).



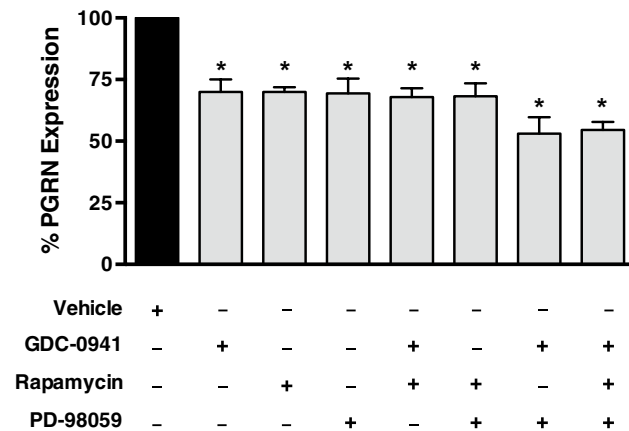
**Fig. 2** Progranulin expression in TOV-21G cells after inhibition of the mTOR signaling pathway. Cells were incubated in the presence or absence of rapamycin for 24 h. PGRN and total and phosphorylated mTOR levels were detected by Western blotting (a). Quantitation of protein levels was performed by densitometry (b, c).  $\beta$ -actin was used as protein loading control for PGRN levels, while levels of p-mTOR were normalized against total mTOR. The values are expressed as

percent or relative densitometric units with respect to control. Cell viability was determined by measuring LDH leakage into the medium (d), while cell proliferation was evaluated by quantifying XTT conversion (e). The results represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated by an asterisk compared with the control, as determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's test



**Fig. 3** Progranulin expression in TOV-21G cells after inhibition of the ERK1/2 signaling pathway. Cells were incubated in the presence or absence of PD-98059 for 24 h. PGRN and total and phosphorylated ERK1/2 levels were detected by Western blotting (a). Quantitation of protein levels was performed by densitometry (b, c).  $\beta$ -actin was used as protein loading control for PGRN levels, while levels of p-ERK1/2 were normalized against total ERK1/2. The values are

expressed as percent or relative densitometric units with respect to control. Cell viability was determined by measuring LDH leakage into the medium (d), while cell proliferation was evaluated by quantifying XTT conversion (e). The results represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated by an asterisk compared with the control, as determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's test



**Fig. 4** Progranulin expression in TOV-21G cells after incubation in the presence or absence of PI3K, mTOR, and ERK1/2 inhibitors as well as all possible combination. Cells were incubated with the highest concentrations of GDC-0941, PD-98059, and Rapamycin or all combinations of the three signaling pathways inhibitors for 24 h. PGRN levels were detected by Western blotting. Quantitation of protein levels was performed by densitometry.  $\beta$ -actin was used as protein loading control for PGRN levels. The values are expressed as percent, and the results represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated by an asterisk compared with the control, as determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's test. No significant difference was observed between treatments

## Discussion

Ovarian clear cell carcinoma is characterized by high resistance to cis-platinum treatment due in part to the constitutive activation of signaling pathways of mTOR and ERK1/2 [5, 24, 25]. Currently, it has been identified some genes regulated by these pathways that may be responsible for this high resistance to platinum-based treatment [26–29]. However, identification of other proteins associated with cisplatin resistance regulated by mTOR and ERK1/2 in OCCC are needed in order to develop new treatment strategies as well as new biomarkers for monitoring the response to cell signaling inhibitor therapies.

PGRN is a protein that participates in growth, progression, metastasis, and chemoresistance of epithelial ovarian cancer [10]. Also, it is responsible for cisplatin resistance in ovarian cancer, liver cancer cells, and urothelial carcinoma-derived human UMUC-3 cells [10, 14, 15], therefore, if PGRN is regulated by the signaling pathways of mTOR and ERK1/2 in OCCC, it could be considered as an ideal candidate for explaining the high resistance to platinum-based treatment, new therapeutic target, and biomarker for therapy response to mTOR and multi-kinase inhibitors.

Previous reports have shown that PGRN expression is regulated through mTOR, PI3K/AKT, and ERK1/2 activation in different cell types [16–19]. Therefore, specific pharmacological inhibitors for these signaling pathways

were used to determine whether these kinases play a role in PGRN expression in OCCC cells. Our results showed a decreased PGRN expression after the incubation of TOV-21G with GDC-0941, rapamycin, and PD-98059, respectively. Also, this incubation resulted in the reduction of AKT, mTOR, and ERK1/2 phosphorylation, as well as cell proliferation. Cellular viability was not affected by any of these treatments. As overall, it seems that PGRN expression in OCCC depends on the activation of PI3K, mTOR, and ERK1/2.

To our knowledge, this study demonstrates for the first time that PGRN expression is regulated by the activation of the mTOR signaling pathway in ovarian cancer. On the other hand, our results agree with the previous report that progranulin production and secretion can be regulated by cAMP through the exchange protein activated by cAMP (EPAC)-ERK1/2 signaling pathway in the ovarian cancer cell lines HEY-A8 and OVCAR-3 [30]. In contrast, our findings are not in concordance with a previous study which reported that PGRN expression in two cell lines derived from serous ovarian carcinoma (OVCAR-3 and SKOV-3) does not require PI3K pathway activation [20]. This difference suggests that PGRN expression could also be influenced by the organ of origin of each histological subtype of ovarian cancer [31].

The mechanism by which mTOR regulates progranulin expression in OCCC cells remains to be elucidated. Downstream targets of mTOR, which are essential regulators of protein synthesis, includes p70 ribosomal S6 kinase 1 (p70S6 K), the eukaryotic translation initiation factors 4E (eIF4E), and the eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1 (4E-BP1) [32, 33]. Therefore, we hypothesize that activation of these pathways is responsible for progranulin synthesis. However, further experiments are warranted to verify this hypothesis in TOV-21G cells.

The ERK1/2 and PI3K/AKT/mTOR pathways are interconnected by multiple points of convergence, crosstalk, and feedback loops. These interactions play a central role in tumorigenesis and tumor progression by regulating many cellular processes including cell proliferation, metastasis, and chemoresistance [34, 35]. Inhibition of any of these pathways, in many cases, may still result in the maintenance of signaling via the reciprocal pathway; therefore, PGRN expression was investigated in TOV-21G cells incubated with the combination of all inhibitors. Our data demonstrated that only the inhibition of PI3K/AKT and ERK1/2 together has a slightly additive effect of an additional 15%. This effect suggests a possible crosstalk between these two pathways for PGRN regulation. Also, PGRN expression was not completely inhibited by the combination of rapamycin, GDC-0941, and PD-98059. This could be the consequence of two possible mechanisms: (1) activation of compensatory pathways in response to ERK1/2 and PI3K/AKT/mTOR inhibition [36] or (2) PGRN is also regulated by

other pathways such as c-Jun amino-terminal kinase (JNK), nuclear factor  $\kappa$  B (NF $\kappa$ B), or PKC in TOV-21G cells.

Signaling pathways such as ERK1/2 and PI3K/AKT/mTOR regulate cellular proliferation through the expression of autocrine growth factors as well as the induction of intracellular molecules such as cyclin-dependent kinases (CDKs) [37, 38]. PGRN stimulates cell proliferation in various types of tumor cells in an autocrine manner [39–41]. A significant decrease in TOV-21G cell proliferation was observed after PI3K/AKT/mTOR and ERK1/2 pathways were inhibited by rapamycin, GDC-0941, and PD-98059. Unfortunately, our experimental design does not allow us to establish whether this effect is due to a decrease in PGRN expression or CDKs induction. Therefore, additional experiments with PGRN neutralizing antibodies are warranted.

Altered signaling pathways has been proposed as a therapeutic target in OCCC tumors [27, 42–45]. Nowadays, several clinical trials using mTOR and ERK inhibitors are currently conducted. The Gynecologic Oncology Group (GOG) 170-I phase II clinical trial, which used temsirolimus (mTOR inhibitor) monotherapy for treating patients with persistent or recurrent EOC, demonstrated that 9.3% of treated patients had a partial response and 24.1% achieved PFS  $\geq$  6 months. Interestingly, patients with ovarian tumors with an increased mTORC1 activity showed a higher response rate compared with those with a lower or none mTORC1 activity. Another phase II clinical trial is currently evaluating the efficacy of temsirolimus in combination with carboplatin and paclitaxel as first-line therapy for newly diagnosed stage III and IV OCCC in patients from the USA, Worldwide, and Japan (GOG-0268). The primary outcome of this trial is the proportion of patients who are alive and PFS for at least 1 year after entering the study, and the secondary outcomes include overall survival and PFS in each population, frequency, and severity of adverse events, and tumor response. Finally, it has been reported that sorafenib (multi-kinase inhibitor) treatment had a significant anti-tumor activity without severe side effects in two patients with recurrent chemoresistant OCCC [46]. Temsirolimus and sorafenib therapy are expensive, and in some cases, ineffective; therefore, it is necessary to have a biomarker for monitoring the response to both therapies in OCCC patients. The results presented in this study demonstrate that inhibition of both ERK1/2 and PI3K/AKT/mTOR signaling pathways reduce PGRN expression. Furthermore, PGRN levels can be quantified in the serum of patients with various types of cancer. Therefore, we propose that PGRN could be an ideal biomarker for therapy response to temsirolimus and sorafenib in patients with OCCC.

