



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

Efecto del Xantomicrol sobre la expresión de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER y su relación con la proliferación y migración en la línea celular de cáncer epitelial ovárico SKOV-3.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y SALUD ANIMAL

P R E S E N T A:

ISIS SANTOS PANIAGUA

TUTOR PRINCIPAL:

CRISTINA ALEIDA OLIVARES SEGURA
(INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, IMSS)

COMITÉ TUTORAL:

MARÍA ADELINA JIMÉNEZ ARELLANES
(INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL, IMSS)

GABRIEL GUTIÉRREZ OSPINA
(INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM)

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX. ABRIL 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

MIEMBROS DEL JURADO

Presidente: Dr. Mario Pérez Martínez
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM)

Secretario: Dra. Cristina Aleida Olivares Segura
Instituto Mexicano del Seguro Social

Vocal: Dr. Alejandro Cervantes Arias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM)

Vocal: Dra. María Adelina Jiménez Arellanes
Instituto Mexicano del Seguro Social

Vocal: Dr. José Gerardo Perera Marín
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM)

AGRADECIMIENTOS.

Al programa de Doctorado en Ciencias de la Producción y Salud Animal de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por abrirme las puertas al conocimiento.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización de la presente tesis (Número de registro de becario 282566).

Al Fondo de Investigación en Salud del IMSS, por el apoyo financiero al proyecto para la realización de esta tesis de doctorado (Número de registro: R-2017-785-009) y a la Coordinación de Investigación en Salud del IMSS, por la beca otorgada (Matrícula de becario:99096716).

A la Dra. Cristina Aleida Olivares Segura, Investigador Asociado “B” en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva (IMSS) por haber dirigido el trabajo de tesis.

A la Dra. María Adelina Jiménez Arellanes, Investigador Titular “B” en la Unidad de Investigación Médica en Farmacología (IMSS) y al Dr. Gabriel Gutiérrez Ospina, Investigador Titular “B” del Instituto de Investigaciones Biomédicas (UNAM) por haber conformado el comité tutor.

A los miembros del jurado; Dr. Mario Pérez Martínez, Profesor Titular “C” de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM), Dr. Alejandro Cervantes Arias, Profesor Titular “A” de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM) y al Dr. José Gerardo Perera Marín, Técnico Académico Titular “C” de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (UNAM) por ayudarme a mejorar el contenido de este trabajo.

DEDICATORIA.

A mis padres Lucila Paniagua Paniagua e Isais Santos Pineda, a mis hermanos Saraí y Said quienes, como una familia siempre unida han estado acompañándome en esta aventura que es la vida, apoyándome, enseñándome, escuchándome, ayudándome y levantándome en su momento, y que, gracias a eso, pero sobre todo a su cariño y amor incondicional hoy sigo de pie, dispuesta a seguir luchando porque sé que siempre estarán a mi lado.

Los quiero.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT.....	2
3. INTRODUCCIÓN.....	3
 <u>3.1.OVARIO.....</u>	3
<u>3.1.1. Anatomía e histología del ovario.....</u>	3
<u>3.1.2. Epidemiología del cáncer de ovario en mujeres.....</u>	3
<u>3.1.3. Estadificación y clasificación del cáncer de ovario.....</u>	4
 <u>3.2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE OVARIO.....</u>	6
<u>3.2.1.Tumores epiteliales ováricos.....</u>	6
<u>3.2.1.1.Tumores serosos.....</u>	7
<u>3.2.1.2.Tumores mucinosos.....</u>	8
<u>3.2.1.3.Tumores endometrioides.....</u>	8
<u>3.2.1.4.Tumores de células claras.....</u>	9
<u>3.2.2.Tumores de células germinales.....</u>	9
<u>3.2.3.Tumores de los cordones sexuales.....</u>	10
 <u>3.3.RECEPTORES DE ESTRÓGENO.....</u>	11
<u>3.3.1.Receptores de estrógenos clásicos y su expresión en el cáncer de ovario.....</u>	11
<u>3.3.2.Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) y su expresión en el cáncer de ovario.....</u>	13
<u>3.3.3.Transformación del epitelio superficial ovárico (OSE).....</u>	14
<u>3.3.4.Participación de los receptores de estrógeno (ERs) en la Transición Epitelio-Mesénquima en el cáncer de ovario.....</u>	15
 <u>3.4. FLAVONOIDES.....</u>	17
<u>3.4.1.Importancia farmacológica de los flavonoides.....</u>	17
<u>3.4.2. Flavonoides y carcinogénesis.....</u>	18
 <u>3.5.XANTOMICROL.....</u>	22
<u>3.5.1.Obtención del xantomicrol.....</u>	22
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5. OBJETIVOS.....	25
<u>5.1. Objetivo general.....</u>	25

___ 5.2. Objetivos particulares.	25
6. HIPÓTESIS.	26
7. MATERIAL Y METODOS.	27
___ 7.1. Cultivo celular.	27
___ 7.2. Tratamiento celular.	27
___ 7.3. Preparacion de xantomicrol.	28
___ 7.4. Ensayo de Cristal Violeta para obtener IC ₅₀	28
___ 7.5. Ensayo de conteo y viabilidad celular con Azul Tripán.	29
___ 7.6. Estímulo con xantomicrol sobre la expresión de los receptores de estrógenos.	30
___ 7.7. Extractos proteicos e inmunodetección de los receptores de estrógenos.	31
___ 7.7.1. Extracto proteico nuclear.	31
___ 7.7.2. Extracto proteico total.	31
___ 7.7.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.	32
___ 7.7.4. Inmunodetección de ER α y ER β	32
___ 7.7.5. Inmunodetección de GPER.	33
___ 7.8. Ensayo de migración celular.	34
___ 7.9. Análisis de resultados.	34
8. RESULTADOS	36
___ 8.1. Expresión endógena de los receptores de estrógenos (ER α , ER β , GPER) en SKOV-3.	36
___ 8.2. Determinación de la IC ₅₀ del xantomicrol a través de la proliferación celular.	36
___ 8.3. El xantomicrol disminuye la proliferación celular.	37
___ 8.4. Efecto del xantomicrol sobre el porcentaje de células viables, concentración de proteína citoplasmática y proteína nuclear.	39
___ 8.5. Regulación diferencial de los receptores de estrógenos en SKOV-3 en presencia de xantomicrol.	42
___ 8.6. Efecto de la migración celular después del tratamiento con xantomicrol. .	43
9. DISCUSIÓN.	45
10. CONCLUSIONES.	49

11. ANEXOS.	51
12. BIBLIOGRAFÍA.	53

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Clasificación del cáncer ovárico.....	6
Figura 2. Incidencia de cáncer ovárico edad-específica por subtipo histológico.....	9
Figura 3. Principales isoformas de ER α y ER β	11
Figura 4. Vías de señalización activadas por GPER y ERs	13
Figura 5. Efecto de los estrógenos sobre el proceso de transición epitelio-mesénquima en células de cáncer de ovario.....	17
Figura 6. Acciones moleculares de los flavonoides en la señalización celular en el cáncer.....	19
Figura 7. Estructura del xantomicrol extraído de las partes aéreas de <i>Brickellia paniculata</i>	23
Figura 8. Patrón representativo de la expresión de los receptores ER α , ER β y GPER, en la línea celular SKOV-3.....	36
Figura 9. Determinación de la IC ₅₀ del xantomicrol y cisplatino sobre la línea celular SKOV-3	37
Figura 10. Efecto antiproliferativo del xantomicrol post tratamiento sobre la línea celular SKOV-3.....	38
Figura 11. Efecto sobre la viabilidad celular en la línea SKOV-3 durante el conteo manual.....	39
Figura 12. Efecto del xantomicrol sobre la proliferación celular, proteína total y nuclear en la línea celular SKOV-3	41
Figura 13. Regulación diferencial del xantomicrol sobre la expresión de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER en las células SKOV-3.....	42
Figura 14. Efecto de xantomicrol sobre la migración celular en la línea celular SKOV-3.	44
Figura 15. Efecto de xantomicrol sobre la línea celular SKOV-3.....	49
Tabla 1. Probabilidad edad-específica de desarrollar cáncer de ovario para mujeres estadounidenses. Basada en casos diagnosticados desde 2012-2014	4
Tabla 2. Estadificación del cáncer de ovario, trompa de Falopio y peritoneo de acuerdo con la FIGO.....	5
Tabla 3. Subtipos histológicos del cáncer epitelial ovárico y sus características comunes.....	8
Tabla 4. Efectos antitumorales de algunos flavonoides sobre la línea celular SKOV-3	20
Tabla 5. Patrón de expresión de los receptores de estrógenos y medios de cultivo utilizados.....	27
Tabla 6. Número de células y dosis utilizadas en los ensayos.....	31
Tabla 7. Efecto del xantomicrol sobre proliferación celular, y concentración de proteína citoplasmática y nuclear en la línea celular SKOV-3..	40
Tabla 8. Efecto del xantomicrol sobre la migración celular en la línea celular SKOV-3.	43
Anexo 1. Análisis espectrofotométrico del xantomicrol.	51-52

ABREVIATURAS

- AKT** Serina/Treonina Proteína Cinasa (Serine/Threonine Protein Kinase)
AMPc Adenosín Monofosfato Cíclico (Cyclic Adenosine Monophosphate)
ARID1A Dominio de interacción rico en AT de la proteína A1 (AT-rich Interactive domain-containing protein 1A)
BRCA1 Proteína de Cáncer de Mama 1 (Breast Cancer 1)
BRCA2 Proteína de Cáncer de Mama 2 (Breast Cancer 2)
BPA Bisfenol A (Bisphenol A)
BRAF Protooncogén B-Raf (B-Raf proto-oncogene)
BrdU 5-bromo-2-desoxiuridina (5-bromo-2'-deoxyuridine)
CA-125 Antígeno de cáncer 125 (Cancer antigen 125)
CEA Antígeno carcinoembrionario (Carcinoembryonic Antigen)
CEO Cáncer Epitelial Ovárico (Ovarian Epithelial Cancer)
CTNNB1 Gen codificante de la proteína Beta-catenina (Gene encoding protein Beta-catenin)
CV Cristal Violeta (Crystal Violet Assay)
DBD Dominio de Unión al DNA (DNA-Binding Domain)
DMSO Dimetilsulfóxido (Dimethyl sulfoxide)
DMEM Medio de Eagle modificado por Dulbecco (Dulbecco's modified Eagle's medium)
E₂ 17 β -estradiol
E.E. Error Estándar (Standard Error)
EGFR Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (Epidermal Growth Factor Receptor)
ERs Receptores de Estrógeno (Estrogen Receptors)
EMC Matriz extracelular (extracellular matrix)
EMT Transición Epitelio-Mesénquima (Epithelial-Mesenchymal Transformation)
ER Receptor de Estrógenos (Estrogen Receptor)
ER α Receptor de Estrógenos Alfa (Estrogen Receptor-Alpha)
ER β Receptor de Estrógenos Beta (Estrogen Receptor-Beta)
ERE Elementos de Respuesta a Estrógenos (Estrogen Responsive Elements)
ErbB2 Receptor tirosina-cinasa erb-b2 (erb-b2 receptor tyrosine kinase 2)
FIGO Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (International Federation of Gynecology and Obstetrics)
GAPDH Gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)
GPCR Receptor Acoplado a Proteínas G (G Protein-Coupled Receptor)
GPER/GPR30 Receptor de Estrógenos 1 Acoplado a Proteínas G (G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1)
HNPCC Cáncer Colorrectal Hereditario sin Poliposis (Hereditary non-polyposis Colorectal Cancer)
IC₅₀ Concentración inhibitoria media
IL-6 Interleucina-6 (Interleukin-6)
KRAS Oncogén Homólogo Viral del Sarcoma de Rata Kirsten (Kirsten rat sarcoma viral oncogene)
LBD Dominio de Unión al Ligando (Ligand Binding Domain)
MAPK Proteína Cinasa Activada por Mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MEC Matriz Extracelular (extracellular matrix)
MET Transición Mesénquima-Epitelio (Mesenchymal-Epithelial Transition)
MMPs Metaloproteasas (Matrix Metalloproteinases)
NF-κB Factor nuclear-κB (Nuclear Factor-κB)
OH Grupo Hidroxilo (Hydroxy)
OSE Epitelio Superficial Ovárico (Ovarian Surface Epithelium)
PBS Amortiguador de fosfatos (Phosphate buffer)
PI3K Fosfoinositol 3-Cinasas (Phosphatidylinositide 3-Kinases)
PIK3CA Gen de la subunidad alfa catalítica de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha gene)
POLII Polimerasa II (Polymerase II)
PTEN Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase)
PI3K Fosfoinositol 3-Cinasas (Phosphatidylinositide 3-Kinases)
POLII Polimerasa II (Polymerase II)
TGF α Factor de Crecimiento Transformante α (Transforming growth factor alpha)
TGF β Factor de Crecimiento Transformante β (Transforming growth factor beta)
TNF Factor de Necrosis Tumoral (Tumor Necrosis Factor)
TP53 Proteína Tumoral p53 (Tumor Protein p53)
SFB Suero Fetal Bovino (Fetal Bovine Serum)

1. RESUMEN

En México el cáncer de ovario ocupa el tercer lugar en cánceres ginecológicos. El cáncer epitelial ovárico representa el 80-90% de los tumores ováricos malignos. La sobrevivida a 5 años en mujeres con cáncer de ovario oscila entre el 20 y 30%. Las terapias convencionales, radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y cirugía, aún son ineficaces para controlar la recurrencia y la metástasis del cáncer de ovario. Por lo tanto, es de suma importancia identificar y evaluar nuevos compuestos potencialmente terapéuticos entre ellos los fitoestrógenos. **Objetivo.** Evaluar los efectos del xantomicrol obtenido de *Brickellia paniculata* sobre la expresión proteica de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER y su influencia en la proliferación y migración en la línea celular de cáncer epitelial ovárico SKOV-3. **Metodología.** Para el desarrollo del estudio, en primer lugar se determinó en la línea celular la presencia a nivel del núcleo de los receptores ER α , ER β , y a nivel celular de GPER mediante la técnica de inmunoblot, después se obtuvo la dosis al 50% de inhibición de la proliferación (IC₅₀) del xantomicrol mediante la técnica de cristal violeta y una vez determinada se tomaron dos dosis cercanas al valor de la IC₅₀ para los ensayos subsecuentes donde se evaluó el efecto del xantomicrol sobre la regulación de la presencia de estos receptores estrogénicos. El efecto del flavonoide sobre la proliferación y viabilidad celular se evaluó a través de la técnica de conteo celular con Azul Tripán, durante 72 horas con tratamiento y 48, 72 y 96 post-tratamiento. Para evaluar el efecto del xantomicrol sobre la migración celular se utilizó el ensayo de herida. **Resultados.** La línea celular SKOV-3 expresa de manera endógena y diferencial los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER. La IC₅₀ del xantomicrol correspondió a 213.94 \pm 10.33 μ g/mL y las dosis utilizadas para los ensayos subsecuentes fueron 200 y 250 μ g/mL. El xantomicrol disminuyó la proliferación celular de manera dosis dependiente durante 72 horas. Después del retiro del xantomicrol del medio de cultivo, se observó un efecto antiproliferativo citostático hasta las 72 horas post-tratamiento, reestableciéndose la proliferación celular después de 96 horas sin exposición al xantomicrol en cultivos pretratados. La viabilidad celular se conservó arriba del 95% en todas las condiciones de estudio. Por último, el xantomicrol redujo significativamente la migración celular en el rango del 77-86%. Interesantemente, los efectos sobre la proliferación y migración celular se acompañaron por una disminución importante en la presencia proteica de ER α (60-80%) e incrementos en los niveles de expresión de ER β (105%) y GPER (48%). **Conclusiones.** El xantomicrol disminuye la proliferación y migración celular, regula negativamente los niveles proteicos de ER α y positivamente los niveles de ER β y GPER en la línea celular de cáncer de ovario SKOV-3.

Palabras claves: Cáncer epitelial ovárico, Flavonoides, Xantomicrol, Receptor de Estrógeno 1 Acoplado a Proteínas G (GPER), Receptor de Estrógeno Alfa (ER α), Receptor de Estrógeno Beta (ER β), SKOV-3, Proliferación, Migración.

2. ABSTRACT

Background. In Mexico, ovarian cancer ranks third in gynecological cancers. Ovarian epithelial cancer accounts for 80-90% of malignant ovarian tumors. In women with ovarian cancer is low 5-year relative survival, this ranges between 20 and 30% Conventional therapies are still ineffective in controlling ovarian cancer recurrence and metastasis. Therefore, it is of paramount importance to identify and evaluate new potentially therapeutic compounds. **Objective.** Evaluate the effects of xanthomicrol obtained from *Brickellia paniculata* on expression of estrogen receptors, ER α , ER β and GPER and its influence on proliferation and migration of epithelial ovarian cancer SKOV-3 cell line. **Methodology.** For the development of the study, the presence of the ER α , ER β receptors at the nucleus level, and at the cellular level of GPER was first determined in the cell line by means of the immunoblot technique, then the dose at 50% inhibition was obtained. of proliferation (IC₅₀) of xanthomicrol by means of the crystal violet technique and once determined, two doses close to the IC₅₀ value were taken for the subsequent tests where the effect of xanthomicrol on the regulation of the presence of these estrogenic receptors was evaluated. The effect of the flavonoid on cell proliferation and viability was evaluated through the Trypan Blue cell count technique, during 72 hours with treatment and 48-, 72- and 96-hours post-treatment. To evaluate the effect of xanthomicrol on cell migration, the wound assay was used. **Results.** The SKOV-3 cell line endogenously and differentially expresses the estrogen receptors ER α , ER β and GPER. The IC₅₀ of xanthomicrol was 213.94 \pm 10.33 μ g/mL and the doses used for tests were 200 and 250 μ g/mL. Xanthomicrol decreased cell proliferation in a dose-dependent manner for 72 hours. After removing xanthomicrol from the culture medium, a cytostatic antiproliferative effect was able observed to 72 hours post-treatment, with proliferation cell reestablishing itself after 96 hours without exposure to xanthomicrol in pretreated cultures. Cell viability was maintained over 95% in all study conditions. Finally, xanthomicrol significantly reduced cell migration in a range to 77-86%. Interestingly, the effects on cell proliferation and migration were accompanied by a major decrease in ER α protein expression (60-80%) and increases in the expression levels of ER β (105%) and GPER (48%). **Conclusions.** Xanthomicrol decreases cell proliferation and migration, were accompanied by a decrease of ER α and increments of ER β and GPER expression levels on epithelial ovarian cancer SKOV-3 cell line.

Key words: Epithelial Ovarian Cancer (EOC), Flavonoids, Xanthomicrol, G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (GPER), Estrogen Receptor Alpha (ER α), Estrogen Receptor Beta (ER β), SKOV-3, Proliferation, Migration.

3. INTRODUCCIÓN.

3.1. OVARIO.

3.1.1. Anatomía e histología del ovario.

Los ovarios son dos órganos ovoides aplanados en forma de almendra, sólidos y de color blanco-rosado, en mujeres cada uno mide de 2-3.5 cm de largo, de 1-1.5 cm de ancho y 1 cm de espesor. Están localizados adyacentes a la pared lateral de la pelvis y se encuentran fijados a la superficie posterior del ligamento ancho del útero a través de un pliegue peritoneal llamado mesovario. El tamaño y localización varían de acuerdo con la edad y etapa reproductiva en la que se encuentran las mujeres. Antes de la pubertad la superficie del ovario es lisa, pero durante la vida fértil adquiere cada vez mayor cantidad de cicatrices y se torna irregular a causa de la ovulación consecutiva. En la menopausia, los ovarios involucionan a un cuarto del tamaño observado en el período fértil (1, 2). Histológicamente en el ovario se localizan dos regiones diferentes, la corteza y la médula, la médula o región medular, está localizada en el centro del ovario y está formada por tejido conjuntivo laxo, un conjunto de vasos sanguíneos tortuosos de gran tamaño, vasos linfáticos y nervios, la segunda es la corteza o región cortical, que rodea a la médula. En el estroma de la corteza están distribuidos los folículos ováricos de diversos tamaños, cada uno con un solo oocito. La superficie del ovario está recubierta por una capa de epitelio simple cuboide, el cual recibe el nombre de epitelio superficial del ovario y está formado por células cuboides que en algunas partes son casi planas. Debajo de este epitelio hay una capa de tejido conjuntivo colágeno denso irregular, la túnica albugínea, que lo separa de la corteza subyacente (3).

3.1.2. Epidemiología del cáncer de ovario en mujeres.

Dentro de los tipos de cáncer ginecológicos, el de ovario ocupa el cuarto lugar de incidencia y el tercero en mortalidad. En el 2020 se diagnosticaron 313,959 casos nuevos y 207,252 decesos a nivel mundial (4), el 58% de los cánceres de ovario son diagnosticados en estadios avanzados III y IV de acuerdo a la clasificación de la FIGO (International Federation of Gynecology) con una supervivencia relativa a los 5 años de

solo el 30% de casos. Sin embargo, la supervivencia relativa a 5 años para los casos localizados de cáncer de ovario es del 93% (5), debido a la ausencia de síntomas al inicio de la enfermedad y la falta de técnicas para realizar un diagnóstico precoz con adecuada sensibilidad y especificidad. En 2019 se diagnosticaron aproximadamente 24,494 casos nuevos de cáncer de ovario y 14,914 decesos en Estados Unidos (6); mientras que en México, al año se estiman alrededor de 4,000 casos nuevos. El riesgo para desarrollar cáncer ovárico es de 1.3% que equivale a 1 de 78 mujeres Tabla 1. La mayoría de los cánceres de ovario no se heredan, pero algunos dependen de mutaciones heredadas en los genes supresores de tumores BRCA1 (Proteína de Cáncer de Mama 1) y BRCA2 (Proteína de Cáncer de Mama 2). Una mutación en BRCA1 o BRCA2 aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de ovario. También la expresión de los receptores hormonales para el estrógeno y la progesterona (P₄) son asociados con la supervivencia de pacientes con cáncer de ovario.

