



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE
LA SALUD
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD
BIOQUÍMICA CLÍNICA

TÍTULO

Coexpresión de las metaloproteinasas de matriz (MMP-2, MMP-9 y MMP-8) y el receptor de andrógenos (AR) y su impacto en el pronóstico del cáncer epitelial de ovario

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

MÉDICO CIRUJANO MIGUEL ANGEL ALMARAZ HERNÁNDEZ

TUTOR

DR. ENRIQUE ANTONIO PEDERNERA ASTEGIANO. Facultad de Medicina UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. LAURA ELENA DÍAZ CUETO. Hospital de Ginecología y Obstetricia no. 4 IMSS

DRA. FLAVIA MORALES VÁSQUEZ. Instituto Nacional de Cancerología

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, JUNIO DEL 2023

Firma de tutor

Firma del responsable de la entidad académica

Firma del alumno



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Clasificación del Cáncer Epitelial de Ovario	4
2.2. Etapas clínicas del cáncer epitelial de ovario	5
2.2.1. Tumores serosos limítrofes	7
2.2.2. Carcinomas serosos de bajo grado.....	8
2.2.3. Carcinomas serosos de alto grado.....	8
2.2.4. Carcinomas endometrioides.....	10
2.2.5. Carcinoma mucinoso.....	10
2.2.6. Carcinoma de células claras	11
2.3. Receptores de hormonas esteroides sexuales.....	12
2.3.1. Receptor de Andrógenos.....	13
2.3.2. Receptor de estrógenos	14
2.3.3. Receptor de ER α	15
2.3.4. Receptor de ER β	15
2.3.5. GPER1	16
2.3.6. Receptor de progesterona.....	17
2.4. Metaloproteinasas de Matriz.....	18
2.5. Marcadores tumorales	20
2.6. Supervivencia	22
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
4. PREGUNTA	24
5. HIPÓTESIS	25
6. OBJETIVOS.....	26
6.1. General	26
6.2. Específicos	26
7. MATERIALES Y MÉTODOS	27
7.1. Criterios de Inclusión	27
7.2. Criterios de Exclusión	27
7.3. Criterios de Eliminación	28
7.4. Base de datos Clínicos	28
7.5. Procesamiento de la Muestra	28
7.5.1. Desparafinación y recuperación antigénica.....	29
7.5.2. Inmunohistoquímica	30

7.5.3. Evaluación de Inmunopositividad	31
7.6. Análisis Estadístico	31
8. RESULTADOS.....	33
8.1. Análisis descriptivo	34
8.2. Expresión de receptores de hormonas esteroideas	36
8.3. Expresión de metaloproteinasas de matriz.....	41
8.4. Análisis de asociación	42
8.5. Análisis de supervivencia	43
9. DISCUSIÓN	53
10. CONCLUSIÓN	56
11. BIBLIOGRAFÍA	57

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo de tesis se realizó con el apoyo del Programa de Estudios de Posgrado del CONACHYT que me otorgó una beca para la realización de mis estudios de Maestría.

Este trabajo fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la Universidad Nacional Autónoma de México a través del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, PAPIIT IN223823 y PAPIIT IN208822.

Las muestras de tumores de ovario se obtuvieron en el contexto de los proyectos INCan 019/060/OMI, CEI 1371/19, HMEMyN CEI 006/2022.

Agradezco especialmente a las Dra. Flavia Morales Vásquez y Dra. Elizabeth Rendón Mondragón por el apoyo académico y la selección de las muestras biológicas utilizadas en este estudio.

Agradezco el apoyo recibido para la realización de este proyecto a los técnicos académicos M en CyEA María José Gómora y del P de M en CyEA Esteban Mena, por la asesoría de las técnicas de inmunohistoquímica.

1. RESUMEN

En la actualidad el cáncer de ovario ocupa el octavo lugar a nivel mundial en incidencia y séptimo en mortalidad de las neoplasias diagnosticadas en mujeres. En México es el sexto en incidencia y en mortalidad de todos los cánceres de la mujer. Su letalidad es consecuencia de una detección tardía y a una sintomatología poco específica que se confunde con patologías relativamente frecuentes del sistema gastrointestinal y/o genitourinario. Esto aunado a la ausencia de pruebas de tamizaje y a la quimio resistencia que se presenta en un buen número de casos; son factores que hacen que este cáncer represente un problema de salud pública, y un reto para su diagnóstico y abordaje prematuro que es fundamental para un mejor pronóstico. Por lo cual, es necesario conocer nuevos elementos que favorezcan el *tamizaje* y el diagnóstico oportuno. Estudios previos han demostrado el papel de las hormonas esteroideas sexuales y de sus receptores en el cáncer epitelial de ovario, Asimismo, algunas enzimas como las metaloproteinasas podrían tener una participación importante en diferentes eventos propios de esta patología como son: carcinogénesis, migración. Invasión, angiogénesis, desregulación del ciclo celular, y con ello promover procesos celulares fundamentales para el crecimiento y la progresión tumoral. El objetivo del presente estudio es evaluar la frecuencia de expresión de los receptores de hormonas esteroideas sexuales (receptor de andrógenos, el receptor de estrógenos alfa, el receptor de progesterona) y de las metaloproteinasas MMP-2, MMP-9 y MMP-8 en carcinomas de ovario y asociarlos a las características clínicas y a la sobrevida total de las pacientes

para identificar su impacto como factores pronósticos. Este es un trabajo retrospectivo con un tamaño de muestra de 111 tumores con diagnóstico anatomopatológico de cáncer primario epitelial de ovario, obtenidas del Instituto Nacional de Cancerología (INCan). El manejo de los tejidos fue de acuerdo con los protocolos establecidos para los bancos de tumores internacionales y fueron aprobados por los Comités de ética de las Instituciones y del hospital participantes. Las metaloproteinasas, MMP-2, MMP-8 y MMP9 están presentes en el epitelio y el estroma de los tumores de ovario. MMP-2 se encuentra con mayor frecuencia en el estroma de los tumores epiteliales de ovario. Los receptores a hormonas sexuales: ER α , PR y AR están presentes en el epitelio de los distintos tipos de tumores epiteliales de ovario. La coexpresión del receptor de andrógenos con las metaloproteinasas está asociada a un peor pronóstico en la sobrevida global de estas pacientes, lo que permite proponer a esta combinación como un factor pronóstico de sobrevida en pacientes con cáncer epitelial de ovario..

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de ovario es la segunda neoplasia ginecológica más común en los países desarrollados y la tercera neoplasia ginecológica más común en los países en desarrollo (el cáncer de cuello uterino es el más común) [1]. Asimismo, es la segunda neoplasia maligna ginecológica más común y la causa más común de muerte por cáncer ginecológico en los Estados Unidos. La edad promedio en el momento del diagnóstico de cáncer de ovario en los Estados Unidos es de 63 años [2].

En el mundo más de 295.000 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de ovario en 2018 y casi 185.000 murieron a causa de esta enfermedad [3]. En los países de ingresos altos, es el tercer cáncer ginecológico más común. Por otra parte, en países de bajos ingresos el cáncer de cuello uterino es el cáncer ginecológico más común, seguido del carcinoma de ovario. En los Estados Unidos, hay aproximadamente 21,400 casos nuevos y 13,800 muertes relacionadas cada año por cáncer de ovario, lo que la convierte en la segunda neoplasia maligna ginecológica más común, la causa más común de muerte por cáncer ginecológico, y la quinta causa principal de muerte por cáncer en mujeres, los cánceres de pulmón y bronquios, mama, colon y páncreas son más frecuentes [4].

Según los datos de la base de datos nacional de cáncer de los Estados Unidos de vigilancia, epidemiología y resultados finales (SEER), aproximadamente el 1.3 por ciento de las mujeres en los Estados Unidos serán diagnosticadas con cáncer de

ovario en algún momento de su vida [5]. Las tasas de incidencia son más altas en las mujeres blancas (11,9 por 100.000) que en las mujeres hispanas (10,3 por 100.000), asiáticas (9,4 por 100.000), negras (9,2 por 100.000) o india americanas (8,1 por 100.000). 100.000). Las tasas de incidencia han ido disminuyendo: de 16,3 por 100.000 mujeres en 1975 a 10,1 por 100.000 en 2016. [6].

En México no existen bases de datos estadísticas sobre esta patología, sin embargo, se estima que la incidencia del cáncer de ovario es menor a la del cáncer de mama, cervicouterino, tiroides, colorrectal y de útero. Es decir, es el tercero en incidencia de los cánceres ginecológicos. Para la mortalidad su incidencia es menor que la del cáncer de mama, cervicouterino, hígado, colorrectal y estómago, esto significa que de los cánceres ginecológicos es el segundo de mayor mortalidad [7].

La historia natural del cáncer de ovario se conoce hace más de 150 años, pero en este periodo no se ha modificado su mortalidad, aunque sí, su incidencia en consecuencia de herramientas empleadas para su diagnóstico. En las dos últimas décadas hubo mejorías en la supervivencia global a cinco años, que se ha incrementado de 30 a 50% con tratamientos con cisplatino; y de 20 a 25% en mujeres con tumores avanzados. En Europa, más de un tercio de las mujeres con cáncer de ovario vive cinco años posteriores a su diagnóstico [8]. La pobre supervivencia se relaciona con el retraso en el diagnóstico que hace que la mayoría de los casos se encuentre en etapas avanzadas de la enfermedad Es de resaltar que se trata de una neoplasia que reacciona favorablemente a la

quimioterapia sistémica mayor a 80% de los casos, cuando se acompaña de cirugía cito-reductora óptima. A pesar de la respuesta completa con quimioterapia de primera línea, la recidiva por cáncer de ovario del tipo epitelial se observa en más de 50% de las mujeres [9].

2.1. Clasificación del Cáncer Epitelial de Ovario

La clasificación del cáncer epitelial de ovario se establece mediante tres principales criterios, el molecular, el genético y el histopatológico, siendo este el último el más utilizado debido a su practicidad para realizar el diagnóstico y menor costo económico. En la clasificación, se toman en cuenta las características histológicas del tejido, como estructura tisular, morfología epitelial, diferenciación celular, número de mitosis, atipias nucleares, infiltración linfocitaria, entre otras. De acuerdo a ellos los tumores epiteliales de ovario los podemos dividir en benignos, limítrofes y carcinomas. Los principales subtipos histológicos de los carcinomas que se presentan dentro de la población se categorizan de acuerdo a su incidencia, siendo los carcinomas serosos los más frecuentes, de los cuales los serosos de alto grado (HGSC, por sus siglas en inglés) representan hasta el 60%- 70% de los casos, seguidos de los tumores endometrioides con un 10%, tumores células claras 10%, seroso de bajo grado (LGSC) en un 5-10%, y mucinosos con 3-4%, sin embargo, la incidencia de cada uno de estos varía de acuerdo a diversos factores tales como, país de origen, dieta, sedentarismo, etnia, entre otros [10].

2.2. Etapas clínicas del cáncer epitelial de ovario

En 2014, el Comité de Oncología Ginecológica de la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, FIGO, revisó la estadificación para incorporar el cáncer de ovario, de las trompas de Falopio y peritoneal en el mismo sistema [11, 12]. Aunque las tomografías computarizadas pueden delinear la diseminación intraabdominal de la enfermedad hasta cierto punto, los cánceres de ovario, de las trompas de Falopio y peritoneales se deben estadificar quirúrgicamente. Los hallazgos quirúrgicos son fundamentales el diagnóstico histológico preciso, el estadio y, por lo tanto, el pronóstico del paciente [13, 14, 15].

En pacientes seleccionados con enfermedad en etapa avanzada, puede ser apropiado iniciar la quimioterapia antes de la intervención quirúrgica, y en estos casos debe haber una confirmación histológica o citológica del diagnóstico antes de comenzar la quimioterapia de inducción [16, 17, 18]. Para la estadificación se considera, el sitio primario del tumor, las vías de drenaje linfático y otros sitios metastásicos.

1. El sitio primario: Los tumores epiteliales ováricos pueden surgir dentro de endometriosis o inclusiones corticales del epitelio mülleriano, probablemente una forma de endosalpingiosis. Éstos incluyen carcinomas endometrioides de bajo grado, carcinomas de células claras, carcinomas serosos de bajo grado, limítrofes y carcinomas mucinosos. Se cree que

estos tumores evolucionan lentamente a partir de condiciones precursoras de menor grado (quistes endometriósicos, cistoadenomas, etc.) y se clasifican como tumores tipo I. Los carcinomas de las trompas de Falopio surgen en la parte distal de estas y la mayoría de estos son carcinomas serosos de alto grado. Se cree que evolucionan rápidamente a partir de otras lesiones precursora y se denominan tumores de tipo II. Este último grupo incluye carcinomas endometrioides y carcinosarcomas de alto grado. Todos estos carcinomas de alto grado frecuentemente se asocian conmutaciones en el gen TP53 [19, 20).

2. Drenaje linfático: El drenaje linfático de los ovarios y las trompas de Falopio se realiza a través de las vías útero-ovárica, infundíbulo-pélvica y del ligamento redondo y una vía accesoria ilíaca externa hacia los siguientes ganglios linfáticos regionales: ilíaca externa, ilíaca común, hipogástrica, sacra lateral, linfa para-aórtica. y ocasionalmente, a los ganglios inguinales. Las superficies peritoneales pueden drenar a través de los vasos linfáticos diafragmáticos y, por tanto, a los principales vasos venosos por encima del diafragma [13, 17, 21, 22).
3. Otros sitios de metástasis: El peritoneo, incluidos el epiplón y las vísceras pélvicas y abdominales, es el sitio más frecuente de diseminación de los cánceres de ovario y de las trompas de Falopio. Esto incluye las superficies diafragmática y hepática. También se observa afectación pleural. Otros sitios extraperitoneales o extra pleurales son relativamente poco comunes, pero pueden ocurrir. [17, 21, 22).