In summary, data in this study show that PGRN expression is regulated through the activation of PI3K/AKT/mTOR and ERK1/2 signaling in the OCCC cell line TOV-21G. Inhibition of these oncogenic pathways is currently under clinical trials for ovarian clear cell carcinoma therapy [44,

46]. Thus, we propose to evaluate PGRN levels in OCCC patients treated with temsirolimus and sorafenib as a potential biomarker for therapy response.

**Acknowledgements** This work was supported by Grants FIS/IMSS/PROT/G15/1464 and FIS/IMSS/PROT/G11/987 from the Fondo de Investigacion en Salud, Instituto Mexicano del Seguro Social to Dr. Laura Diaz-Cueto. Carlos Eduardo Perez-Juarez was a graduate student in the Posgrado en Ciencias Biologicas at the Universidad Nacional Autonoma de Mexico. He was supported by a scholarship from the CONACYT, Mexico (Num. 365460/245530) and the Instituto Mexicano del Seguro Social (Matricula: 99095927), Ciudad de Mexico, Mexico. This article is a partial fulfillment of the requirements for his PhD degree.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that there are no conflict of interest.

## References

1. 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.
2. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68:284–96.
3. Köbel M, Kalloger SE, Boyd N, et al. Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med*. 2008;5:e232.
4. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16061.
5. Itamochi H, Kigawa J, Terakawa N. Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci*. 2008;99:653–8.
6. Galluzzi L, Senovilla L, Vitale I, et al. Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 2012;31:1869–83.
7. Matsuzaki S, Yoshino K, Ueda Y, et al. Potential targets for ovarian clear cell carcinoma: a review of updates and future perspectives. *Cancer Cell Int*. 2015;15:117.
8. Fujiwara K, Shintani D, Nishikawa T. Clear-cell carcinoma of the ovary. *Ann Oncol*. 2016;27(Suppl 1):i50–2.
9. Mabuchi S, Sugiyama T, Kimura T. Clear cell carcinoma of the ovary: molecular insights and future therapeutic perspectives. *J Gynecol Oncol*. 2016;27:e31.
10. Arechavala-Velasco F, Perez-Juarez CE, Gerton GL, Diaz-Cueto L. Progranulin and its biological effects in cancer. *Med Oncol*. 2017;34:194.
11. Cuevas-Antonio R, Cancino C, Arechavala-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 Investig*. 2010;28:452–8.
12. Han JJ, Yu M, Houston N, Steinberg SM, Kohn EC. Progranulin is a potential prognostic biomarker in advanced epithelial ovarian cancers. *Gynecol Oncol*. 2011;120:5–10.
13. Carlson AM, Maurer MJ, Goergen KM, et al. Utility of progranulin and serum leukocyte protease inhibitor as diagnostic and prognostic biomarkers in ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomark Prev*. 2013;22:1730–5.

14. Cheung ST, Cheung PF, Cheng CK, Wong NC, Fan ST. Granulin-epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC) B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. *Gastroenterology*. 2011;140:344–55.
15. Buraschi S, Xu SQ, Stefanello M, et al. Suppression of progranulin expression inhibits bladder cancer growth and sensitizes cancer cells to cisplatin. *Oncotarget*. 2016;7:39980–95.
16. Piscopo P, Rivabene R, Adduci A, et al. Hypoxia induces up-regulation of progranulin in neuroblastoma cell lines. *Neurochem Int*. 2010;57:893–8.
17. Liu F, Zhang W, Yang F, et al. Interleukin-6-stimulated progranulin expression contributes to the malignancy of hepatocellular carcinoma cells by activating mTOR signaling. *Sci Rep*. 2016;6:21260.
18. Frampton G, Invernizzi P, Bernuzzi F, et al. Interleukin-6-driven progranulin expression increases cholangiocarcinoma growth by an Akt-dependent mechanism. *Gut*. 2012;61:268–77.
19. Yang D, Li R, Wang H, et al. Clinical implications of progranulin in gastric cancer and its regulation via a positive feedback loop involving AKT and ERK signaling pathways. *Mol Med Rep*. 2017;16:9685–91.
20. Diaz-Cueto L, Arechavaleta-Velasco F, Diaz-Arizaga A, Dominguez-Lopez P, Robles-Flores M. PKC signaling is involved in the regulation of progranulin (acroganin/PC-cell-derived growth factor/granulin-epithelin precursor) protein expression in human ovarian cancer cell lines. *Int J Gynecol Cancer*. 2012;22:945–50.
21. Dunn GP, Cheung HW, Agarwalla PK, et al. In vivo multiplexed interrogation of amplified genes identifies GAB2 as an ovarian cancer oncogene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2014;111:1102–7.
22. Noske A, Lindenberg JL, Darb-Esfahani S, et al. Activation of mTOR in a subgroup of ovarian carcinomas: correlation with p-eIF-4E and prognosis. *Oncol Rep*. 2008;20:1409–17.
23. Park SH, Kim KY, An BS, et al. Cell growth of ovarian cancer cells is stimulated by xenoestrogens through an estrogen-dependent pathway, but their stimulation of cell growth appears not to be involved in the activation of the mitogen-activated protein kinases ERK-1 and p38. *J Reprod Dev*. 2009;55:23–9.
24. Mabuchi S, Kawase C, Altomare DA, et al. mTOR is a promising therapeutic target both in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant clear cell carcinoma of the ovary. *Clin Cancer Res*. 2009;15:5404–13.
25. Rowswell-Turner RB, Rutishauser JA, Kim KK, et al. Novel small molecule MEK inhibitor URML-3881 enhances cisplatin sensitivity in clear cell ovarian cancer. *Transl Oncol*. 2019;12:917–24.
26. Wang Y, Qu Y, Niu XL, Sun WJ, Zhang XL, Li LZ. Autocrine production of interleukin-8 confers cisplatin and paclitaxel resistance in ovarian cancer cells. *Cytokine*. 2011;56:365–75.
27. Mabuchi S, Kuroda H, Takahashi R, Sasano T. The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2015;137:173–9.
28. Gasparri ML, Bardhi E, Ruscito I, et al. PI3K/AKT/mTOR Pathway in ovarian cancer treatment: are we on the right track. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 2017;77:1095–103.
29. Li Z, Zhou W, Zhang Y, et al. ERK regulates HIF1 $\alpha$ -mediated platinum resistance by directly targeting PHD2 in ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2019;25(19):5947–60.
30. 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;24:7084–93.
31. Zorn KK, Bonome T, Gangi L, et al. Gene expression profiles of serous, endometrioid, and clear cell subtypes of ovarian and endometrial cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:6422–30.
32. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004;18:1926–45.
33. Siddiqui N, Sonenberg N. Signalling to eIF4E in cancer. *Biochem Soc Trans*. 2015;43:763–72.
34. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. *Trends Biochem Sci*. 2011;36:320–8.
35. Asati V, Mahapatra DK, Bharti SK. PI3K/Akt/mTOR and Ras/Raf/MEK/ERK signaling pathways inhibitors as anticancer agents: structural and pharmacological perspectives. *Eur J Med Chem*. 2016;109:314–41.
36. Wu YL, Maachani UB, Schweitzer M, et al. Dual inhibition of PI3K/AKT and MEK/ERK pathways induces synergistic antitumor effects in diffuse intrinsic pontine glioma cells. *Transl Oncol*. 2017;10:221–8.
37. Chambard JC, Lefloch R, Pouyssegur J, Lenormand P. ERK implication in cell cycle regulation. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773:1299–310.
38. McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2007;1773:1263–84.
39. Serrero G. Autocrine growth factor revisited: PC-cell-derived growth factor (progranulin), a critical player in breast cancer tumorigenesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;308:409–13.
40. Wei Z, Huang Y, Xie N, Ma Q. Elevated expression of secreted autocrine growth factor progranulin increases cervical cancer growth. *Cell Biochem Biophys*. 2015;71:189–93.
41. Tanimoto R, Lu KG, Xu SQ, et al. Mechanisms of progranulin action and regulation in genitourinary cancers. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:100.
42. Mabuchi S, Hisamatsu T, Kimura T. Targeting mTOR signaling pathway in ovarian cancer. *Curr Med Chem*. 2011;18:2960–8.
43. Li H, Zeng J, Shen K. PI3K/AKT/mTOR signaling pathway as a therapeutic target for ovarian cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;290:1067–78.
44. Janku F. Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway inhibitors in solid tumors: from laboratory to patients. *Cancer Treat Rev*. 2017;59:93–101.
45. Caumanns JJ, Berns K, Wisman GBA, et al. Integrative kinome profiling identifies mTORC1/2 inhibition as treatment strategy in ovarian clear cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2018;24:3928–40.
46. Koshiyama M, Matsumura N, Baba T, Yamaguchi K, Yoshioka Y, Konishi I. Two cases of recurrent ovarian clear cell carcinoma treated with sorafenib. *Cancer Biol Ther*. 2014;15:22–5.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**14 ANEXO 2**

**(Artículo de revisión)**

# Progranulin and its biological effects in cancer

Fabian Arechavaleta-Velasco<sup>1</sup> · Carlos Eduardo Perez-Juarez<sup>1</sup> · George L. Gerton<sup>2</sup> ·  
Laura Diaz-Cueto<sup>1</sup> 

Received: 12 October 2017 / Accepted: 1 November 2017  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2017

**Abstract** Cancer cells have defects in regulatory mechanisms that usually control cell proliferation and homeostasis. Different cancer cells share crucial alterations in cell physiology, which lead to malignant growth. Tumorigenesis or tumor growth requires a series of events that include constant cell proliferation, promotion of metastasis and invasion, stimulation of angiogenesis, evasion of tumor suppressor factors, and avoidance of cell death pathways. All these events in tumor progression may be regulated by growth factors produced by normal or malignant cells. The growth factor progranulin has significant biological effects in different types of cancer. This protein is a regulator of tumorigenesis because it stimulates cell proliferation, migration, invasion, angiogenesis, malignant transformation, resistance to anticancer drugs, and immune evasion. This review focuses on the biological effects of progranulin in several cancer models and provides evidence that this growth factor should be considered as a potential biomarker and target in cancer treatment.