Tabla 1. Probabilidad edad-específica de desarrollar cáncer de ovario para mujeres estadounidenses. Basada en casos diagnosticados desde 2012-2014. Tomada y modificada de: (7).

Edad (años)	Probabilidad 10-años	o 1 en
40	0.1 %	870
50	0.2 %	474
60	0.3 %	327
70	0.4 %	265
80	0.4 %	283
Riesgo de por vida	1.3 %	78

3.1.3. Estadificación y clasificación del cáncer de ovario.

La clasificación por etapas (estadios) de la enfermedad, utiliza el sistema propuesto por la FIGO, la cual se basa en los hallazgos quirúrgico-patológicos y en la extensión de la enfermedad, clasificándose en estadios I, II, III y IV (Tabla 2).

Tabla 2. Estadificación del cáncer de ovario, trompa de Falopio y peritoneo de acuerdo con la FIGO. Tomado y modificado de: (8, 9).

ESTADIO	DESCRIPCIÓN
<p>IA</p> <p>IB</p> <p>IC</p>	<p>Estadio I: Tumor limitado a los ovarios.</p> <p>Tumor limitado a un ovario (cápsula intacta) o trompas de Falopio. No hay tumores en la superficie ovárica o en la superficie de las trompas de Falopio Sin células malignas ascitis y lavados peritoneales.</p> <p>Tumor limitado a ambos ovarios (cápsula intacta) o trompas de Falopio. No hay tumores en la superficie ovárica o en la superficie de las trompas de Falopio Sin células malignas en ascitis y lavados peritoneales.</p> <p>Tumor en uno o ambos ovarios o trompas de Falopio: IC1 Derrame quirúrgico. IC2 Ruptura de la cápsula antes de la cirugía o tumor en la superficie ovárica o en la superficie de las trompas de Falopio. IC3 Células malignas en ascitis o lavados peritoneales.</p>
<p>IIA</p> <p>IIB</p>	<p>Estadio II: Tumor en uno o ambos ovarios o trompas de Falopio con extensión pélvica o cáncer peritoneal primario.</p> <p>Extensión y/o implantes en el útero y/o trompas de Falopio. Sin células malignas en ascitis y lavados peritoneales.</p> <p>Extensión a otros órganos pélvicos.</p>
<p>IIIA</p> <p>IIIB</p> <p>IIIC</p>	<p>Estadio III: Tumor en uno o ambos ovarios, o trompas de Falopio, con implantes peritoneales fuera de la pelvis y/o metástasis en los nódulos linfáticos retroperitoneales.</p> <p>Positivo en nódulos linfáticos retroperitoneales y/o metástasis microscópica fuera de la pelvis.</p> <p>IIIA1 Positivo solo en nódulos linfáticos retroperitoneales. IIIA1 (i) Metástasis ≤ 10 mm. IIIA1(ii) Metástasis > 10 mm.</p> <p>IIIA2 Microscópico fuera de la pelvis (arriba del borde) afectando el peritoneo ± positivo a nódulos linfáticos retroperitoneales.</p> <p>Metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis ≤ 2 cm ± positivo a nódulos linfáticos retroperitoneales.</p> <p>Metástasis peritoneal macroscópica fuera de la pelvis > 2 cm ± positivo a nódulos linfáticos retroperitoneales. Incluye extensión a la cápsula de hígado/bazo sin involucrar el parénquima de cada órgano.</p>
<p>IVA</p> <p>IVB</p>	<p>Estadio IV: Metástasis distante excluyendo metástasis peritoneal.</p> <p>Efusión pleural con citología positiva</p> <p>Metástasis en el parénquima del hígado y/o bazo. Metástasis en órganos extra-abdominales (nódulos linfáticos inguinales y nódulos linfáticos fuera de cavidad abdominal).</p>

3.2. CLASIFICACIÓN DEL CÁNCER DE OVARIO.

La clasificación histogenética de los tumores ováricos consta de tres categorías de acuerdo con las estructuras anatómicas en las cuales los tumores se originaron; a) del epitelio superficial (aprox. 90%), b) del estroma ovárico que incluye a los cordones sexuales (5%) o, c) de células germinales (menos del 5%) (Figura 1).

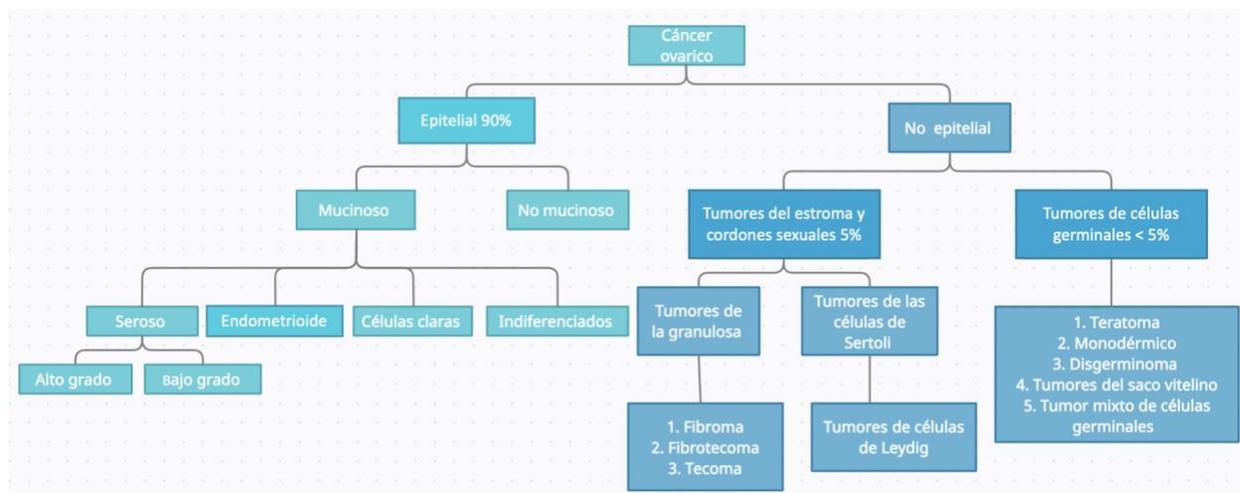


Figura 1. Clasificación del cáncer ovárico. Tomado y modificado de: (10).

3.2.1. Tumores epiteliales ováricos.

De acuerdo con su nivel proliferativo e invasivo los tumores se clasifican en: benignos, limítrofes y malignos. Los tumores benignos presentan escasa proliferación celular y un comportamiento no invasivo, los limítrofes tienen un bajo potencial de malignidad ya que, la proliferación celular es abundante, pero sin tener un comportamiento invasivo y por último se clasifican como malignos cuando hay abundante proliferación e invasión. La mayoría de los tumores ováricos malignos en mujeres son de tipo epitelial, representan el 60% de todos los tumores ováricos y el 90% de los tumores malignos de ovario. Los tumores epiteliales de ovario se clasifican de la siguiente manera: tumores serosos, tumores mucinosos, tumores endometriodes, tumores de células claras, tumores de Brenner, carcinomas indiferenciados y tumores epiteliales mixtos (8, 11). El riesgo de desarrollar cáncer epitelial ovárico a lo largo de la vida de la mujer es del 1.3%, el cual aumenta para portadoras de BRCA2 (15-20%) y es mayor para mujeres

con una mutación BRCA1 (40-45%). Los factores de riesgo para cáncer epitelial ovárico incluyen: edad avanzada, infertilidad, endometriosis y síndrome de ovario poliquístico entre otros. Se estima que el 18% de los casos de cáncer epitelial ovárico están asociados con una mutación de la línea germinal; la mayoría de estos son atribuibles a BRCA1 y BRCA2, pero también incluyen otros genes en la vía de recombinación homóloga (por ejemplo, TP53 (gen que codifica la Proteína tumoral p53), ATM (gen que codifica la proteína quinasa serina/treonina), MRE11 (gen que codifica la nucleasa de reparación de ruptura de doble cadena), RAD51 (gen que codifica a la proteína homóloga de la bacteriana RecA y de la Rad51 de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*), H2AX (gen que codifica a la proteína histona de la familia H2A), PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2), RPA (gen que codifica a la proteína de replicación A), BRIP1 (gen que codifica a la proteína 1 que interactúa con BRCA1), BARD1 (gen que codifica a la proteína que interactúa con la región N-terminal de BRCA1) y RAD52 (gen que codifica a la proteína de reparación del DNA homóloga a la proteína Rad52 de *S. cerevisiae*) y genes de reparación de errores de emparejamiento (Tabla 3).

3.2.1.1. Tumores serosos.

Los carcinomas serosos representan la mayoría de los tumores malignos (75-80%) y están formados por células que se asemejan a las del revestimiento interno de las trompas de Falopio. La incidencia del carcinoma seroso aumenta en las mujeres de entre 70-74 años y disminuye ligeramente a la edad de 75-79 años (Figura 2) (12). Estos tumores a su vez se dividen en: seroso de alto grado (high-grade serous ovarian cancer –HGSOC-), el cual es el más común y agresivo, y se caracteriza por mutaciones en TP53 y defectos en la reparación del ADN por recombinación homóloga, aproximadamente el 10% de los pacientes tienen una mutación en los genes BRCA1 y BRCA2. Mientras que los tumores serosos de bajo grado (low-grade serous carcinoma -LGSC-) a menudo se asocian con tumores serosos proliferativos limítrofes o atípicos y a menudo contienen mutaciones en BRAF y KRAS (8, 12-14).

Tabla 3. Subtipos histológicos de cáncer epitelial ovárico y sus características comunes. Tomado y modificado de: (15).

Características	Carcinoma seroso de alto grado	Carcinoma de células claras	Carcinoma endometriode	Carcinoma mucinoso	Carcinoma seroso de bajo grado
% de casos	70	12	11	3	3
Edad media al diagnóstico	61	55	56	53	43
Marcadores tumorales	CA-125	CA-125	CA-125	CEA;CA19-9	CA-125
Factores de riesgo genéticos	BRCA1/2	HNPCC	HNPCC/BRCA	Desconocido	Tumores borderline serosos
Etapas al diagnóstico	Avanzada	Temprana	Temprana	Temprana	Avanzada
Respuesta a la quimioterapia basada en platino	Quimiosensitivo	Quimioresistente Radiosensitivo	Quimiosensitivo	Quimioresistente	Quimioresistente
Mutaciones genéticas comunes	<i>P53; BRCA1/2; defectos en HR</i>	<i>PI3CA; ARD1A; PTEN; MSI</i>	<i>CTNNB1; ARD1A; PTEN; MSI</i>	<i>KRAS; HER2; CDKN2A</i>	<i>BRAF; KRAS; NRAS; ERBB2; PI3KCA</i>
Perfil inmunológico común	P53+;WNT1+;Pax8+; Ki67 elevado	HNFβ+;WT1-;ER-	ER+;pax8+;Vimentina+;WT1-;P53 silvestre	CK20+; Cdx2+; CK7+;ER-;WT1-	WT1+;Pax8+;P53 silvestre; Ki67 bajo

BRCA1/2=Gen de susceptibilidad al cáncer de mama 1/2; CA-125=Antígeno de cáncer 125; CEA=Antígeno carcinoembrionario; RE=Receptor de estrógeno; HNPCC=Cáncer colorrectal hereditario sin poliposis; HR=Recombinación homóloga; MSI=Inestabilidad de microsatélites; PTEN=Homólogo de fosfatasa y tensina; BRAF=Protooncogén B-Raf; KRAS Oncogén Homólogo Viral del Sarcoma de Rata Kirsten; CTNNB1 Gen codificante de la proteína Beta-catenina; STIC=Carcinoma intraepitelial tubárico seroso; ARD1A Dominio de interacción rico en AT de la proteína A1; TP53=Proteína tumoral p53.

3.2.1.2. Tumores mucinosos.

Los carcinomas mucinosos (3-10%), son tumores formados por células que se asemejan a las del epitelio endocervical (Tipo endocervical o mülleriano) o más frecuentemente a las del epitelio intestinal (Tipo intestinal). Suelen presentar mutaciones en el gen KRAS y parece ser que no están asociados a mutaciones de BRCA (8, 12-14).

3.2.1.3. Tumores endometrioides.

Los carcinomas endometrioides son tumores formados por células que se asemejan a las del revestimiento interno del útero (endometrio). Pueden estar asociados con la presencia aberrante de endometrio fuera del útero (endometriosis) y con crecimiento excesivo (hiperplasia) o cáncer de endometrio. La mayor incidencia de carcinoma endometrioides en mujeres se encuentra en el rango de 55-59 años (Figura 2). Se ha visto que las mutaciones de CTNNB1 son comunes en el cáncer ovárico endometrial, además de mutaciones ARD1A y la pérdida de la proteína BAF250a codificada por ARD1A (8, 12-14, 16).

3.2.1.4. Tumores de células claras.

Los tumores de células claras están formados por células que contienen abundante glucógeno en el citoplasma. La mayor incidencia de carcinoma de células claras en mujeres se encuentra en el rango de 55-59 años (Figura 2); frecuentemente este tipo de tumores se encuentran relacionados con endometriosis y síndrome de Lynch. Las mutaciones somáticas más frecuentes se han descrito en los genes ARID1A, PIK3CA y PETEN (12-14, 16, 17).

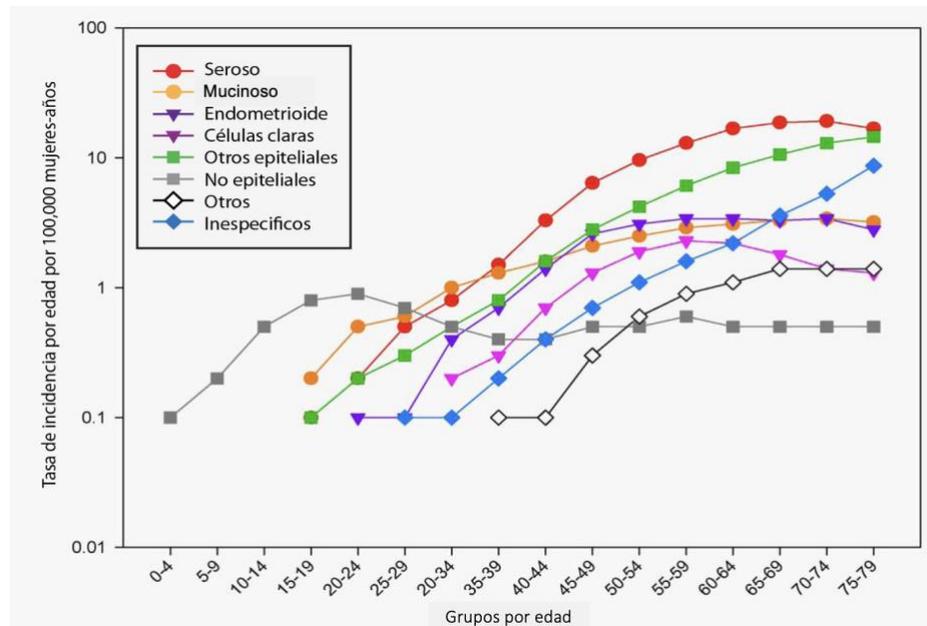


Figura 2. Incidencia de cáncer ovárico edad-específica por subtipo histológico. Tomado y modificado de: (12).

3.2.2. Tumores de células germinales.

Son tumores ováricos formados por células que al parecer son derivadas de células germinales primordiales. Estos tumores representan una cuarta parte de todos los tumores ováricos en mujeres, pero del 3-7% son malignos. Más de la mitad de todas las neoplasias que se desarrollan en niñas y adolescentes son de origen germinal. Dentro de los tumores de células germinales se encuentran los siguientes subtipos: Teratomas, tumores del saco vitelino, carcinoma embrional y coriocarcinomas (12).

3.2.3. Tumores de los cordones sexuales.

Son tumores ováricos que se cree que se originan de las células de la teca, células del estroma, células de la granulosa y sus homólogos de los cordones sexuales testiculares, las células de Sertoli y Leydig. Estos tumores frecuentemente están asociados con manifestaciones endocrinas. Representan aproximadamente el 8% de los tumores ováricos en mujeres y aproximadamente el 7% de estos son malignos. Dentro de los tumores de cordones sexuales se encuentran los siguientes subtipos: tumores de las células de la granulosa, tumores de células de Sertoli, fibromas, tecomas, tumores de células de Sertoli-Leydig y tumores de células esteroideas.

Recientes estudios morfológicos, inmunohistoquímicos y genéticos moleculares han llevado a desarrollar un nuevo paradigma de la patogénesis y origen del cáncer epitelial ovárico. El paradigma está basado en un modelo “dualista” de carcinogénesis que divide el cáncer epitelial de ovario en 2 grandes categorías, designadas Tipo I y Tipo II. Los tumores Tipo I (confinados al ovario), son diagnosticados en estadio I generalmente, se desarrollan de tumores limítrofes y de endometriosis, este grupo está compuesto de carcinomas de bajo grado de tipo seroso y endometrioides, carcinomas de células claras, mucinosos y transicionales (Brenner). Tienen un comportamiento poco activo y agresivo, son genéticamente estables carecen de mutaciones en el gen TP53 y cada tipo histológico exhibe un perfil genético molecular distintivo (18). El Tipo I se caracteriza por presentar mutaciones específicas en los genes KRAS, BRAF, ERBB2, CTNNB1, PTEN, PIK3CA, ARID1A Y PPP2RIA (19). Este tipo de tumores se detecta fácilmente por examinación pélvica y/o ultrasonido transvaginal, constituyen solo el 25% de los cánceres de ovario y representan aproximadamente el 10% de las muertes causadas por esta neoplasia. En contraste, el grupo designado como Tipo II, incluye carcinomas intraepiteliales de las trompas de Falopio, los cuales son altamente agresivos, e inestables genéticamente, presentan mutaciones en TP53 en el 80% de los casos y tienen alteraciones moleculares en el gen BRCA ya sea por mutación del mismo o por metilación de su promotor; se desarrollan rápidamente y casi siempre se detectan en estadios avanzados (III o IV), este tipo de tumores incluyen el carcinoma seroso de alto grado, el carcinoma no diferenciado y los tumores mesodérmicos mixtos (carcinosarcoma). Representan aproximadamente el 75% de los cánceres de ovario y

son responsables de aproximadamente el 90% de las muertes por esta enfermedad (18, 19).

3.3. RECEPTORES DE ESTRÓGENO.

3.3.1. Receptores de estrógenos clásicos y su expresión en el cáncer de ovario.

Los efectos inducidos por los estrógenos se llevan a cabo a través de sus receptores; (ER por sus siglas en inglés Estrogen Receptor) alfa ($ER\alpha$ 595 aa; PM 66-70 kDa) y beta ($ER\beta$ 530 aa; PM 53-59 kDa). Ambos receptores tienen diversas isoformas; $ER\alpha$ ($ER\alpha66$, $ER\alpha46$ y $ER\alpha36$) y $ER\beta$ ($ER\beta1$, $ER\beta2$, $ER\beta3$, $ER\beta4$ y $ER\beta5$). Todas estas isoformas tienen patrones de expresión diferencial, tanto en líneas celulares como en tejidos de tumores ováricos y actúan como factores de transcripción activados por el ligando, estradiol (E_2) (Figura 3) (20-22).

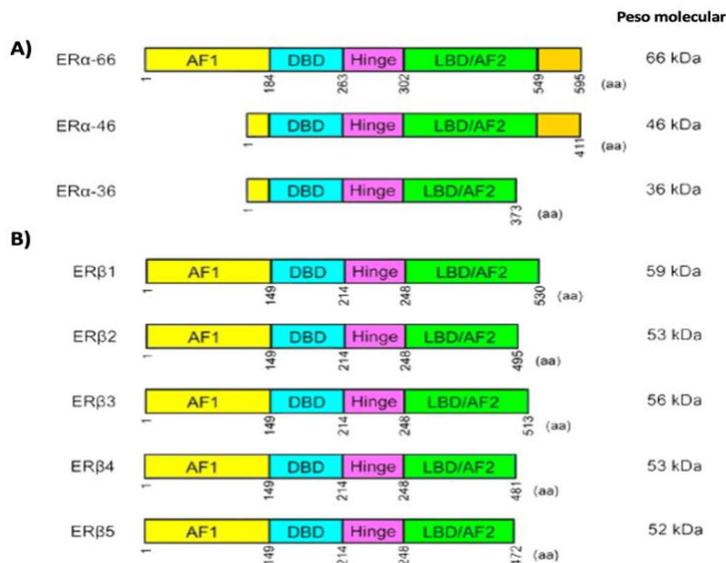


Figura 3. Principales isoformas de $ER\alpha$ ($ER\alpha-66$, $ER\alpha-46$ y $ER\alpha36$) **(A)** $ER\alpha-36$ difiere de $ER\alpha-46$ en el C-terminal. $ER\beta$ ($ER\beta1$, $ER\beta2$, $ER\beta3$, $ER\beta4$ y $ER\beta5$) **(B)**. AF1 Función de activación 1, AF2 función de activación 2, DBD dominio de unión a ADN y LBD dominio de unión a ligando. Tomado y modificado de: (23).