En resumen, la clasificación de esta enfermedad se agrupa en cuatro etapas principales, siendo la etapa I en la que se presentan los tumores menos diseminados, la masa tumoral se encuentra limitada en uno o ambos ovarios. En el caso de la etapa clínica II involucra a los ovarios y la cavidad pélvica; la etapa III a los ovarios, la cavidad pélvica, presenta implantes en el peritoneo y metástasis a nivel de nódulos linfáticos y la última etapa corresponde a la etapa clínica IV que es determinada cuando ya hay metástasis a distancia a otros órganos

2.2.1. Tumores serosos limítrofes

Este tipo de tumores no son considerados como tumores con “potencial maligno” debido a que la gran mayoría no presenta características invasivas, a diferencia de otros tipos de carcinomas; son de pronóstico favorable para las pacientes que lo desarrollan, presentan alto porcentaje de células en mitosis y atípicas nucleares comparados con tumores benignos, pese a que no son considerados como tumores de alto riesgo, cerca del 10% de estos pueden desarrollar implantes en el peritoneo y dar origen a carcinomas serosos de bajo grado (LGSC, por sus siglas en inglés), [23, 24). Asimismo, ambas entidades se han visto coexistiendo por lo que se les atribuyen diversas alteraciones compartidas en KRAS y BRAF en el 30% de los tumores serosos limítrofes. La mayoría de los tumores serosos limítrofes, son quistes uniloculares o multiloculares con formaciones micro- papilares, las cuales presentan estructuras complejas pero que mantienen su

arquitectura tisular, presentan un epitelio que asemeja a las células secretoras de la trompa de Falopio (23).

2.2.2. Carcinomas serosos de bajo grado

Este tipo de tumores corresponden al 5-10% de los tumores epiteliales de ovario, presentan papilas y al momento de su diagnóstico [24, 25], puede presentarse en uno o ambos ovarios, son considerados como tumores que provienen de micro invasiones a partir de los tumores limítrofes, sin embargo, diversos estudios los catalogan como entidades diferentes, presentan mutaciones en KRAS y BRAF en un 19% y 38%, respectivamente. Asimismo, alteraciones en genes ERBB2 han sido bien identificados, los cuales se han visto sobre todo asociados a la vía de lasMAPK relacionada con procesos de proliferación y migración celular [26, 27], sin embargo, las pacientes con este tipo de mutaciones presentan un mejor pronóstico [25].

2.2.3. Carcinomas serosos de alto grado

Los carcinomas serosos de alto grado (HGSC por sus siglas en inglés) son los que se presentan en mayor frecuencia, representan alrededor del 60-70% de los tumores diagnosticados, y generalmente se detectan en etapas avanzadas de la enfermedad [24, 25], al igual que en los tumores limítrofes y LGSC estos tumores se asemejan a tejido de la tuba uterina, presentan papilas y en su mayoría son

sólidos, además de presentar gran cantidad de mitosis atípicas asociadas y pleiomorfismos nucleares, estos carcinomas se asocia a mutaciones en genes relacionados con la reparación del DNA como es el caso de BRCA 1 y BRCA 2 del 15-20% de los casos principalmente cuando hay antecedentes familiares, otro caso es el de TP53 que es de los genes que se asocia principalmente a este tipo de tumor hasta en un 97% (25; 26, 27); a pesar de que los HGSC son caracterizados como carcinomas de ovario, se ha propuesto que la mayoría de estos tienen un origen distinto, se postula que el origen de estos carcinomas es en las fimbrias de la tuba de Falopio, a partir de lesiones precursoras, denominadas carcinomas intraepiteliales de la serosa de la tuba (STIC, serous tubal intraepithelial carcinoma), las cuales sufren cambios morfológicos y genéticos que tienen la capacidad de invadir el tejido ovárico al brindar un mejor microambiente para la supervivencia de las células tumorales [24, 26, 28]. Asimismo, se ha descrito el riesgo de desarrollar HGSC cuando presentan STICs, no obstante, pese a que el origen de los carcinomas serosos de alto grado se relaciona con las STICs, también se atribuye su formación a cambios en tumores serosos de bajo grado o a mutaciones propias del epitelio de la superficie ovárica (ESO) que dan origen a los HGSC; presentan alto porcentaje de proliferación celular medido por Ki67 [24, 26]. Además, en este subtipo histológico se ha observado un comportamiento atípico donde una alta concentración de CA-125 inicial parece no siempre asociarse a un mal pronóstico [84]

2.2.4. Carcinomas endometrioides

Este tipo de tumores representa el 10% de los carcinomas de ovario, son quísticos o sólidos, y se han asociado a buen pronóstico en etapas tempranas de la enfermedad y se estima que el 28% de estos son de localización bilateral [24], se han asociado a padecimientos como síndrome de Lynch y a endometriosis, en el 42% de las pacientes, asimismo, su origen puede ser derivado de cáncer de endometrio en el 20% de los diagnosticados, a diferencia de los LGSC y HGSC este tipo de carcinomas se asocia con mutaciones en genes relacionados con las vías WNT/ β -catenin and PI3K/PTEN en el 20% [24, 25], por otro lado, mutaciones en ARID1A se han asociado tanto en carcinomas endometrioides como en carcinomas de células claras [19].

2.2.5. Carcinoma mucinoso

Este tipo de tumores representan del 3-4%, pueden ser clasificados en tumores mucinosos limítrofes y carcinomas mucinosos [23; 25], el primer tipo corresponden a tumores con bajo nivel invasivo, de superficie lisa, presentan múltiples regiones quísticas, presentan en el interior de sus células gran cantidad de mucosidad, lo cual se atribuye al epitelio cilíndrico de tipo gastrointestinal, presenta núcleos basales, su supervivencia es favorable cuando es detectada en estadio clínico I, interesante es el hecho de que, tanto los de tipo limítrofe como los carcinomas mucinosos pueden coexistir dentro del mismo tumor [23, 24], Estos presentan

mutaciones en KRAS en el 92% de los tumores limítrofes mucinosos y en 64% de los carcinomas mucinosos. Esto se traduce en un panorama alentador cuando son diagnosticados en estadios tempranos de la enfermedad y de localización unilocular, sin embargo, el pronóstico de las pacientes es bajo al ser diagnosticadas en etapas tardías, y asociarse a mutaciones en TP53 en el 68% y Her2 en el 18% de los casos [24, 25].

2.2.6. Carcinoma de células claras

Su incidencia es del 5%, sin embargo, en países como Japón puede presentarse en el 25% de los casos, son tumores por lo general sólidos y microscópicamente presentan un núcleo claramente picnóticosos, [oplasma rico en glucógeno y bajo porcentaje de mitosis, aún no está del todo claro el origen de este tipo de tumores (25), sin embargo, se relacionan con el subtipo endometriode ya que comparten factores que involucran su desarrollo, el síndrome de Lynch, endometriosis y mutaciones en ARID1A del 46-57% de los casos,[29,30], por otra parte, se ha reportado la ausencia de expresión de PTEN en el 40%. Asimismo cambios en la expresión del factor nuclear 1beta del hepatocito (HNF-1 β), se encuentra elevado en este tipo de carcinomas, este factor se encuentra actuando principalmente en hepatocitos y participa en la síntesis de glucógeno y participa en la fase tardía secretora del endometrio y durante la gestación además de estar participando en la regulación de genes y proteínas relacionados con la carcinogénesis de este tipo de tumores como anexina 4 relacionada con la resistencia al paclitaxel [24].

2.3. Receptores de hormonas esteroides sexuales

Las hormonas desempeñan múltiples procesos biológicos en el organismo, sin embargo, en la mayoría de los casos es indispensable que estas se unan a receptores específicos para llevar a cabo su función, existen diversos tipos de receptores asociados a cada hormona, entre los que destacan los receptores de hormonas esteroides sexuales, los cuales, al ser activados regulan procesos asociados, a eventos principalmente reproductivos [31; 32]. Los receptores de hormonas esteroides sexuales pertenecen a la súper familia de los receptores nucleares de Clase I, actuando como factores de transcripción [33, 34. 35], entre estos se encuentran, el receptor de andrógenos (AR), el receptor de estrógenos (ER) y el receptor de progesterona (PR), estas proteínas presentan dos dominios de transactivación y una región bisagra, el AF-1 (A/B) localizado en el extremo N-terminal, AF-2, en el extremo C-terminal, un dominio de unión al ligando (LBD), uno de unión al ADN, el cual presenta secuencias conservadas entre cada tipo de receptor o isoformas asociadas a estos [36, 37].

La activación de los receptores de hormonas esteroides sexuales, se lleva a cabo una vez que la hormona atraviesa la bicapa lipídica de la membrana plasmática y contacta con su receptor específico, el cual permanece unido a proteínas de choque térmico (HSP por sus siglas en inglés) hasta que son reconocidas por las secuencias complementarias de la hormona en el citoplasma de la célula, una vez que se lleva a cabo el reconocimiento entre la hormona y el receptor se disocia la HSP, seguido de cambios conformacionales que promueven su mejor

acoplamiento, se llevan a cabo dimerizaciones que al translocar al núcleo reconocen secuencias palíndromas que permiten la unión en los sitios DBD y se unen a los elementos de respuesta al ADN, asimismo, se reclutan al complejo, proteínas co-activadoras o co-reguladoras de la transcripción de sus genes blanco, relacionadas de manera tejido específico [32, 38, 39].

2.3.1. Receptor de Andrógenos

El receptor de andrógenos es una proteína conformada por 919 aminoácidos, pertenece a la súper familia de los receptores nucleares Clase I, tiene un peso molecular de 110 kDa, se encuentra localizado en el cromosoma X (locus Xq11-Xq12) y está conformado por ocho exones [40]. Se encuentra participando en el mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios, la espermatogénesis en la diferenciación sexual, síndromes relacionados a alteraciones genéticas, como el caso del síndrome de feminización testicular [41], hasta su participación en diversos tipos de cáncer, como próstata y mama [42] estos procesos están mediados principalmente por la testosterona y la dehidrotestosterona, la mayoría de los procesos biológicos relacionados a la hormona y su receptor están asociados a efectos fisiológicos en el hombre. Sin embargo, también se encuentran realizando funciones fisiológicas importantes en la mujer; intervienen en el desarrollo y mantenimiento del tejido ovárico, las trompas de Falopio y el endometrio [43]. El receptor de andrógenos al igual que el de progesterona y estrógenos actúa como factor de transcripción, asimismo, puede estar interactuando en diversas vías de señalización, como la vía PI3K/Akt/mTOR,

PTEN, la vía de EGFR entre otras, [44], esto le permite al receptor poder amplificar la señal activando diversas proteínas mediadas por segundos mensajeros. Estos receptores pueden estar efectuando diversos procesos celulares estando anclados a la membrana plasmática, esto lo hacen debido a que presentan sitios de palmitoilación en el dominio E del receptor, esto les permite llevar a cabo funciones que requieren una activación intracelular [45].

2.3.2. Receptores de estrógenos

Existen diversos tipos de receptores de estrógenos, entre los cuales se encuentran los receptores nucleares, los receptores de membrana y los receptores acoplados a proteínas G, cada uno de ellos tiene la capacidad de contactar a su ligando para llevar a cabo una acción biológica [45]. En el caso de los receptores nucleares se ha descrito dos isoformas ER α y ER β , ambos comparten más del 95% de homología en su sitio de unión al ADN; su transcripción se lleva a cabo por genes localizados en diferentes cromosomas (cromosoma 6 y 14 respectivamente), en el caso del ER α se encuentra expresado en la glándula mamaria, útero, ovario, hueso testículo y epidídimo, mientras que el ER β se encuentra distribuido en próstata, vejiga, epitelio del ovario, tejido adiposo y colon [45, 46]; asimismo, la función biológica de cada uno de ellos se encuentra limitada al balance que presenta cada receptor, en el caso del ER α se ha asociado principalmente a procesos de proliferación celular por lo que se ha visto asociado a diversos tipos de cáncer dependientes de estrógenos como cáncer de mama y cáncer de endometrio, mientras que el ER β se relaciona con funciones anti

proliferativas, en algunos estudios lo refieren como un marcador de buen pronóstico como por ejemplo en el cáncer de ovario [47].

2.3.3. Receptor de estrógenos alfa

El receptor de estrógenos alfa ($ER\alpha$) a diferencia del $ER\beta$ presenta una mayor actividad transcripcional debido a que en sus extremo N-terminal tiene un excedente en su secuencia de aminoácidos, mientras que el $ER\beta$ tiene una secuencia de 530 el $ER\alpha$ presenta una secuencia total de 595 [35]. El $ER\alpha$ se encuentra localizado en el cromosoma 6q25.1 y es codificado por el ESR1, tiene un peso molecular de 66 kDa, sin embargo, cuenta con otras isoformas de menor tamaño (36kDa y 46kDa) como producto de splicings alternativos, los cuales carecen de NTD y del dominio AF-1, [51], se encuentra expresado principalmente en órganos y tejidos reproductivos, sin embargo, está distribuido en todo el cuerpo, especialmente en mama, útero ovario, riñón, hígado y cerebro [47, 48, 49]. Este tipo de receptor actúa como factor de transcripción nuclear, por lo que presente una señalización de tipo canónica, induciendo la transcripción de genes blancos, participa en procesos de diferenciación celular, proliferación y apoptosis, sin embargo, estas características han relacionado al $ER\alpha$ directamente con el desarrollo de cáncer de mama y cáncer de endometrio [50].

2.3.4. Receptor de estrógenos β

Se encuentra codificado por el ESR2 localizado en el cromosoma 14q22-24, presenta un peso molecular de 60 kDa presenta cinco isoformas de menor tamaño

con modificaciones en el extremo carboxilo terminal y LBD, se encuentra distribuido en ovarios, pulmones, tracto gastrointestinal, vejiga y sistema nervioso [47, 48, 49, 51]. A pesar de que el ER β y el ER α se encuentran codificados por genes distintos, ambos presentan sitios de unión al ligando altamente conservados, asimismo, tienen la capacidad de formar heterodímeros, lo que les confiere una mayor actividad biológica además de que el ER β suprime la actividad del ER α [35]; tanto el receptor alfa como el beta, pueden interactuar con otras moléculas que amplifican la señalización río abajo, tales como proteínas G, receptores con actividad de tirosina-cinasa, así como receptores asociados a factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) y el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo 1 (IGF-1), asimismo, pueden interactuar con moléculas de señalización como Src, PI3K, ErbB2 y con proteínas adaptadoras como Shc, SH2, lo cual facilita la interacción con proteínas que participan en procesos relacionados con proliferación, diferenciación y apoptosis, como las vías de las MAPK y Akt, vías que se han visto alteradas en algunos tipos de cáncer como en mama, ovario, útero y endometrio, los cuales se han relacionado con la expresión tanto del ER β como el ER α [51]

2.3.5. GPER1

A diferencia de los receptores nucleares, el GPER1 o como anteriormente se le conocía como GPER30, se encuentra localizado en el cromosoma 7p22.3, es un receptor de siete dominios transmembranales acoplado a proteínas G, tiene un peso molecular de 44kDa, se encuentra distribuido en diversos tejidos como útero,

hueso, sistema nervioso, etc., una vez que su ligando se une al receptor se llevan a cabo señalizaciones de acción rápida mediadas por la activación de la adenilato ciclasa, los cuales incrementan las concentraciones de AMP cíclico, promoviendo movilizaciones de calcio que permitiendo la síntesis y activación del fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato, permitiendo la acción de segundos mensajeros para una activación intracelular [51, 52]; asimismo, el GPER1 puede estar mediando la vía genómica y promover la transcripción de genes específicos, esto debido a que durante la señalización puede estar interactuando con los receptores de estrógenos nucleares [53]. El GPER1, puede participar en procesos de proliferación celular mediados por 17- β estradiol en tejidos que no expresan alguno de los receptores nucleares clásicos, por lo que se ha visto asociado a diversos tipos de cáncer como en mama, tiroides y ovario, su expresión se ha asociado con mayor agresividad en líneas celulares [53, 54] por lo que recientemente el GPER1 ha sido propuesto como blanco terapéutico para enfermedades metabólicas, cardiovasculares, del sistema nervioso, y en cáncer [54].