**Keywords** Progranulin · Cancer · Biomarker

## Introduction

Progranulin (PGRN) is a protein also known as acrogranin, granulin/epithelin precursor (GEP), proepithelin (PEPI), PC cell-derived growth factor (PCDGF), and 88-kDa glycoprotein (GP88). These names were originated by the different groups that independently identified the parent glycoprotein or its derivative fragments in specific tissues or cells. PGRN is a 67–88-kDa glycoprotein identified in 1990 by Anakwe and Gerton in the sperm of the guinea pig and, because it was present in the acrosome granule, they called it “acrogranin.” Later, they established its participation in the biogenesis of guinea pig acrosome [1, 2]. Simultaneously, two other research groups isolated and characterized small cell growth-modulating proteins or peptides of approximately 6-kDa. The first group purified peptides from rat kidney, which they called “epithelins” [3]. The second research team utilized rat bone marrow and human peripheral leukocytes as sources, naming the peptides “granulins” [4]. Rat epithelins and rat and human granulins were subsequently recognized as homologous and derived from a common precursor named “proepithelin” [5] or PGRN [6], respectively, which were also homologous to acrogranin [2]. Another name for this autocrine growth factor, which is homologous to PGRN, is PCDGF since it was purified from PC cells derived from adipogenic teratoma cells (1246-3A cell line) [7].

The granulin precursor (*GRN*) gene-encoding human PGRN, contains 13 exons and is located on the long arm of chromosome 17, specifically in the cytogenetic band 17q21.23, while the murine gene is found in a syntenic region on chromosome 11 [8, 9]. Human preprogranulin consists of 593 amino acids, of which about 15% of the residues correspond to cysteines; its sequence forms seven and a half repetitions in tandem of a highly conserved motif called the granulin domain [6, 9].

✉ Laura Diaz-Cueto  
ldiazcueto@gmail.com

<sup>1</sup> Research Unit in Reproductive Medicine, UMAE Hospital de Gineco Obstetricia No. 4 “Luis Castelazo Ayala”, IMSS, Av. Rio Magdalena No. 289, Sexto piso. Tizapan, San Angel, CP 01090 Mexico City, Mexico

<sup>2</sup> Center for Research on Reproduction and Women’s Health, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

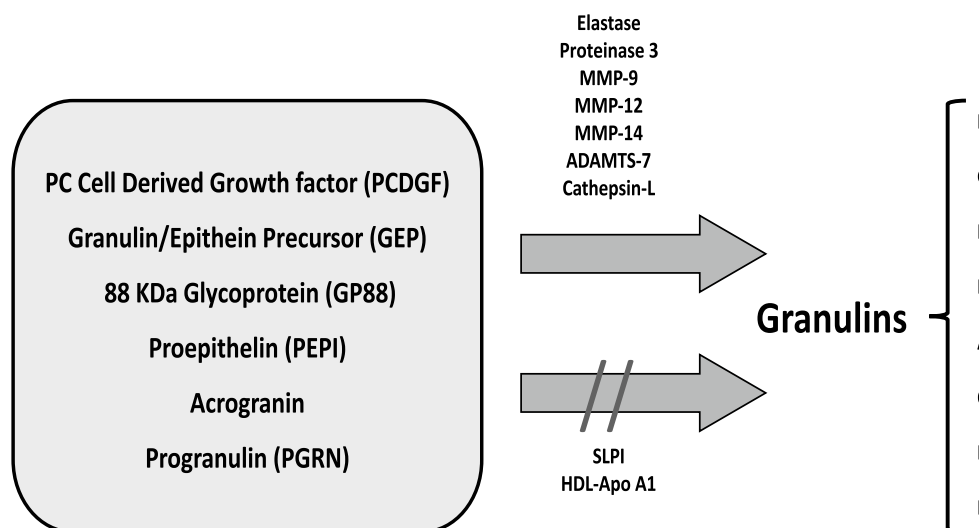


After secretion, PGRN may be proteolytically cleaved between the granulin domains to produce fragments or individual granulin peptides. Neutrophil secreted elastase, proteinase 3, matrix metalloproteinase 9 (MMP-9), MMP-12, MMP-14, and a disintegrin-like and metalloproteinase domain 7 (ADAMTS-7), are proteases capable of processing PGRN [10–15]. Furthermore, a recent study demonstrated that cathepsin L (Cat L), a lysosomal protease, proteolytically processes and degrades intracellular PGRN in the lysosome [16]. In contrast, secretory leukocyte protease inhibitor protein (SLPI) and high-density lipoprotein/apolipoprotein A-I (HDL/Apo A-I) protect PGRN from proteolysis by two mechanisms: (1) binding to the inter-granulin linker regions to block accessibility to proteases and (2) inhibiting the converting protease directly [10, 17] (Fig. 1).

Intact PGRN protein is a concatenation of 7 granulin domains (G-F-B-A-C-D-E) preceded by a half granulin domain, “paragranulin” (P) (Fig. 1). The intact protein sequence (P-G-F-B-A-C-D-E) is encoded by 12 out of the 13 exons of the *GRN* gene. PGRN actions depend on the cellular target. As mentioned above, PGRN can be cleaved into bioactive fragments or individual granulin peptides. Generally, PGRN is considered anti-inflammatory; however, when PGRN is fragmented, the resulting granulin peptides take on new bioactivities. For example, some granulin peptides are pro-inflammatory. In other cases, granulin peptides are toxic; in the case of *Caenorhabditis elegans*, certain granulin peptides increase TDP-43 levels via a posttranslational mechanism and exacerbate TDP-43 toxicity [18]. Rollinson et al. [19] expressed recombinant PGRN and each of the

individual granulin peptides; they demonstrated that short-duration treatments with PGRN result in the downregulation of several critical transcripts. Gene ontology analysis supports the regulation of biological processes such as the spliceosome and proteasome in response to PGRN treatment, as well as lysosomal pathway constituents. On the other hand, granulin peptide treatments alter the regulation of numerous noncoding RNAs.

PGRN and granulins produce significant biological effects, which are mediated through a cell surface receptor. A unique PGRN-specific receptor has not yet been identified. Up to now, PGRN has been demonstrated to interact with different binding proteins depending on the cell type. PGRN is able to bind to the beta propeller region of sortilin through its C-terminal tail. This protein is a single-pass transmembrane protein in the vacuolar protein sorting/targeting protein 10 (VPS10) family, which regulates intracellular protein trafficking and acts as a cell surface receptor. In the brain, sortilin can regulate PGRN levels through endocytosis [20]. In castration-resistant prostate cancer cells, sortilin loss may contribute to prostate cancer enhancing PGRN effects. Therefore, extracellular PGRN levels depend on PGRN–sortilin interactions [21]. PGRN and granulin interactions with tumor necrosis factor receptor (TNFR) 1 and 2 have also been demonstrated. In these receptors, PGRN binds directly to the extracellular CRD2 and CRD3 domains. In mouse inflammatory models, binding of PGRN to TNF receptors inhibits TNF- $\alpha$  binding and its biological effects, which may explain the anti-inflammatory properties of PGRN [22]. More recently, EphA2, a member of a large



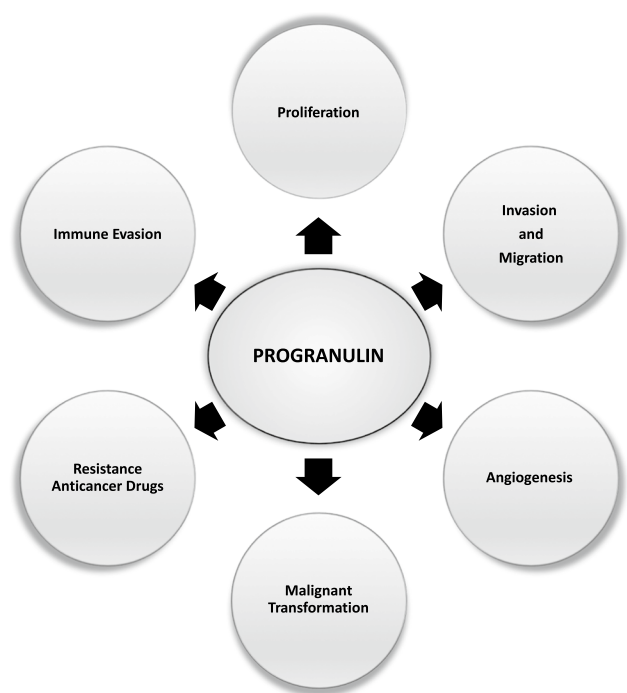
**Fig. 1** Granulin family. Granulins are small peptides derived from a larger precursor (PC cell-derived growth factor, granulin/epithelin precursor, 88-kDa glycoprotein, proepithelin, acrogranin, or progranulin), which can be cleaved by several enzymes. PGRN cleavage releases seven full-length granulin domains (G, F, B, A, C, D, E) and

one half-length paragranulin domain (P). Secretory leukocytes protease inhibitor (SLPI) or high-density lipoprotein/apolipoprotein A-1 (HDL-Apo A1) binding to the full-length PGRN prevents its proteolytic process

family of receptor tyrosine kinases (RTKs), was identified as a functional signal receptor for PGRN in a human urinary bladder cancer cell line. The interaction between EphA2 and PGRN provides the opportunity to understand the mechanisms through which PGRN activates tumorigenic signaling pathways [23].