Los receptores de estrógenos $ER\alpha$ y $ER\beta$ están presentes en el ovario desde la etapa folicular primaria. La activación de estos receptores por el E_2 provoca diferentes respuestas; en el caso de $ER\alpha$ se llevan a cabo acciones proliferativas, mientras que para el $ER\beta$ se provocan acciones de diferenciación celular, por lo tanto, son parte importante en la foliculogénesis (21, 24). Las vías activadas por los Receptores de estrógenos (ERs) incluyen el incremento de calcio intracelular (25), estimulación de la

Adenilato Ciclasa (AC) y transcripción génica regulada por AMPc (26), y la activación de algunas proteínas cinasas activadas por mitógenos (27). La expresión de ER α y ER β se encuentra en células epiteliales superficiales del ovario normal, en tumores ováricos de tipo epitelial y en líneas celulares de cáncer de ovario y en el endometrio (28). En el cáncer epitelial ovárico la expresión se caracteriza por un predominio del ER α (aprox. 60%) y sus niveles son generalmente más altos que los encontrados en los ovarios normales o en tumores benignos. Este receptor se encuentra tanto en la membrana citoplasmática como en el citoplasma (29-32). Se ha descrito que la pérdida en la expresión del ER β es un proceso importante en el desarrollo del cáncer de ovario, y la expresión del ER β es significativamente más alto en estadios tempranos de este cáncer comparado con estadios avanzados (II-IV). Se encontró que la alta expresión del ER β esta significativamente asociada con una larga sobrevida libre de la enfermedad (33). La pérdida de la expresión del ER β en cánceres de ovario puede ser una característica de la transformación maligna. Asimismo, se ha descrito que la sobre expresión del ER β en la línea celular de adenocarcinoma ovárico (PEO14) provoca una reducción del 50% en su capacidad proliferativa (32). El incremento en la expresión de ER α y la disminución en la expresión de ER β parece ser una característica que se presenta en tumores malignos de ovario, colon, pulmón, próstata y mama al ser comparados con tumores benignos (34, 35). Estudios *in vitro* donde se llevó a cabo la sobre expresión de ER β 1 en las líneas celulares de cáncer de ovario humano SKOV-3 y ES-2, mostraron una reducción en la proliferación y la migración celular, así como un aumento en la apoptosis. Sin embargo, las isoformas ER β 2 y ER β 5 se han asociado con actividades pro migratorias e invasivas. La presencia de ER β 2 en el citoplasma de células provenientes de pacientes con carcinoma ovárico seroso de alto grado, ha llevado a relacionar a esta isoforma con quimiorresistencia (21). Dentro de los efectos estrogénicos mediados por estos receptores nucleares, se encuentran los efectos mitogénicos mediados por una variedad de genes incluidos IGF1, ciclina D1, c-myc y efp, los cuales son importantes para la proliferación y supervivencia celular; C-myc oncogén que se amplifica o sobre expresa en una gran variedad de tumores humanos (23, 36, 37).

3.3.2. Receptor de estrógenos acoplado a proteínas G (GPER) y su expresión en el cáncer de ovario.

GPER es un receptor acoplado a proteínas G, está involucrado en las acciones rápidas de los estrógenos (38). Se expresa en la membrana celular y en el retículo endoplásmico. El GPER es una proteína de 375 aa con un PM de aproximadamente 42 kDa. La activación de GPER involucra la activación de vías enzimáticas y canales iónicos lo que conlleva a la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR), activación de proteínas cinas activadas por mitógenos (MAPK) y movilización de calcio, resultando en la regulación de varios de los genes de expresión (Figura 4) (39).

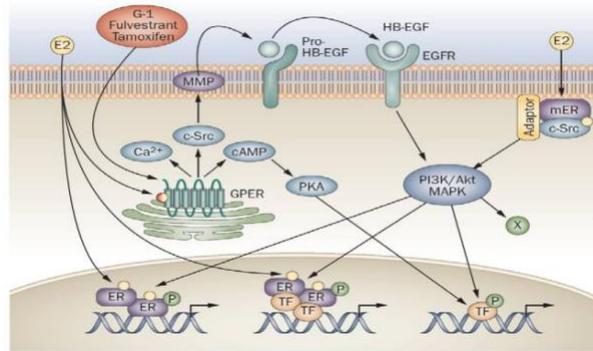


Figura 4. Vías de señalización activadas por GPER y ERs. Los estrógenos endógenos incluyendo el 17 β -estradiol son activadores no selectivos de los ER α , ER β y GPER. Los estrógenos activan los ER nucleares, inducen su dimerización y unión a los genes del promotor blanco. Subpoblaciones de ERs en la membrana plasmática activadas por estrógenos interactúan con moléculas de señalización como *c-src*, la cual media señales rápidas vía PI3K/Akt y MAPK. La activación de GPER estimula la producción de AMPc, movilización de calcio y *c-src*, la cual activa MMPs provocan la liberación de HB-EGF y transactiva EGFR, activando a su vez las vías MAPK y PI3K/Akt que pueden inducir efectos rápidos no genómicos) o efectos genómicos regulando la transcripción. Tomado y modificado de: (39).

GPER media efectos pleiotrópicos de los estrógenos en muchos cánceres relacionados con estrógenos y hay una fuerte asociación entre GPER y la proliferación celular, la migración y la invasión del cáncer (40). Sin embargo, el papel de GPER en el cáncer de ovario es parcialmente conocido y poco claro. En tumores de cáncer de ovario humano, GPER se ha asociado con tasas de baja supervivencia (41), un tercio de los tumores malignos tienen sobre-expresión de este receptor (28). Existen varios estudios que apoyan el concepto de que GPER tiene un papel supresor de tumor en el cáncer de ovario. Ignatov y colaboradores, observaron una menor expresión de GPER

en cánceres de ovario comparado con tejido sano, siendo mayor la expresión en etapas tempranas en comparación a las etapas tardías, lo cual se asoció con un resultado clínico más favorable. En este contexto, se utilizó un agonista selectivo de GPER-1 (G1), el cual suprimió la proliferación de líneas celulares de cáncer de ovario; SKOV-3 y OVCAR-3 (21, 42). Zhu y colaboradores, analizaron muestras de 110 pacientes con cáncer epitelial ovárico y los resultados sugirieron que la expresión de GPER nuclear, pero no citoplásmico está asociado a una supervivencia deficiente (43). En la línea celular de cáncer de ovario BG-1, la proliferación celular mediada por GPER requiere de la coexpresión de $ER\alpha$ (44). Mientras que en células de cáncer de ovario negativas a $ER\alpha$, GPER media los efectos de estrógenos independientemente de $ER\alpha$ (45, 46). Por lo tanto, la función de GPER en la progresión del cáncer de ovario y el cross-talk entre GPER con los ERs, y la regulación de estos requiere de mayor investigación (47). Se ha descrito que un compuesto que regula la expresión de GPER a nivel transcripcional, es el bisfenol A (BPA), un componente de los plásticos de policarbonato con una estructura similar a la del 17β -estradiol, el cual induce la transcripción de GPER en células GC-1 de espermatogonias de rata (48). GPER modula la expresión de proteínas que son componentes críticos del ciclo celular como c-fos y ciclina D1 y factores para la invasión y metástasis celular. La metástasis del cáncer es la principal causa de mortalidad en pacientes con tumores malignos, se estima que es responsable del 90% de las muertes relacionadas con cáncer (49). La degradación de la matriz extracelular (EMC) es una característica crucial de los tumores de ovario metastásicos y este proceso está asociado con la sobre-expresión de las metaloproteasas de matriz (MMPs) (50, 51): MMP-2 y MMP-9, la MMP-2 ha sido considerada como uno de los factores clave para la iniciación de este proceso (52, 53).

3.3.3. Transformación del epitelio superficial ovárico (OSE).

Se ha planteado que la mayoría de los cánceres epiteliales de ovario se originan por la transformación de las células del OSE. El OSE está formado por una monocapa de células inmediatas a la túnica albugínea, de la cual se separan por su lamina basal. Esta

monocapa celular rodea al ovario y está en continuidad con el mesotelio peritoneal, con el cual comparte un origen embriológico común. Su desarrollo ocurre durante eventos tempranos de la embriogénesis y se deriva del epitelio celómico que recubre a las crestas gonadales (54, 55). Las células del OSE tienen una morfología que varía de un epitelio cúbico a un epitelio escamoso, presenta microvellosidades y cilios, cuentan con la presencia de desmosomas y uniones estrechas incompletas, así como la expresión de integrinas y cadherinas tipo 7, 8, 18 y 19, las cuales mantienen su organización en monocapa (56). El OSE tiene la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares en respuesta a señalizaciones ambientales, expresa proteínas típicas de células epiteliales como E-cadherina y β -catenina, epitelio Mulleriano que incluyen formas de células columnares y varios marcadores que se encuentran en las neoplasias ováricas incluidos CA125 y E-cadherina, marcadores de células mesoteliales y mesenquimales como vimentina, fibronectina y N-cadherina y de células pluripotenciales como ALDH1, Lgr5, Lef1, CD133, y CK6b. El conjunto de estas propiedades, le confieren al OSE la plasticidad de efectuar las transiciones epitelio-mesénquima (EMT por sus siglas en inglés) y mesénquima-epitelio (MET por sus siglas en inglés) como mecanismos que le permiten moverse durante el proceso de regeneración para reparar la herida después del daño ocasionado por la ruptura folicular. Existe la teoría de que cuando el OSE disminuye su capacidad para producir EMT puede transformarse hacia fenotipos epiteliales complejos, lo cual pudiera ocasionar una deformación metaplásica y posteriormente una transformación maligna (54, 57).

3.3.4. Participación de los receptores de estrógeno (ERs) en la Transición Epitelio-Mesénquima en el cáncer de ovario.

Los estrógenos y la P_4 mantienen la función de los tejidos reproductivos de la mujer. El cáncer de ovario se diagnostica generalmente en etapas avanzadas después de que la neoplasia se ha diseminado, los eventos moleculares exactos que llevan a la metástasis de células tumorales ováricas no se han elucidado se ha planteado que, al parecer, un prerequisite necesario para que la metástasis ocurra es que las células adquieran las

capacidades tanto de migración como de invasión. Durante la metástasis, la EMT es un proceso importante, en el cual las células epiteliales cambian su polaridad celular y pierden su adhesión intercelular; además, de adquirir un incremento en su motilidad y en sus propiedades invasivas para llegar a convertirse en células mesenquimales, esto en términos de sus funciones y características (58). En el proceso de EMT, existe regulación a la alta y a la baja de múltiples marcadores celulares y proteínas de señalización, tales como marcadores específicos mesenquimales los cuales aumentan (ejemplo: vimentina y fibronectina, N-cadherina e integrinas b1 y b3), marcadores específicos epiteliales los cuales disminuyen (ej. E-caderina y citoqueratina) y factores de transcripción (ejemplo: SNAIL y SLUG) (33). Una vez que una célula epitelial ovárica se transforma por el proceso EMT, se separa de la membrana basal a una región no celular y metastatiza a través del flujo del fluido abdominal (53). Dentro de los factores involucrados en el incremento de riesgo del cáncer de ovario, se encuentran las hormonas esteroideas; E₂ y P₄, las cuales tienen una relevancia en la carcinogénesis ovárica (59). El E₂ es la principal hormona sexual femenina, ha sido considerada como una de las causas efectivas en el desarrollo del cáncer de ovario a través de sus acciones vía los receptores de estrógenos ER α y ER β . Estos receptores tienen diferentes funciones fisiológicas en los tumores ováricos. Existe una expresión dual de ER α y ER β en tejido de ovario normal, pero altos niveles de expresión de ER α y completa ausencia de la expresión de ER β en tumores metastásicos (60). El E₂ estimula la proliferación celular ovárica (61) e incrementa el potencial metastásico de líneas celulares de cáncer epitelial ovárico humano. Esto induce distintos cambios morfológicos, los cuales aumentan la EMT y también incrementan la capacidad migratoria de las células de cáncer. La participación de los ERs durante el proceso de la metástasis de los tumores ováricos se da a través de la regulación diferencial de genes involucrados en las transiciones epitelio mesénquima (62). Las células epiteliales iniciales cambian su polaridad y se separan de la membrana basal y matriz extracelular (MEC) mediante la regulación de las MMP y la alteración de la fuente del citoesqueleto. El siguiente paso implica la angiogénesis a través de las acciones de varios factores de crecimiento, extravasación y penetración en la sangre o el vaso linfático. Este proceso permite que las células cancerosas ingresen a la circulación y salgan de la corriente sanguínea en un sitio remoto, lo que puede implicar transiciones mesenquimales-

epiteliales (MET) y, por lo tanto, una reversión a un fenotipo epitelial (58). En diferentes líneas celulares de cáncer de ovario ER positivas, se han realizado ensayos de proliferación para demostrar los efectos del estrógeno *in vitro*. El estrógeno alteró la regulación hacia arriba y hacia abajo de genes relacionados con EMT (marcadores de superficie celular) y factores de transcripción tales como las proteínas SNAIL y SLUG (58) (Figura 5).

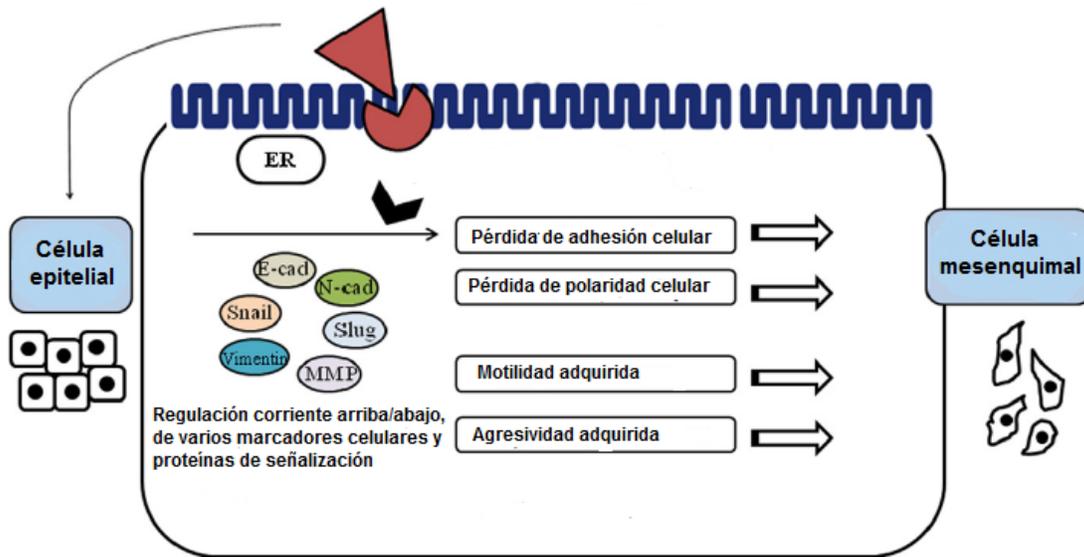


Figura 5. Efecto de los estrógenos sobre el proceso de transición epitelio-mesénquima en células de cáncer de ovario. Los estrógenos inducen la proliferación celular de cáncer de ovario y la EMT principalmente a través de la vía ER α , lo cual conduce a una mayor actividad migratoria y alteraciones funcionales a través de regulación a la alta o a la baja de genes y factores de transcripción relacionados con la EMT. E-cad (E-caderina) disminuye, mientras Vimentina, Snail, Slug y MMP aumentan. Tomado y modificado de: (58).

3.4. FLAVONOIDES.

3.4.1. Importancia farmacológica de los flavonoides.

Los flavonoides constituyen un amplio grupo de compuestos fenólicos ampliamente distribuidos en el reino vegetal y representan componentes sustanciales de la parte no energética de la dieta humana (63). Son especialmente comunes en especies de plantas que crecen en regiones áridas y semiáridas, y principalmente proveen protección a la planta contra la radiación ultravioleta dañina, contra la infección de microorganismos y ataque de insectos. La mayoría de esos productos naturales tienen actividades farmacológicas interesantes tales como; anticancerígenas, antioxidantes,

antidiabéticas, hepatoprotectoras, antimicóticas, anti-inflamatorias, antimicrobianas, así como su actividad antiproteolítica al inhibir algunas proteasas de matriz, entre otros (64-67).

La mayoría de los flavonoides se ingieren en la dieta habitual en forma de glucósidos, que tienen una o más moléculas de azúcar unidas a grupos fenólicos o al grupo hidroxilo C-3. Normalmente, estos compuestos se pueden absorber de dos formas: la primera y más sencilla está relacionada con la estructura de agliconas, que se absorben directamente en el intestino delgado; el segundo involucra sustancias que se encuentran en su forma glicosilada, las cuales sufren reacciones metabólicas de biotransformación (fase I), incluyendo reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis. Después de la absorción, los compuestos son metabolizados por enzimas en las células intestinales o hepáticas que promueven reacciones de conjugación con grupos metilo, sulfato y ácido glucurónico (fase II) (68).

3.4.2. Flavonoides y carcinogénesis.

A continuación, se describen brevemente algunos estudios que han demostrado que los flavonoides poseen una amplia variedad de efectos anticancerígenos. Los flavonoides alteran significativamente los procesos biológicos involucrados en el cáncer, incluida la inflamación y la inmunidad, el metabolismo redox, el crecimiento celular, la autofagia, la apoptosis y el ciclo celular. Las vías de señalización relacionadas con estos procesos biológicos incluyen: MAPK, factor nuclear- κ B (NF- κ B), dominio de pirina del receptor tipo Nod que contiene 3 (NLRP3) inflammasoma, transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3), efecto Warburg, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2), factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF1 α), diana de rapamicina (mTOR), Ras, macroautofagia, puntos de control del ciclo celular, vías apoptóticas intrínsecas y extrínsecas y la senescencia, son modulados por los flavonoides en el cáncer (Figura 6) (68). En cáncer de mama inducido en ratas, se encontró que la tangeretina aislada del aceite de cascara de mandarina y de otros cítricos, provoca arresto celular en la fase G1/S regulando a la alta p53/p21 e inhibe la metástasis mediante la supresión de las MMP2 y MMP9. Los flavonoides como la acacetina, baicaleina,

luteolina, wogonina, eupatorina entre otros, también pueden inducir apoptosis, autofagia y, disminución en la invasión y proliferación celular (69-71).

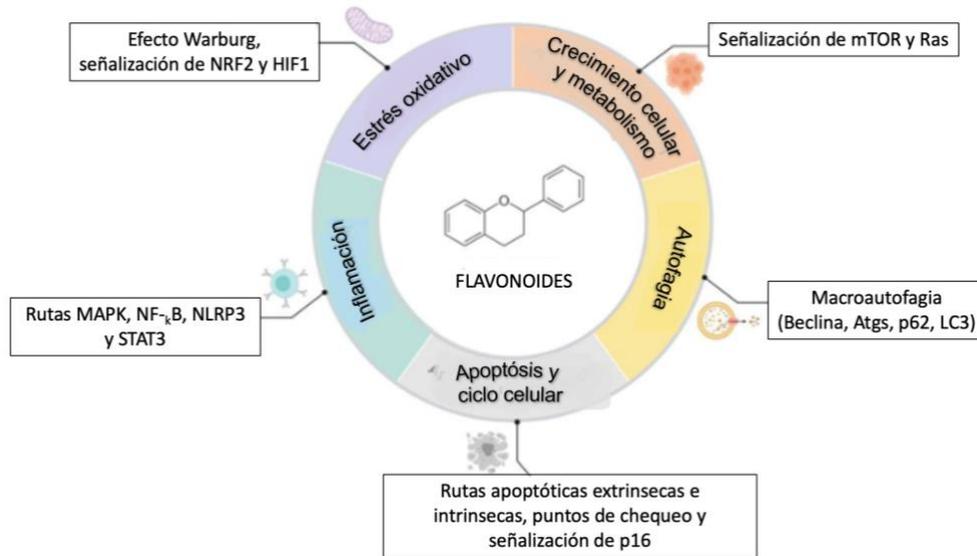


Figura 6. Acciones moleculares de los flavonoides en la señalización celular en el cáncer. Los flavonoides alteran significativamente los procesos biológicos involucrados en el cáncer, incluida la inflamación y la inmunidad, el metabolismo redox, el crecimiento celular, la autofagia, la apoptosis y el ciclo celular. Las vías de señalización relacionadas con estos procesos biológicos, incluyen proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), factor nuclear- κ B (NF- κ B), dominio de pirina del receptor tipo Nod 3 (NLRP3) inflammasoma, transductor de señal y activador de transcripción 3 (STAT3), efecto Warburg, factor 2 relacionado con el factor nuclear eritroide 2 (NRF2), factor 1 alfa inducible por hipoxia (HIF1 α), objetivo mecánico de la rapamicina (mTOR), Ras, macroautofagia, puntos de control del ciclo celular, vías apoptóticas intrínsecas y extrínsecas, y la senescencia, son modulados por los flavonoides en el cáncer. Tomado y modificado de: (68).