2.3.6. Receptor de progesterona

Pertenece a la súper familia de los receptores nucleares de Clase I, se encuentra localizado en el cromosoma 11q22-q23, cuenta con dos sitios de transcripción codificados por dos promotores distintos, los cuales dan como resultado tres isoformas del receptor, la primera de estas de mayor tamaño es la PR-B de 116 kDa, PR-A de 94 kDa, PR-C 60 kDa, en las primeras dos isoformas, las

secuencias del dominio de unión al ADN, la región bisagra, y el dominio de unión al ligando son las mismas, la diferencia entre ambos radica en el extremo amino terminal, además de la diferencia de 164 aminoácidos en el PR-A, mientras que para PR-C carece del dominio de unión al ADN, por lo que transcripcionalmente es inactivo [55, 56, 57]. No obstante, pese a que el PR-B y PR-A, presentan una alta homología en la secuencia de aminoácidos, cada uno de ellos presenta una función orgánica específica, de tal manera, que el PR-B es necesario para el desarrollo de glándula mamaria, mientras que el PR-A, es necesario para el desarrollo uterino [56]. El PR puede actuar por dos vías principales, la genómica y la no genómica, en la primera, el PR actúa como factor de transcripción regulando la transcripción de genes blanco mientras que en la vía no genómica el PR se encuentra anclado a la membrana plasmática acoplado a proteínas G, al activarse desencadena una serie de activaciones o inhibiciones que permiten que se lleve a cabo de manera más rápida una determinada función [57], La activación de ciertas proteínas citoplásmicas, tales como la Src, ERK/MAPK y su interacción con señalizaciones extra nucleares se asocian a patologías como el cáncer de mama, pulmón, útero y ovario [56].

2.4. Metaloproteinasas de Matriz

Las metaloproteinasas de matriz MMPs son enzimas proteolíticas que actúan sobre los componentes de la matriz extracelular como la colágena, fibronectina, laminina, y también sobre receptores de superficie, moléculas de adhesión celular y factores de crecimiento como el EGF y el TGF β [58]. Son importantes en el

desarrollo embrionario, el embarazo, la angiogénesis y en eventos patológicos como enfermedades cardiovasculares, autoinmunes, aterosclerosis y la progresión tumoral. Se da la remodelación de la matriz extracelular tanto en procesos fisiológicos como patológicos como la transición epitelio-mesénquima, la proliferación, la migración e invasión celular, supresión de la apoptosis y la inestabilidad genómica [59, 60]. En neoplasias humanas se ha mostrado que estas enzimas son producidas por células del estroma que rodea a las células malignas, aunque también algunas de ellas se expresan en células epiteliales como la MMP7 y excepcionalmente las MMP2 y MMP9. Además, en los carcinomas ováricos se ha demostrado que la MMP-9 esta elevada en el tejido maligno y en el suero de las pacientes, participando en la formación de metástasis promoviendo la invasión celular a través de la degradación de la membrana basal; los niveles de MMP-9 se correlación positivamente con la agresividad tumoral y confieren un mal pronóstico [61].

Se ha demostrado que los carcinomas de ovario expresan las MMP-2,-3,-7,-8,-9 y sus inhibidores TIMPS-1,-2 y -3; contrario a lo que se reporta para los carcinomas de mama, la MMP-8 se asocia a la progresión de los tumores de ovario mientras que la MMP-2 y -9 se relacionan con la migración e invasión celular y se asocian con un pronóstico en pacientes con carcinomas de ovario [62 - 64].

Pocos estudios han explorado la regulación hormonal de las MMP; los estrógenos y la progesterona incrementan la actividad enzimática de MMP-2 en las células del músculo liso vasculares [65], mientras que la DHT tiene efectos inversos sobre la actividad de MMP-2 en estas mismas células [66].

2.5. Marcadores tumorales

Actualmente los marcadores utilizados en el seguimiento de las pacientes con carcinoma de ovario son el CA 125 y el HE4 que junto con el estado reproductivo de la paciente se calcula un algoritmo. Para el antígeno de carbohidrato 125 (CA 125), es una glucoproteína de tipo mucinosa, producida por el gen MUC16 y asociada con la membrana celular. Este biomarcador se usa con mayor frecuencia para lesiones ováricas. Se ha utilizado desde principios de la década de 1980 cuando Bast et al. aisló específicamente el anticuerpo monoclonal OC125 en el tejido ovárico canceroso en comparación con el tejido ovárico sano [67]. Su límite superior es de 35 U / ml en pacientes pre y posmenopáusicas [68]. Sin embargo, esta medición no es muy sensible en las primeras fases del cáncer de ovario (sólo está elevada en 23 a 50% de los casos en estadio I) [69]. Además, se pueden observar niveles elevados de CA125 en suero en otras afecciones fisiológicas o patológicas (menstruación, embarazo, endometriosis, enfermedades inflamatorias del peritoneo) [70]. En un metaanálisis de Ferraro et al. [71], la especificidad de CA125 para detectar el cáncer de ovario fue del 78% (IC del 95%: 76-80).

Por otro lado, la proteína 4 del epidídimo humano (HE4) es un nuevo biomarcador que se ha evaluado actualmente para diagnosticar tumores malignos de ovario [68]. Es una glicoproteína que pertenece a la familia de seroproteínas ácidas nucleares de cuatro enlaces disulfuro (WFDC2) miembro a su vez de la familia de proteínas con dominio Whey acidic protein (WAP, por sus siglas en inglés). Los principales genes que codifican las proteínas WAP se encuentran principalmente en el cromosoma 20q12-13.1 [72]. Presentes en el suero, las proteínas WAP, que

se compone de alrededor de 50 aminoácidos, y su función biológica aún no se ha identificado por completo [73]. HE4 contiene 2 dominios WAP, se aisló inicialmente en el epidídimo y podría desempeñar un papel en la maduración de los espermatozoides [74]. Este biomarcador se expresa débilmente en los tejidos del epitelio de los órganos respiratorios y reproductivos, pero se sobre expresa en los tumores de ovario [75]. Yanaranop y col [76]. informaron una especificidad del 86% para HE4, y el criterio de uso apropiado (AUC, por sus siglas en inglés) fue mayor que el CA125 sólo, con valores de 0.893 y 0.865, respectivamente. Estos datos, de acuerdo con los reportados en un estudio multicéntrico italiano reciente que incluyó a 387 pacientes, mostraron que la HE4 para diagnosticar el cáncer epitelial de ovario parecía más confiable que CA125 [77]. Los niveles de marcador HE4 siempre pueden interpretarse de acuerdo con el ensayo inmunológico empleado. El nivel de corte de 70 pmol/L a menudo se usa para pacientes premenopáusicas y 140 pmol / L para pacientes menopáusicas; pero a veces se emplea el nivel umbral de 140 pmol/L, o incluso otros valores cercanos [78]. Sin embargo, al contrario de CA125; el tabaquismo parece ser un factor significativo que afecta las variaciones de HE4 en suero [79]. El nivel de HE4 aumenta del 20 al 30% en los fumadores en comparación con los no fumadores [80]. Caso similar sucede con los anticonceptivos hormonales combinados por lo que su interpretación debe estar sujeta a las características individuales de cada paciente [81].

2.6. Supervivencia

Por último, el Algoritmo de riesgo de malignidad ovárica (ROMA) [82]. Asocia los niveles de HE4 y CA125 de acuerdo con el estado de la menopausia, definido por la falta de menstruación o los signos clínicos de la menopausia durante 6 meses.

Índice predictivo premenopáusico (IP)

$$IP = - 12.0 + 2.38 \times \text{LN} (\text{HE4}) + 0.0626 \times \text{LN} (\text{CA125})$$

Índice predictivo postmenopáusico (IP)

$$IP = - 8.09 + 1.04 \times \text{LN} (\text{HE4}) + 0.732 \times \text{LN} (\text{CA125})$$

Probabilidad prevista (PP)

$$PP = \exp (PI) / [1 + \exp (PI)] \times 100$$

Por lo tanto, el puntaje ROMA corresponde a la probabilidad pronosticada [PP] y se expresa mediante una tasa porcentual. Se proponen diferentes niveles de corte para mujeres no menopáusicas, y otro para mujeres que han alcanzado la menopausia. Según el ensayo inmunológico para medir CA125 y HE4, los niveles de corte pueden diferir para clasificar a los pacientes en un grupo de riesgo bajo o alto [83]. Por lo que es indispensable saber qué método se utiliza o hacer referencia a los valores normales dados por el laboratorio que realiza las pruebas para interpretar correctamente los resultados de este algoritmo [78].

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de ovario se diagnostica frecuentemente en estadios tardíos cuando ya se encuentra diseminado fuera de la cavidad pélvica; a pesar de que el tumor primario es sensible al tratamiento habitual, alrededor del 70% de las pacientes recaen dentro de los dos años posteriores al diagnóstico y menos del 50% de ellas sobreviven a los 5 años. Es bien conocido que el ovario es un órgano sensible a hormonas y hay evidencias epidemiológicas que sugieren que los andrógenos participan en la carcinogénesis ovárica, el AR es el receptor a hormonas esteroides que es más frecuentemente expresado en los carcinomas de ovario; se ha descrito también que las MMP-2-8 y 9 participan en la migración e invasión celular por lo que este trabajo pretende aportar información sobre la coexpresión de las metaloproteinasas de matriz (MMP 2-8-9) y su correlación con la expresión del AR; así como su significado como biomarcadores de la supervivencia global de las pacientes con cáncer epitelial de ovario.

4. PREGUNTA

¿El perfil de expresión de las metaloproteinasas MMP2, MMP8 y MMP9 en conjunto con la de los receptores de hormonas esteroides sexuales modificará la supervivencia global de las pacientes en los diferentes subtipos histológicos de carcinoma de ovario?

5. HIPÓTESIS

La expresión de las metaloproteinasas MMP2, MMP8 y MMP9 en asociación con la expresión del receptor de andrógenos en las distintas variantes histopatológicas de carcinoma de ovario tiene un impacto en el pronóstico de supervivencia en las pacientes con esta neoplasia.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Evaluar la presencia de las metaloproteinasas MMP2, MMP8 y MMP9 y del receptor de andrógenos en muestras de tumores de carcinoma de ovario y su papel como predictor de sobrevida en esta patología

6.2. Objetivos Específicos

1. Evaluar la frecuencia de expresión y la localización de las metaloproteinasas de matriz (MMP2, MMP8 y MMP9) y del receptor de andrógenos (AR) en muestras de carcinoma de ovario mediante la técnica de inmunohistoquímica
2. Estratificar y analizar los perfiles de expresión de las metaloproteinasas (MMP2, MMP8 y MMP9) y del receptor de andrógenos (AR) por subtipo histológico y estadio de la enfermedad al momento del diagnóstico.
3. Recopilar las características clínicas de las pacientes al momento del diagnóstico y su asociación con la supervivencia de estas.
4. Analizar las curvas de supervivencia asociadas a la presencia de las metaloproteinasas de matriz y a la expresión de los receptores a hormonas esteroides sexuales

7. MATERIALES Y MÉTODOS

Este proyecto fue aprobado por las Comisiones de Investigación y Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y los Comités de Investigación y Ética del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), (UNAM: FM/DI/016/2019 y FM/DI/114/22, INCan 019/060/OMI). Este es un estudio retrospectivo, longitudinal y observacional realizado a partir de 111 muestras seleccionadas obtenidas de pacientes del INCan, el número de la muestra se determinó por conveniencia, tomando los siguientes criterios de selección:

7.1. Criterios de Inclusión:

Pacientes con cáncer epitelial primario de ovario (tumores de tipo seroso bajo grado, seroso alto grado, endometrioides, mucinosos y de células claras), así como tumores de tipo seroso limítrofe, sin tratamiento previo a quimioterapia que firmaron previos el consentimiento informado.

7.2. Criterios de Exclusión:

Pacientes con tumores benignos, cáncer de ovario no epitelial, carcinomas no primarios de ovario, y carcinomas de ovario: de Brenner, de células transicionales, epidermoide o indiferenciado.

7.3. Criterios de Eliminación:

Muestras que presentaron un análisis anatómico-patológico distinto a cáncer epitelial de ovario de los subtipos serosos, endometrioides, mucinosos, células claras, y serosos limítrofes, o con un tamaño de la muestra inadecuado para el procesamiento histológico.

7.4. Base de datos Clínicos

Se construyó una base de datos que contiene la información clínica de los pacientes; esta se obtuvo directamente de los expedientes clínicos de cada una de las pacientes participantes, conteniendo la información clínico obstétrica, antecedentes patológicos, no patológicos, heredofamiliares más relevantes para el padecimiento, así como datos del abordaje inicial, diagnóstico, líneas de tratamiento, documentación de progresión y/o recurrencia de la enfermedad y el seguimiento que se le dio a las pacientes.

7.5. Procesamiento de la Muestra

Fragmentos de muestras de tejido de aproximadamente 1cm obtenidas en el estudio transoperatorio se fijaron por inmersión en paraformaldehído al 4% durante 24h, se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) y se deshidrataron con concentraciones graduales de etanol durante 1h cada uno. A continuación, se procedió a la aclaración del tejido por medio de dos cambios de xilol y se embebió en parafina (dos cambios de 3h c/u) para finalmente incluirlo en parafina en moldes de aluminio. La calidad del tejido tumoral se verificó al

microscopio en laminillas teñidas con Hematoxilina y Eosina antes de llevar a cabo la inmunohistoquímica. Los cortes de tejido de 3µm de grosor se recibieron en laminillas cargadas luego se desparafinaron a 57°C toda la noche, luego se sumergieron en xilol durante 30 minutos. Posteriormente, se procedió a la rehidratación de los tejidos mediante baños de alcoholes en concentraciones graduales descendentes hasta llegar finalmente a agua destilada.