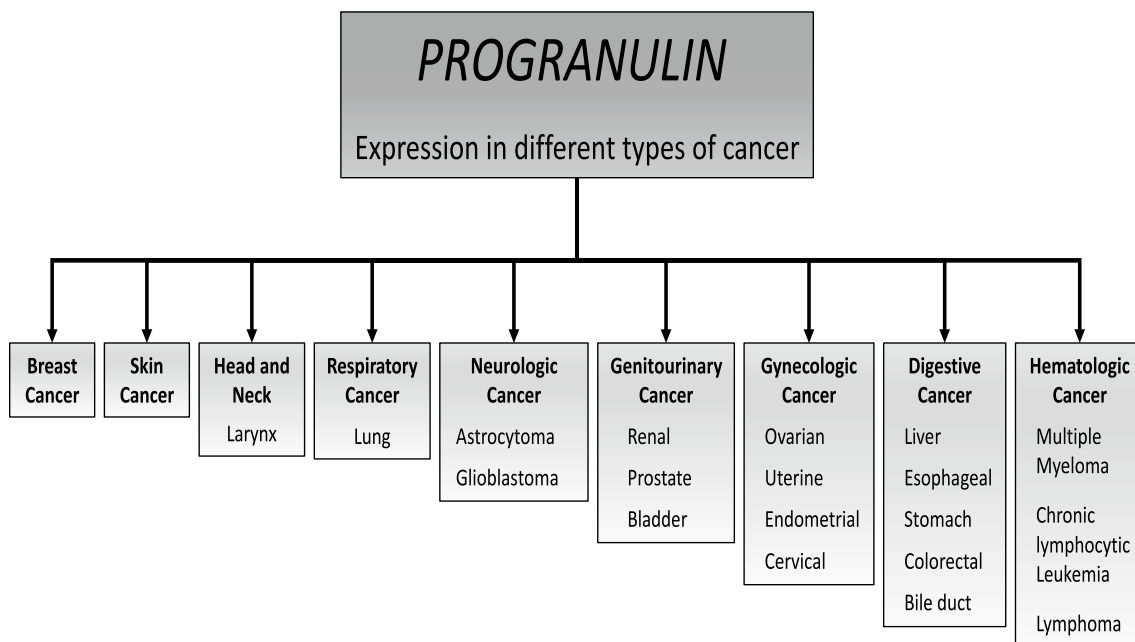
In vitro and in vivo studies have demonstrated the important role of PGRN in diverse physiological processes. This protein participates in the growth stimulation of preimplantation mammalian embryo development [24], in early embryogenesis [25], in wound healing [26], inflammation [11, 27], angiogenesis [26, 28], and bone and cartilage development [29, 30]. It is also an adipokine implicated in obesity, insulin resistance, and rheumatic disease [31]. The role of PGRN in several neural pathologies led to an explosion of *GRN* genetic studies [32–35]. PGRN is a neurotrophic and neuroprotective factor that shields neural tissue from inflammation and degeneration. Loss of function mutations in the *GRN* gene has been associated with neurological and neurodegenerative diseases as in frontotemporal dementia, Parkinson’s disease, Creutzfeldt–Jakob disease, motor neuron disease, and Alzheimer’s disease [36, 37].

PGRN overexpression has been observed in many different types of cancer as shown in Fig. 2. In these tissues, high expression of PGRN drives tumor progression since it promotes cellular responses such as cell proliferation, migration, invasion, angiogenesis, malignant transformation, resistance to anticancer drugs, and immune evasion (Fig. 3). Numerous studies over the last two decades have pointed to the importance of PGRN in cancer, and



**Fig. 3** Biological effects of PGRN. Increased expression of PGRN promotes different responses that can lead to the development of cancer

this review focuses on the biological effects of PGRN in several cancer models. Furthermore, the uses of PGRN as a biomarker and as a target in cancer treatment are addressed.



**Fig. 2** Progranulin expression in cancer. Increased expression of PGRN has been detected in cancer tissue from different organs

## Biological effects of progranulin in cancer

### Cellular proliferation

PGRN promotes proliferation of normal epithelial cells and several cancer cell lines. Cellular proliferation was first demonstrated by the PGRN derivative epithelin 1 (granulin A) on BALB/MK mouse epidermal keratinocytes [3]. Later, a study in mouse embryos revealed that exogenous PGRN added to cultures increases the number of trophoblast cells compared to the controls, besides exhibiting other important effects on embryos [24, 38]. Moreover, to emphasize how important this protein is as a growth factor, PGRN purified from the culture medium of the PC cell line (highly tumorigenic cells) promotes proliferation of 3T3 mouse embryo fibroblast cells [7]. The 3T3 cells generally need two or more growth factors to proliferate *in vitro*; however, PGRN by itself can function as a mitogen in these cells. Furthermore, PGRN stimulates cell division in 3T3 cells lacking expression of insulin-like growth factor receptor 1 (IGF-1R), which is required for other growth factors [insulin-like growth factor (IGF-1), epidermal growth factor (EGF) and platelet-derived growth factor (PDGF)] to promote proliferation [39, 40]. Additional evidence supporting PGRN proliferative effects comes from studies in which the inhibition of PGRN expression by transfection of a short hairpin RNA (shRNA) into the cell line derived from colorectal cancer SW1116 decreases Ki67, whereas overexpression of PGRN increases it [41].

Mitogenic effects of PGRN also have been observed in other cell lines such as the human epithelial adrenal carcinoma cell line SW-13, multiple myeloma ARP-1 and RPMI 8226 cells, lung carcinoma A549 cells, cervical cancer SiHa cells, prostate carcinoma DU145 cells, laryngeal carcinoma Hep-2 cells and breast cancer cell line SKBR3. Cell proliferation promoted by PGRN was through the activation of the signaling transduction pathways of MAPK/ERK 1/2 and PI3K/AKT/mTOR [42–48].

Molecular mechanisms by which PGRN induces proliferation are still poorly understood. However, studies in breast cancer cells have revealed that PGRN regulates the expression of cyclin D1 and B [49, 50]. Additionally, another study demonstrated a significant correlation between PGRN and cyclin D1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma tissues compared with control samples [51]. Additional mechanisms that have been described include phosphorylation of c-myc in MCF-7 breast cancer cells that overexpress the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2 receptor) [48], and inhibition of senescence in cervical cancer cell lines [46].

### Migration and invasion

Activation of the epithelium–mesenchymal transition (EMT) process, which can occur as tumorigenesis progresses, is important for cell migration and invasiveness. The EMT process allows cells to escape from the primary tumor after the epithelial cells acquire characteristics of mobile mesenchymal cells [52]. Several studies suggest that PGRN promotes migration and invasion in various cell lines such as breast cancer MCF-7 cells, colorectal cancer SW1116 cells, bladder cancer 5637 cells, prostate cancer LNCaP and DU145 cells, human epithelial adrenal carcinoma SW-13 cells, hepatocellular carcinoma Hep 3B cells, and ovarian carcinoma SW626 and A2780 cells [41, 42, 45, 49, 53–55].

PGRN-promoted migration and invasion of cancer cells can occur by multiple mechanisms. One is through the EMT process, since PGRN overexpression in ovarian cancer cell line A2780 increases mesenchymal marker expression, such as vimentin and twist, and decreases epithelial markers such as E-cadherin and cytokeratin, thereby increasing cell migration and invasiveness [56].

PGRN also increases the invasive capacity of ovarian and breast cancer cells through activation of MMP-2 and upregulation of MMP-9, respectively [49, 53]. In bladder cancer cells, PGRN activates focal adhesion kinase (FAK) through paxillin and ERK phosphorylation. Also, PGRN interacts with the F-actin protein drebrin and induces actin cytoskeleton remodeling. Both effects induce invasion and migration of malignant bladder cells [54]. In contrast to the effects of intact PGRN, the proteolysis-derived granulin A binds to  $\alpha$ -enolase of human HepG-2 cancer cells to inhibit growth, glucose uptake, migration, and invasion [57].

### Angiogenesis

The earliest relationship between PGRN and angiogenesis was established for wound healing, where PGRN induces human microvascular endothelial cell proliferation and promotes tube-like structures [26]. Subsequently, in the MCF-7 breast cancer cell line, elevated PGRN concentrations are associated with high endothelial growth factor (VEGF) expression [53]. Additionally, PGRN and its derivatives isolated from mesothelioma cells induce VEGF-independent angiogenesis [58]. Other studies have shown a correlation between high PGRN expression with elevated VEGF expression as well as high microvessel density in tissues from breast cancer tumors, esophageal squamous cell carcinoma, and colorectal tumors [41, 59, 60].