Los flavonoides poseen una estructura similar a las hormonas esteroideas particularmente a los estrógenos y han sido ampliamente estudiados por su potencial efecto contra cánceres hormono-dependientes. A las sustancias químicas que tienen actividades similares a las de los estrógenos, como la capacidad de unirse a los ER y modular la expresión de genes regulados por estrógenos, y que son de origen exógeno se les conoce como xenoestrógenos los cuales son producidos sintéticamente y fitoestrógenos los cuales provienen de las plantas (74). Los flavonoides suprimen la migración e invasión, afectan la progresión del ciclo celular e inducen la apoptosis en varias líneas celulares tumorales entre ellas la de cáncer epitelial ovárico humano SKOV-3 (Tabla 4) (77-83). Algunos flavonoides poseen efectos anti-estrogénicos y reducen el riesgo de cáncer de mama (72). Pueden inhibir la actividad de la aromatasa evitando la conversión de andrógenos a estrógenos (73). Un buen ejemplo es la

regulación de la síntesis de la Interleucina-6 (IL-6) en fibroblastos y en líneas celulares hematopoyéticas. La inhibición de la expresión de IL-6 por moléculas parecidas a los estrógenos resulta de factores de transcripción nuclear proveniente de una vía de acción indirecta, la cual involucra a los ERs, pero no a elementos de respuesta sobre el DNA (75). Este mecanismo de transcripción no clásico provee una posible explicación para la mediación de la síntesis de IL-6 por isoflavonas. La concentración de las isoflavonas en la dieta puede inhibir la proliferación celular, tal es el caso de la genisteína y daidzeína quienes disminuyeron la proliferación celular y la síntesis de IL-6 a través, de una vía dependiente del receptor de estrógeno en las líneas de cáncer ovárico humano Caov-3 y OVCAR-3 a concentraciones dietéticamente alcanzables (10^{-8} – 10^{-10} M) (76).

Tabla 4. Efectos antitumorales de algunos flavonoides sobre la línea celular SKOV-3.

Compuesto	Clasificación	Modelo	Efecto	Mecanismo	Referencia
Delfinidina	Antocianidina	SKOV-3	Disminución de la proliferación celular de manera dosis dependiente	Inactivación de la fosforilación de las proteínas AKT, P70S6K, S6 y ERK1/2 en las vías de señalización PI3K/AKT y ERK1/2 MAPK	(77)
Daidzeína	Isoflavona	SKOV-3	Disminución en la migración e invasión celular	Disminuye p-PI3K, p-AKT y p-GSK3 β	(78)
Quercetina	Flavonol	SKOV-3 -Modelo de xenoinjerto	Induce apoptosis	Regula al alza la expresión de DR5 inducida por CHOP	(79)
Galato de epigallocatequina (EGCG)	Polifenol	-SKOV-3-ip1 (sensibles al paclitaxel), -SKOV-3-TR-ip2 (resistente paclitaxel)	Arresto celular en G2/M y S	Reducir la expresión de hTERT y Bcl-2	(80)
Luteolina Miricetina	Flavona	SKOV-3	Apoptosis a través de la señalización de ROS	Inducen actividad de la caspasa-3 e inhiben la actividad de la caspasa-9	(81)
Genisteína	Isoflavonoide	-Cultivo conjunto de macrófagos THP-1 -OCSLC derivados de SKOV-3	-Inhibe la polarización M2 de macrófagos -Disminuye la proliferación celular en SKOV-3	Interrupción del eje de señalización IL-8/STAT3	(82)
Protoapigenona	Derivado de la epigenina (flavona)	SKOV-3	Arresto en las fases S y G2/M y apoptosis	Disminución de la expresión de p-Cdk2, Cdk2, p-Ciclina B1 y Ciclina B1. Disminución en la expresión de Bcl-xL y Bcl-2	(83)

Aunque las líneas celulares positivas a receptores de estrógenos han sido investigadas, los efectos anticancerígenos de las isoflavonas sobre las células de cáncer de ovario no han sido muy explorados. Se conoce que en líneas celulares de cáncer ovárico humano Caov-3 y OVCAR-3 tanto la genisteína como la daizeina modifican la producción de citosinas y reducen la proliferación celular a través de una vía dependiente del receptor de estrógenos (76). Los compuestos polifenólicos a los cuales pertenecen los flavonoides pueden suprimir el desarrollo del cáncer de ovario a través de mecanismos complejos, como la unión competitiva a los ER o sitios de unión de estrógenos o mediante la reducción de la actividad de la enzima aromatasa que convierte los andrógenos en estrógenos (84). En células de cáncer de ovario humano BG-1, la genisteína (10^{-4} M), suprime la capacidad de migración y la EMT inducida por 17β -estradiol (85) a través de una vía dependiente de ER y de la regulación de la señalización de TGF- β (Factor de crecimiento tumoral β). En otro estudio también se reporta la inhibición de la señalización de TGF- β por E_2 , en el cual las MAPKs activadas por E_2 , vía GPER inhiben la activación de proteínas Smad, que son moléculas río abajo de la señalización de TGF- β . Generalmente se conoce que TGF- β juega un papel como supresor del tumor dependiendo del contexto celular y del estadio del tumor (86). La daidzeina (50 μ M) suprime la invasión celular en células de cáncer de mama humano MDA-MB-231, reduciendo la actividad de la MMP-2 (87).

Por último, se ha descrito que el xantomicrool tiene efecto citotóxico/antitumoral al ser evaluado sobre diversas líneas celulares provenientes de tumores humanos; HL60 (IC₅₀ 0.88 μ g/mL), K562 (IC₅₀ 1.69 μ g/mL), HeLa (IC₅₀ 87.5 μ g/mL), A549 (IC₅₀ >100 μ g/mL), Saos-2 (IC₅₀ 0.75 μ g/mL), A2780-cp (IC₅₀ 1.56 μ g/mL), A2780-s (IC₅₀ 0.89 μ g/mL) y HFFF-P16 (IC₅₀ 13.8 μ g/mL) (88), así como el extracto de la hoja de *Dracocephalum kotschyii* Boiss utilizado en Spinal-Z, remedio empleado en la etnomedicina Iraní cuyo ingrediente activo parece ser el xantomicrool. En este mismo estudio se investigaron las propiedades del remedio etnomédico y de las hojas de *D. kotschyii* Boiss en ratones BALB/c machos de seis semanas, inoculados con células WEHI-164 (de fibrosarcoma murino) y se observó que *D. kotschyii* inhibe la tasa de crecimiento tumoral sin pérdida de peso corporal, lo que sugiere una toxicidad mínima (89). Se ha descrito que el xantomicrool tiene efecto anticancerígeno sobre células de

melanoma de ratón B16F10, tanto en la viabilidad celular como en el crecimiento inicial del tumor, el volumen y el peso del tumor y en la angiogénesis. Estos parámetros disminuyeron significativamente en ratones hembra de la cepa C57BL/6 (90). También se han investigado los efectos del xantomicrool en tumores de mama en ratones y en células 4T1 de cáncer de mama triple negativas derivadas del tejido de la glándula mamaria de la cepa de ratón BALB/c, donde se observó que este compuesto disminuyó la viabilidad celular y la capacidad clonogénica, induciendo la detención de G1 y la apoptosis en las células de cáncer de mama *in vitro* y provocando una reducción significativa en el volumen y el peso de los tumores de ratones *in vivo* (91). Aunque las propiedades antioxidantes de las isoflavonas pueden contribuir a los efectos anti-cáncer, este efecto inhibitorio sobre las células de cáncer es más probable que esté relacionado a la capacidad de que las isoflavonas modulen procesos genómicos, tales como RNAm por vías de transcripción mediadas por receptor de estrógenos. También hay evidencia que el xantomicrool puede suprimir la migración celular y la invasión en líneas hepatocelulares humanas después de aumentar la disponibilidad del receptor opioide Mu (92) y prevenir la vascularización *in vivo* del melanoma al interferir en la señalización de la vía PI3K/AKT e inhibiendo la secreción de VEGF (90).

3.5. XANTOMICROL.

3.5.1. Obtención del xantomicrool.

Dentro de las principales clases de flavonoides están las flavonas, su diversidad química depende del número y posición del OH y de los grupos metoxilos (-OCH₃) unidos al esqueleto de la flavona, una de las actividades biológicas de las flavonas con un gran número de -OCH₃ es que son efectivas como agentes quimiopreventivos/quimioterapéuticos en el cáncer. Los flavonoides metoxilados son mucho más estables que los compuestos no metilados, la metilación de los grupos OH del flavonoide aumentan la biodisponibilidad de estos compuestos. En este contexto el xantomicrool, es un atractivo blanco para estudios de prevención de cáncer (88, 93, 94). El xantomicrool (5-Hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-6,7,8-trimetoxi-4H-1-benzopiran-4-ona), es una flavona altamente metoxilada por lo tanto es menos polar que otras flavonas (95), el compuesto utilizado fue aislado de *Brickellia paniculata*. *B. paniculata* es una planta

que pertenece a la familia Asteraceae, el género es originario del continente americano e incluye alrededor de 100 especies, se propaga de forma silvestre desde el sur de Canadá hasta Sudamérica. En México se localizan un gran número de especies y algunas poseen propiedades medicinales; principalmente para tratar problemas gastrointestinales (96). Comúnmente se le conoce como prodigiosa ó *ch'ail pox* (lengua Tzetzal y Tzotzil, Chiapas). En el Atlas de Plantas Medicinales de México se encuentran registradas dos especies del mismo género con el mismo nombre común (prodigiosa) que son *B. cavanillesii* y *B. squirrosa* (<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx>). En la Figura 7, se muestra la estructura química del xantomicrol obtenido de las partes aéreas de *B. paniculata* (extracto metanólico).

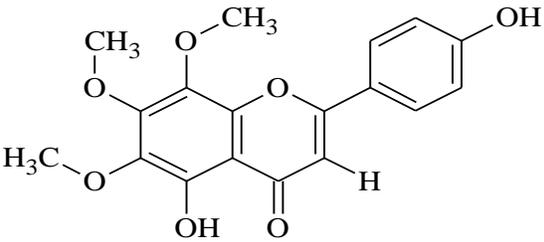
 <p>A photograph of a herbarium specimen of <i>B. paniculata</i>. The plant material is pressed and dried, showing green leaves and small, light-colored flowers. A small label at the bottom left of the specimen reads "G. B. Hinton".</p>	 <p>The chemical structure of Xantomicrol is shown as a benzopyran-4-one derivative. It features a benzopyran core with a carbonyl group at position 4 and a hydrogen atom at position 1. The benzene ring is substituted with a hydroxyl group at position 5 and a 4-hydroxyphenyl group at position 2. The pyran ring is substituted with methoxy groups at positions 6, 7, and 8, and a hydroxyl group at position 3.</p> <p>Xantomicrol (5-Hidroxi-2-(4-hidroxifenil)-6,7,8-trimetoxi-4H-1-benzopiran-4-ona)</p>
Ejemplar de herbario de <i>B. paniculata</i>	Estructura química del xantomicrol

Figura 7. Estructura del xantomicrol extraído de las partes aéreas de *B. paniculata*.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En mujeres el cáncer de ovario ocupa el cuarto lugar de incidencia y el tercer lugar de mortalidad; la mayoría de las pacientes que son diagnosticadas en estadios avanzados tienen una sobrevida de cinco años. Este cáncer es considerado hormono-dependiente y algunos de los receptores que participan en esta patología son ER α , ER β y GPER. La expresión de estos receptores es variable durante la progresión del cáncer de ovario, en general se ha descrito que ER α juega papel de promotor del tumor; mientras que el receptor ER β va disminuyendo su presencia de manera progresiva durante el desarrollo del cáncer por lo que se asocia como un protector. Por otro lado, los hallazgos encontrados del papel que juega el GPER son controversiales; por una parte, se ha descrito que la expresión de este receptor está a la baja en cáncer de ovario cuando se comparó con el tejido benigno. Además, se tiene evidencia que la expresión de éste es mayor la etapa temprana del cáncer, lo que permite establecer la posibilidad de ser utilizado como un pronóstico clínico más favorable. En contraste, existen estudios que asocian a GPER con una supervivencia pobre en pacientes con cáncer de ovario, así como una expresión más frecuente en cánceres de ovario epiteliales que en tumores con bajo potencial maligno.

Las terapias convencionales como la radioterapia, quimioterapia, inmunoterapia y cirugía son poco eficaces para controlar la recurrencia y la metástasis del cáncer de ovario, por lo que, es de suma importancia identificar y evaluar nuevos compuestos que ayuden potencialmente a ser eficientes los tratamientos terapéuticos. Dentro de los compuestos involucrados que han generado interés se encuentran los flavonoides entre los que destaca el xantomicol, una flavona obtenida de *Brickellia paniculata*, de la cual se han descrito en diferentes líneas celulares propiedades antioxidantes, citotóxicas y antitumorales. Por lo tanto, el presente estudio se encaminó a investigar en la línea celular SKOV-3, la participación de este flavonoide en la proliferación y migración celular y determinar si se modifica la presencia de receptores estrógenos ER α , ER β y GPER. El conocimiento obtenido de los efectos del xantomicol sobre la línea celular de cáncer de ovario entorno a la proliferación, migración y presencia de los ERs podría ser de gran

utilidad para establecer a esta flavona como un nuevo blanco terapéutico y por lo tanto nuevas estrategias de tratamiento en el cáncer de ovario.

5. OBJETIVOS.

5.1. Objetivo general.

Evaluar los efectos de la flavona xantomicrool obtenida de *Brickellia paniculata* sobre la expresión de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER y su influencia en la proliferación y migración en línea celular de cáncer epitelial ovárico SKOV-3.

5.2. Objetivos particulares.

- Identificar la expresión endógena de las proteínas de los receptores ER α , ER β y GPER mediante inmunoblot en la línea celular de cáncer epitelial ovárico SKOV-3.
- Evaluar el efecto antiproliferativo del xantomicrool sobre la línea celular de cáncer epitelial ovárico SKOV-3 y obtener su IC₅₀ a través de la técnica colorimétrica de Cristal Violeta.
- Evaluar si el efecto del xantomicrool sobre la línea celular SKOV-3 es un proceso antiproliferativo citostático, mediante el conteo celular con Azul Tripán y evaluar la viabilidad.
- Analizar el efecto del xantomicrool sobre la expresión proteica de los receptores ER α , ER β y GPER, mediante inmunoblot en la línea celular de cáncer epitelial ovárico SKOV-3.
- Analizar si el efecto del xantomicrool sobre la expresión de los receptores de estrógenos influye en la migración celular de SKOV-3, mediante la técnica de ensayo de herida.

6. HIPÓTESIS.

Sí el xantomicol aislado de *Brickellia paniculata* regula a la baja la expresión proteica de ER α y a la alta ER β y GPER, entonces el xantomicol, disminuirá la proliferación y migración en la línea celular de cáncer epitelial de ovario SKOV-3.

7. MATERIAL Y METODOS.

7.1. Cultivo celular.

La línea celular de adenocarcinoma epitelial ovárico SKOV-3 (ATCC® HTB-77) se adquirió de la casa comercial American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Para su desarrollo las células se cultivaron en cajas de polipropileno de 75 cm² (Corning NY), en un medio rico en glucosa (DMEM, Gibco, Life Technologies Corporation, Grand Island, NY) que contenía 5% de suero fetal bovino (SFB), 2 mM/L L-glutamina, 100 IU/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomina (DMEM-FBS suplementado), e incubadas a 37°C en una atmosfera de 5% CO₂. La línea celular SKOV-3 original se mantuvo en cultivo por aproximadamente 15 pases al momento de realizar cada ensayo.

Para el inicio del estudio fue necesario primeramente obtener un grupo de extractos proteicos que indicara la presencia o ausencia de los tres receptores de estrógeno. Para ello, se procesaron extractos proteicos de líneas celulares obtenidas de ATCC, a saber: como control negativo de GPER se utilizó la línea de células fetales de riñón humano (HEK-293, CRL-3216); MCF-7 (HTB-22) y MDA-231 (HTB-26) control positivo y negativo de los receptores de estrógeno, respectivamente. En breve cada línea celular se desarrolló en su medio de cultivo correspondiente, el cual fue suplementado con 10% SFB, 2 mM de L-glutamina (Sigma Chemicals Co), 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina (Gibco, BRL). En la Tabla 5, se describe el patrón de expresión de los ERs y medios de cultivo utilizados.

Tabla 5. Patrón de expresión de los receptores de estrógenos y medios de cultivo utilizados.

LÍNEA CELULAR	ERα	ERβ	GPER	MEDIO DE CULTIVO	REFERENCIA
SKOV-3	+	+	+	DMEM	(47)
HEK-293	-	-	-	DMEM	(97)
MCF-7	+	+	+	DMEM	(98)
MDA-231	-	+	/	Leivovitz's	(98)

7.2. Tratamiento celular.

Las células SKOV-3 se sembraron en placas de cultivo de tejidos para cada uno de los ensayos. Las células adheridas a la superficie de la placa se sometieron a un ayuno de 24 h el cual consistió en colocar medio DMEM-H [(DMEM sin rojo de fenol, Sigma-

Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt, Germany), suplementado con 5% de FBS, previamente tratado con carbón-dextrán (FBS; charcoal-dextran treated, Hyclone, South Logan, UT, EUA)]. Al término, las células se lavaron e inmediatamente fueron expuestas a los diferentes tratamientos dependiendo del ensayo, se emplearon dosis crecientes de xantomicol (de 25 hasta 300 µg/mL). Los diferentes tratamientos se disolvieron en el vehículo DMSO. En cada estudio se utilizó como control el medio DMEM-H y DMSO. Una vez recibido el tratamiento, las células se incubaron por un periodo de 72 h, realizando un re-estimulo cada 48 h con medio fresco.

7.3. Preparaciones de xantomicol.

El xantomicol (pureza > 90%) fue proporcionado por la Dra. Jiménez Arellanes María Adelina de la Unidad de Investigación Médica en Farmacología, Centro Médico Nacional Siglo XXI. La pureza e identidad química del compuesto se corroboró por resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C) Anexo 1. Para su uso, el xantomicol se disolvió con dimetilsulfóxido (DMSO) con agitación constante a una temperatura de 65°C durante 30 min. La concentración final de xantomicol correspondió a 4 µg/µL al 4% de DMSO y se almacenó a -20°C hasta su utilización. Las dosis correspondientes para cada experimento se prepararon con medio DMEM sin rojo de fenol alto en glucosa (SIGMA, EUA), suplementado con 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomicina. Las dosis utilizadas del flavonoide estuvieron dentro del rango reportado en la literatura (89). La concentración final de DMSO no excedió 0.25% a lo largo del estudio y todos los grupos control fueron expuestos a sus respectivas concentraciones de DMSO, como control de vehículo.

7.4. Ensayo de Cristal Violeta para obtener IC₅₀.

Para determinar la IC₅₀ del xantomicol sobre la línea celular SKOV-3, se llevó a cabo el ensayo colorimétrico de Cristal Violeta (CV, Sigma, USA), el cual tiene como objetivo determinar el porcentaje de los núcleos de las células teñidos con CV. Para ello, se sembraron 7 x 10³ células de SKOV-3, por pozo en cajas de 96 pozos (Corning) depositadas en un volumen de 100 µL de medio DMEM con SFB 5%, después de 24 h el

medio fue removido y las células se lavaron con 100 μ L de PBS 0.01M, inmediatamente después, las células recibieron medio DMEM sin rojo de fenol, suplementado con 10% SFB tratado previamente con carbón-dextrán (Hyclone, South Logan, UT, EUA). Al término de 24 h de ayuno, las células recibieron el estímulo de xantomicrool (25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275 y 300 μ g/mL) y DMSO (0.125, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35%). 48 h después las células se re-estimularon con medio fresco. Concluido el periodo de 72 h, las células de cada pozo fueron fijadas adicionando 100 μ L de paraformaldehído al 1.1% (PFA) durante 15 min a temperatura ambiente (TA); después de 3 lavados con agua desionizada y se dejó secar la placa a TA. Una vez que la placa estuvo seca, a cada pozo se le añadió 100 μ L de CV al 0.1 % diluido en ácido fórmico (200 mM, pH 6.0) y se dejó actuar por 20 min. Al término, se retiró el exceso de CV con lavados con agua desionizada y nuevamente la placa se dejó secar a TA. El colorante que se incorporó al núcleo de las células fue solubilizado colocando 100 μ L de una disolución de ácido acético al 10% y la placa se conservó en agitación durante 20 min. Finalmente, la absorbancia de cada pozo se determinó a una longitud de onda de 590 nm en un lector de placas BioTek Synergy HT.

Para la obtención de la IC₅₀, los resultados de absorbancia (Abs) se transformaron a porcentaje de proliferación celular con la siguiente formula: Porcentaje (%) de proliferación celular = (Abs tratamiento) (100%) / (Abs control) y los resultados se analizaron mediante una regresión lineal. Para este estudio se llevaron a cabo tres experimentos por triplicado.

