



DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

“EFECTO DE PINX1, CORREGULADOR DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS A, EN LA FORMACIÓN DE OVARIO-ESFERAS DE CÉLULAS DE CÁNCER DE OVARIO”

TESIS

**Para obtener el grado de
MAESTRA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL**

PRESENTA

Biol. Exp. Miriam Cruz Castillo

2202800648

miriamcruzca@gmail.com

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

JURADO:

Presidenta:

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

Secretario:

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís

Vocales:

Dra. Noemi Baranda Ávila

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

Ciudad de México a 07 de diciembre de 2022

CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México; a 07 de diciembre de 2022

Comisión Académica de la Maestría en

Biología de la Reproducción Animal

Presente

La que suscribe **Miriam Cruz Castillo** alumna con número de matrícula **2202800648**, de la Maestría en **Biología de la Reproducción Animal** de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación titulado **“Efecto de PinX1, corregulador del receptor de estrógenos α , en la formación de ovario-esferas de células de cáncer de ovario”** a desarrollar en Instituto Nacional de Cancerología. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



Biol. Exp. Miriam Cruz Castillo

Nombre completo y firma autógrafa

DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

La que suscribe **Miriam Cruz Castillo**, alumna de la **Maestría en Biología de la Reproducción Animal**, de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada: **“Efecto de PinX1, corregulador del receptor de estrógenos α , en la formación de ovario-esferas de células de cáncer de ovario”**.

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. Jurado para lo obtención del grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si ésta no fuese de mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 07 de diciembre de 2022.

Atentamente



Biol. Exp. Miriam Cruz Castillo



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

División en Ciencias Biológicas y de la Salud
Maestría en Biología de la Reproducción Animal

T E S I S

“Efecto de PinX1, corregulador del receptor de estrógenos α , en la formación de ovario-esferas de células de cáncer de ovario”

Para obtener el grado de Maestra en Biología de la
Reproducción Animal que presenta:

Biol. Exp. Miriam Cruz Castillo

Codirectores:

Dra. Elizabeth Langley McCarron, Codirectora
Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura, Codirector

Asesor:

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís, Asesor

Ciudad de México a 7 de diciembre de 2022

COMITE TUTORAL

CODIRECTORES:

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Investigador en Ciencias Médicas D
Instituto Nacional de Cancerología
langleyemx@gmail.com

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Departamento de Biología de la Reproducción
Unidad Iztapalapa
Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)
pgdm@xanum.uam.mx

ASESOR:

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís
Departamento de Ciencias Naturales
Unidad Cuajimalpa
Universidad Autónoma Metropolitana (UAM)
ctcf@ciencias.unam.mx

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Iztapalapa

Departamento de Biología de la Reproducción Animal

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís

Universidad Autónoma Metropolitana

Unidad Cuajimalpa

Departamento de Ciencias Naturales

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

Subdirección de Investigación Clínica

Instituto Nacional de Cancerología

Dra. Noemi Baranda Avila

Subdirección de Investigación Básica

Instituto Nacional de Cancerología

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma Metropolitana, especialmente a la Unidad Iztapalapa por abrirme sus puertas al conocimiento, por brindarme las herramientas para continuar con mis estudios y por ser mi segunda casa donde pude crear grandes recuerdos.

Quiero expresar un especial agradecimiento a la Dra. Elizabeth Langley McCarron, quién me permitió tener mi primer acercamiento a un laboratorio de investigación, por su apoyo y orientación, por compartir su amor hacia la ciencia y siempre forzarme a crecer profesionalmente, gracias por todo.

Agradezco a quién siempre estuvo apoyándome, escuchándome y animándome, al Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura, ya que sin él este camino no hubiera sido igual, gracias por su amor a la docencia y a enseñarme que el único lugar donde “éxito” está antes que “trabajo” es en el diccionario.

Al Dr. Ernesto Soto Reyes por sus críticas y comentarios, por compartirme su conocimiento y por siempre estar dispuesto a ayudarme en lo que necesitaba.

Aprecio las horas que compartí junto con la Dra. Noemí Baranda Ávila, por siempre estar dispuesta a ayudarme, por regalarme su conocimiento, por su apoyo que me dio desde licenciatura y, sobre todo, por siempre animarme cuando los experimentos hacían de las suyas, gracias por tanto.

Gracias a la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez, por apoyarme con reactivos y abrirme las puertas de su laboratorio, por su amabilidad y por siempre tener una respuesta cálida y divertida, por su atención y conocimientos brindados.

Quiero reconocer los días de felicidad que pasé a lado de cada uno de mis compañeros de laboratorio, con aquellos que dijeron adiós, con los que permanecieron, con los que se integraron y con los que conocí durante mi estancia en el INCan, gracias por tantas risas y por contribuir en mi formación, por su apoyo y por crear recuerdos a mi lado.

Agradezco el apoyo otorgado por CONACYT con número de registro (CVU) 1079851 durante mis estudios de maestría.

Agradezco a todas las críticas y comentarios de los miembros del Jurado de Examen de Grado.

JURADO DE EXAMEN DE GRADO

El jurado designado por la Comisión de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobó la Tesis titulada “**Efecto de PinX1, corregulador del receptor de estrógenos α , en la formación de ovario-esferas de células de cáncer de ovario**” con fecha 07 de diciembre de 2022.