7.5.1. Desparafinación y recuperación antigénica

Cada una de las laminillas obtenidas es colocada en el horno toda la noche a una temperatura de 57°C. Para terminar el proceso de Desparafinación, se sumergen en xilol durante 30 minutos y se procede a la rehidratación de las secciones obtenidas mediante baños de alcoholes en concentraciones graduales descendentes, comenzando por etanol absoluto con un tiempo de contacto de 3 minutos para cada uno, seguido por un baño de agua destilada y PBS 1x por el mismo tiempo.

Para la recuperación de epítomos

durante 15 minutos, una vez concluido este periodo se deja enfriar y se lava tres veces con PBS 1x durante 5 minutos cada vez y se prosigue con la realización de la inmunohistoquímica.

7.5.2. Inmunohistoquímica

Se incubaron las laminillas en H₂O₂ al 0.9% durante 10 minutos a temperatura ambiente; la permeabilización celular se hizo con tritón al 1% en PBS por 25 minutos y el bloque inespecífico con suero de caballo al 5% durante 30 minutos. Los anticuerpos primarios utilizados fueron: para los receptores de hormonas esteroideas AR dilución 1:50 (Cat. Sc816 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), ER α dilución 1:100 (Cat. Sc543 Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) and PR dilución 1:250 (Cat. 8757 Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). Y para las metaloproteinasas los anticuerpos fueron MMP-2 (Cat. 436000, Thermo Fisher Scientific). MMP-9 (Cat. 13667, Cell Signaling Technology) y MMP-8 (Cat. OAAB10023 Aviva Systems) las diluciones fueron de 1:200 para los dos primeros y de 1:100 para el anticuerpo de MMP8. Los tejidos se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente por toda la noche a temperatura ambiente. Como anticuerpo secundario se empleó el reactivo Mach2 anticonejo HRP (Biocare Medical, CA, USA). Previo lavado del anticuerpo primario se procedió a incubar durante 1 hora a temperatura ambiente con el Mach2 y posterior a ello se reveló la tinción con el cromógeno 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina (DAB) y la contra tinción de los núcleos se hizo con Hematoxilina de Gill, para finalmente realizar el montaje de los tejidos en resina sintética.

7.5.3. Evaluación de Inmunopositividad

Para la evaluación de la positividad se utilizó la escala de Inmunoreactive Score (IRS), las laminillas fueron leídas por tres observadores independientes, determinando el grado de intensidad de la tinción y el porcentaje de células positivas por campo. La escala correspondiente para el porcentaje de células positivas fue de **1**: <25% de células positivas, **2**: para un rango de 26-50% de células positivas, **3**: para 51- 75% de células positivas y **4**: del 76-100% de células positivas; para determinar la intensidad de positividad la escala fue **1**: débil, **2**: moderado y **3**: intensa. El puntaje máximo que se obtiene de la multiplicación de ambos factores es 12 y se consideró positiva una reacción cuando el IRS fue ≥ 2 .

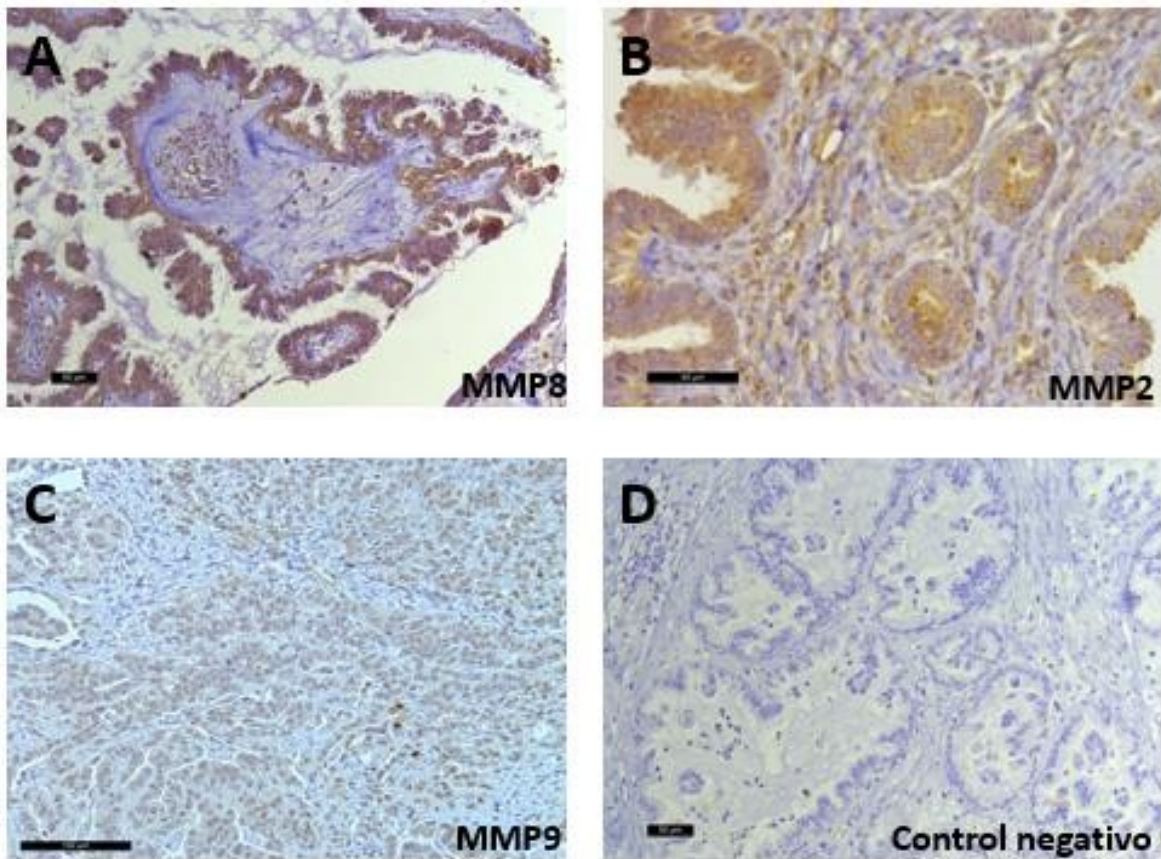
7.6. Análisis Estadístico

Se realizó inicialmente un análisis descriptivo de las características de la población de la muestra y evaluando la frecuencia de expresión de las enzimas y receptores a hormonas esteroideas sexuales en tumores de ovario con respecto al subtipo histológico, posteriormente se realizó un análisis de asociación por medio de tablas de contingencia utilizando la prueba de Chi-cuadrado; la asociación en la expresión de las enzimas se evaluó por el coeficiente de correlación de Spearman. Posteriormente se procede a realizar un análisis de supervivencia de cada una de las variables clínicas y de los receptores y enzimas en estudio, para lo cual se les realizó a las pacientes un seguimiento durante 5 años después de su diagnóstico

anatomopatológico de cáncer epitelial de ovario para obtener el gráfico de Kaplan Meier de supervivencia con respecto a la expresión de las enzimas y receptores hormonales. La diferencia estadísticamente significativa se definió con un valor de error tipo I de 5% ($\alpha \leq 0.05$). Utilizando para los análisis estadísticos el software IBM SPSS Statistics Software versión 26.

8. RESULTADOS

Inmunohistoquímica



Fotomicrografía que ilustra la expresión de las MMPs en distintos subtipos histológicos de cáncer de ovario A) Tumor seroso limítrofe B) Carcinoma endometriode C) Carcinoma endometriode D) HGSC. Las barras indican 50 micras.

8.1. Análisis descriptivo

Se incluyeron 111 casos de tumores epiteliales de ovario con diagnóstico anatomopatológico confirmado, de las cuales 31 (27%) corresponden a tumores serosos limítrofes, 10 (9%) serosos de bajo grado, 30 (27%) serosos de alto grado, 25 (22.5%) endometrioides, 9 casos del subtipo mucinoso (8.1%) y 5 de células claras que corresponde al 4.5% de las muestras analizadas.

La mediana fue de 48 años. El 52.3% de las mujeres se encontraba en menopausia al momento del diagnóstico, El estadio I mostró una mayor frecuencia con 52.7%, seguido por el estadio III con 33.6%. Con respecto a la citorreducción del tumor a la que fueron sometidas las pacientes se observó que en el 83.3% fueron cirugías óptimas. (Tabla 1).

Tabla 1. Características de la población		n:111
Edad ¹		48 años (42, 57 años)
CA-125 U/mL ¹		274 (94.95 – 720.5)
Subtipo Histológico ¹	Tumores limítrofes	27% (n=31)
	Seroso de bajo grado	9% (n=10)
	Seroso de alto grado	27% (n=30)
	Endometriode	22,5% (n=25)
	Mucinoso	8,1% (n=9)
	Células claras	4,5% (n=5)
Estadio Clínico FIGO ¹	I	52,7% (n=58)
	II	3,6% (n=4)
	III	33,6% (n=37)
	IV	10% (n=11)
Estado Reproductivo ¹	Menopausia	52,3% (n=56)
	Premenopausia	47,7% (n=51)
Citorreducción ¹	Óptima	83,3% (n=85)
	Subóptima	16,7 (17)

¹Mediana, (C1 , C3)

8.2. Expresión de receptores de hormonas esteroideas

Se observó la expresión de los receptores a hormonas esteroideas sexuales en toda la población y posteriormente se estratificó los tumores en limítrofes y carcinomas.

El receptor de andrógenos se expresó en toda la población en un 62.1%, en los casos limítrofes se observa una frecuencia de expresión del 70.9% mientras que en los carcinomas un 58.7%. La presencia de ER en toda la población, limítrofes y carcinomas es similar. Este receptor se expresa en menor proporción comparado con AR y PR ($P < 0.05$). Por otra parte, PR se expresó 70.9% en los tumores limítrofes mientras que en los carcinomas en un 57.5%. (Figura 1A, B y C).

La expresión de MMPs en las tres poblaciones descritas es semejante, aunque la metaloproteinasa que se encuentra en mayor frecuencia es MMP2 en comparación con MMP8 y 9 ($P < 0.05$) (Figura 1D, E y F).

Se estudio el porcentaje de inmunotinción nuclear positiva en los diferentes subtipos histológicos del carcinoma de ovario en donde se observó variación en la frecuencia de los tres receptores aunque no se encontraron diferencias significativas entre los grupos estudiados (Figura 2).

8.3. Expresión de metaloproteinasas de matriz

La expresión de las MMPs fue evaluada por subtipo histológico en donde podemos observar que en los HGSC la expresión de MMP-2 difiere de manera significativa con MMP-8 y 9. En el caso de los carcinomas endometrioides solo se muestra una diferencia entre MMP2 y MMP8 ($P < 0.05$) (Figura 3).

Por otra parte, se evaluó la expresión de receptores a hormonas esteroides y MMP2,-8 y 9 clasificando las muestras por estadio clínico. Primer grupo estadio I y II y

segundo grupo estadio III y IV. ER presentó una menor expresión en los tumores en estadio III y IV. La frecuencia de MMP-2 fue mayor en comparación con MMP-8 y 9 en todos los estadios clínicos. ($P < 0.05$) (Figura 4).

Las proporciones de inmunorreacciones positivas para MMP2, MMP9 y MMP8 se evaluaron en dos compartimentos celulares, epitelio y estroma. La frecuencia de MMP2 fue mayor en el epitelio en comparación con el estroma en la población completa y en carcinomas (Fig. 5A y 5C). MMP9 y MMP8 difieren en su expresión entre epitelio y estroma y esta diferencia se mantiene estratificando la población en limítrofes y carcinomas. La MMP2 es la metaloproteinasa que se expresa más en el estroma comparando con la proporción encontrada de MMP9 y 8. ($P < 0.05$) (Fig. 5A, 5B y 5C).

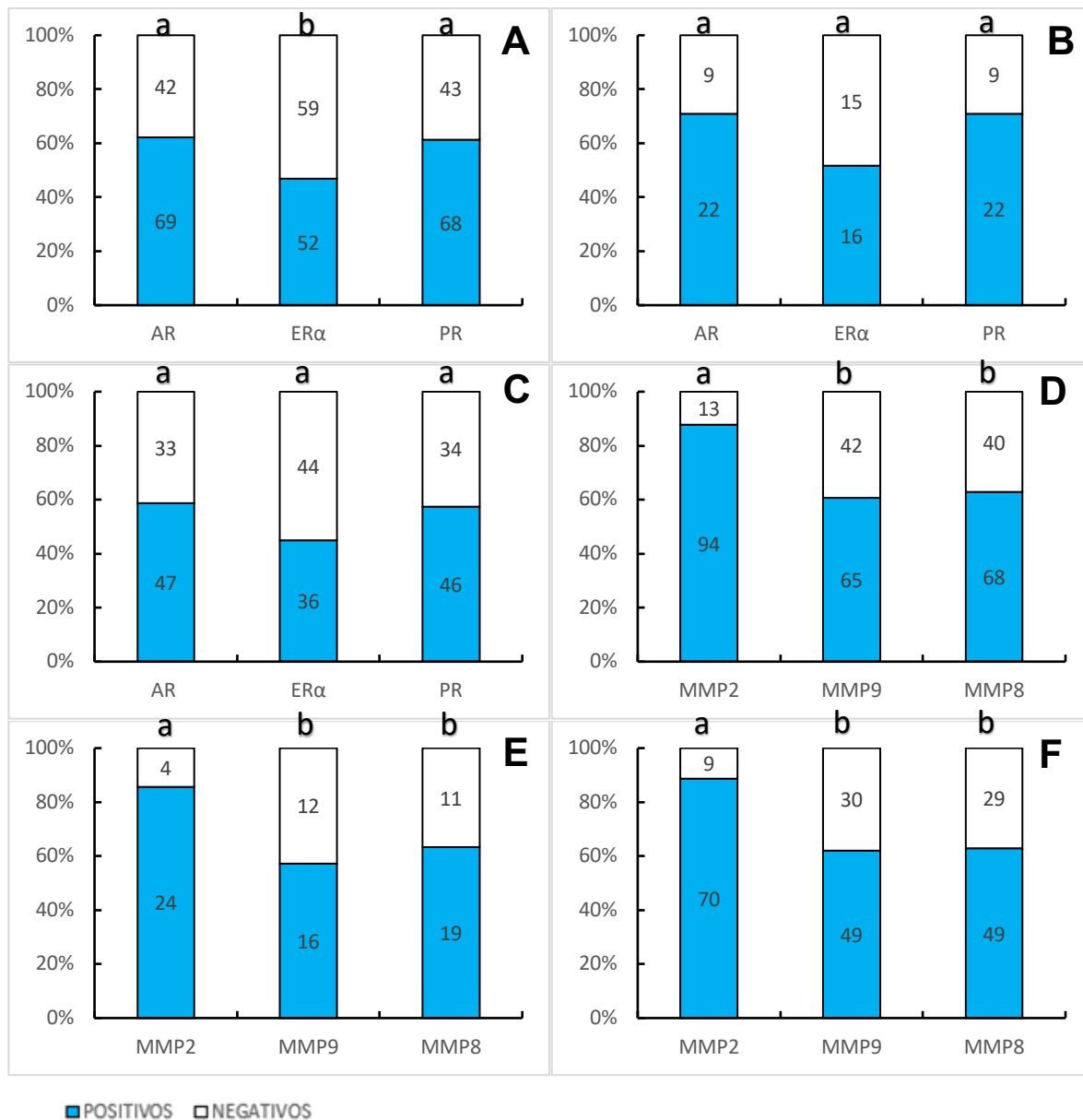


FIGURA 1. Expresión en epitelio de receptores de hormonas esteroideas sexuales y metaloproteinasas de matriz A) expresión de receptores de hormonas esteroideas sexuales en toda la población de estudio. B) expresión de hormonas esteroideas sexuales en pacientes con diagnósticos de tumores limítrofes. C) expresión de hormonas esteroideas sexuales en pacientes con diagnóstico de carcinoma. D) expresión de metaloproteinasas de matriz en toda la población de estudio. E) expresión de metaloproteinasas de matriz en pacientes con diagnósticos de tumores limítrofes F) expresión de metaloproteinasas de matriz en pacientes con diagnósticos de carcinoma. Las letras diferentes indican significancia estadística. P<0.05