7.5. Ensayo de conteo y viabilidad celular con Azul Tripán.

Para determinar el efecto antiproliferativo citostático del xantomicrool sobre la línea celular SKOV-3 se realizó el ensayo colorimétrico de Azul Tripán al 4% (Gibco, USA). Este estudio tiene como principio la introducción del colorante al citoplasma celular como un parámetro de muerte celular. Para ello, se sembraron 7×10^3 células SKOV-3 en cada pozo, en cajas de 96 pozos en un volumen 100 μ L de medio DMEM-SFB 5%, después de 24 h el medio fue removido y se lavaron con 100 μ L de PBS 0.01M e inmediatamente las células recibieron medio de ayuno por 24 h, al término, las células fueron expuestas a dos concentraciones de xantomicrool, una dosis mayor a la IC₅₀ (250 μ g/mL) y una dosis

por debajo de la IC_{50} (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) siendo la IC_{50} (213.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Como control se utilizaron sus respectivas concentraciones de vehículo (0.2 y 0.25%) durante 72 h (T-72). Al termino, el medio con xantomicrool, se reemplazó cada 48 h con medio fresco (DMEM-SFB 5%). El conteo celular con Azul Tripán se llevó a cabo en el tiempo T-72 y se continuó a las 48, 72 y 96 h post-estimulo. Transcurrido el tiempo de estímulo, las células fueron tripsinizadas con 100 μL tripsina al 0.25% p/v y 1mM de EDTA en PBS 0.01M durante 5 min y la reacción se detuvo con DMEM-SFB 5%. Las células de los tres pozos se recuperaron en microtubos de 0.6 mL y después se centrifugaron a 10,000 rpm por 10 min, al termino, el sobrenadante se decantó y dependiendo del tamaño del botón celular, éste fue resuspendido en un volumen de 30-150 μL DMEM-SFB 5% más 10 μL de Azul Tripán y el contenido del tubo se contó en la cámara de Neubauer. Cada uno de los resultados obtenidos de las diferentes dosis fue dividido entre tres para sacar el promedio de células por pozo, los resultados fueron transformados a porcentaje tomando como el 100% a las células correspondientes al control. Para este estudio se llevaron a cabo tres experimentos por triplicado.

7.6. Estímulo con xantomicrool sobre la expresión de los receptores de estrógenos.

Para determinar el efecto del xantomicrool sobre la expresión de los receptores de estrógenos ($ER\alpha$, $ER\beta$ y GPER), se sembraron células SKOV-3 empleando el esquema descrito en la Tabla 6. El medio utilizado fue DMEM-SFB 5%, después de 24 h el medio fue removido y las células fueron lavadas con 100 μL de PBS 0.01M para posteriormente dejarlas en medio de ayuno por 24 h en medio DMEM-SFB-T 5%, las células fueron expuestas a 200 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de xantomicrool, así como con 0.2 y 0.25% de vehículo durante 72 h.

Tabla 6. Número de células y dosis utilizadas en los ensayos.

Línea celular	Extractos nucleares (Cajas de 100 mm)	Extractos citoplasmáticos (Cajas de 35 mm)	Xantomicro (µg/mL)		DMSO (%)	
			200	250	0.2	0.25
SKOV-3	1.5 x 10 ⁶	5 x 10 ⁵	200	250	0.2	0.25
HEK-293	-----	6 x 10 ⁵	-----	-----	-----	-----
MCF-7	3 x 10 ⁶	-----	-----	-----	-----	-----
MDA-231	3 x 10 ⁶	-----	-----	-----	-----	-----

7.7. Extractos proteicos e inmunodetección de los receptores de estrógenos.

7.7.1. Extracto proteico nuclear.

Concluido el tiempo de estímulo, se procedió a la extracción de proteínas nucleares utilizando la metodología de Schreiber (99) con algunas modificaciones. Primeramente, las células se lavaron con PBS 0.01 M frío, y posteriormente se lisaron con un amortiguador hipotónico (amortiguador A), el cual contiene HEPES 10 mM pH 7.6, cloruro de magnesio 1.5 mM, cloruro de potasio 10 mM, NP-40 0.5%, fluoruro de sodio 1 mM, ditiotreitolo 0.5 mM, ortovanadato de sodio 1 mM y complete mini 1X Roche. Las células se desprendieron de la caja utilizando un raspador y el lisado se colocó en tubos de 1.5 mL. Los tubos se mantuvieron con agitación constante a una temperatura de 4°C durante 15 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 7,000 rpm por 1 min a TA; trascurrido el tiempo, el sobrenadante se decantó y el botón celular se resuspendió en amortiguador B, el cual contiene: RIPA, "complete mini" 1X, fluoruro de sodio 1 mM y ortovanadato de sodio 1 mM. Los núcleos se lisaron durante 30 min a 4°C con agitaciones vigorosas cada 5 min; posteriormente, para recuperar el sobrenadante, los lisados se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C durante 10 min y se conservaron a -70°C hasta su análisis.

7.7.2. Extracto proteico total.

Concluido el tiempo de estímulo con xantomicro y DMSO, se procedió a la extracción de las proteínas, para ello se utilizó el amortiguador de lisis RIPA (Radioimmunoprecipitation Assay Buffer), compuesto por 1% Igepal, 0.4 Deoxycolato, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 5 mM EDTA, 0.14 M NaCl y 0.01M PMSF. Se agregaron dos inhibidores de proteasas (Complete mini de Roche; Diagnostics, Mannheim, Alemania y

Proteoblock de Fermentas). El procedimiento de extracción de proteínas se realizó a 4°C. Brevemente, las células se lavaron 2 veces con PBS 0.01 M frío e inmediatamente se colocó el amortiguador de lisis y las células se desprendieron de la caja mediante un raspado; el lisado se colocó en tubos de 1.5 mL y se agitó vigorosamente en vortex cada 2 min hasta completar 10 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 13,000 rpm por 10 min. El precipitado se decantó y el sobrenadante se conservó a -70°C hasta su análisis.

7.7.3. Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

La concentración de proteína en los diferentes extractos de los cultivos celulares se determinó mediante el método Bradford. Para la curva estándar se utilizó albumina sérica bovina (2, 4, 8, 12, 16 y 20 µg/mL). Esta técnica se basa en el cambio de coloración del azul de Coomassie G250 en respuesta a diferentes concentraciones de proteínas. Este compuesto interacciona con los residuos de aminoácidos básicos (principalmente arginina) y aromáticos provocando un cambio de coloración del rojo al azul, el cual se cuantifica a una absorbancia de 590 nm (100). Cada una de las muestras se cuantificó por duplicado.

7.7.4. Inmunodetección de ER α y ER β .

Una vez determinada la concentración de proteínas de cada uno de extractos nucleares, estos se analizaron mediante una electroforesis SDS-Poliacrilamida al 7.5%, para ello se aplicaron por carril 20 y 60 µg de proteína para ER α y ER β , respectivamente. Previo al corrimiento electroforético, cada muestra se desnaturalizó calentándose a 37°C durante 15 min en presencia de β -Mercaptoetanol. La electroforesis se llevó a cabo a 100V y se dejó correr hasta que el frente de azul de bromofenol llegó al borde. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas PVDF-FL (Immobilon®-FL Massachusetts EUA) por medio de transferencia húmeda a 120 mA durante 2 h a 4°C. Inmediatamente la membrana se incubó con amortiguador de bloqueo (blocking buffer, Li-COR, USA) durante 1 h con agitación a TA. Al termino, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios Anti-ER α D8H8 (1:4000; cat. no. 8644; Cell Signalling Technology. Danvers, MA EUA) y Anti- ER β 68-4 (1:5000; cat. no. 05-824;

Merck Millipore). Como control de carga se detectó la expresión de POLII con anti-POLII H-224 (1:500; cat. no. SC-9001; Santa Cruz, Biotechnology, Inc.); diluidos en la misma solución de bloqueo, se incubaron toda la noche con agitación a 4°C. Al terminó la membrana se lavó 4 veces con amortiguador Tris salino (TBS) con 0.1% de Tween-20 (TBS-T) con cambios cada 5 min. Finalmente, la membrana se incubó con los anticuerpos secundarios acoplados a IgG de conejo (IRDye TM-800-conjugated anti-rabbit) y a IgG de ratón (IRDye TM-680-conjugated anti-mouse) a una dilución 1:15,000. Estos anticuerpos se diluyeron en TBS-T. La incubación de anticuerpos secundarios fue durante 1 h a TA con agitación y protegidos de la luz. Al término, se repitieron los lavados con amortiguador de fosfatos 0.01M (PBS) que contenía 0.1% de Tween-20 (PBS-T). Los extractos nucleares de MCF-7 se utilizaron como control positivo de ER α (8 μ g) y ER β (45 μ g) y el de MDA-MB-231 como control negativo de ER α . Las proteínas específicas se visualizaron con el sistema de imagen infrarrojo Odyssey CLx (Gene Company, EUA) y fueron analizadas por el Software Image Studio v2.1 (LI-COR). Para confirmar los resultados cada experimento se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones.

7.7.5. Inmunodetección de GPER.

Una vez determinada la concentración de proteína de los distintos extractos celulares, 45 μ g proteína se analizaron por electroforesis SDS-Poliacrilamida al 10%. Para ello, el homogenizado proteico se desnaturalizó calentándolo a 37°C durante 30 min en presencia de β -Mercaptoetanol. La electroforesis se llevó a cabo a 100V y se dejó correr hasta que el marcador de 25 kD llegó al borde. Una vez concluida la electroforesis, las proteínas presentes en el gel se transfirieron a membrana PVDF-FL, utilizando una cámara de transferencia Mini-Trans-Blot (Bio-Rad, Hercules, CA) a 20 V durante 90 min. La membrana se incubó con amortiguador de bloqueo Li-COR durante 1 h a TA y al termino se incubaron con los anticuerpos primarios, anti GPER generado en conejo a una dilución 1:650 (Abcam, Cambridge, MA) y anti-GAPDH generado en ratón a una dilución 1:10,000; (Millipore, Temecula CA, EUA) diluidos en amortiguador de bloqueo Li-COR, durante toda la noche a 4°C con agitación constante. Al terminó la membrana se lavó 4 veces con TBS-T con cambios cada 5 min. Finalmente, la membrana se incubó con los anticuerpos secundarios acoplados a IgG de conejo (IRDye TM-800-conjugated anti-

rabbit) y a IgG de ratón (IRDye TM-680-conjugated anti-mouse) a una dilución 1:15,000. Estos anticuerpos se diluyeron en TBS-T. La incubación de anticuerpos secundarios fue durante 1 h a TA con agitación y protegidos de la luz. Al término, se repitieron los lavados con PBS-T. Como control positivo de la expresión de GPER se utilizó extracto de cerebro de ratón y como control negativo extracto de células HEK-293. La expresión de GAPDH se utilizó como control interno para mostrar que la concentración de las muestras fuera igual. Las proteínas específicas se visualizaron con el sistema de imagen infrarrojo Odyssey CLx (Gene Company, EUA) y fueron analizadas por el Software Image Studio v2.1 (LI-COR). Para confirmar los resultados, cada experimento se realizó por triplicado bajo las mismas condiciones.

7.8. Ensayo de migración celular.

Para el desarrollo de los ensayos de migración celular se sembraron 1.5×10^4 células en cajas de 12 pozos y se cultivaron hasta alcanzar una confluencia de 90%. Después de 24 h de ayuno, la monocapa de células se hirió con extremo cuidado usando la punta de una pipeta de 100 μ L y las células desprendidas se eliminaron lavando con PBS (101). Posteriormente, los cultivos en monocapa heridos fueron expuestos a los siguientes tratamientos: Control (DMEM-H), vehículo (0.2 y 0.25%), xantomicol (200 y 250 μ g/mL) durante 72 h. Durante este periodo, el medio se reemplazó por medio fresco con los mismos tratamientos cada 48 h. Como control de migración se consideró a las células tratadas únicamente con DMEM-H. Las imágenes de la herida de la monocapa se capturaron a las 0, 24, 48 y 72 h utilizando un microscopio Axiovert 25 (Carl-Zeiss, AG) con un objetivo CP- "Achromat" 10x/0.25 Ph1 (Carl-Zeiss AG) y una cámara fotográfica digital Power Shot A580 (Canon, Inc.) equipado con un adaptador de cámara DC150 (Leica, Microsystems GmbH). Las áreas de la herida se analizaron empleando el Software de análisis bioimagen Icy v2.0.3.0 (<http://icy.bioimageanalysis.org>).

7.9. Análisis de resultados.

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado, como estadística descriptiva se utilizó el promedio y el error estándar (E.E.). La comparación entre grupos fue hecha por análisis de varianza de una vía (ANOVA) con prueba post hoc de Dunnett's

utilizando el software GraphPad Prism 6[®] (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).
Un valor de $P < 0.05$ indica diferencia estadísticamente significativa.

8. RESULTADOS

8.1. Expresión endógena de los receptores de estrógenos (ER α , ER β , GPER) en SKOV-3

El estudio de inmunodetección para los receptores de estrógenos nos permitieron identificar las bandas proteicas correspondientes a los pesos moleculares descritos para cada uno de ellos, a saber, el receptor ER α (66 kDa), ER β (59 kDa) y GPER (44 kDa). Este ensayo confirmó que la línea celular de cáncer epitelial ovárico SKOV-3 contiene la proteína de cada receptor y que está presente de manera endógena y diferencial. La figura 8 muestra el patrón representativo del estudio.

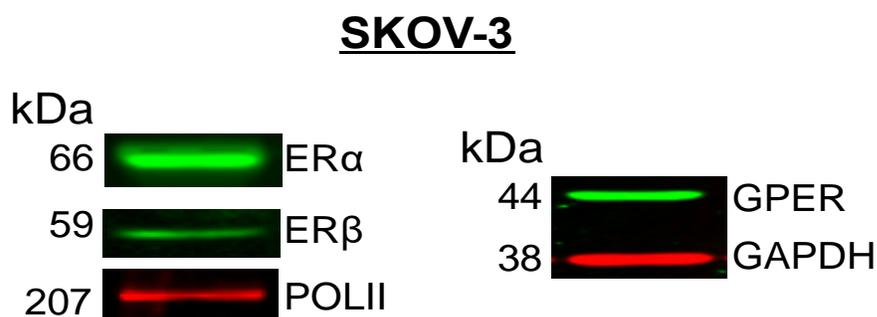


Figura 8. Patrón representativo de la expresión de los receptores ER α , ER β y GPER, en la línea celular SKOV-3. Los resultados del inmunoblot mostraron las bandas correspondientes a los pesos moleculares de cada uno de los receptores de estrógenos. POLII y GAPDH se utilizaron como control de carga de los extractos nucleares y totales, respectivamente.

8.2. Determinación de la IC₅₀ del xantomicrol a través de la proliferación celular.

El análisis de los ensayos de proliferación celular presentes en la figura 9 nos indica que tanto el xantomicrol como el cisplatino inducen una actividad antiproliferativa sobre SKOV-3 de manera dosis dependiente, con una dosis de IC₅₀ para el xantomicrol de $213.94 \pm 10.33 \mu\text{g/mL}$, con un coeficiente de correlación $R = 0.97$, mientras que el cisplatino correspondió a $6.23 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$ con una $R = 0.91$. En la figura inferior se

indica claramente que el vehículo utilizado a las dosis correspondientes (0.125 hasta 0.35%) no mostraron efecto sobre la proliferación celular.

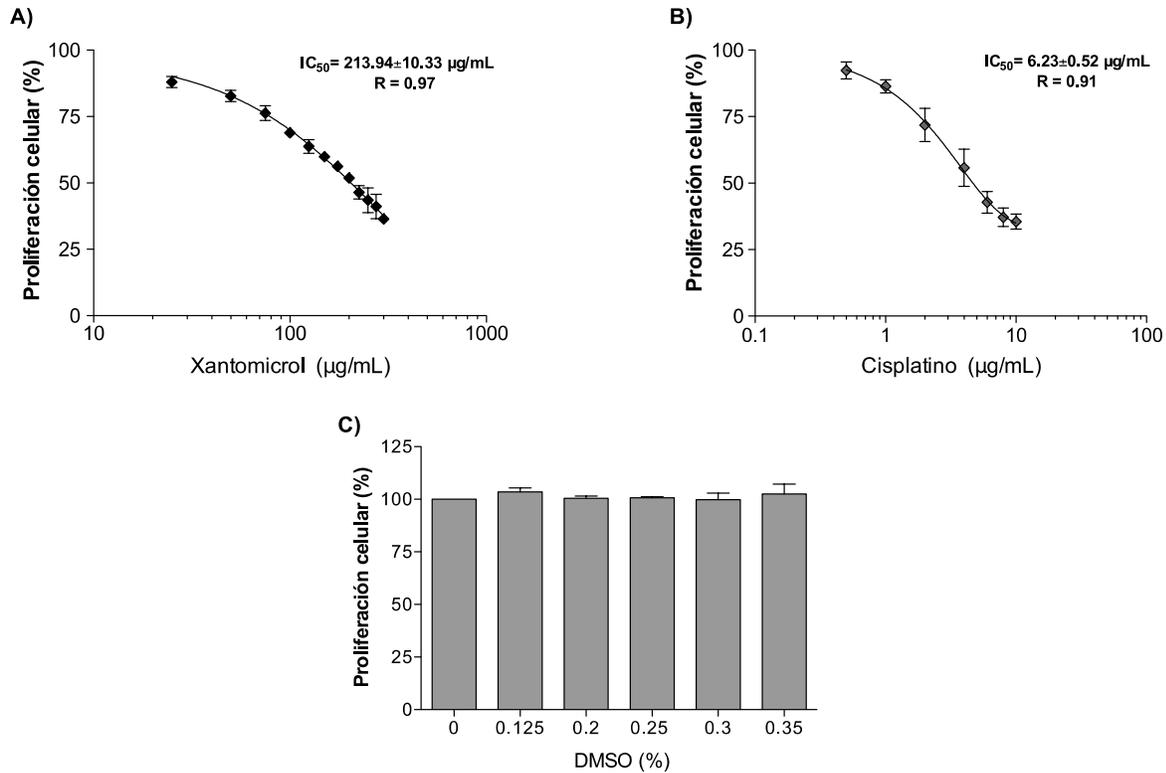


Figura 9. Determinación de la IC_{50} del xantomicrol y cisplatino sobre la línea celular SKOV-3. Las células SKOV-3 se expusieron a dosis crecientes de xantomicrol o cisplatino (cis-diaminodichloroplatino). La IC_{50} del xantomicrol se estimó en relación con el cisplatino, siendo este último nuestro estándar. Tras realizar un análisis de regresión lineal, la IC_{50} para xantomicrol fue de $213.94 \pm 10.33 \mu\text{g/mL}$, con un coeficiente de correlación de $R = 0.97$ (A). Para el cisplatino, la IC_{50} fue de $6.23 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$ con un coeficiente de correlación de $R = 0.91$ (B). El DMSO (vehículo; datos de solubilidad en diferentes concentraciones porcentuales) no afectó la proliferación celular (C). Los resultados representan la media \pm E.E. de tres experimentos independientes.

8.3. El xantomicrol disminuye la proliferación celular.

El efecto antiproliferativo del xantomicrol sobre la línea celular SKOV-3 se presenta en la figura 10. Los resultados obtenidos revelaron que en el tiempo T-72, las dosis de 200 y 250 $\mu\text{g/mL}$ de xantomicrol provocaron una disminución en la proliferación celular en un 45% y 63%, respectivamente ($P < 0.001$), conservando su efecto 48 h post tratamiento, en contraste, únicamente la dosis de 250 $\mu\text{g/mL}$ de xantomicrol fue capaz de

mantener disminuida la proliferación celular por 72 h post tratamiento. Adicionalmente, a las 96 h postratamiento se restableció el porcentaje de proliferación celular a valores similares a T-72. Esta respuesta fue específica y dosis dependiente, e independiente de la presencia de DMSO, lo cual demuestra que el flavonoide es el responsable del efecto antiproliferativo y no el DMSO empleado como vehículo.