Downregulation or null PGRN expression by transfection of shRNA in the cell line SW1116 derived from colorectal carcinoma decreases expression of angiogenic factors such as VEGF-A, VEGF-C, and FGF-1 (fibroblast growth factor 1) and reduces secreted VEGF-A levels in the culture

medium of the cells. Interestingly, PGRN overexpression increases the same angiogenic factors. VEGF-A expression induced by PGRN is mediated by tumor necrosis factor receptor 2 (TNFR2)/Akt and the ERK signal transduction pathways [41]. Another mechanism by which PGRN mediates angiogenesis is by promoting proliferation, migration, and tubular structure formation by HUVEC cells (human umbilical vein endothelial cells). Interestingly, all these events are mediated through the interaction between PGRN and midkine protein (MK), a heparin-binding growth factor [61].

### **Malignant cell transformation**

Malignant transformation is the unsolved process by which cells acquire the properties of cancer. Efficient anchorage-independent growth, which is the ability of cells to grow independently of a solid surface, and tumor production in nude mice are commonly considered to indicate a highly transformed phenotype. The earliest study to demonstrate that PGRN can promote cell transformation was performed by He et al. [42], in which overexpression of this growth factor in non-transformed renal epithelial MDCK cells and human adrenal carcinoma SW-13 cells enhanced clonogenicity in semisolid agar. Also, in this study overproduction of PGRN in SW-13 cells markedly increases their tumorigenicity in nude mice. Later, another study with immortalized uterine smooth muscle cells transfected either with PGRN alone or in combination with human telomerase reverse transcriptase (hTERT) and Simian Virus 40 Early Region (SV40ER) genes, showed that PGRN transfection gene increases colony formation in soft agar, while co-expression of PGRN, hTERT, and SV40ER resulted in more extensive anchorage-independent growth and tumor formation in nude mice. These results suggest that co-expression of these three genes is necessary and sufficient to transform uterine smooth muscle cells [62]. Similarly, transfection of PGRN gene into ovarian surface epithelial cells immortalized by co-transfection with the hTERT and Simian Virus 40 large T antigen (SV40LT) genes revealed that PGRN overexpression increases colonogenicity in soft agar and tumorigenicity in nude mice [63]. Moreover, in human cervical mucosa epithelial H8 cells, PGRN overexpression by gene transfection and cell culture treatment with human recombinant PGRN promotes malignant transformation *in vitro* and *in vivo* as illustrated by increases in cell proliferation and tumor formation in nude mice, respectively [64].

### **Progranulin and resistance to anticancer drugs**

Resistance to anti-neoplastic drugs is a recurrent problem in the treatment of many types of cancers and is the major obstacle to survival in patients with metastatic chemoresistant cancer. The precise cause of this problem is unknown,

but growth factor overexpression and their receptors are suspected to be involved. One study has reported that cancer cells that become resistant to anticancer drugs can influence the tumor microenvironment, since cells initially chemosensitive within a tumor, may become chemoresistant due to the secretion of soluble factors released by chemoresistant cells. PGRN is one of the factors identified in the conditioned medium of chemoresistant colorectal cancer cells, and it can influence the survival in otherwise chemosensitive tumor cells through the activation of growth and survival signaling pathways [65].

Tangkeangsirisin et al. [66] were one of the first groups to demonstrate that PGRN confers resistance to anticancer drugs. In their study, they observed that overexpression of PGRN in breast cancer cells MCF-7 prevents tamoxifen (anti-estrogen)-induced apoptosis and promotes tumor growth and angiogenesis *in vivo*, even in the presence of tamoxifen. Subsequently, Wang and Serrero [67] revealed that PGRN overexpression in multiple myeloma cells leads to the development of resistance to dexamethasone, a conventional drug for treatment of patients with multiple myeloma. Furthermore, Kim and Serrero [68] showed that trastuzumab, a monoclonal antibody directed against HER2, does not have a significant growth inhibitory effect on breast cancer cells overexpressing HER2 and PGRN. More recently, Abrahale et al. [69] described that PGRN overexpression in MCF-7 breast cancer cells confers resistance to letrozole, an aromatase inhibitor used in the treatment of estrogen receptor-positive (ER+) breast cancer, in a dose- and time-dependent manner. Conversely, PGRN silencing reduces cell viability and restores sensitivity to letrozole. Finally, chemoresistance to cisplatin has been shown in ovarian cancer cell lines overexpressing PGRN [70].

The mechanisms by which PGRN promotes drug resistance in these types of cancer are unknown. Nevertheless, decreased expression of the anti-apoptotic Bcl-2 protein induced by letrozole and cisplatin does not occur in the presence of PGRN [69, 70]. Similarly, this same mechanism, where PGRN avoids downregulation of Bcl-2, is involved in the development of resistance to tamoxifen and trastuzumab in breast cancer cells [50, 66, 68]. Another possible mechanism involved in progranulin-conferred chemoresistance includes the inhibition of the poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage induced by tamoxifen and dexamethasone, a hallmark of caspase-dependent apoptosis [66, 67].

Increased levels of PGRN have also been associated with chemoresistance to doxorubicin and cisplatin, and with a reduced survival time of patients with hepatocellular carcinoma. The mechanism of this association seems to be mediated by the expression of adenosine triphosphate-dependent binding cassette (ABC)B5 drug transporter in cells that also express the hepatic cancer stem cell markers CD133 and epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) [71, 72].

In a more recent study with glioblastoma multiforme cells, PGRN overproduction induced resistance to temozolomide (alkylating agent) by upregulation of DNA repair genes PARP, serine/threonine kinase ATM, BRCA1, Rad51, and X-ray repair cross-complementing gene 1 (XRCC1) as well as enhanced expression of cancer stemness genes CD133, CD44, and ABCG2, through the activation of AP-1 transcription factor, specifically cFos/JunB [73].

Although it has been shown that PGRN confers resistance to anticancer drugs, more studies are warranted to further investigate other chemoresistance mechanisms in different types of cancer.

### Progranulin and immunoresponse

Immune evasion is a strategy used by tumors to escape the host immune response, enabling the tumor to continue growing. Cheung et al. [74] reported that PGRN renders hepatocellular carcinoma cells resistant to natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity. The resistance to NK cell lysis induced by PGRN seems to be due to downregulation of MHC class I chain-related molecule A (MICA), which is a ligand for NK stimulatory receptor NK group 2-member D (NKG2D), and upregulation of human leukocyte antigen-E (HLA-E), a ligand for NK inhibitory receptor CG94/NKG2A. Interestingly, inhibition of PGRN activity by neutralizing antibody in hepatocellular carcinoma cells enhanced sensitivity to NK cytotoxicity.

### Progranulin as cancer biomarker

A cancer biomarker is a biomolecule such as DNA, RNA, or protein that can be measured in tissues or body fluids and can assist in cancer diagnosis, design of treatment modalities, treatment effectiveness, or cancer recurrence detection. Therefore, based on their usage, cancer biomarkers can be diagnostic, predictive, and prognostic [75]. For its important role in carcinogenesis, PGRN has been considered to be a diagnostic, predictive, and prognostic biomarker for some types of cancer.

In epithelial ovarian cancer, PGRN levels in sera of patients with advanced stages of disease can predict who will have recurrence within 18 months of completion of chemotherapy and who will exhibit significantly shortened progression-free survival and overall survival [76]. Furthermore, a correlation between high expression of PGRN mRNA in tissues from malignant ovarian tumors and shorter patient overall survival was observed by Cuevas-Antonio et al. [77]. According to the previous studies, Carlson et al. [78] demonstrated that PGRN serum concentrations are significantly elevated in patients with advanced stages (III and IV) of ovarian epithelial cancer but not in the earlier

stages I and II. Also in this study, high PGRN concentrations were associated with decreased in overall patients' survival. Therefore, these studies demonstrate the promise in using PGRN as a biomarker of ovarian cancer.

Also, in breast cancer, PGRN levels in serum samples from patients with stage I–IV are significantly higher than in healthy women; nonetheless, no differences were observed between the diverse stages of this malignancy [79]. A cohort study of 697 newly diagnosed breast cancer patients who underwent curative surgery, evaluated the association between preoperative PGRN levels and breast cancer recurrence. This study revealed that preoperative serum PGRN levels are clinically significant for predicting recurrence in patients with hormone receptor-positive tumors; however, these data have several limitations that are important to consider when interpreting the study's results [80]. Serrero et al. [81] also analyzed PGRN expression by immunohistochemistry in paraffin-embedded breast tumor sections from patients with estrogen receptor-positive invasive ductal carcinoma. Their results showed that high PGRN expression was associated with a decrease in disease-free and overall survival as well as a 5.9-fold higher hazard of disease recurrence and a 2.5 higher mortality risk compared to patients with low PGRN expression in the tumor tissue. Taken together, all these data suggest that PGRN could be a predictive and prognostic marker in breast cancer. Nevertheless, more studies are required to determine whether PGRN could be a useful biomarker in other types of breast cancer that are receptor positive or negative for estrogen, HER2, and progesterone.

Tumor samples ( $n = 210$ ) surgically obtained from astrocytoma patients were analyzed to determine PGRN expression and its association with tumor grade and overall survival of the patients. PGRN expression is upregulated in astrocytoma cells and tumor blood vessels as compared with normal brain and positively correlated with pathological grading. In grade II astrocytoma, strong vascular PGRN expression is closely related to tumor recurrence. Moreover, in glioblastoma patients, the increased PGRN expression correlates with decreased patient survival [82].