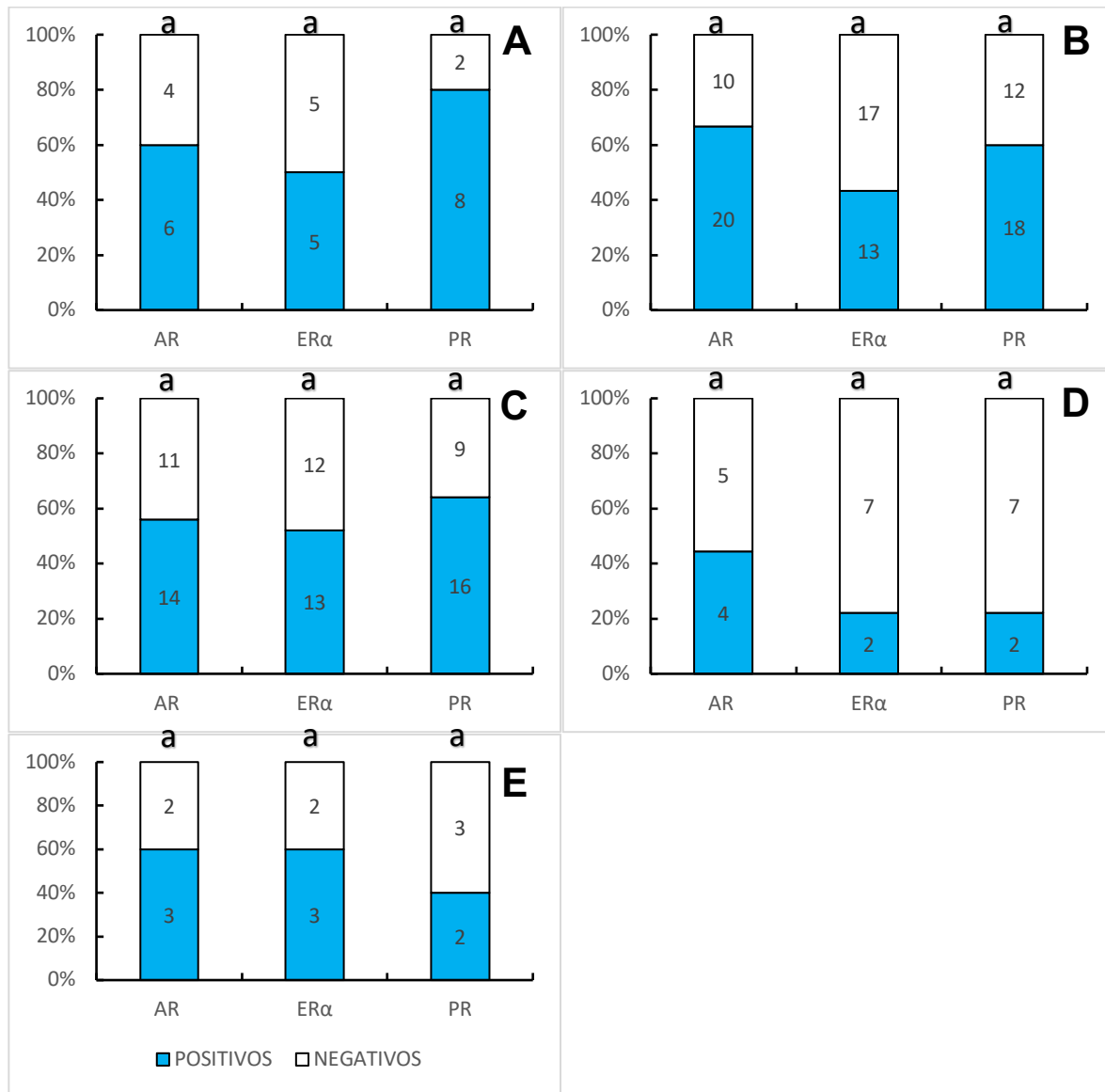


FIGURA 2. Expresión en epitelio de los receptores de hormonas esteroideas sexuales en los diferentes subtipos histológicos de cáncer epitelial de ovario. A) seroso de bajo grado, B) seroso de alto grado. C) endometriode. D) mucinoso, E) células claras. Las letras diferentes indican significancia estadística. P<0.05

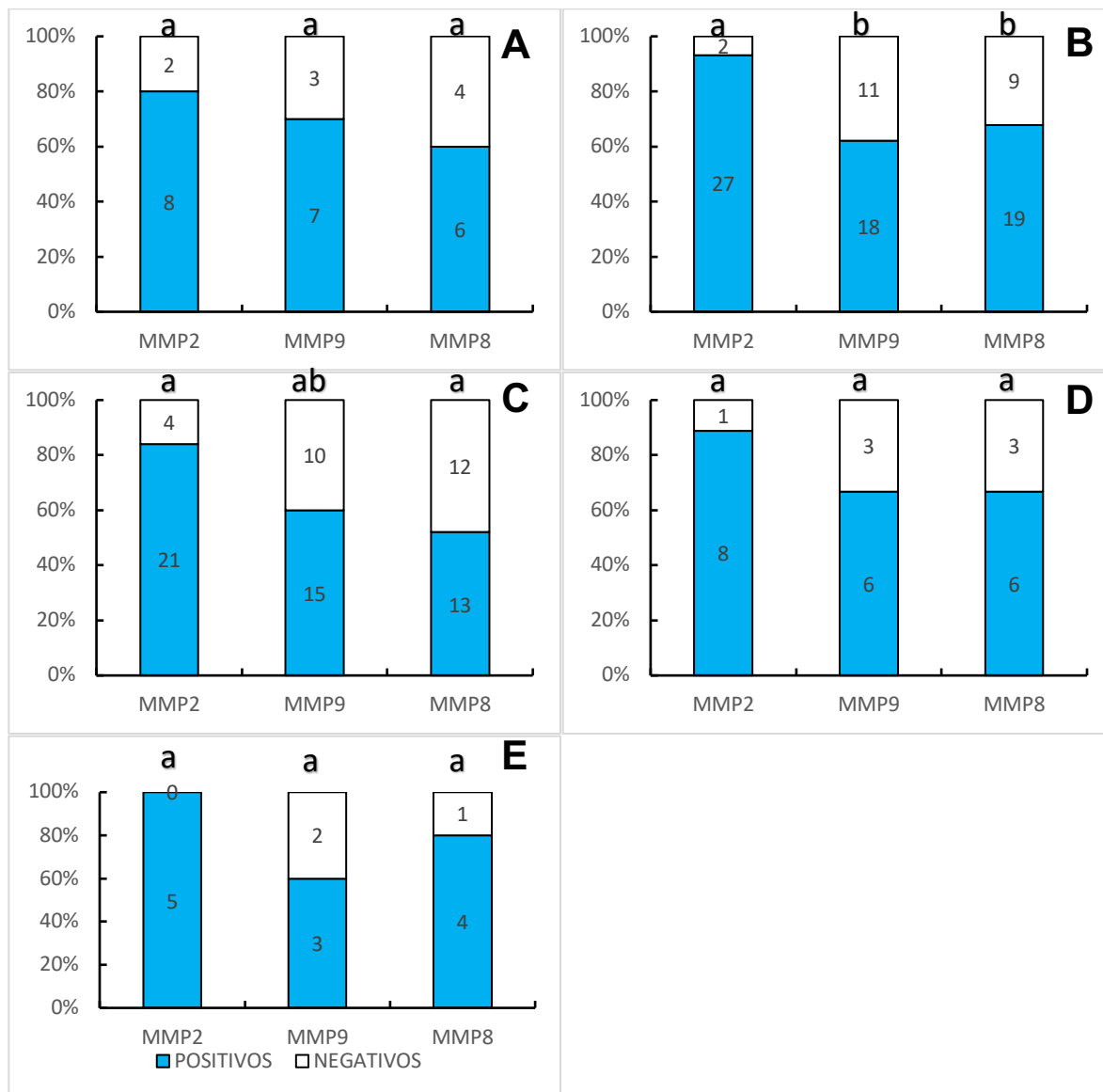


FIGURA 3. Expresión en epitelio de las metaloproteinasas de matriz en los diferentes subtipos histológicos de cáncer epitelial de ovario. A) seroso de bajo grado, B) seroso de alto grado. C) endometriode. D) mucinoso, E) células claras. Las letras diferentes indican significancia estadística. $P < 0.05$.

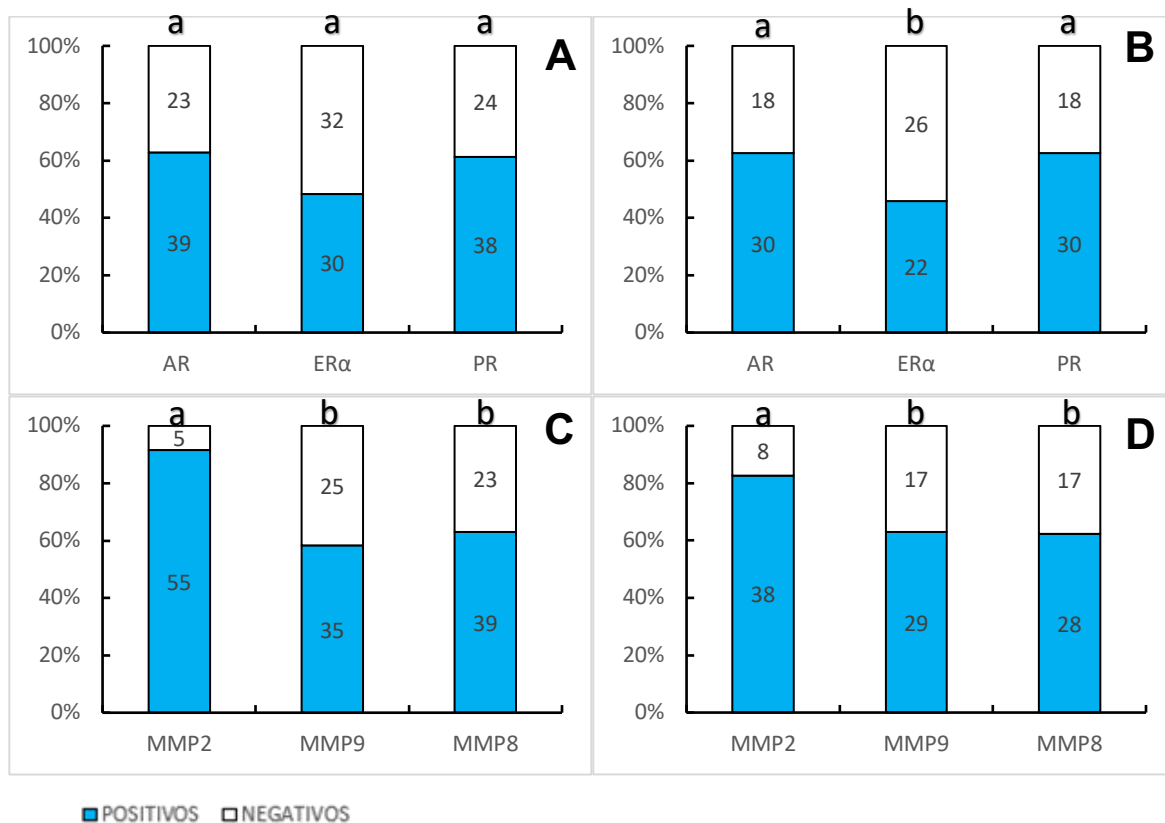


FIGURA 4. Expresión en epitelio de los receptores de hormonas esteroideas sexuales y metaloproteinasas de matriz de acuerdo con el estadio clínico. A) Expresión de receptores de hormonas esteroideas sexuales en estadio I y II. B) Expresión de receptores de hormonas esteroideas sexuales en estadio III y IV. C) Expresión de metaloproteinasas de matriz en estadio I y II. D) Expresión de metaloproteinasas de matriz en estadio III y IV. Las letras diferentes indican significancia estadística. $P < 0.05$