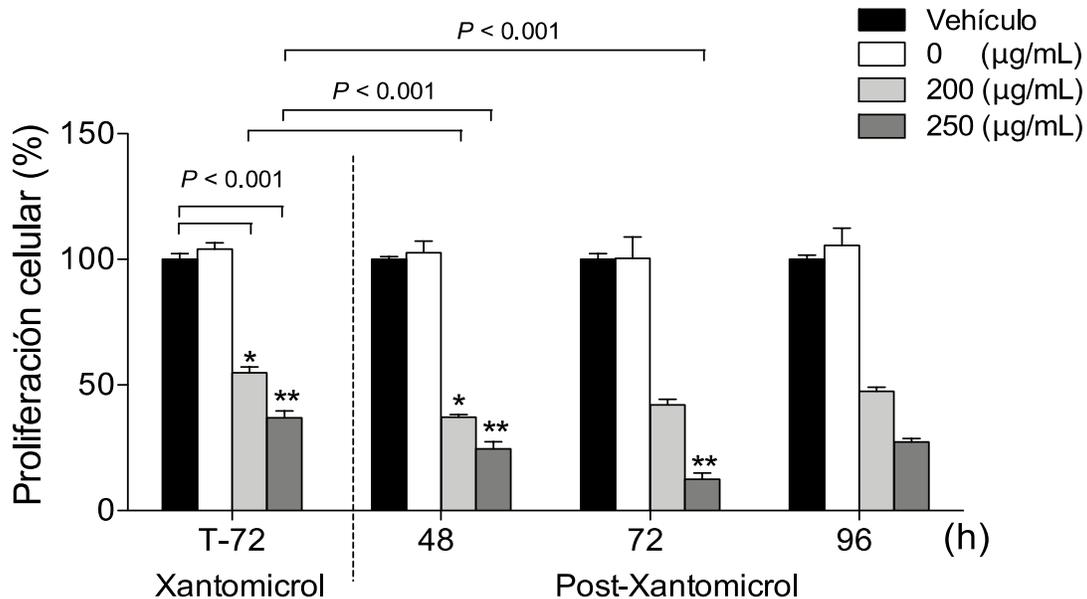


Figura 10. Efecto antiproliferativo del xantomicrol post tratamiento sobre la línea celular SKOV-3. Las células se trataron con xantomicrol a 200 y 250 µg/mL y con sus respectivas concentraciones de vehículo 0.2 y 0.25% durante 72 h (T-72). Al término de las 72 h se retiró el estímulo y se llevó a cabo el conteo celular de T-72 así como de las 48, 72 y 96 h post tratamiento. Las dosis empleadas de xantomicrol 200 y 250 µg/mL redujeron significativamente ($P < 0.001$) la proliferación de células SKOV-3 después de 72 h de incubación. El efecto fue significativo ($P < 0.001$) y de larga duración, ya que la proliferación celular se mantuvo baja hasta 96 horas después de retirar el xantomicrol del medio. Los resultados representan la media \pm E.E de tres experimentos realizados. (*, **) Se encontraron diferencias significativas ($P < 0.001$) luego del ANOVA de una vía seguido de la prueba de Dunnett.

En la Figura 11 se observa la viabilidad celular durante el conteo manual de las células después de cada uno de los tiempos de experimentación antes mencionados. La viabilidad celular no cambio por lo que los efectos observados en la proliferación celular son ocasionados por el xantomicrol y no por la manipulación de las células en cada uno de los experimentos.

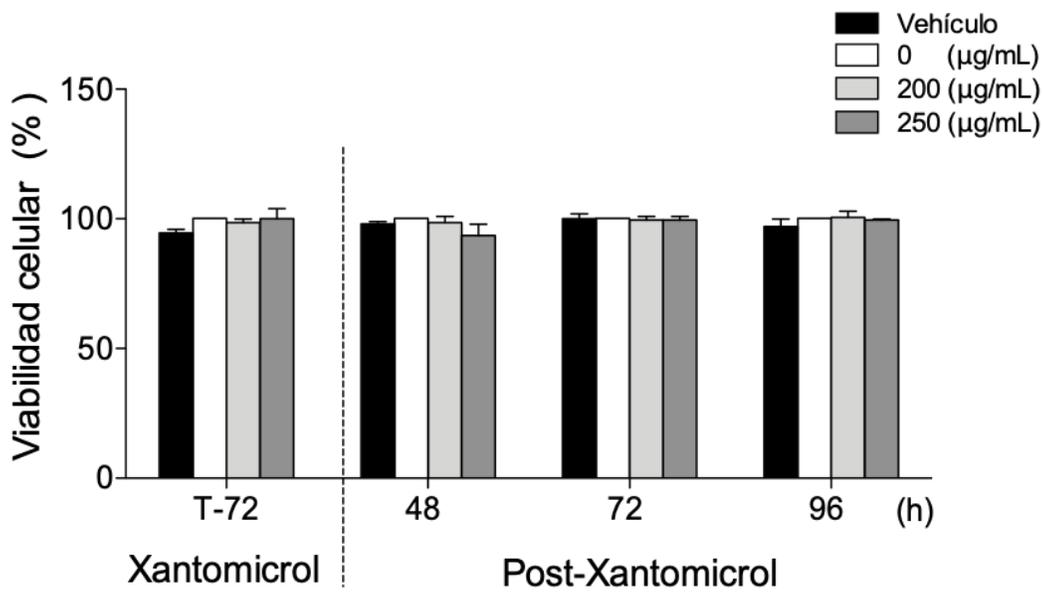


Figura 11. Efecto sobre la viabilidad celular en la línea SKOV-3 durante el conteo manual. Las células se trataron con xantomicrol y DMSO durante 72 h (T-72). Al término de las 72 h se retiró el estímulo y se llevó a cabo el conteo de células no viables T-72 así como de las 48, 72 y 96 h post tratamiento. Para el análisis post estímulo, se consideró como el 100% el conteo de T-72. No hubo diferencia significativa al comparar todas las condiciones. La gráfica representa la media de tres experimentos independientes \pm E.E.

8.4. Efecto del xantomicrol sobre el porcentaje de células viables, concentración de proteína citoplasmática y proteína nuclear.

El análisis de resultados entorno al conteo celular, cuantificación proteica nuclear y total se resumen en la Tabla 7. Los resultados obtenidos revelaron que a las 72 h ambas dosis (200 y 250 µg/mL) de xantomicrol provocaron una disminución significativa ($P < 0.05$) en la proliferación celular en un 47% y 72%, respectivamente, en cuanto a la concentración de proteína nuclear este fenómeno se observó con un 28% y 38%, respectivamente y citoplasmática de 64% solamente con la dosis de 250 µg/mL (Figura 12). Esta respuesta fue específica y dosis dependiente, e independiente de la presencia de DMSO, lo cual demuestra que los efectos en la proliferación celular y concentración proteica son producidos por el flavonoide y no por acción del vehículo utilizado.

Tabla 7. Efecto del xantomicrol sobre proliferación celular, y concentración de proteína citoplasmática y nuclear en la línea celular SKOV-3. A las 72 h de estímulo con xantomicrol (200 y 250 µg/mL) o vehículo (0.2 y 0.25%). Los datos representan la media de por lo menos tres experimentos independientes ± E.E., tomando como 100% el control. * $P < 0.05$ vs control.

Tratamiento	Porcentaje (%)		
	Células/Pozo	Proteína nuclear	Proteína total
Xantomicrol			
(µg/mL)			
C	100	100	100
200	52.85 ± 4.87*	38.41 ± 3.73*	71.89 ± 8.15
250	27.38 ± 4.47*	35.83 ± 4.52*	61.63 ± 3.87*
Vehículo			
0.20%	96.58 ± 17.63	100.85 ± 4.02	94.27 ± 10.17
0.25%	82.82 ± 2.33	97.56 ± 3.20	87.9 ± 2.96

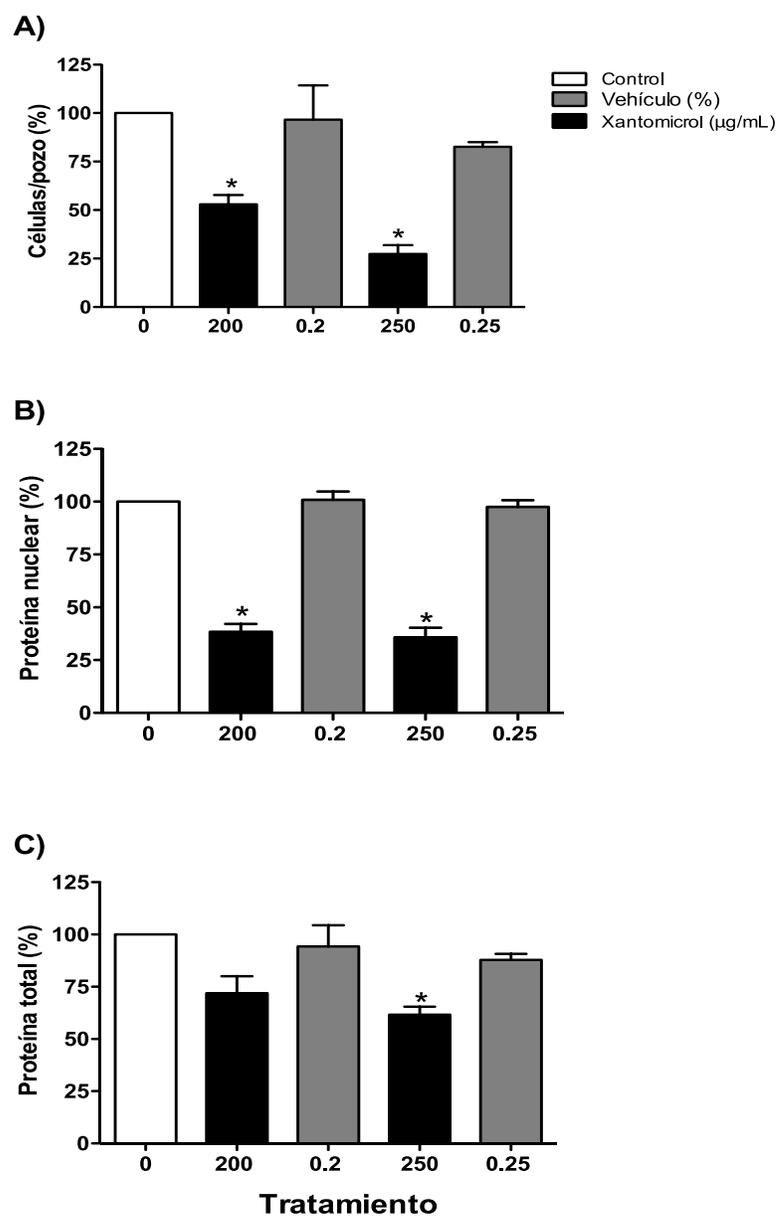


Figura 12. Efecto del xantomicrol sobre la proliferación celular, proteína total y nuclear en la línea celular SKOV-3. Datos correspondientes al % de **(A)** células viables, **(B)** proteína nuclear y **(C)** proteína total en la línea celular SKOV-3 estimuladas por 72 h con xantomicrol (200 y 250 µg/mL) o vehículo (0.2 y 0.25%). Las gráficas representan la media de tres experimentos independientes \pm E.E. * $P < 0.05$. vs control considerado el 100%.

8.5. Regulación diferencial de los receptores de estrógenos en SKOV-3 en presencia de xantomicrol.

Los resultados representativos de los ensayos en los Western blot se encuentran en la figura 13. En ella se aprecia que la banda proteica para el receptor ER α disminuye de forma dosis dependiente al tratamiento de xantomicrol con un 60% y 80%, respectivamente al compararlas con el 100% del control ($P < 0.0001$, Figura 13A). Por el contrario, ER β y GPER aumentaron su expresión con la dosis de 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ siendo ER β en un 105% ($P < 0.01$) y GPER en un 48% ($P < 0.001$), Figura 13B y C, respectivamente.

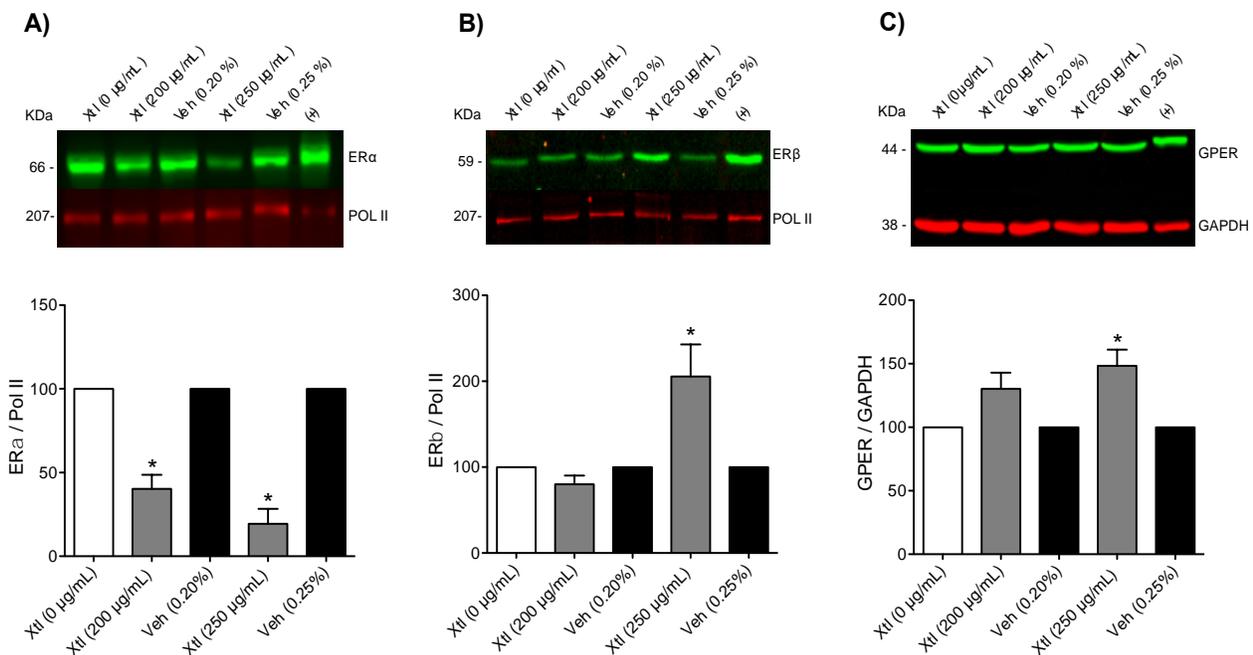


Figura 13. Regulación diferencial del xantomicrol sobre la expresión de los receptores de estrógenos ER α , ER β y GPER en las células SKOV-3. Las células se estimularon con xantomicrol y vehículo durante 72 h. Se muestran los inmunoblots representativos de ER α (A), ER β (B) y la POL II como control de carga, GPER (C) como control de carga GAPDH. (+) corresponde al control positivo, para ER α extractos proteicos nucleares de células MCF-7, ER β extractos proteicos nucleares de células MDA-MB-231 y GPER extractos proteicos de cerebro de ratón. Los resultados se expresan como el porcentaje de unidades relativas densitométricas con respecto al control. Las gráficas representan la media \pm E.E. de tres experimentos independientes. * $P < 0.0001$ (A), 0.01 (B), 0.001 (C) vs control, respectivamente.

8.6. Efecto de la migración celular después del tratamiento con xantomicrol.

El efecto del xantomicrol sobre la migración celular se analizó mediante el ensayo de cicatrización de la herida en la línea celular metastásica SKOV-3. El ensayo se realizó a las 24, 48 y 72 h de estímulo con xantomicrol (Figura 14A). Los resultados se analizaron sobre los porcentajes en el cierre de la herida a lo largo del tiempo desde las 24 hasta las 72 h. Se encontró que las células no tratadas (control y vehículo 0.25%) mostraron porcentajes de cierre de la herida en un rango de entre 80.61%-54.90% y 82.07%-56.69, respectivamente (Tabla 8). Esa capacidad de migración disminuyó con las dos dosis del flavonoide; con 200 µg/mL los porcentajes estuvieron en un rango de entre 85 y 77% y con 250 µg/mL entre 86% y 83% (Tabla 8). Las comparaciones de los porcentajes de los cierres de las heridas provocadas por los tratamientos en un mismo tiempo demostraron que a las 48 y 72 h de estímulo con 200 y 250 µg/mL de xantomicrol son significativamente diferentes al vehículo y al control ($P < 0.0001$, Figura 14B).

Tabla 8. Efecto del xantomicrol sobre la migración celular en la línea celular SKOV-3. Porcentaje del cierre de la herida a las 24, 48 y 72 h de estímulo con xantomicrol y el vehículo. Se consideró el ancho inicial de cada herida como 100%. * $P < 0.0001$ Control y vehículo vs 200 y 250 µg/mL de xantomicrol a las 48 y 72 h.

<i>Tratamiento</i>	<i>Área de la herida (%)</i>		
	<i>Tiempo (h)</i>		
	<i>24</i>	<i>48</i>	<i>72</i>
Vehículo	82.07 ± 1.46	72.53 ± 1.71	56.69 ± 2.32
Xantomicrol 0 (µg/mL)	80.61 ± 1.66	71.28 ± 1.88	54.90 ± 2.69
Xantomicrol 200(µg/mL)	85.43 ± 1.21	79.83 ± 1.23*	77.14 ± 1.34*
Xantomicrol 250(µg/mL)	85.88 ± 1.13	82.89 ± 1.15*	82.98 ± 1.33*

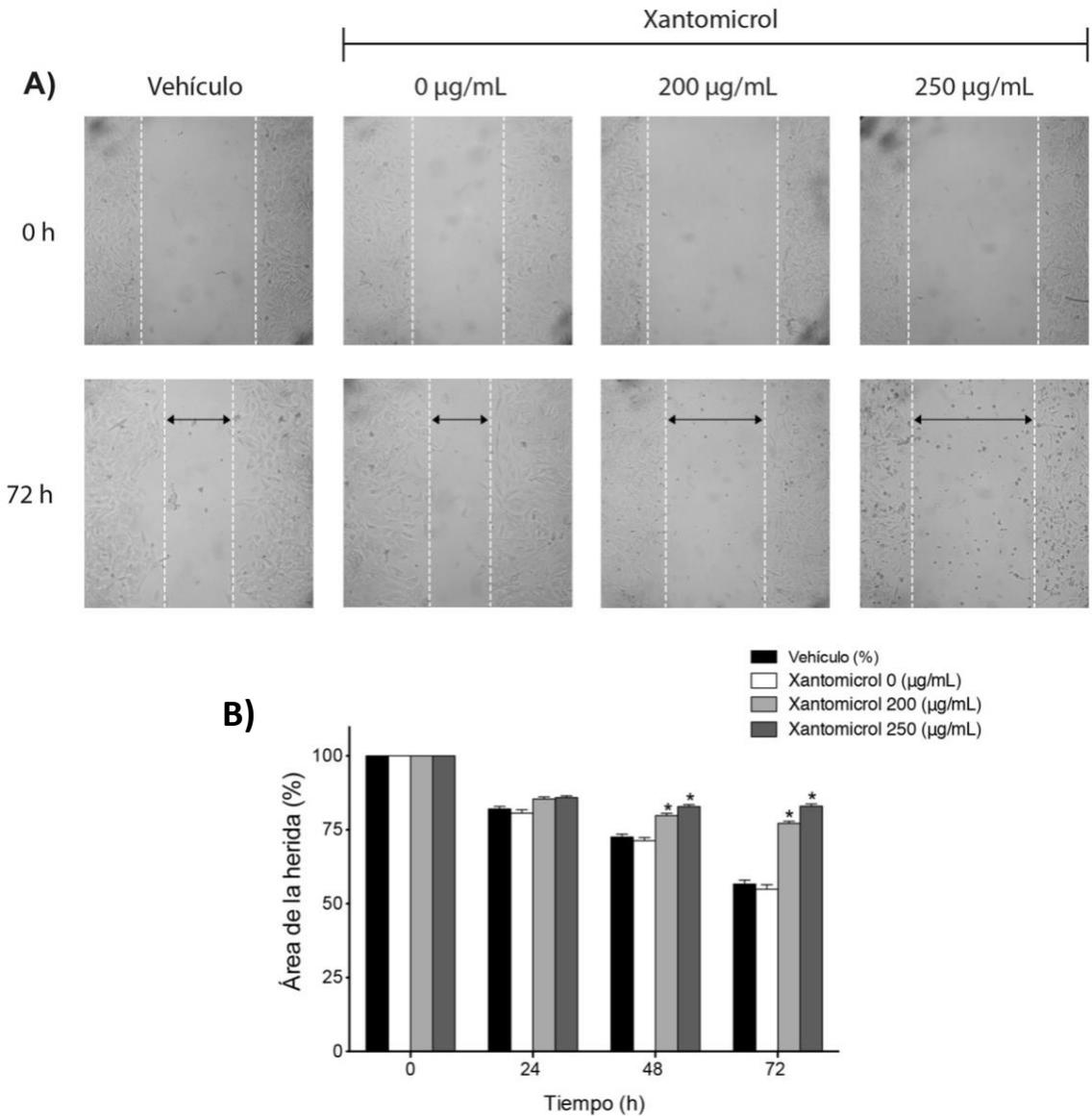


Figura 14. Efecto de xantomicrol sobre la migración celular en la línea celular SKOV-3. Las células se estimularon durante 72 horas con xantomicrol (200 y 250 µg/mL) y vehículo (0.25%) **(A)**. El análisis de los datos de migración se llevó a cabo midiendo el ancho de la herida obtenida a las 0, 24, 48 y 72 h de ocho cuadrantes por pozo, considerando el ancho inicial de cada herida como 100%. * $P < 0.0001$ Control y vehículo vs 200 y 250 µg/mL de xantomicrol a las 48 y 72 h **(B)**. Cada punto de la gráfica se representa como la media de tres experimentos independientes \pm E.E.

9. DISCUSIÓN.

Los resultados demostraron que el xantomicrool tiene un efecto antiproliferativo en la línea celular SKOV-3 a las 72 horas de estímulo, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Jahaniani F., et al., quienes observaron una disminución de la proliferación celular en diferentes líneas celulares cancerosas al ser expuestas al xantomicrool y entre las cuales se destacan las líneas A2780-S y A2780-CP por ser procedentes de carcinoma ovárico, sensibles y resistentes a cisplatino respectivamente (89). Cabe señalar que en este estudio no se analizó el tipo de muerte celular ocasionada por la exposición al flavonoide, por lo que se sugiere realizar estudios que arrojen información sobre los mecanismos de muerte celular, como sería el de la expresión de proteínas relacionadas con autofagia, necrosis y apoptosis; en este último caso podría ser a través de la expresión proteica de la Caspasa-3 ya que esta converge tanto en la vía extrínseca como intrínseca (70).