One study with tissue samples from patients with prostate cancer demonstrated that PGRN expression is detected in more than 50% of cells in all samples of high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and invasive cancer. In normal prostate tissues, PGRN expression is low and less than 10% of cells express the protein [83]. Likewise, PGRN levels in malignant renal tissue detected by western blot analysis were significantly higher as compared to benign renal tissue. Also, in the same study, tissue samples from patients with renal cell carcinoma show higher levels of PGRN expression compared with low-grade renal cell carcinoma and normal tissue [84]. In patients with bladder cancer, urinary levels of PGRN

are significantly increased relative to control samples; in addition, high PGRN levels correlate with the stage and pathological cancer grade [85]. Unfortunately, the small sample size of this study is a limitation; however, the results suggest that urine PGRN levels may serve as a simple test as part of a bladder cancer workup. Other studies have reached the same conclusions but also with critical limitations; however, it is important to note that PGRN has been included in a panel of urinary diagnostic markers for noninvasive detection of primary and recurrent urothelial urinary bladder carcinoma. So far, the analyses that have been performed are inconclusive, and it is necessary to carry out larger or multicenter studies to substantiate the benefits of including PGRN in a diagnostic panel [86].

A cohort study of 131 patients with chronic lymphocytic leukemia demonstrated that PGRN concentrations measured in plasma are significantly increased compared to normal controls. Moreover, the high PGRN plasma levels are strongly associated with adverse risk factors including unmutated immunoglobulin heavy chain variable (*IGHV*) gene status, expression of CD38, and levels of ZAP-70. Therefore, PGRN, as well as the other risk factors, is a prognostic marker for establishing the time to first treatment and overall survival in these patients [87].

Edelman et al. [88] demonstrated the utility of PGRN as a biomarker for nonsmall cell lung carcinoma because the blood levels of patients with stages III and IV are higher in comparison with healthy patients and correlate with a low progression-free survival.

In a retrospective study of tissues from patients with advanced biliary tract cancer who received palliative chemotherapy, PGRN expression was evaluated by immunohistochemistry. A poorer response to chemotherapy in patients with PGRN-positive tumors is observed, and also PGRN overexpression is significantly associated with poor progression-free survival [89]. In conclusion, PGRN could find application in predicting treatment outcomes.

Recently, a study of 254 patients with untreated malignant lymphoma showed that PGRN concentrations measured in sera of patients are significantly higher than levels found in the healthy control group [90]. In addition, the group of patients with high PGRN concentrations shows a poor prognosis with respect to overall survival and progression-free survival.

Collectively, the studies presented in this section show that PGRN concentrations in serum, urine or its expression in tissues can be useful for monitoring the clinical course of tumors and patient prognosis. Therefore, PGRN could be a worthy biomarker for some types of cancers.

## Progranulin inhibition as treatment for cancer

Overexpression of PGRN in different types of cancer produces significant effects in carcinogenesis. Several studies have demonstrated that inhibition of PGRN expression with small interfering RNA (siRNA), short hairpin (shRNA), antisense cDNA, or specific neutralizing antibodies minimize its participation in tumorigenesis.

Strong inhibition of tumorigenicity *in vivo* was first documented using PC cells derived from adipogenic teratoma cells, where PGRN expression was inhibited by transfection of antisense PGRN cDNA [91]. The results of this study showed that tumors develop promptly when empty-vector control PC cells are injected into mice, while tumor growth is significantly inhibited if the PC cells are transfected with antisense PGRN cDNA prior to injection into mouse hosts.

Treatment of MDA-MB-468 breast cancer cells with anti-PGRN-neutralizing antibody resulted in dose-dependent decrease in their proliferation [92]. Additionally, inhibition of PGRN expression by antisense PGRN cDNA transfection also reduces proliferation and colony formation; moreover, tumor formation *in vivo* is significantly inhibited. These results demonstrated that PGRN acts as an autocrine factor and is essential for the tumorigenicity of breast carcinomas.

In several ovarian cancer cell lines, inhibition of PGRN by antisense cDNA transfection decreases cell proliferation and invasion through downregulation of cyclin D and CDK4 and inactivation of MMP-2 [49]. Other studies using the ovarian cancer cell lines HEY-A8 and OVCAR-3 show that PGRN production and secretion can be regulated by endothelin 1 (ET-1), lysophosphatidic acid (LPA), and cAMP through the signal transduction pathway of cAMP-EPAC-ERK1/2. Treatment of these cells with neutralizing PGRN antibody inhibits basal as well as LPA, ET-1, and cAMP-induced proliferation. Moreover, apoptosis is induced by this treatment, as demonstrated by the presence of caspase-3 and PARP cleavage, DNA fragmentation, and nuclear condensation [93].

PGRN levels are significantly increased in gastric cancer tissue compared with healthy tissue. *Helicobacter pylori* infection is the primary cause of gastric cancer and is associated with an increased gastric epithelial cell proliferation and migration. A recent study demonstrated that infection of gastric epithelial cells by *H. pylori* significantly increase PGRN expression and induces cell proliferation and migration. Furthermore, downregulation of PGRN by specific siRNA reduces *H. pylori*-induced cell proliferation and migration in gastric epithelial cells [94].

Several studies using hepatocellular carcinoma cells and orthotopic liver tumor models demonstrated that PGRN neutralization by anti-PGRN antibody inhibited growth of hepatoma cells *in vitro* without significant effect on normal liver cells. In the nude mice model, neutralizing antibody

therapy decreases PGRN serum levels, inhibits in a dose-dependent manner the growth of established tumors, and decreases tumor angiogenesis by reducing microvessel density and VEGF levels. It seems that these effects are at least partially mediated via p44/42 MAPK/Akt signal transduction pathway [95]. In another study, chemoresistant cells from hepatocellular carcinoma were generated by cisplatin and doxorubicin treatment [96]. These subpopulations express higher cancer stem cell markers such as CD133, PGRN, and ABCB5 multidrug transporter as compared with the parental cell lines. Also, their ability to form colonies and spheroids is enhanced. Interestingly, incubation in the presence of anti-PGRN antibody sensitized these chemoresistant subpopulation and their parental cell lines to apoptosis induced by chemotherapy. The mechanism behind this enhanced chemotherapy response seems to be due to a decrease in ABCB5 expression and cell survival signaling mediated via Akt and Bcl-2. In the same study, the combined effects of PGRN-neutralizing antibody and cisplatin in vivo were evaluated in an orthotopic liver tumor model. Anti-PGRN treatment alone inhibited tumor growth, while combination with cisplatin eliminated the intrahepatic tumor in 3 weeks [96]. A recent study designed to identify effective and noninvasive diagnostic biomarkers for hepatocellular carcinoma by oncoproteogenomics technology (integration of proteomics, genomics, and transcriptomic analyses) revealed a significantly higher co-amplification and co-expression of PGRN and S100A9 in tumor and urine samples from patients compared to the controls [97].

Finally, endogenous depletion of PGRN by shRNA in UMUC-3 urothelial cancer cells inhibits cell proliferation, migration, invasion, and anchorage-independent growth as well as reduced tumor cell growth in vivo in both xenograft and orthotopic tumor models. Furthermore, suppression of PGRN expression sensitized bladder cancer cells to cisplatin [98].

Collectively, the discussed evidence supports the hypothesis that PGRN neutralization may be an important target for cancer therapy. Thus, development of new anti-PGRN-neutralizing antibodies for clinical use is warranted.

## Conclusions

In the last two decades, the study of PGRN in cancer has advanced considerably. Research has been conducted to establish a role for PGRN in many forms of cancer, as well as to determine the mechanism of action for its biological effects. So far, several proteins have been proposed to act as the PGRN receptor. However, binding to these proteins does not fully explain PGRN growth factor or neuroprotective effects; therefore, it is thought that PGRN must have its own receptor. Signaling pathways activated by PGRN

have already been described, and they are essential pathways in cancer development and progression. According to the data in the literature, it is clear that PGRN overexpression induces proliferation and migration in several cancer cells. Also, modulation of PGRN levels by RNA silencing or inhibition of PGRN by treatment with neutralizing antibodies counteracts these effects. All this evidence and the fact that PGRN is a unique secretory glycoprotein highlight its potential use as a biomarker or as a therapeutic target in cancer. The information that currently exists regarding PGRN is very exciting, but more clinical studies, with a larger patient base, are warranted to cement possible uses for this interesting growth factor in diagnosis and treatment.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** All authors declare that they do not have conflict of interest.

## References

1. Anakwe OO, Gerton GL. Acrosome biogenesis begins during meiosis: evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. *Biol Reprod.* 1990;42(2):317–28.
2. Baba T, Hoff HB, Nemoto H, et al. Acrogranin, an acrosomal cysteine-rich glycoprotein, is the precursor of the growth-modulating peptides, granulins, and epithelins, and is expressed in somatic as well as male germ cells. *Mol Reprod Dev.* 1993;34:233–43.
3. Shoyab M, McDonald VL, Byles C, Todaro GJ, Plowman GD. Epithelins 1 and 2: isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. *Proc Natl Acad Sci.* 1990;87(20):7912–6.
4. Bateman A, Belcourt D, Bennett H, Lazure C, Solomon S. Granulins, a novel class of peptide from leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990;173(3):1161–8.
5. Plowman GD, Green JM, Neubauer MG, Buckley SD, McDonald VL, Todaro GJ, Shoyab M. The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *J Biol Chem.* 1992;267(18):13073–8.
6. Bhandari V, Palfree RG, Bateman A. Isolation and sequence of the granulin precursor cDNA from human bone marrow reveals tandem cysteine-rich granulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:1715–9.
7. Zhou J, Gao G, Crabb JW, Serrero G. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J Biol Chem.* 1993;268:10863–9.
8. Bhandari V, Bateman A. Structure and chromosomal location of the human granulin gene. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188:57–63.
9. Baba T, Nemoto H, Watanabe K, Arai Y, Gerton GL. Exon/intron organization of the gene encoding the mouse epithelin/granulin precursor (acrogranin). *FEBS Lett.* 1993;322:89–94.
10. Zhu J, Nathan C, Jin W, Sim D, Ashcroft GS, Wahl SM, et al. Conversion of proepithelin to epithelins: roles of SLPI and elastase in host defense and wound repair. *Cell.* 2002;111(6):867–78.
11. Kessenbrock K, Fröhlich L, Sixt M, Lämmermann T, Pfister H, Bateman A, et al. Proteinase 3 and neutrophil elastase enhance inflammation in mice by inactivating antiinflammatory progranulin. *J Clin Investig.* 2008;118(7):2438–47.