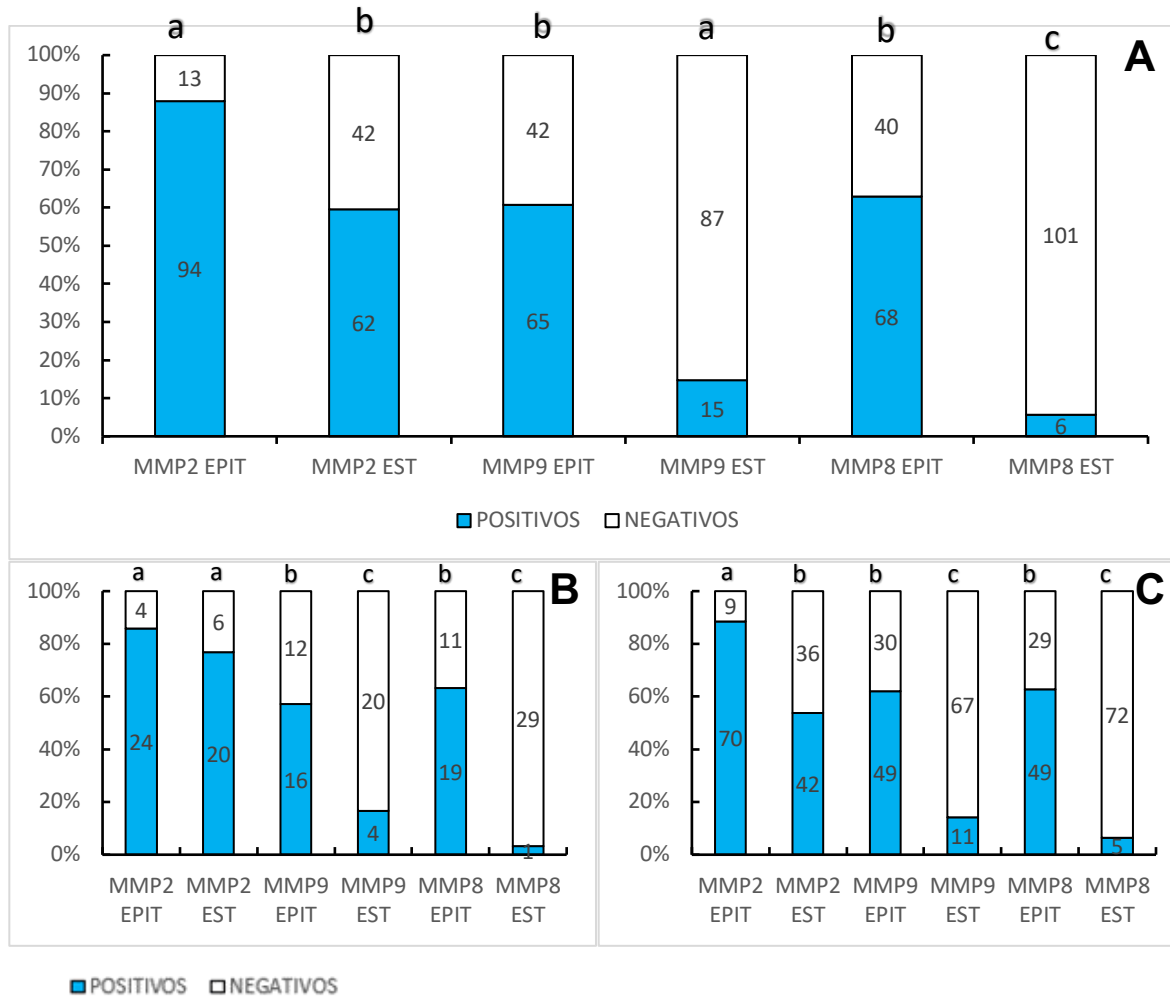


FIGURA 5. Comparación de la expresión de las metaloproteinasas de matriz en epitelio y estroma. A) Expresión de las metaloproteinasas de matriz en epitelio y estroma en toda la población de estudio. B) Expresión de las metaloproteinasas de matriz en epitelio y estroma en tumores limítrofes. C) Expresión de las metaloproteinasas de matriz en epitelio y estroma en carcinomas. Abreviaturas. EPIT: epitelio. EST: estroma. Las letras diferentes indican significancia estadística. $P < 0.05$

8.4. Análisis de asociación

Se realizaron tablas de contingencia para establecer una asociación entre la expresión de las MMPs y los receptores de hormonas esteroideas; así como con el estadio clínico, el subtipo histológico, estado reproductivo, CA-125 aldiagnóstico,

tipo de citorreducción para lo cual se aplicó la prueba de χ^2 o la prueba exacta de Fisher, según sea el caso.

No se encontró asociación entre las MMP-2,-8 y -9 con el subtipo histológico, estadio clínico (FIGO), estado reproductivo de la paciente y el tipo de citorreducción practicada, tampoco hubo asociación de los tres receptores a hormonas esteroides sexuales con las variables arriba mencionadas (no mostrado). Sin embargo, la asociación de las metaloproteinasas -2, -8 y -9 con los receptores de hormonas esteroideas sexuales (AR, ER α , PR), se encontró que la expresión de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) está asociada a la del receptor de andrógenos, pero no a la de la colagenasa (MMP-8), como se muestra en la tabla2, estos hallazgos de asociación no se observaron con el ER α ni el PR receptor de estrógenos alfa ni con el receptor de progesterona.

Tabla 2. Asociación de AR y MMPs	<i>P</i>
AR – MMP2	0.037
AR – MMP9	0.05
AR – MMP8	0.336

8.5. Análisis de supervivencia

Para evaluar el impacto en el pronóstico de la paciente se realizó el análisis de curvas de supervivencia (Kaplan Meier). Analizando la supervivencia por subtipo histológico, por estadio clínico, estado reproductivo, CA-125, tipo de citorreducción (óptima y subóptima) continuando con la supervivencia en cada uno de los receptores hormonales (AR, ER α y PR) y en cada una de las metaloproteinasas (MMP-2, MMP-9, MMP-8) y por último evaluando la supervivencia al asociar las MMP-2-8-9 con AR, ER α y PR.

En la supervivencia por estadio clínico es evidente el impacto que tienen los estadios avanzados en una menor supervivencia global a corto, mediano y largo plazo con un valor de $p < 0.001$ (Figura 6b). Para el caso del estado reproductivo la supervivencia es significativamente menor en las mujeres posmenopáusicas con valor de $p = 0.01$ (Figura 6a). Mismo caso es observado en la cuantificación del marcador tumoral CA-125 al diagnóstico con un valor de $p = 0.003$ (Figura 6d) y en el tipo de citorreducción con un valor de $p < 0.001$ (Figura 6e). La estirpe tumoral de estas pacientes también impacta en su supervivencia, observando que el subtipo histológico seroso de alto grado tiene la menor supervivencia en comparación con el resto de las variantes histológicas (Figura 6c).

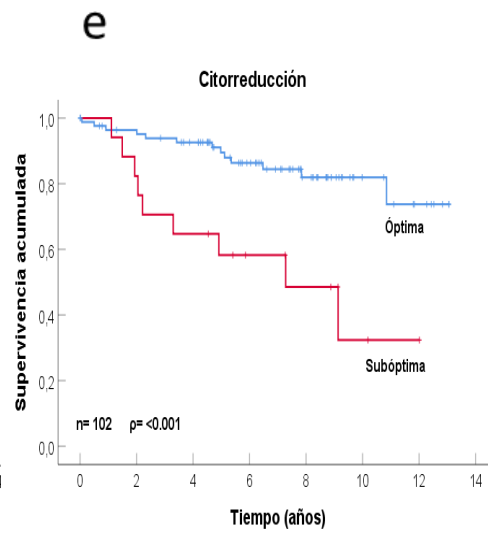
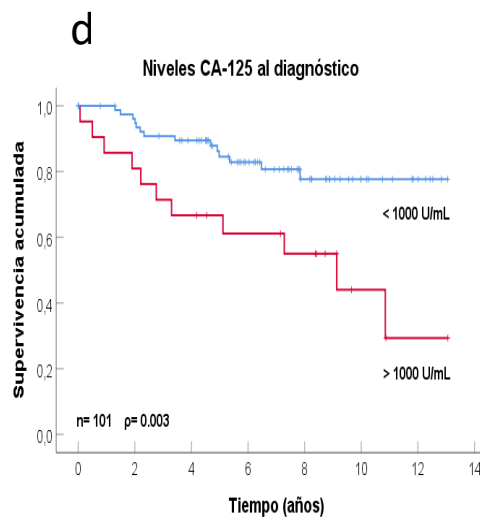
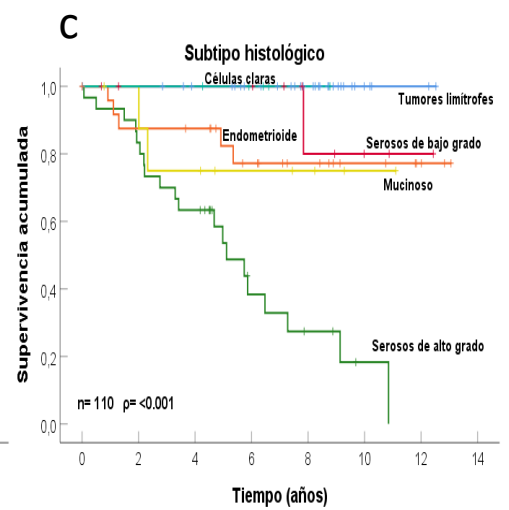
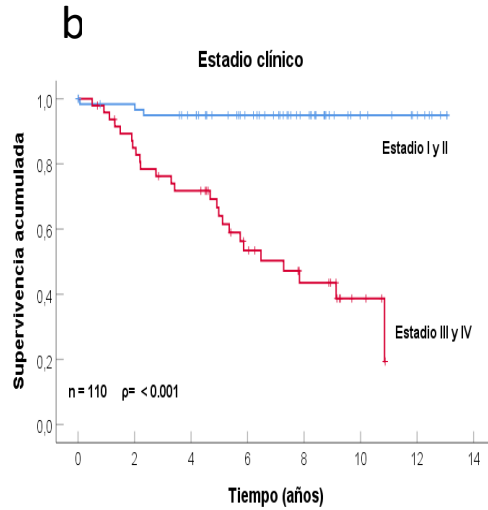
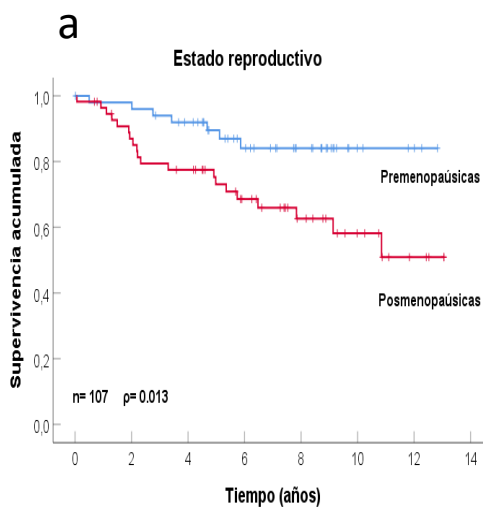


Figura 6. Curvas de supervivencia de las pacientes con cáncer epitelial de ovario de acuerdo a) el estado reproductivo, b) estadio clínico, c) subtipo histológico, d) niveles de CA125 inicial y e) tipo de citoreducción.

Al realizar el análisis de la supervivencia de cada uno de los receptores hormonales no se observó un impacto en la supervivencia por la presencia o ausencia en la expresión de cada una de estas proteínas (Figura 7 a, b y c).

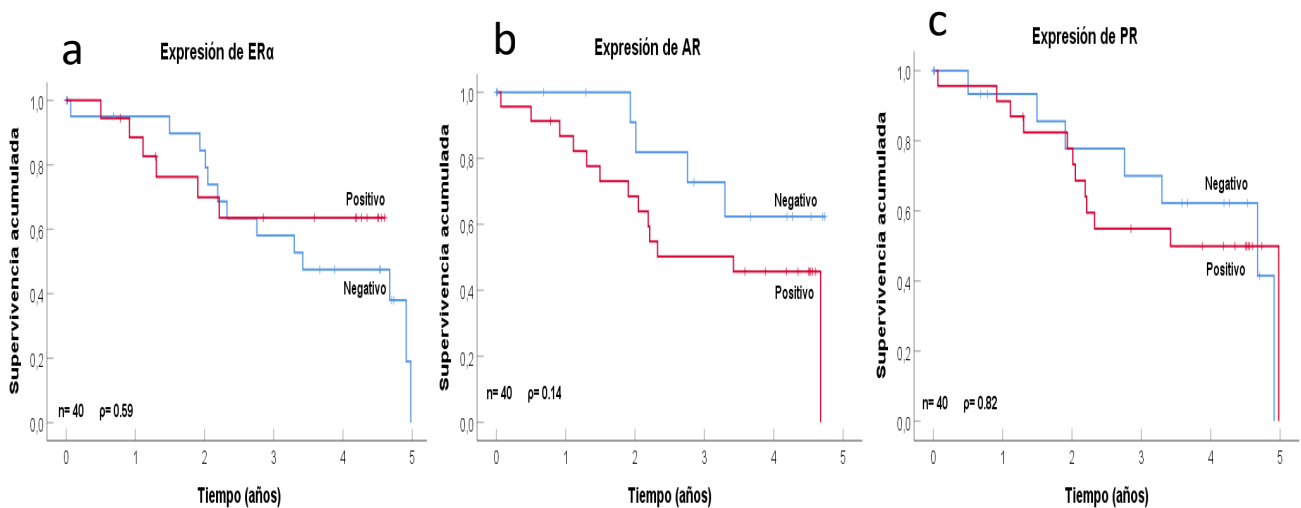


Figura 7. Curvas de supervivencia de las pacientes con cáncer epitelial de ovario de acuerdo a la expresión de los receptores a hormonas esteroides sexuales, a) ER alfa, b) AR c) PR.

El análisis de supervivencia de la expresión individual en el tejido tumoral de cada una de las metaloproteinasas de matriz no mostró ningún impacto en la supervivencia por la presencia o la ausencia de cada una de estas MMPs (Figura 8 a,b y c).