Por otro lado, observamos que el xantomicrool mantenía disminuida la proliferación celular post-tratamiento hasta 96 horas, lo cual concuerda con la acción de los flavonoides en varios estudios (68, 74,77-83), ya que se ha visto que estos compuestos tienen efectos sobre el ciclo celular como es el caso de la miricitrina y la quercetina, los cuales inducen arresto celular en la fase G1 al regular a la baja la expresión de p-Erk, ciclina D1 y CDK4 en la línea celular de cáncer ovárico A2780/CP70 (102). Por otro lado, la epigenina induce arresto celular en la fase G0/G1 y G2/M, la luteolina en G2/M y miricetina detienen el ciclo celular en las fases G0/G1 y G2/M en células SKOV-3 (81). También se ha demostrado que el xantomicrool interfiere con el proceso carcinogénico de las células de cáncer mamario AT1 a través de arresto en la fase G1 del ciclo celular (91). Por lo que se sugieren estudios posteriores que arrojen información sobre los mecanismos por los cuales se mantiene disminuida la proliferación post tratamiento con xantomicrool en la línea SKOV-3.

En mujeres el cáncer de ovario es considerado como un cáncer sensible a hormonas con expresión de receptores de estrógenos en un 60-100% (103) de aquí la importancia de conocer el patrón de expresión proteica tanto de los receptores clásicos ($ER\alpha$, $ER\beta$) como el acoplado a proteínas G en la línea celular de cáncer epitelial ovárico, SKOV-3. En el presente trabajo se investigó la expresión de los receptores de estrógenos; los

ensayos de inmunodetección demostraron una banda de 66 kDa correspondiente a ER α y 59 kDa para ER β (104) y de 44 kDa correspondiente al peso molecular del receptor GPER (105). Por lo que confirmamos que la línea celular SKOV-3 expresa de manera endógena y diferencial los tres receptores de estrógenos (47) (Figura 8). En un estudio reciente se observó que el xantomicrool tiene efectos en la disminución de la proliferación celular por proceso apoptótico a través del aumento en la expresión de la caspasa 9 esto en una línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231 triple negativa (91); por lo que es de suma importancia seguir con los estudios del xantomicrool en diferentes líneas celulares de cáncer de ovario que tengan patrones diferentes de expresión de receptores de estrógenos.

Los receptores ER α y ER β se expresan tanto en el núcleo como en el citoplasma en SKOV-3 (104), nosotros solo nos dimos a la tarea de detectar la expresión en el núcleo para estos dos receptores, mientras que para GPER la expresión fue del lisado total. Además, de los estrógenos los ERs también muestran afinidad por ciertos componentes vegetales denominados fitoestrógenos (106). Al igual que el cáncer de mama, el cáncer de ovario en mujeres es considerado hormono dependiente, por lo que no es raro suponer que el flavonoide xantomicrool puede ejercer efecto sobre los receptores de estrógenos al igual que los fitoestrógenos genisteina, luteolina y baicaleina (107, 108). Rutherford. et al., observaron la expresión de ER α y ER β en tejido de ovarios sanos humanos y una alta expresión de ER α y ausencia de ER β en tumores metastásicos humanos (60). Estudios previos han demostrado que existe una interacción entre ER α y GPER, en células Ishikawa (carcinoma endometrial humano) el E₂ aumenta la proliferación celular, pero al ser silenciados ER α y GPER a través de RNAi (RNA de interferencia) el efecto del E₂ es bloqueado, sugiriendo que ambas proteínas están involucradas en el proceso de proliferación mediado por E₂ (109). Usando células de cáncer de ovario humano BG-1, Albanito et al., demostraron que tanto ER α como GPER son requeridos para que haya un aumento de la proliferación mediada por E₂. En BG-1, el E₂ regula a la alta la expresión de c-fos, incrementa la fosforilación de ERK1/2 y la proliferación. Estos efectos fueron bloqueados por oligonucleótidos antisentido dirigidos a ER α y GPER, demostrando así que ambos receptores son necesarios para incrementar la expresión de c-fos, fosforilación de ERK1/2 y la proliferación mediada por E₂ (44) Romano y Gorelick, al

comparar las funciones de GPER en diferentes líneas celulares observaron que GPER requiere de ER α para aumentar la proliferación dependiente de E₂ en células de cáncer de ovario humano (BG-1) y células de adenocarcinoma endometrial humano Ishikawa pero no en células de cáncer de mama humano SK-BR-3 (111). Sugiriendo así que la interacción y crosstalk de GPER/ER α depende del contexto celular (110, 111). En este estudio el xantomicrol disminuyó ER α y aumentó la disponibilidad de proteína ER β y GPER (Figura 13). Aunque es probable que tales cambios sean la base de la inhibición inducida de la proliferación y migración por xantomicrol en células SKOV-3 (112) el mecanismo preciso que vincula los eventos debe confirmarse y explorarse posteriormente. Esto es particularmente importante ya que se afirma que la activación de ER α promueve la progresión del cáncer (113) mientras que lo contrario parece para ER β (60, 114-116) y GPER (42, 117).

Uno de los objetivos terapéuticos de los agentes anticancerígenos es la prevención del inicio de metástasis en pacientes de alto riesgo, así como la prevención de metástasis adicionales (71). Los flavonoides representan una fuente importante y poco explorada de agentes anticancerígenos con un gran potencial en el bloqueo de la metástasis. La eficacia anticancerígena pleiotrópica de los flavonoides se puede observar en el proceso de retardar o revertir la metástasis e invasión (71). En células de cáncer de mama humano MDA-MB-231 tratadas con la flavona epigenina, se describe que esta disminuyó la capacidad de proliferación y migración, a través de la inhibición de la vía de señalización ligada a IL-6, que tiene un papel importante en la progresión, invasión y metástasis del cáncer de mama (118). Li, Shengnan. et al., encontraron que el E₂ aumenta la viabilidad celular de diferentes células de cáncer de ovario humano y especialmente en SKOV-3, esta línea celular aumento su capacidad migración y proliferación (119). En este estudio se observó que el xantomicrol inhibió la migración de células SKOV-3 (Figura 14). El mecanismo subyacente a este efecto es desconocido. Previamente Lin Zi-Zhong. et al. (92), revelaron que la migración de la línea celular de carcinoma hepatocelular humano (Huh7) es frenada por xantomicrol después de antagonizar los receptores opioides Mu (MOR). Por lo que, es probable que el xantomicrol mitigue la migración celular tras la inhibición de los MOR, ya que se ha observado que en la línea celular SKOV-3 que expresa MOR, el butorfanol un fármaco agonista-

antagonista de MOR inhibe la proliferación e invasión de células SKOV-3 (120). Aunque los estudios futuros deben abordar este problema, el hecho de que la eliminación de MOR en ratones disminuye el crecimiento y la progresión del cáncer de pulmón (121) y que la sobreexpresión de MOR promueva el crecimiento tumoral y la metástasis al aumentar la proliferación celular, la migración y la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT) en células de cáncer de pulmón humano (122) apoyan esta posibilidad. Aún queda mucho que dilucidar sobre los mecanismos por los cuales el xantomicrool es capaz de disminuir la proliferación y la migración celular, así como el papel que juegan los receptores de estrógenos en estos procesos.

Para esta investigación el xantomicrool fue solubilizado en DMSO, el cual es un disolvente aprótico importante que puede solubilizar una amplia variedad de moléculas polares y no polares. Su aparente toxicidad baja en concentraciones <10% ha permitido su uso ubicuo y aplicación generalizada. También se ha descrito que el DMSO actúa como un inductor de la diferenciación celular y como un secuestrante de radicales libres y se ha visto que tiene efectos relacionados sobre la permeabilidad y la fusión de la membrana (123). Por esta razón, incluimos DMSO en todos los ensayos como control de vehículo a las concentraciones correspondientes de DMSO de cada dosis de xantomicrool, las cuales nunca excedieron el 0.25%, correspondiente a la dosis más alta utilizada en nuestros experimentos. Como grupos control (dosis cero) se utilizó solamente medio de cultivo, por lo que los resultados obtenidos se deben a la acción del xantomicrool y no al vehículo utilizado para su solubilidad así mismo, los efectos observados en la disminución de la proliferación celular son ocasionados por el xantomicrool y no por la manipulación de las células ya que la medición de la viabilidad celular no se vio afectada durante el conteo manual.

10. CONCLUSIONES.

La línea celular SKOV-3 como modelo de cáncer epitelial de ovario, nos permitió considerar al xantomicrool como un potente agente antitumoral. Confirmamos la expresión endógena de los ERs; ER α , ER β y GPER. Mediante ensayos *in vitro* demostramos que la exposición a xantomicrool produce una reducción significativa en la proliferación celular. El xantomicrool fue capaz de modular la expresión de los ERs de manera diferencial; inhibió la expresión del ER α hasta en un 80% e indujo un incremento en la expresión de ER β en 105% y GPER en 48% provocando una disminución en la capacidad de migración celular de un rango del 77-82% después de 72 horas de estímulo. Por lo tanto, los hallazgos encontrados en la presente investigación nos dan la pauta para analizar en próximos estudios las vías de señalización involucradas en este proceso, así como saber si su efecto antiproliferativo se da a través de un proceso apoptótico, necrótico o de autofagia.

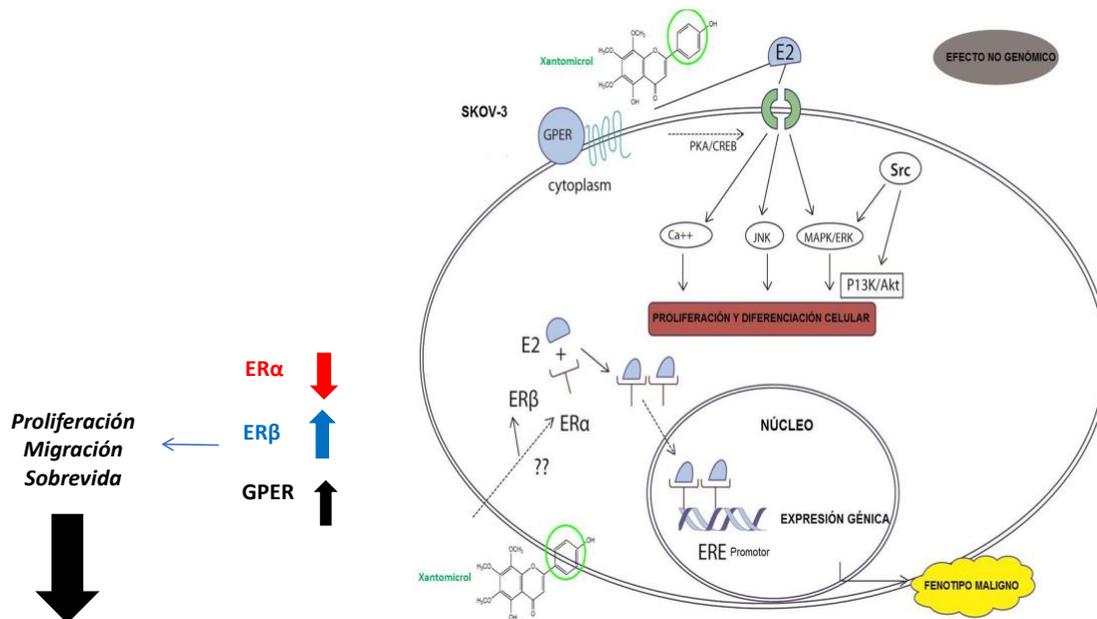
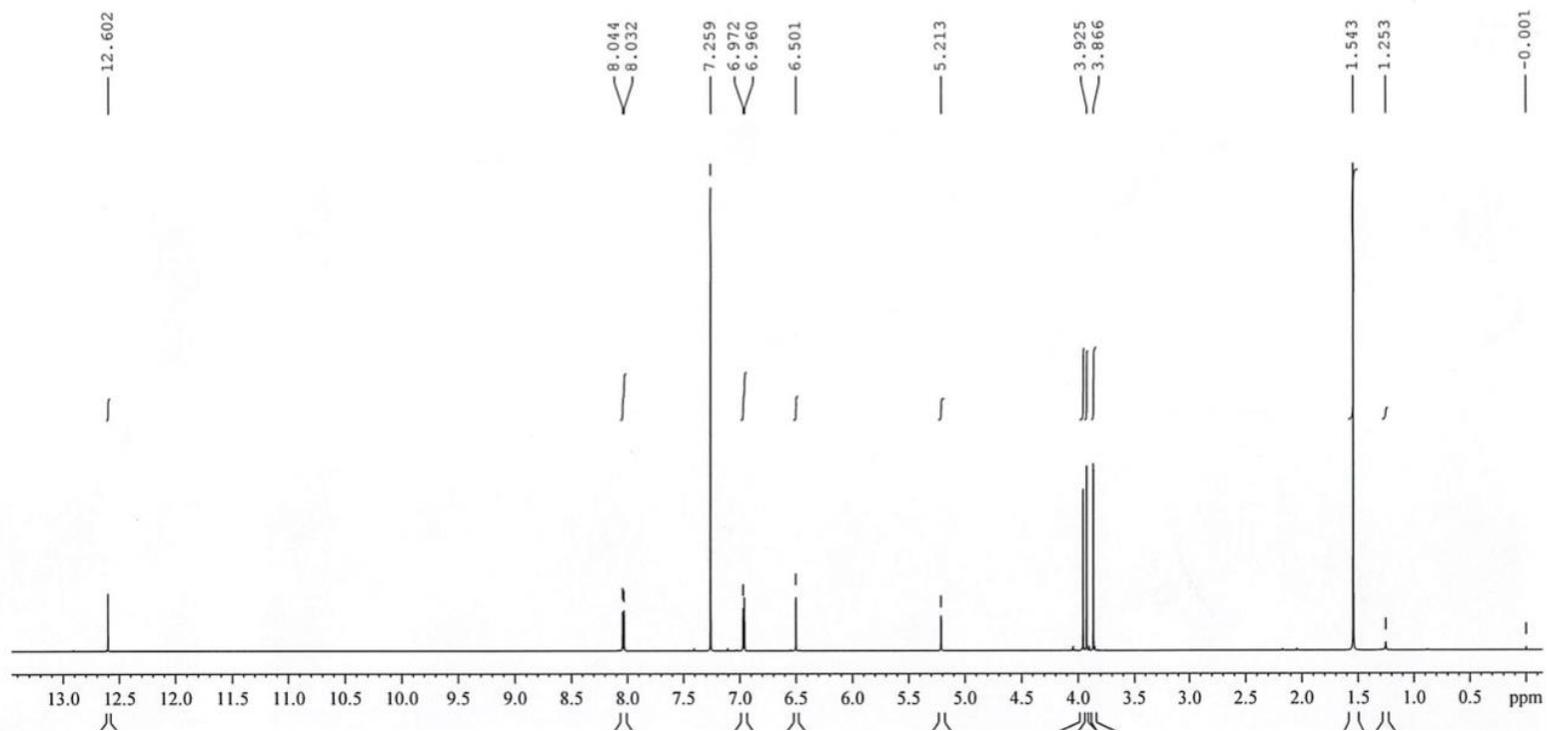


Figura 15. Efecto de xantomicrool sobre la línea celular SKOV-3.

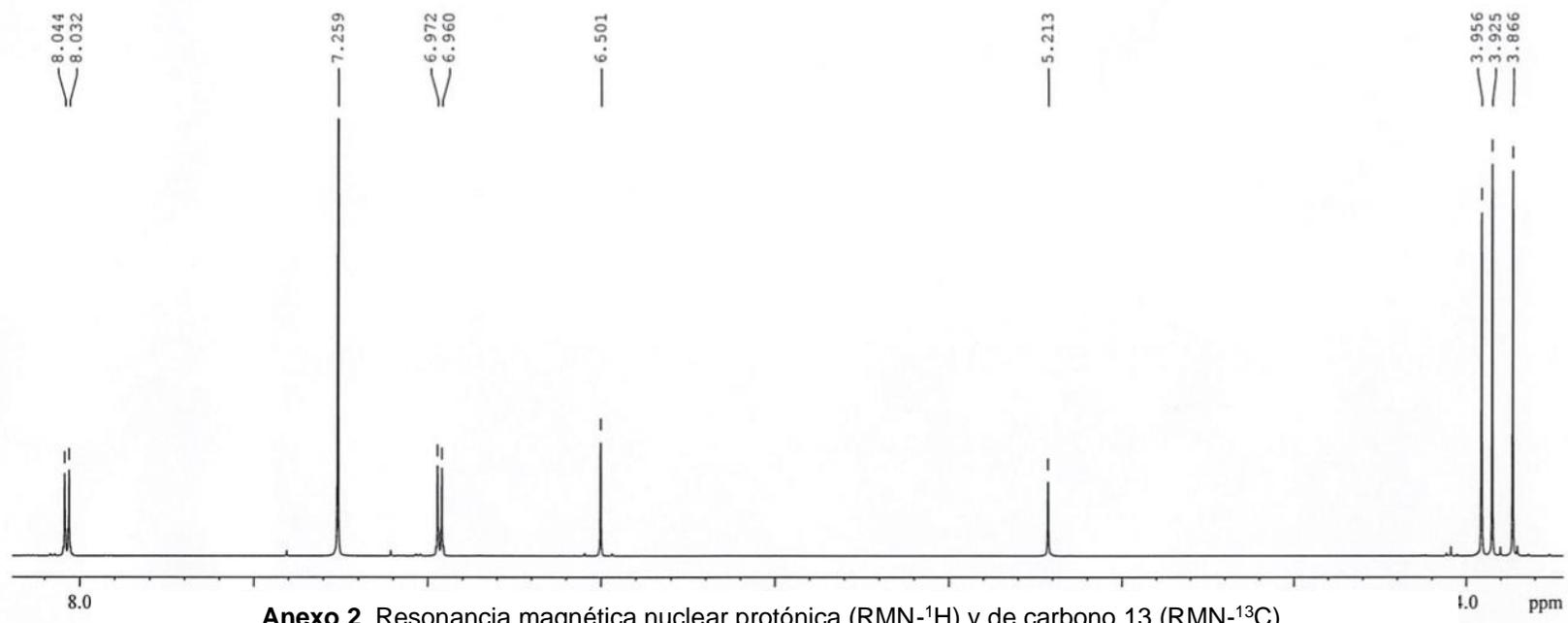
11. ANEXOS.

Entidad solicitante SecTec/IMSS
Instituto de Química, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN)
Bruker AVANCE III HD 700 MHz
Criosonda TCI 700 H-C / N-D de 5 mm
Dra. Adelina Jimenez
Bp1
17-02-20
LURMN-4330_Bp1
LURMN_PROTON CDCI3 /home/nmr/LURMN-SecTec/IMSS NEE 37



Anexo 1. Resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C).

Entidad solicitante SecTec/IMSS
Instituto de Química, Laboratorio de Resonancia Magnética Nuclear (LURMN)
Bruker AVANCE III HD 700 MHz
Criosonda TCI 700 H-C / N-D de 5 mm
Dra. Adelina Jimenez
Bp1
17-02-20
LURMN-4330 Bp1
LURMN_PROTON CDC13 /home/nmr/LURMN-SecTec/IMSS NEE 37



Anexo 2. Resonancia magnética nuclear protónica (RMN-¹H) y de carbono 13 (RMN-¹³C).

12. BIBLIOGRAFÍA.

1. Albanito L, Sisci D, Aquila S, Brunelli E, Vivacqua A, Madeo A, et al. Epidermal growth factor induces G protein-coupled receptor 30 expression in estrogen receptor-negative breast cancer cells. *Endocrinology*. 2008;149(8):3799-808.
2. Hoffman B, Schorge J, Schaffer J. *Ginecología de Williams*. 2 ed ed. McGraw-Hill, editor. México 20122a. ed.
3. Gartner L, Hiatt J. In: *Médica-Panamericana*, editor. *Atlas en color de histología*. 5a ed. México 5a ed 2011.
4. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71:209-49.
5. Hurwitz LM, Pinsky PF, Trabert B. General population screening for ovarian cancer. *The Lancet*. 2021;397(10290):2128-30.
6. Xia C, Dong X, Li H, Cao M, Sun D, He S, et al. Cancer statistics in China and United States, 2022: profiles, trends, and determinants. *Chin Med J (Engl)*. 2022;135(5):584-90.
7. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, et al. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2018;68(4):284-96.
8. Berek JS, Renz M, Kehoe S, Kumar L, Friedlander M. Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *International journal of gynaecology and obstetrics: the official organ of the International Federation of Gynaecology and Obstetrics*. 2021;155 Suppl 1:61-85.
9. Kumar A, Nelson F, Richard N, Mitchell R. *Robbins Patología Humana España*: Elsevier; 8a ed 2008.
10. Gaona-Luviano P, Medina-Gaona LA, Magana-Perez K. Epidemiology of ovarian cancer. *Chin Clin Oncol*. 2020;9(4):47.
11. Kehoe S. FIGO staging in ovarian carcinoma and histological subtypes. *J Gynecol Oncol*. 2020;31(4):e70.
12. Coburn SB, Bray F, Sherman ME, Trabert B. International patterns and trends in ovarian cancer incidence, overall and by histologic subtype. *Int J Cancer*. 2017;140(11):2451-60.
13. Izar B, Tirosh I, Stover EH, Wakiro I, Cuoco MS, Alter I, et al. A single-cell landscape of high-grade serous ovarian cancer. *Nat Med*. 2020;26(8):1271-9.
14. Matulonis UA, Sood AK, Fallowfield L, Howitt BE, Sehouli J, Karlan BY. Ovarian cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2016;2:16061.
15. Kuroki L, Guntupalli SR. Treatment of epithelial ovarian cancer. *BMJ*. 2020;371:m3773.
16. Chen S, Li Y, Qian L, Deng S, Liu L, Xiao W, et al. A Review of the Clinical Characteristics and Novel Molecular Subtypes of Endometrioid Ovarian Cancer. *Front Oncol*. 2021;11:668151.
17. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *The Lancet*. 2019;393(10177):1240-53.
18. Kurman RJ, Shih le M. The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *The American journal of surgical pathology*. 2010;34(3):433-43.
19. Kurman RJ, Shih le M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Human pathology*. 2011;42(7):918-31.