12. Xu D, Suenaga N, Edelmann MJ, Fridman R, Muschel RJ, Kessler BM. Novel MMP-9 substrates in cancer cells revealed by a label-free quantitative proteomics approach. *Mol Cell Proteomics*. 2008;7:2215–28.
13. Suh HS, Choi N, Tarassishin L, Lee SC. Regulation of progranulin expression in human microglia and proteolysis of progranulin by matrix metalloproteinase-12 (MMP-12). *PLoS ONE*. 2012;7:e35115.
14. Butler GS, Dean RA, Tam EM, Overall CM. Pharmacoproteomics of a metalloproteinase hydroxamate inhibitor in breast cancer cells: dynamics of membrane type 1 matrix metalloproteinase-mediated membrane protein shedding. *Mol Cell Biol*. 2008;28:4896–914.
15. Bai XH, Wang DW, Kong L, et al. ADAMTS-7, a direct target of PTHrP, adversely regulates endochondral bone growth by associating with and inactivating GEP growth factor. *Mol Cell Biol*. 2009;29:4201–19.
16. Lee CW, Stankowski JN, Chew J, et al. The lysosomal protein cathepsin L is a progranulin protease. *Mol Neurodegener*. 2017;12:55.
17. Okura H, Yamashita S, Ohama T, et al. HDL/apolipoprotein A-I binds to macrophage-derived progranulin and suppresses its conversion into proinflammatory granulins. *J Atheroscler Thromb*. 2010;17:568–77.
18. Salazar DA, Butler VJ, Argouarch AR, et al. The progranulin cleavage products, granulins, exacerbate TDP-43 toxicity and increase TDP-43 levels. *J Neurosci*. 2015;35:9315–28.
19. Rollinson S, Young K, Bennion-Callister J, Pickering-Brown SM. Identification of biological pathways regulated by PGRN and GRN peptide treatments using transcriptome analysis. *Eur J Neurosci*. 2016;44:2214–25.
20. Zheng Y, Brady OA, Meng PS, Mao Y, Hu F. C-terminus of progranulin interacts with the beta-propeller region of sortilin to regulate progranulin trafficking. *PLoS ONE*. 2011;6:e21023.
21. Tanimoto R, Morcavallo A, Terracciano M, et al. Sortilin regulates progranulin action in castration-resistant prostate cancer cells. *Endocrinology*. 2015;156:58–70.
22. Wang BC, Liu H, Talwar A, Jian J. New discovery rarely runs smooth: an update on progranulin/TNFR interactions. *Protein Cell*. 2015;6:792–803.
23. Neill T, Buraschi S, Goyal A, et al. EphA2 is a functional receptor for the growth factor progranulin. *J Cell Biol*. 2016;215:687–703.
24. 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(2):406–18.
25. Daniel R, He Z, Carmichael KP, Halper J, Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem*. 2000;48(7):999–1009.
26. He Z, Ong CH, Halper J, Bateman A. Progranulin is a mediator of the wound response. *Nat Med*. 2003;9(2):225–9.
27. Tang W, Lu Y, Tian QY, Zhang Y, Guo FJ, Liu GY, et al. The growth factor progranulin binds to TNF receptors and is therapeutic against inflammatory arthritis in mice. *Science*. 2011;332(6028):478–84.
28. Toh H, Cao M, Daniels E, Bateman A. Expression of the growth factor progranulin in endothelial cells influences growth and development of blood vessels: a novel mouse model. *PLoS ONE*. 2013;8(5):e64989.
29. Feng JQ, Guo FJ, Jiang BC, Zhang Y, Frenkel S, Wang DW, et al. Granulin epithelin precursor: a bone morphogenic protein 2-inducible growth factor that activates Erk1/2 signaling and JunB transcription factor in chondrogenesis. *FASEB J*. 2010;24(6):1879–92.
30. Xu K, Zhang Y, Ilalov K, Carlson CS, Feng JQ, Di Cesare PE, Liu CJ. Cartilage oligomeric matrix protein associates with granulin–epithelin precursor (GEP) and potentiates GEP-stimulated chondrocyte proliferation. *J Biol Chem*. 2007;282(15):11347–55.
31. Abella V, Pino J, Scotece M, et al. Progranulin as a biomarker and potential therapeutic agent. *Drug Discov Today*. 2017;22(10):1557–64.
32. Antonell A, Gil S, Sánchez-Valle R, et al. Serum progranulin levels in patients with frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease: detection of GRN mutations in a Spanish cohort. *J Alzheimers Dis*. 2012;31:581–91.
33. Kämäläinen A, Viswanathan J, Natunen T, et al. GRN variant rs5848 reduces plasma and brain levels of granulin in Alzheimer's disease patients. *J Alzheimers Dis*. 2013;33:23–7.
34. Nicholson AM, Finch NA, Rademakers R. Human genetics as a tool to identify progranulin regulators. *J Mol Neurosci*. 2011;45:532–7.
35. Toh H, Chitramuthu BP, Bennett HP, Bateman A. Structure, function, and mechanism of progranulin; the brain and beyond. *J Mol Neurosci*. 2011;45:538–48.
36. Petkau TL, Leavitt BR. Progranulin in neurodegenerative disease. *Trends Neurosci*. 2014;37:388–98.
37. Kao AW, McKay A, Singh PP, Brunet A, Huang EJ. Progranulin, lysosomal regulation and neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci*. 2017;18:325–33.
38. Qin J, Díaz-Cueto L, Schwarze JE, et al. Effects of progranulin on blastocyst hatching and subsequent adhesion and outgrowth in the mouse. *Biol Reprod*. 2005;73:434–42.
39. Xu SQ, Tang D, Chamberlain S, et al. The granulin/epithelin precursor abrogates the requirement for the insulin-like growth factor 1 receptor for growth in vitro. *J Biol Chem*. 1998;273:20078–83.
40. Zanicco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentinis B, He ZH, Baserga R. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res*. 1999;59:5331–40.
41. Yang D, Wang LL, Dong TT, et al. Progranulin promotes colorectal cancer proliferation and angiogenesis through TNFR2/Akt and ERK signaling pathways. *Am J Cancer Res*. 2015;5:3085–97.
42. He Z, Bateman A. Progranulin gene expression regulates epithelial cell growth and promotes tumor growth in vivo. *Cancer Res*. 1999;59:3222–9.
43. Wang W, Hayashi J, Kim WE, Serrero G. PC cell-derived growth factor (granulin precursor) expression and action in human multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2003;9:2221–8.
44. Kong WJ, Zhang SL, Chen X, et al. PC cell-derived growth factor overexpression promotes proliferation and survival of laryngeal carcinoma. *Anticancer Drugs*. 2007;18:29–40.
45. Monami G, Emiliozzi V, Bitto A, Lovat F, Xu SQ, Goldoni S, et al. Proepithelin regulates prostate cancer cell biology by promoting cell growth, migration, and anchorage-independent growth. *Am J Pathol*. 2009;174(3):1037–47.
46. Zhang XY, Pan ZX, Liu H, et al. Effect of progranulin (PGRN) on the proliferation and senescence of cervical cancer cells. *Genet Mol Res*. 2015;14:14331–8.
47. Feng T, Zheng L, Liu F, et al. Growth factor progranulin promotes tumorigenesis of cervical cancer via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Oncotarget*. 2016;7:58381–95.
48. Kim WE, Yue B, Serrero G. Signaling pathway of GP88 (Progranulin) in breast cancer cells: upregulation and phosphorylation of c-myc by GP88/Progranulin in Her2-overexpressing breast cancer cells. *Breast Cancer (Auckl)*. 2015;9:71–7.
49. Liu Y, Xi L, Liao G, et al. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF)/granulin–epithelin precursor (GEP) decreased cell proliferation and invasion through downregulation of cyclin D and CDK4 and inactivation of MMP-2. *BMC Cancer*. 2007;7:22.
50. Lu R, Serrero G. Mediation of estrogen mitogenic effect in human breast cancer MCF-7 cells by PC-cell-derived growth