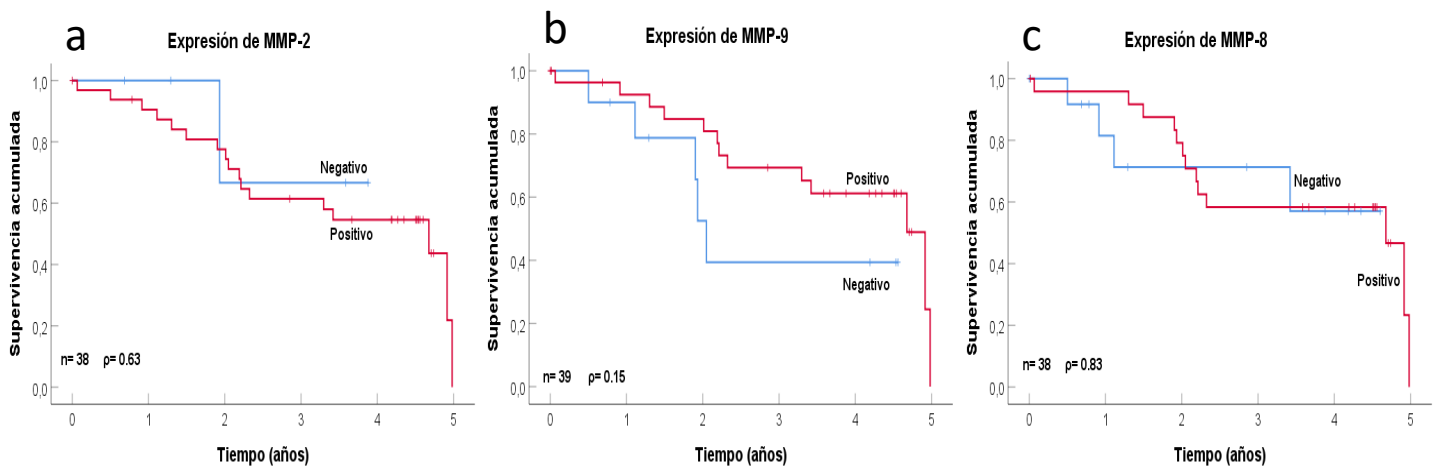


Figura 8. Curvas de supervivencia de las pacientes con cáncer epitelial de ovario de acuerdo a la expresión de las metaloproteinasas de matriz a) MMP2, b) MMP9, c) MMP8.

Al evaluar la sobrevida cuando se expresaban de manera simultánea los receptores hormonales y las MMPs, se observó que la coexpresión del receptor de estrógenos con cada una de las metaloproteinasas no impactaba en la sobrevida, mismo supuesto observado para el receptor de progesterona.

Sin embargo, cuando se coexpresaban el receptor de andrógenos con cada una de las metaloproteinasas se encontró un impacto significativo en la sobrevida en la coexpresión AR-MMP2 ($\rho= 0.03$) y con la MMP-9 ($\rho= 0.05$), y con la MMP-8 ($\rho=0.03$), como se puede observar en las (Figura 9 a, b y c).

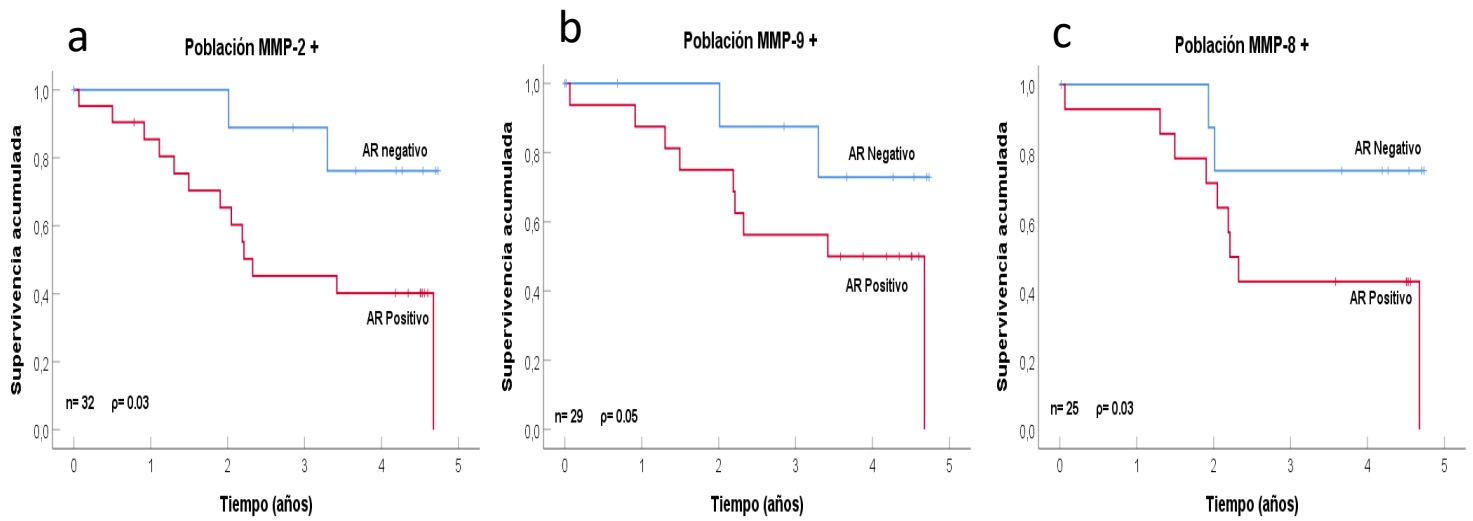


Figura 9: Curvas de supervivencia de las pacientes con cáncer epitelial de ovario de acuerdo a la expresión del receptor de andrógenos en grupos estratificados según la expresión positiva de las metaloproteinasas de matriz a) MMP2, b) MMP9 , c) MMP8.

9. DISCUSIÓN

El análisis descriptivo de la población muestra que la edad promedio al diagnóstico de nuestra cohorte es menor a la descrita en la literatura [10], siendo aproximadamente de (-)10 años al momento en el que se diagnostica esta patología; lo cual es importante, ya que es necesario considerar a esta patología, como un diagnóstico diferencial en enfermedades gastrointestinales y genitourinarias, en este segmento etario de la población mexicana.

El CA-125 tiene un comportamiento variable, similar a lo descrito en la literatura [70], por lo cual su evaluación e interpretación dependerá del contexto clínico de cada paciente y de los demás estudios paraclínicos realizados.

El subtipo histológico más frecuente fue el seroso de alto grado seguido del endometriode lo cual difiere a lo descrito en otras poblaciones donde el subtipo mucinoso tiende a ser el segundo más frecuente[18], incluso en nuestra muestra el seroso de bajo grado era más frecuente que el mucinoso, siendo este último superior sólo al de células claras, lo cual es un factor a considerar para un adecuado abordaje inicial para el diagnóstico y también para el tratamiento ya que éste difiere de acuerdo a la variante histopatológica de la que se trate [24).

En el análisis de asociación, que contrasta a las variables clínicas con los receptores de hormonas esteroideas y con las metaloproteinasas, no se observaron asociaciones significativas. Lo cual sugiere que la expresión de estas moléculas

es independiente de las variables clínicas evaluadas. Al evaluar la asociación de los receptores hormonales con las metaloproteinasas se observó que solo para el caso del receptor de andrógenos había una asociación en la expresión de este con MMP-2 y MMP-9. Tomando en cuenta la literatura que hemos revisado, no tenemos una explicación documentada para esta asociación.

El subtipo histológico, el estadio clínico, el estado reproductivo, el tipo de cito reducción, y el nivel de CA-125 al momento del diagnóstico son elementos significativos para el pronóstico de la sobrevida global en esta enfermedad, los resultados aquí descritos se comportan de acuerdo con lo ya descrito en la literatura [23-25) lo que confirma la importancia de tenerlos en cuenta en la toma de decisiones diagnósticas, pronósticas y terapéuticas, así como variables confusoras en futuros estudios de factores de riesgo.

Al evaluar el efecto sobre la supervivencia de los pacientes relacionado a la expresión de cada uno de los tipos de MMPs y de los receptores a las hormonas sexuales evaluados de manera individual, no hubo un impacto significativo. Sin embargo, cuando seleccionamos los pacientes con expresión positiva de alguna de las metaloproteinasas estudiadas, la presencia del receptor de andrógenos muestra una reducción significativa en la sobrevida de las pacientes, este hallazgo no está presente en el caso de los otros receptores hormonales (ER α y PR). El impacto negativo en la sobrevida puede deberse a la suma del efecto de los factores expresados individualmente; como alternativa, podría haber una interacción directa o indirecta generadas por la coexpresión de estas moléculas. El analizar el mecanismo que participa en el peor pronóstico cuando se expresan

simultáneamente MMMP- 2, 8, y 9 con AR será motivo de futuros estudios.

10. CONCLUSIONES

- Las metaloproteinasas, MMP-2, MMP-8 y MMP9 están presentes en el epitelio y el estroma de los tumores de ovario. MMP-2 se encuentra con mayor frecuencia en el estroma de los tumores epiteliales de ovario.
- Los receptores a hormonas sexuales: ER α , PR y AR están presentes en el epitelio de los distintos tipos de tumores epiteliales de ovario
- Los hallazgos relacionados al subtipo histológico, el estadio clínico, el estado reproductivo, el nivel de CA-125, y el tipo de citorreducción sobre la evolución del cáncer epitelial de ovario demuestran que los mismos son factores asociados a la sobrevida global de las pacientes.
- La coexpresión de las gelatinasas (MMP-2 y MMP-9) y la colagenasa (MMP-8) con el receptor de andrógenos (AR), se tradujo en un impacto negativo en la curva de supervivencia de las pacientes que padecen la enfermedad.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al.. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* 2015; 65:87. doi: 10.3322/caac.21262.
2. Vigilancia, epidemiología y resultados finales Datos estadísticos sobre el cáncer: cáncer de ovario. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/ovary.html>
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018 8(6):394-424. doi: 10.3322/caac.21492
4. Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, Jemal A. Cancer Statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* 2021; 71: 7. doi: 10.3322/caac.21654
5. Liao CI, Chow S, Chen LM, Kapp DS, Mann A, Chan JK. 2018 Trends in the incidence of serous fallopian tube, ovarian, and peritoneal cancer in the US. *Gynecol Oncol*. May;149(2):318-323. doi: 10.1016/j.ygyno.2018.01.030.
6. Sant M, Aareleid T, Berrino F, Bielska Lasota M, Carli PM, Faivre J, Grosclaude P, Hédelin G, Matsuda T, Møller H, Möller T, Verdecchia A, Capocaccia R, Gatta G, Micheli A, Santaquilani M, Roazzi P, Lisi D; 2003EUROCORE Working Group. EUROCORE-3: survival of cancer patients diagnosed 1990-94--results and commentary. *Ann Oncol*.;14 Suppl 5:v61-118. doi: 10.1093/annonc/mdg754.
7. Gallardo-Rincon D, Cantu-de-Leon D, Alanis-Lopez P, Alvarez-Avitia MA, Banuelos-Flores J, Herbert-Nunez GS, et al. 2011. Third National Ovarian Consensus. Grupo de Investigacion en Cancer de Ovario y Tumores Ginecologicos de Mexico "GICOM". *Rev Invest Clin*. 2011;63(6):665-702.
8. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ 2008. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 58:71-96. doi: 10.3322/CA.2007.0010.
9. Chan JK, Cheung MK, Husain A, Teng NN, West D, Whittemore AS, Berek JS, Osann K. 2006 Patterns and progress in ovarian cancer over 14 years. *Obstet Gynecol*. 108(3 Pt 1):521-8. doi: 10.1097/01.AOG.0000231680.58221.a7.
10. Cho, K.R., Shih, I.-M., 2009. Ovarian Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis*. 4, 287–313. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246>
11. Zeppernick F, Meinhold-Heerlein I. 2014 The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Arch Gynecol Obstet*. 290(5):839-42. doi: 10.1007/s00404-014-3364-8.
12. Purbadi S, Anggraeni TD, Vitria A. 2021 Early stage epithelial ovarian cancer metastasis through peritoneal fluid circulation. *J Ovarian Res*.14(1):44. doi: 10.1186/s13048- 021-00795-z.
13. Berek JS, Friedlander M, Hacker NF. 2020 Epithelial ovarian, fallopian tube, and peritoneal cancer. In: Berek JS, Hacker NF, Eds. *Berek and Hacker's Gynecologic Oncology*, 7th edn. Wolters Kluwer Health;
14. Berek JS, Renz M, Kehoe S, Kumar L, Friedlander M. 2021 Cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: 2021 update. *Int J Gynaecol Obstet*. Oct;155 Suppl 1(Suppl 1):61-85. doi: 10.1002/ijgo.13878.
15. Scully RE, Young RH, Clements PB. 1998. Tumors of the ovary, maldeveloped gonads, fallopian tube, and broad ligaments. *Atlas of Tumor Pathology*. Third series. Armed Forces Institute of Pathology;
16. Levanon K, Crum C, Drapkin R. 2008 New insights into the pathogenesis of serous ovarian cancer and its clinical impact. *J Clin Oncol*; 26:5284-5293. doi:

10.1200/JCO.2008.18.1107

17. Deffieux X, Morice P, Thoury A, Camatte S, Duvillard P, Castaigne D. 2005 Anatomy of pelvic and para-aortic nodal spread in patients with primary fallopian tube carcinoma. *J Am Coll Surg*.;200:45-48. doi: 10.1016/j.jamcollsurg.2004.09.017
18. Bankhead CR, Kehoe ST, Austoker J. 2005 Symptoms associated with diagnosis of ovarian cancer: a systematic review. *BJOG*.;112:857-865. doi: 10.1111/j.1471-0528.2005.00572.x
19. Kurman RJ, Shih leM. 2008 Pathogenesis of ovarian cancer: lessons from morphology and molecular biology and their clinical implications. *Int J Gynecol Pathol*. 2008 Apr;27(2):151-60. doi: 10.1097/PGP.0b013e318161e4f5.
20. Crum CP, Drapkin R, Miron A, et al. 2007 The distal fallopian tube: a new model for pelvic serous carcinogenesis. *Curr Opin Obstet Gynecol*.;19:3-9. doi: 10.1097/GCO.0b013e328011a21f.
21. Baekelandt M, Jorunn Nesbakken A, Kristensen GB, Trope CG, Abeler VM. 2000 Carcinoma of the fallopian tube. *Cancer*. 89:2076-2084.
22. Burghardt E, Girardi F, Lahousen M, Tamussino K, Stettner H. 1991 Patterns of pelvic and paraaortic lymph node involvement in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*.;40:103-106. doi: 10.1016/0090-8258(91)90099-q.
23. Hauptmann S, Friedrich K, Redline R, Avril S. Ovarian borderline tumors in the 2014 WHO classification: evolving concepts and diagnostic criteria. *Virchows Arch*. 2017 Feb;470(2):125-142. doi: 10.1007/s00428-016-2040-8.
24. Prat J. Pathology of borderline and invasive cancers. 2017 *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol*. 41:15-30. doi: 10.1016/j.bpobgyn.2016.08.007.
25. Lheureux S, Gourley C, Vergote I, Oza AM. Epithelial ovarian cancer. *Lancet*. 2019 Mar 23;393(10177):1240-1253. doi: 10.1016/S0140-6736(18)32552-2.
26. Shih IM, Wang Y, Wang TL. 2021 The Origin of Ovarian Cancer Species and Precancerous Landscape. *Am J Pathol*. 191(1):26-39. doi: 10.1016/j.ajpath.2020.09.006.
27. Vang R, Shih leM, Kurman RJ. 2009 Ovarian low-grade and high-grade serous carcinoma: pathogenesis, clinicopathologic and molecular biologic features, and diagnostic problems. *Adv Anat Pathol*. 16(5):267-82. doi: 10.1097/PAP.0b013e3181b4fffa.
28. Kurman RJ, Shih leM. 2010 The origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer: a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol*.;34(3):433-43. doi: 10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79.
29. Kurman RJ, Shih leM. 2011 Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer--shifting the paradigm. *Hum Pathol*. 42(7):918-31. doi: 10.1016/j.humpath.2011.03.003.
30. Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T, Senz J, McConechy MK, Anglesio MS, Kalloger SE, Yang W, Heravi-Moussavi A, Giuliany R, Chow C, Fee J, Zayed A, Prentice L, Melnyk N, Turashvili G, Delaney AD, Madore J, Yip S, McPherson AW, Ha G, Bell L, Fereday S, Tam A, Galletta L, Tonin PN, Provencher D, Miller D, Jones SJ, Moore RA, Morin GB, Oloumi A, Boyd N, Aparicio SA, Shih leM, Mes-Masson AM, Bowtell DD, Hirst M, Gilks B, Marra MA, Huntsman DG. 2010 ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med*. 14;363(16):1532-43. doi: 10.1056/NEJMoa1008433.
31. Goldstein, I., Traish, A., Kim, N., Munarriz, R., 2004. The Role of Sex Steroid Hormones in Female Sexual Function and Dysfunction: *Clin. Obstet. Gynecol*. 47, 471–484. <https://doi.org/10.1097/00003081-200406000-00022>
32. Molenda HA, Kilts CP, Allen RL, Tetel MJ. 2003 Nuclear receptor coactivator function in reproductive physiology and behavior. *Biol Reprod*.69(5):1449-57. doi: 10.1095/biolreprod.103.019364.
33. Mangelsdorf D.J., Thummel C., Beato M., Herrlich P., Schütz G., Umesono K., Blumberg

- B., Kastner P., Mark M., Chambon P., et al. 1995 The nuclear receptor superfamily: The second decade. *Cell*;83:835–839. doi: 10.1016/0092-8674(95)90199-X.
34. Huang P., Chandra V., Rastinejad F. 2010 Structural overview of the nuclear receptor superfamily: Insights into physiology and therapeutics. *Annu. Rev. Physiol.*;72:247–272. doi: 10.1146/annurev-physiol-021909-135917.
 35. Porter BA, Ortiz MA, Bratslavsky G, Kotula L. 2019 Structure and Function of the Nuclear Receptor Superfamily and Current Targeted Therapies of Prostate Cancer. *Cancers (Basel)*. 23;11(12):1852. doi: 10.3390/cancers11121852.
 36. McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW. 1999 Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev.*;20(3):321-44. doi: 10.1210/edrv.20.3.0366.
 37. McKenna NJ, Xu J, Nawaz Z, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. 1999 Nuclear receptor coactivators: multiple enzymes, multiple complexes, multiple functions. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 69(1-6):3-12. doi: 10.1016/s0960-0760(98)00144-7.
 38. Georget V, T erouanne B, Nicolas JC, Sultan C. 2002 Mechanism of antiandrogen action: key role of hsp90 in conformational change and transcriptional activity of the androgen receptor. *Biochemistry*.1;41(39):11824-31. doi: 10.1021/bi0259150.
 39. Sever R, Glass CK. 2013 Signaling by nuclear receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. ;5(3):a016709. doi: 10.1101/cshperspect.a016709.
 40. Tan MH, Li J, Xu HE, Melcher K, Yong EL. 2015 Androgen receptor: structure, role in prostate cancer and drug discovery. *Acta Pharmacol Sin*. 36(1):3-23. doi: 10.1038/aps.2014.18.
 41. Sultan C, Lumbroso S, Poujol N, Belon C, Boudon C, Lobaccaro JM. 1993 Mutations of androgen receptor gene in androgen insensitivity syndromes. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 46(5):519-30. doi: 10.1016/0960-0760(93)90178-y.
 42. Michmerhuizen AR, Spratt DE, Pierce LJ, Speers CW. 2020 ARe we there yet? Understanding androgen receptor signaling in breast cancer. *NPJ Breast Cancer*. 25;6:47. doi: 10.1038/s41523-020-00190-9.
 43. Gibson, D.A., Simitsidellis, I., Collins, F., Saunders, P.T.K., 2014. Evidence of androgen action in endometrial and ovarian cancers. *Endocr. Relat. Cancer* 21, T203–T218. <https://doi.org/10.1530/ERC-13-0551>
 44. Kono M, Fujii T, Lim B, Karuturi MS, Tripathy D, Ueno NT. 2017 Androgen Receptor Function and Androgen Receptor-Targeted Therapies in Breast Cancer: A Review. *JAMA Oncol.*;3(9):1266-1273. doi: 10.1001/jamaoncol.2016.4975.
 45. Levin ER. 2008 Rapid signaling by steroid receptors. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*;295(5):R1425-30. doi: 10.1152/ajpregu.90605.2008.
 46. Farzaneh, F., Noghabaei, G., Barouti, E., Poursmaili, F., Jamshidi, J., Fazeli, A., Taghavi, S., Emamalizadeh, B., Darvish, H., 2016. Analysis of CYP17, CYP19 and CYP11A1 Gene Polymorphisms in Iranian Women with Breast Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev*. 17, 23–26. <https://doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.S3.23>
 47. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Str om A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA. 2007 Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev*.n87(3):905-31. doi: 10.1152/physrev.00026.2006.
 48. Hess R. A. 2003 Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. *Reproductive Biology and Endocrinology*.;1(1):p. 52. doi: 10.1186/1477-7827-1-52.
 49. Amenogbe E, Chen G, Wang Z, Lu X, Lin M, Lin AY. 2020 A Review on Sex Steroid Hormone Estrogen Receptors in Mammals and Fish. *Int J Endocrinol*. 7;2020:5386193. doi: 10.1155/2020/5386193.
 50. Lupu R, Menendez JA. 2006 Targeting fatty acid synthase in breast and endometrial cancer: An alternative to selective estrogen receptor modulators? *Endocrinology*. Sep;147(9):4056-66. doi: 10.1210/en.2006-0486.

51. Fuentes, N., Silveyra, P., 2019. Estrogen receptor signaling mechanisms, in: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. Elsevier, pp. 135–170. doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001
52. Chen, C., Gong, X., Yang, X., Shang, X., Du, Q., Liao, Q., Xie, R., Chen, Y., Xu, J., 2019. The roles of estrogen and estrogen receptors in gastrointestinal disease (Review). *Oncol. Lett.* <https://doi.org/10.3892/ol.2019.10983>
53. Vajaria R, Vasudevan N. 2018 Is the membrane estrogen receptor, GPER1, a promiscuous receptor that modulates nuclear estrogen receptor-mediated functions in the brain? *Horm Behav.* 104:165-172. doi: 10.1016/j.yhbeh.2018.06.012.
54. Nilsson S, Koehler KF, Gustafsson JÅ. 2011 Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.*;10(10):778-92. doi: 10.1038/nrd3551.
55. Bottino, M.C., Lanari, C., 2010. Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Med. B. Aires* 70, 173–184.
56. Hagan, C.R., Daniel, A.R., Dressing, G.E., Lange, C.A., 2012. Role of phosphorylation in progesterone receptor signaling and specificity. *Mol. Cell. Endocrinol.* 357, 43–49. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.017>
57. Patel B, Elguero S, Thakore S, Dahoud W, Bedaiwy M, Mesiano S. 2015 Role of nuclear progesterone receptor isoforms in uterine pathophysiology. *Hum Reprod Update.*;21(2):155-73. doi: 10.1093/humupd/dmu056.
58. Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. 2010 Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.*;141(1):52-67. doi: 10.1016/j.cell.03.015.
59. Gialeli C, Theocharis AD, Karamanos NK. 2011 Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting. *FEBS J.*;278(1):16-27.
60. Radisky ES, Radisky DC. 2010 Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.*;15(2):201-12.
61. Zhang Y, Chen Q. 2017 Relationship between matrix metalloproteinases and the occurrence and development of ovarian cancer. *Braz J Med Biol Res.*;50(6):e6104.
62. Davidson B, Goldberg I, Gotlieb WH, Kopolovic J, Ben-Baruch G, Nesland JM, et al. 1999 High levels of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 mRNA correlate with poor survival in ovarian carcinoma. *Clin Exp Metastasis.*;17(10):799-808.
63. Jia ZH, Jia Y, Guo FJ, Chen J, Zhang XW, Cui MH. Phosphorylation of STAT3 at Tyr705 regulates MMP-9 production in epithelial ovarian cancer. *PLoS One.* 2017;12(8):e0183622.
64. Stadlmann S, Pollheimer J, Moser PL, Raggi A, Amberger A, Margreiter R, et al. 2003 Cytokine- regulated expression of collagenase-2 (MMP-8) is involved in the progression of ovarian cancer. *Eur J Cancer.* 39(17):2499-505.
65. Grandas OH, Mountain DH, Kirkpatrick SS, Cassada DC, Stevens SL, Freeman MB, et al. 2009 Regulation of vascular smooth muscle cell expression and function of matrix metalloproteinases is mediated by estrogen and progesterone exposure. *J Vasc Surg.*49(1):185-91.
66. Mountain DJ, Freeman BM, Kirkpatrick SS, Beddies JW, Arnold JD, Freeman MB, et al. 2013 Androgens regulate MMPs and the cellular processes of intimal hyperplasia. *J Surg Res.*184(1):619-27. doi: 10.1016/j.jss.2013.05.070.
67. Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, Nadler LM, Colvin RB, Knapp RC. 1981 Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma. *J Clin Invest.* 68(5):1331–1337. doi:10.1172/jci110380

68. Hellström I, Raycraft J, Hayden-Ledbetter M, et al. 2003 The HE4 (WFDC2) protein is a biomarker for ovarian carcinoma. *Cancer Res.*;63(13):3695–3700.
69. Bast RC Jr, Klug TL, St John E, et al. 1983 A radioimmunoassay using a monoclonal antibody to monitor the course of epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med.*309(15):883–887. doi:10.1056/NEJM198310133091503
70. Buamah P. 2000 Benign conditions associated with raised serum CA-125 concentration. *J Surg Oncol.* 75(4):264–265. doi:10.1002/1096-9098(200012)75:4<264::aid-jso7>3.0.co;2-q
71. Ferraro S, Braga F, Lanzoni M, Boracchi P, Biganzoli EM, Panteghini M. 2013 Serum human epididymis protein 4 vs carbohydrate antigen 125 for ovarian cancer diagnosis: a systematic review. *J Clin Pathol.* 66(4):273–281. doi:10.1136/jclinpath-2012-201031
72. Bouchard D, Morisset D, Bourbonnais Y, Tremblay GM. 2006 Proteins with whey-acidic-protein motifs and cancer. *Lancet Oncol.* 7(2):167–174. doi:10.1016/S1470-2045(06)70579-4
73. Hennighausen LG, Sippel AE. 1982 Mouse whey acidic protein is a novel member of the family 'four-disulfide core' proteins. *Nucleic Acids Res.* 10(8):2677–2684. doi:10.1093/nar/10.8.2677
74. Kirchhoff C, Habben I, Ivell R, Krull N. 1991 A major human epididymis-specific cDNA encodes a protein with sequence homology to extracellular proteinase inhibitors. *Biol Reprod.* 45(2):350–357. doi:10.1095/biolreprod45.2.350
75. Drapkin R, von Horsten HH, Lin Y, et al. 2005 Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 65(6):2162–2169. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3924
76. Yanaranop M, Anakrat V, Siricharoenchai S, Nakrangsee S, Thinkhamrop B. 2017. Is the Risk of Ovarian Malignancy Algorithm Better Than Other Tests for Predicting Ovarian Malignancy in Women with Pelvic Masses?. *Gynecol Obstet Invest.* 82(1):47–53. doi:10.1159/000446238
77. Romagnolo C, Leon AE, Fabricio ASC, et al. 2016 HE4, CA125 and risk of ovarian malignancy algorithm (ROMA) as diagnostic tools for ovarian cancer in patients with a pelvic mass: An Italian multicenter study. *Gynecol Oncol.* 141(2):303–311. doi:10.1016/j.ygyno.2016.01.016
78. Dochez V, Caillon H, Vaucel E, Dimet J, Winer N, Ducarme G. Biomarkers and algorithms for diagnosis of ovarian cancer: CA125, HE4, RMI and ROMA, a review. *J Ovarian Res.* 2019;12(1):28. Published 2019 Mar 27. doi:10.1186/s13048-019-0503-7
79. Fortner RT, Vitonis AF, Schock H, et al. 2017 Correlates of circulating ovarian cancer early detection markers and their contribution to discrimination of early detection models: results from the EPIC cohort. *J Ovarian Res.* 10(1):20. Published 2017 Mar 20. doi:10.1186/s13048-017-0315-6
80. Urban N, Thorpe J, Karlan BY, et al. 2012 . Interpretation of single and serial measures of HE4 and CA125 in asymptomatic women at high risk for ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 21(11):2087–2094. doi:10.1158/1055-9965.EPI-12-0616
81. Ferraro S, Schiumarini D, Panteghini M. 2015 Human epididymis protein 4: factors of variation. *Clin Chim Acta.* 438:171–177. doi:10.1016/j.cca.2014.08.020
82. Moore RG, McMeekin DS, Brown AK, et al. 2009; A novel multiple marker bioassay utilizing HE4 and CA125 for the prediction of ovarian cancer in patients with a pelvic mass. *Gynecol Oncol.* 12(1):40–46. doi:10.1016/j.ygyno.2008.08.031
83. Chudecka-Głaz AM. 2015 ROMA, an algorithm for ovarian cancer. *Clin Chim*

Acta. 440:143–151. doi:10.1016/j.cca.2014.11.015

84. Morales-Vasquez F, Pedernera E, Reynaga-Obregon J, Lopez-Basave HN, Gomora MJ, Carlon E, et al. 2016 High levels of pretreatment CA125 are associated to improved survival in high grade serous ovarian carcinoma. *J Ovarian Res.* 9(1):41.