20. Barros RP, Gustafsson JA. Estrogen receptors and the metabolic network. *Cell metabolism*. 2011;14(3):289-99.
21. Langdon SP, Herrington CS, Hollis RL, Gourley C. Estrogen Signaling and Its Potential as a Target for Therapy in Ovarian Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(6).
22. Parker LP, Taylor DD, Kesterson S, Gercel-Taylor C. Gene expression profiling in response to estradiol and genistein in ovarian cancer cells. *Cancer Genomics Proteomics*. 2009;6(3):189-94.
23. Hua H, Zhang H, Kong Q, Jiang Y. Mechanisms for estrogen receptor expression in human cancer. *Exp Hematol Oncol*. 2018;7:24.
24. Leung PC, E.Y A. *The Ovary*. Second ed. Elsevier: S, editor. USA2004.
25. Pietras RJ, Szego CM. Endometrial cell calcium and oestrogen action. *Nature*. 1975;253(5490):357-9.
26. Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS. Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994;91(18):8517-21.
27. Barton M. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER--Clues and questions. *Steroids*. 2012;77(10):935-42.
28. Kolkova Z, Casslén V, Henic E, Ahmadi S, Ehinger A, Jirström K, et al. The G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER/GPR30) does not predict survival in patients with ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2012;5(1):1-11.
29. Bardin A, Boulle N, Lazennec G, Vignon F, Pujol P. Loss of ERbeta expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer*. 2004;11(3):537-51.
30. Brandenberger AW, Tee MK, Jaffe RB. Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(3):1025-8.
31. Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer letters*. 2006;231(2):151-7.
32. Lindgren PR, Cajander S, Bäckström T, Gustafsson J-Å, Mäkelä S, Olofsson JI. Estrogen and progesterone receptors in ovarian epithelial tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 2004;221(1-2):97-104.
33. Chan KK, Wei N, Liu SS, Xiao-Yun L, Cheung AN, Ngan HY. Estrogen receptor subtypes in ovarian cancer: a clinical correlation. *Obstet Gynecol*. 2008;111(1):144-51.
34. Drummond AE, Fuller PJ. Ovarian actions of estrogen receptor-beta: an update. *Semin Reprod Med*. 2012;30(1):32-8.
35. Thomas C, Gustafsson JA. The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy. *Nat Rev Cancer*. 2011;11(8):597-608.
36. Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA. ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? *Steroids*. 2008;73(11):1039-51.
37. Lazennec G, Bresson D, Lucas A, Chauveau C, Vignon F. ER beta inhibits proliferation and invasion of breast cancer cells. *Endocrinology*. 2001;142(9):4120-30.
38. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;7(12):715-26.
39. Prossnitz ER, Barton M. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. *Mol Cell Endocrinol*. 2014;389(1-2):71-83.
40. Wang D, Hu L, Zhang G, Zhang L, Chen C. G protein-coupled receptor 30 in tumor

development. *Endocrine*. 2010;38(1):29-37.

41. Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, Howard T, Qualls CR, Lee SJ, et al. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009;114(3):465-71.

42. Ignatov T, Modl S, Thulig M, Weissenborn C, Treeck O, Ortmann O, et al. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. *J Ovarian Res*. 2013;6(1):51.

43. Zhu CX, Xiong W, Wang ML, Yang J, Shi HJ, Chen HQ, et al. Nuclear G protein-coupled oestrogen receptor (GPR30) predicts poor survival in patients with ovarian cancer. *J Int Med Res*. 2018;46(2):723-31.

44. Albanito L, Madeo A, Lappano R, Vivacqua A, Rago V, Carpino A, et al. G protein-coupled receptor 30 (GPR30) mediates gene expression changes and growth response to 17beta-estradiol and selective GPR30 ligand G-1 in ovarian cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67(4):1859-66.

45. Liu H, Yan Y, Wen H, Jiang X, Cao X, Zhang G, et al. A novel estrogen receptor GPER mediates proliferation induced by 17beta-estradiol and selective GPER agonist G-1 in estrogen receptor alpha (ERalpha)-negative ovarian cancer cells. *Cell Biol Int*. 2014;38(5):631-8.

46. Yan Y, Liu H, Wen H, Jiang X, Cao X, Zhang G, et al. The novel estrogen receptor GPER regulates the migration and invasion of ovarian cancer cells. *Mol Cell Biochem*. 2013;378(1-2):1-7.

47. Yan Y, Jiang X, Zhao Y, Wen H, Liu G. Role of GPER on proliferation, migration and invasion in ligand-independent manner in human ovarian cancer cell line SKOV3. *Cell Biochem Funct*. 2015;33(8):552-9.

48. Sheng ZG, Huang W, Liu YX, Zhu BZ. Bisphenol A at a low concentration boosts mouse spermatogonial cell proliferation by inducing the G protein-coupled receptor 30 expression. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;267(1):88-94.

49. Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med*. 2006;12(8):895-904.

50. Coticchia CM, Curatolo AS, Zurakowski D, Yang J, Daniels KE, Matulonis UA, et al. Urinary MMP-2 and MMP-9 predict the presence of ovarian cancer in women with normal CA125 levels. *Gynecol Oncol*. 2011;123(2):295-300.

51. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J*. 2011;278(1):16-27.

52. Kenny HA, Kaur S, Coussens LM, Lengyel E. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. *J Clin Invest*. 2008;118(4):1367-79.

53. Kenny HA, Lengyel E. MMP-2 functions as an early response protein in ovarian cancer metastasis. *Cell Cycle*. 2009;8(5):683-8.

54. Xu, Jiao, et al. "Mechanism for the decision of ovarian surface epithelial stem cells to undergo neo-oogenesis or ovarian tumorigenesis." *Cellular Physiology and Biochemistry* 50.1 (2018): 214-232.

55. Pepling ME. Follicular assembly: mechanisms of action. *Reproduction*. 2012;143(2):139-49.

56. Okamura H, Katabuchi H. Pathophysiological dynamics of human ovarian surface epithelial cells in epithelial ovarian carcinogenesis. *International review of cytology*. 2005;242:1-54.

57. Auersperg N. Ovarian surface epithelium as a source of ovarian cancers: unwarranted speculation or evidence-based hypothesis? *Gynecol Oncol*.

2013;130(1):246-51.

58. Jeon S-Y, Hwang K-A, Choi K-C. Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;158:1-8.

59. Ho SM. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2003;1:73.

60. Rutherford T, Brown WD, Sapi E, Aschkenazi S, Munoz A, Mor G. Absence of estrogen receptor-beta expression in metastatic ovarian cancer. *Obstet Gynecol*. 2000;96(3):417-21.

61. Bai W, Oliveros-Saunders B, Wang Q, Acevedo-Duncan ME, Nicosia SV. Estrogen stimulation of ovarian surface epithelial cell proliferation. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. 2000;36(10):657-66.

62. Park SH, Cheung LW, Wong AS, Leung PC. Estrogen regulates Snail and Slug in the down-regulation of E-cadherin and induces metastatic potential of ovarian cancer cells through estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol*. 2008;22(9):2085-98.

63. Aherne SA, O'Brien NM. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*. 2002;18(1):75-81.

64. Bremner P, Heinrich M. Natural products as targeted modulators of the nuclear factor-kappaB pathway. *J Pharm Pharmacol*. 2002;54(4):453-72.

65. Fattahi M, Cusido RM, Khojasteh A, Bonfill M, Palazon J. Xanthomicrol: a comprehensive review of its chemistry, distribution, biosynthesis and pharmacological activity. *Mini Rev Med Chem*. 2014;14(9):725-33.

66. Hernandez NE, Tereschuk ML, Abdala LR. Antimicrobial activity of flavonoids in medicinal plants from Tafi del Valle (Tucuman, Argentina). *J Ethnopharmacol*. 2000;73(1-2):317-22.

67. Sartor L, Pezzato E, Dell'Aica I, Caniato R, Biggin S, Garbisa S. Inhibition of matrix-proteases by polyphenols: chemical insights for anti-inflammatory and anti-invasion drug design. *Biochem Pharmacol*. 2002;64(2):229-37.

68. Ponte LGS, Pavan ICB, Mancini MCS, da Silva LGS, Morelli AP, Severino MB, et al. The Hallmarks of Flavonoids in Cancer. *Molecules*. 2021;26(7).

69. Abotaleb M, Samuel SM, Varghese E, Varghese S, Kubatka P, Liskova A, et al. Flavonoids in cancer and apoptosis. *Cancers*. 2019;11(1):28.

70. Kopustinskiene DM, Jakstas V, Savickas A, Bernatoniene J. Flavonoids as anticancer agents. *Nutrients*. 2020;12(2):457.

71. Liskova A, Koklesova L, Samec M, Smejkal K, Samuel SM, Varghese E, et al. Flavonoids in cancer metastasis. *Cancers*. 2020;12(6):1498.

72. Takemura H, Sakakibara H, Yamazaki S, Shimoi K. Breast cancer and flavonoids - a role in prevention. *Curr Pharm Des*. 2013;19(34):6125-32.

73. Pouget C, Fagnere C, Basly JP, Besson AE, Champavier Y, Habrioux G, et al. Synthesis and aromatase inhibitory activity of flavanones. *Pharm Res*. 2002;19(3):286-91.

74. Wang, Xiaoqiang, et al. "Exploring the biological activity and mechanism of xenoestrogens and phytoestrogens in cancers: emerging methods and concepts." *International journal of molecular sciences* 22.16 (2021): 8798.

75. Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, De Groote D, Zangerle PF, Collette J, et al. Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*.

1997;26(1):63-71.

76. Chen X, Anderson JJ. Isoflavones inhibit proliferation of ovarian cancer cells in vitro via an estrogen receptor-dependent pathway. *Nutr Cancer*. 2001;41(1-2):165-71.

77. Lim W, Song G. Inhibitory effects of delphinidin on the proliferation of ovarian cancer cells via PI3K/AKT and ERK 1/2 MAPK signal transduction. *Oncol Lett*. 2017;14(1):810-8.

78. Chan KK, Siu MK, Jiang Y-x, Wang J-j, Leung TH, Ngan HY. Estrogen receptor modulators genistein, daidzein and ERB-041 inhibit cell migration, invasion, proliferation and sphere formation via modulation of FAK and PI3K/AKT signaling in ovarian cancer. *Cancer Cell Int*. 2018;18(1):65.

79. Yi L, Zongyuan Y, Cheng G, Lingyun Z, Guilian Y, Wei G. Quercetin enhances apoptotic effect of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in ovarian cancer cells through reactive oxygen species (ROS) mediated CCAAT enhancer-binding protein homologous protein (CHOP)-death receptor 5 pathway. *Cancer Sci*. 2014;105(5):520-7.

80. Chen H, Landen CN, Li Y, Alvarez RD, Tollefsbol TO. Epigallocatechin gallate and sulforaphane combination treatment induce apoptosis in paclitaxel-resistant ovarian cancer cells through hTERT and Bcl-2 down-regulation. *Exp Cell Res*. 2013;319(5):697-706.

81. Tavsan Z, Kayali HA. Flavonoids showed anticancer effects on the ovarian cancer cells: Involvement of reactive oxygen species, apoptosis, cell cycle and invasion. *Biomed Pharmacother*. 2019;116:109004.

82. Ning Y, Feng W, Cao X, Ren K, Quan M, Chen A, et al. Genistein inhibits stemness of SKOV3 cells induced by macrophages co-cultured with ovarian cancer stem-like cells through IL-8/STAT3 axis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):19.

83. Chang HL, Su JH, Yeh YT, Lee YC, Chen HM, Wu YC, et al. Protoapigenone, a novel flavonoid, inhibits ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Lett*. 2008;267(1):85-95.

84. Sak K. In vitro cytotoxic activity of flavonoids on human ovarian cancer cell lines. *Cancer Sci Res*. 2015;2(1):1-13.

85. Hwang KA, Park MA, Kang NH, Yi BR, Hyun SH, Jeung EB, et al. Anticancer effect of genistein on BG-1 ovarian cancer growth induced by 17 beta-estradiol or bisphenol A via the suppression of the crosstalk between estrogen receptor alpha and insulin-like growth factor-1 receptor signaling pathways. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013;272(3):637-46.

86. Tirado-Rodriguez B, Ortega E, Segura-Medina P, Huerta-Yepez S. TGF- beta: an important mediator of allergic disease and a molecule with dual activity in cancer development. *J Immunol Res*. 2014;2014:318481.

87. Magee PJ, Allsopp P, Samaletdin A, Rowland IR. Daidzein, R-(+)equol and S-(-)equol inhibit the invasion of MDA-MB-231 breast cancer cells potentially via the down-regulation of matrix metalloproteinase-2. *Eur J Nutr*. 2014;53(1):345-50.

88. Olivares A, Santos I, Jiménez-Arellanes M. *Brickellia paniculata* (Mill.) B.L. Rob: A Review of Medicinal Uses and Chemo-Biological Potential. *Int J of Pharmacog Chinese Med*. 2020;4(1):1-7.

89. Jahaniani F, Ebrahimi SA, Rahbar-Roshandel N, Mahmoudian M. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent. *Phytochemistry*. 2005;66(13):1581-92.

90. Ghazizadeh F, Shafiei M, Falak R, Panahi M, Rakhshani N, Ebrahimi SA, et al. Xanthomicrol Exerts Antiangiogenic and Antitumor Effects in a Mouse Melanoma (B16F10) Allograft Model. *J Evid Based Complementary Altern Med.* 2020;2020.
91. Attari F, Keighobadi F, Abdollahi M, Arefian E, Lotfizadeh R, Sepehri H, et al. Inhibitory effect of flavonoid xanthomicrol on triple-negative breast tumor via regulation of cancer-associated microRNAs. *Phytother Res.* 2021;35(4):1967-82.
92. Lin ZZ, Bo N, Fan YC, Wu YT, Yao HL, Chen S, et al. Xanthomicrol suppresses human hepatocellular carcinoma cells migration and invasion ability via Muu-opioid receptor. *J Pharm Pharmacol.* 2022;74(1):139-46.
93. Sergeev IN, Li S, Colby J, Ho CT, Dushenkov S. Polymethoxylated flavones induce Ca(2+)-mediated apoptosis in breast cancer cells. *Life Sci.* 2006;80(3):245-53.
94. Walle T. Methoxylated flavones, a superior cancer chemopreventive flavonoid subclass? *Semin Cancer Biol.* 2007;17(5):354-62.
95. Wollenweber E, Dorr M, Rivera D, Roitman JN. Externally accumulated flavonoids in three Mediterranean *Ononis* species. *Z Naturforsch C.* 2003;58(11-12):771-5.
96. Aguilar A CJ, Chino S, Jáquez P, López ME. . Herbario Medicinal del Instituto Mexicano del Seguro Social. Información Etnobotánica 1994.
97. Santos I. Análisis del efecto de la expresión y activación de los receptores de Gonadotropinas (hFSHR y LHR) sobre el Receptor membranal para estrógenos (GPER) en una línea celular de cáncer de ovario [Tesis Maestría]. Ciudad de México: UNAM; 2015.
98. Cochrane DR, Cittelly DM, Howe EN, Spoelstra NS, McKinsey EL, LaPara K, et al. MicroRNAs link estrogen receptor alpha status and Dicer levels in breast cancer. *Horm Cancer.* 2010;1(6):306-19.
99. Schreiber E, Matthias P, Müller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(15):6419.
100. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal biochem.* 1976;72(1-2):248-54.
101. Segura-Bautista D, Olivares A, Casas-Gonzalez P, Bonilla E, Salazar Z, Perez-Solis MA. GPR30 expression and function in breast cancer cells are induced through a cisacting element targeted by ETS factors. *Oncol Rep.* 2020;43(5):1669-82.
102. Zhang Y, Chen S, Wei C, Rankin GO, Ye X, Chen YC. Flavonoids from Chinese bayberry leaves induced apoptosis and G1 cell cycle arrest via Erk pathway in ovarian cancer cells. *European Journal Med Chem.* 2018;147:218-26.
103. Modugno F, Laskey R, Smith AL, Andersen CL, Haluska P, Oesterreich S. Hormone response in ovarian cancer: time to reconsider as a clinical target? *Endocr Relat Cancer.* 2012;19(6):R255-R79.
104. Chan KK, Siu MK, Jiang Y-x, Wang J-j, Wang Y, Leung TH, et al. Differential expression of estrogen receptor subtypes and variants in ovarian cancer: effects on cell invasion, proliferation and prognosis. *BMC cancer.* 2017;17(1):606.
105. Filardo EJ, Thomas P. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. *Endocrinology.* 2012;153(7):2953-62.
106. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007;87(3):905-31.

107. Kim YS, Choi KC, Hwang KA. Genistein suppressed epithelial-mesenchymal transition and migration efficacies of BG-1 ovarian cancer cells activated by estrogenic chemicals via estrogen receptor pathway and downregulation of TGF-beta signaling pathway. *Phytomedicine*. 2015;22(11):993-9.
108. Shang D, Li Z, Zhu Z, Chen H, Zhao L, Wang X, et al. Baicalein suppresses 17-beta-estradiol-induced migration, adhesion and invasion of breast cancer cells via the G protein-coupled receptor 30 signaling pathway. *Oncol Rep*. 2015;33(4):2077-85.
109. Vivacqua A, Lappano R, De Marco P, Sisci D, Aquila S, De Amicis F, et al. G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF α in estrogen receptor α -positive cancer cells. *Mol Endocrinol*. 2009;23(11):1815-26.
110. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74.
111. Romano SN, Gorelick DA. Crosstalk between nuclear and G protein-coupled estrogen receptors. *Gen Comp Endocrinol*. 2018;261:190-7.
112. Kuo SM. Flavonoids and gene expression in mammalian cells. *Adv Exp Med Biol*. 2002;505:191-200.
113. Choi JH, Lee KT, Leung PC. Estrogen receptor alpha pathway is involved in leptin-induced ovarian cancer cell growth. *Carcinogenesis*. 2011;32(4):589-96.
114. Bossard C, Busson M, Vindrieux D, Gaudin F, Machelon V, Brigitte M, et al. Potential role of estrogen receptor beta as a tumor suppressor of epithelial ovarian cancer. *PloS one*. 2012;7(9):e44787.
115. De Stefano I, Zannoni GF, Prisco MG, Fagotti A, Tortorella L, Vizzielli G, et al. Cytoplasmic expression of estrogen receptor beta (ERbeta) predicts poor clinical outcome in advanced serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2011;122(3):573-9.
116. Zhu J, Hua K, Sun H, Yu Y, Jin H, Feng Y. Re-expression of estrogen receptor beta inhibits the proliferation and migration of ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *Oncol Rep*. 2011;26(6):1497-503.
117. Zhang Q, Madden NE, Wong AST, Chow BKC, Lee LTO. The Role of Endocrine G Protein-Coupled Receptors in Ovarian Cancer Progression. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2017;8:66.
118. Zhao G, Han X, Cheng W, Ni J, Zhang Y, Lin J, et al. Apigenin inhibits proliferation and invasion, and induces apoptosis and cell cycle arrest in human melanoma cells. *Oncol Rep*. 2017;37(4):2277-85.
119. Li S, Pan MH, Lai CS, Lo CY, Dushenkov S, Ho CT. Isolation and syntheses of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones as inhibitors of HL-60 cell lines. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(10):3381-9.
120. Wang B, Li Y, Shen Y, Xu Y, Zhang C. Butorphanol Inhibits the Malignant Biological Behaviors of Ovarian Cancer Cells via Down-Regulating the Expression of TMEFF1. *Onco Targets Ther*. 2020;13:10973-81.
121. Mathew B, Lennon FE, Siegler J, Mirzapioazova T, Mambetsariev N, Sammani S, et al. The novel role of the mu opioid receptor in lung cancer progression: a laboratory investigation. *Anesth Analg*. 2011;112(3):558-67.
122. Lennon FE, Mirzapioazova T, Mambetsariev B, Poroyko VA, Salgia R, Moss J, et al. The Mu opioid receptor promotes opioid and growth factor-induced proliferation, migration and Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) in human lung cancer. *PloS one*. 2014;9(3):e91577.
123. Galvao J, Davis B, Tilley M, Normando E, Duchon MR, Cordeiro MF. Unexpected

low-dose toxicity of the universal solvent DMSO. The FASEB Journal. 2014;28(3):1317-30.