- factor (PCDGF/granulin precursor). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:142–7.
51. Huang K, Huang C, Shan K, Chen J, Li H. Significance of PC cell-derived growth factor and cyclin D1 expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37:411–7.
  52. Prieto-García E, Díaz-García CV, García-Ruiz I, Agulló-Ortuño MT. Epithelial-to-mesenchymal transition in tumor progression. *Med Oncol*. 2017;34:122.
  53. Tangkeangsirisin W, Serrero G. PC cell-derived growth factor (PCDGF/GP88, progranulin) stimulates migration, invasiveness and VEGF expression in breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 2004;25:1587–92.
  54. Monami G, Gonzalez EM, Hellman M, et al. Proepithelin promotes migration and invasion of 5637 bladder cancer cells through the activation of ERK1/2 and the formation of a paxillin/FAK/ERK complex. *Cancer Res*. 2006;66:7103–10.
  55. Cheung ST, Wong SY, Leung KL, et al. Granulin–epithelin precursor overexpression promotes growth and invasion of hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:7629–36.
  56. Dong T, Yang D, Li R, et al. PGRN promotes migration and invasion of epithelial ovarian cancer cells through an epithelial mesenchymal transition program and the activation of cancer associated fibroblasts. *Exp Mol Pathol*. 2016;100:17–25.
  57. Chen X, Xu H, Wu N, et al. Interaction between granulin A and enolase 1 attenuates the migration and invasion of human hepatoma cells. *Oncotarget*. 2017;8:30305–16.
  58. Eguchi R, Nakano T, Wakabayashi I. Progranulin and granulin-like protein as novel VEGF-independent angiogenic factors derived from human mesothelioma cells. *Oncogene*. 2017;36:714–22.
  59. Chen XY, Li JS, Liang QP, He DZ, Zhao J. Expression of PC cell-derived growth factor and vascular endothelial growth factor in esophageal squamous cell carcinoma and their clinicopathologic significance. *Chin Med J (Engl)*. 2008;121:881–6.
  60. Li LQ, Huang HL, Ping JL, Wang XH, Zhong J, Dai LC. Clinicopathologic and prognostic implications of progranulin in breast carcinoma. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124:2045–50.
  61. Huang H, Li J, Lu Y, Min L, Li D, Dai L. Role of midkine-progranulin interaction during angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8:8809–20.
  62. Matsumura N, Mandai M, Miyanishi M, et al. Oncogenic property of acrogranin in human uterine leiomyosarcoma: direct evidence of genetic contribution in in vivo tumorigenesis. *Clin Cancer Res*. 2006;12:1402–11.
  63. Miyanishi M, Mandai M, Matsumura N, et al. Immortalized ovarian surface epithelial cells acquire tumorigenicity by Acrogranin gene overexpression. *Oncol Rep*. 2007;17:329–33.
  64. Lu Y, Zheng L, Zhang W, et al. Growth factor progranulin contributes to cervical cancer cell proliferation and transformation in vivo and in vitro. *Gynecol Oncol*. 2014;134:364–71.
  65. Bose D, Zimmerman LJ, Pierobon M, et al. Chemoresistant colorectal cancer cells and cancer stem cells mediate growth and survival of bystander cells. *Br J Cancer*. 2011;105:1759–67.
  66. Tangkeangsirisin W, Hayashi J, Serrero G. PC cell-derived growth factor mediates tamoxifen resistance and promotes tumor growth of human breast cancer cells. *Cancer Res*. 2004;64:1737–43.
  67. Wang W, Hayashi J, Serrero G. PC cell-derived growth factor confers resistance to dexamethasone and promotes tumorigenesis in human multiple myeloma. *Clin Cancer Res*. 2006;12:49–56.
  68. Kim WE, Serrero G. PC cell-derived growth factor stimulates proliferation and confers Trastuzumab resistance to Her-2-overexpressing breast cancer cells. *Clin Cancer Res*. 2006;12:4192–9.
  69. Abrahale T, Brodie A, Sabnis G, et al. GP88 (PC-Cell Derived Growth Factor, progranulin) stimulates proliferation and confers letrozole resistance to aromatase overexpressing breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2011;11:231.
  70. Pizarro GO, Zhou XC, Koch A, et al. Prosurvival function of the granulin–epithelin precursor is important in tumor progression and chemoresistance. *Int J Cancer*. 2007;120:2339–43.
  71. Cheung ST, Cheung PF, Cheng CK, Wong NC, Fan ST. Granulin–epithelin precursor and ATP-dependent binding cassette (ABC) B5 regulate liver cancer cell chemoresistance. *Gastroenterology*. 2011;140:344–55.
  72. Cheung PF, Cheng CK, Wong NC, et al. Granulin–epithelin precursor is an oncofetal protein defining hepatic cancer stem cells. *PLoS ONE*. 2011;6:e28246.
  73. Bandey I, Chiou SH, Huang AP, Tsai JC, Tu PH. Progranulin promotes Temozolomide resistance of glioblastoma by orchestrating DNA repair and tumor stemness. *Oncogene*. 2015;34:1853–64.
  74. Cheung PF, Yip CW, Wong NC, et al. Granulin–epithelin precursor renders hepatocellular carcinoma cells resistant to natural killer cytotoxicity. *Cancer Immunol Res*. 2014;2:1209–19.
  75. Goossens N, Nakagawa S, Sun X, Hoshida Y. Cancer biomarker discovery and validation. *Transl Cancer Res*. 2015;4:256–69.
  76. Han JJ, Yu M, Houston N, Steinberg SM, Kohn EC. Progranulin is a potential prognostic biomarker in advanced epithelial ovarian cancers. *Gynecol Oncol*. 2011;120:5–10.
  77. 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;28:452–8.
  78. Carlson AM, Maurer MJ, Goergen KM, et al. Utility of progranulin and serum leukocyte protease inhibitor as diagnostic and prognostic biomarkers in ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2013;22:1730–5.
  79. Tkaczuk KR, Yue B, Zhan M, et al. Increased circulating level of the survival factor GP88 (Progranulin) in the serum of breast cancer patients when compared to healthy subjects. *Breast Cancer (Auckl)*. 2011;5:155–62.
  80. Koo DH, Park CY, Lee ES, Ro J, Oh SW. Progranulin as a prognostic biomarker for breast cancer recurrence in patients who had hormone receptor-positive tumors: a cohort study. *PLoS ONE*. 2012;7:e39880.
  81. Serrero G, Hawkins DM, Yue B, et al. Progranulin (GP88) tumor tissue expression is associated with increased risk of recurrence in breast cancer patients diagnosed with estrogen receptor positive invasive ductal carcinoma. *Breast Cancer Res*. 2012;14:R26.
  82. Wang M, Li G, Yin J, Lin T, Zhang J. Progranulin overexpression predicts overall survival in patients with glioblastoma. *Med Oncol*. 2012;29:2423–31.
  83. Pan CX, Kinch MS, Kiener PA, et al. PC cell-derived growth factor expression in prostatic intraepithelial neoplasia and prostatic adenocarcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:1333–7.
  84. Donald CD, Laddu A, Chandham P, et al. Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium. *Anticancer Res*. 2001;21:3739–42.
  85. Selmy MA, Ibrahim GH, El Serafi TI, Ghobeish AA. Evaluation of urinary proepithelin as a potential biomarker for bladder cancer detection and prognosis in Egyptian patients. *Cancer Biomark*. 2010;7:163–70.
  86. Soukup V, Kalousová M, Capoun O, et al. Panel of urinary diagnostic markers for non-invasive detection of primary and recurrent urothelial urinary bladder carcinoma. *Urol Int*. 2015;95:56–64.
  87. Göbel M, Eisele L, Möllmann M, et al. Progranulin is a novel independent predictor of disease progression and overall survival in chronic lymphocytic leukemia. *PLoS ONE*. 2013;8:e72107.
  88. Edelman MJ, Feliciano J, Yue B, et al. GP88 (progranulin): a novel tissue and circulating biomarker for non-small cell lung carcinoma. *Hum Pathol*. 2014;45:1893–9.

89. Kim JH, Do IG, Kim K, et al. Progranulin as a predictive factor of response to chemotherapy in advanced biliary tract carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;78:1085–92.
90. Yamamoto Y, Goto N, Takemura M, Yamasuge W, Yabe K, Takami T, et al. Association between increased serum GP88 (progranulin) concentrations and prognosis in patients with malignant lymphomas. *Clin Chim Acta*. 2017;473:139–46.
91. Zhang H, Serrero G. Inhibition of tumorigenicity of the teratoma PC cell line by transfection with antisense cDNA for PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95:14202–7.
92. Lu R, Serrero G. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97:3993–8.
93. 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;24:7084–93.
94. Wang H, Sun Y, Liu S, et al. Upregulation of progranulin by *Helicobacter pylori* in human gastric epithelial cells via p38MAPK and MEK1/2 signaling pathway: role in epithelial cell proliferation and migration. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011;63:82–92.
95. Ho JC, Ip YC, Cheung ST, et al. Granulin–epithelin precursor as a therapeutic target for hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47:1524–32.
96. Wong NC, Cheung PF, Yip CW, et al. Antibody against granulin–epithelin precursor sensitizes hepatocellular carcinoma to chemotherapeutic agents. *Mol Cancer Ther*. 2014;13:3001–12.
97. Huang CH, Kuo CJ, Liang SS, et al. Onco-proteogenomics identifies urinary S100A9 and GRN as potential combinatorial biomarkers for early diagnosis of hepatocellular carcinoma. *BBA Clin*. 2015;3:205–13.
98. Buraschi S, Xu SQ, Stefanello M, et al. Suppression of progranulin expression inhibits bladder cancer growth and sensitizes cancer cells to cisplatin. *Oncotarget*. 2016;7:39980–95.