Presidenta

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa



Secretario

Dr. Ernesto Soto Reyes Solís

Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Cuajimalpa
Departamento de Ciencias Naturales



Vocal

Dra. Noemi Baranda Avila

Subdirección de Investigación Básica
Instituto Nacional de Cancerología



Vocal

Dra. María Guadalupe Isabel Domínguez Gómez

Subdirección de Investigación Clínica
Instituto Nacional de Cancerología

DEDICATORIA

A mis padres, Clara y Gerardo: Gracias mamá por siempre estar cuando más lo necesitaba, por alentarme y ayudarme para lograr mis metas, por regañarme cada que lo necesitaba y entenderme, por ser una mujer excepcional y trabajadora, por confiar en mí y cuidarme. Gracias papá por inculcarme el sentido de responsabilidad, por enseñarme a agotar todas las posibilidades antes de rendirme, por tu comprensión y apoyo, por darme tu confianza y enseñarme que se nos va la vida en cosas redundantes y que cuando se necesita un respiro no está mal descansar. Su hija siempre estará agradecida por su esfuerzo tan grande que han hecho a lo largo de los años y me siento afortunada de tenerlos como padres. Gracias por haberme fomentado el deseo de superación, este logro es por y para ustedes, los amo.

A mi hermana Karen: Por ser un ejemplo para seguir. Doy gracias a la vida por tenerte como hermana mayor y poder encontrar apoyo y respuesta en ti.

A mi familia, por el apoyo incondicional que me dan.

Agradezco a la vida por enseñarme que no se necesitan de un millón de personas a tu lado, sino las indicadas. Por siempre llevarme por el camino indicado y regalarme a los necesarios, a aquellos que me confortan y ofrecen un lugar cálido en donde me puedo apoyar.

Contenido

Abreviaturas	13
Resumen	16
Abstract	17
1. Introducción	18
1.1 Fisiología del Ovario	18
1.2 Epidemiología del cáncer de ovario epitelial.....	19
1.3 Etiología del COE	20
1.4 Clasificación del cáncer de ovario epitelial	21
Carcinoma Seroso de Alto Grado (HGSC).....	21
Carcinoma Seroso de Bajo Grado (LGSC).....	22
Carcinoma endometriode.....	23
Carcinoma mucinoso	24
Carcinoma de Células Claras.....	25
1.5 Factores de riesgo y protectores asociados al COE.....	26
1.6 Diagnóstico del COE	31
1.7 Estadificación del COE.....	33
1.8. Hormonas esteroides y COE.....	34
1.8.1 Biosíntesis de estrógenos en el ovario.....	34
1.8.2 Estrógenos en el COE.....	37
1.9 Receptores de hormonas esteroides y receptores de estrógenos	38
1.9.1 Mecanismo y vía de señalización mediada por el receptor de estrógenos (ER)	40
1.9.2 Correguladores de los receptores de hormonas esteroides.....	43
1.9.3 Dominio LBD y ligando del ER	45
1.9.4 Fosforilaciones del ER α	48
1.10 Modelo de la contribución de coactivadores y correpresores a la actividad agonista/antagonista de los modulares selectivos del ER	50
1.11 Células troncales y células troncales cancerosas	51
1.11.1 Características de las células troncales cancerosas	52
1.11.2 Células troncales cancerosas y formación de tumores.....	54
1.12 Formación de esferoides	54

2. Antecedentes	54
2.1 CTC en cáncer de ovario epitelial y marcadores de superficie	54
2.1.1 Marcador de superficie CD44	57
2.1.2 Marcador de superficie CD133	59
2.2 PinX1, un nuevo corregulador del ER α	60
3. Planteamiento del problema	66
4. Justificación	67
5. Pregunta de investigación	67
6. Hipótesis	67
7. Objetivos	67
7.1 Objetivo General	67
7.2 Objetivos Particulares	67
8. Material y métodos	68
8.1 Ensayo <i>in silico</i>	68
8.2 Cultivo celular.....	68
8.3 Ensayos de proliferación celular con el silenciamiento de PinX1	69
8.4 Obtención de ovario-esferas.....	70
8.5 Citometría de flujo	70
8.6 Transfección estable de PinX1S.....	71
8.7 Western Blot	71
8.8 Número y tamaño de ovario-esferas	72
9. Análisis Estadístico	73
10. Resultados	74
10.1 Ensayo <i>in silico</i>	74
10.2 Presencia de PinX1 en las líneas celulares de COE.....	84
10.3 Estandarización del silenciamiento de la proteína PinX1 en las líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3.....	84
10.4 Estandarización de sobreexpresión de la proteína PinX1.....	86
10.5 Ensayos de proliferación celular de las líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3	87
10.6 Ensayos de proliferación celular de líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3 con el silenciamiento de PinX1.....	88
10.7 Estandarización para formación de ovario-esferas.....	91
10.8 Ensayos de formación de ovario-esferas y efecto de PinX1 sobre el número y tamaño de ovario-esferas generadas	103

11. Discusión de Resultados	107
12. Conclusiones y perspectivas	120
12.1 Conclusiones	120
12.2 Perspectivas	121
13. Referencias	122

Abreviaturas

AF-1	Dominio de Función de Activación 1
AF-2	Dominio de Función de Activación 2
ALDH	Aldehído Deshidrogenasa
AP-1	Proteína Activadora-1
APC	Fluorocromo Aloficocianina
AR	Receptor de Andrógenos
ARID1A	Dominio de Interacción AT-Rich 1A 2
RNAm	RNA mensajero
ATP	Adenosín Trifosfato
BRCA1	Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 1
BRCA2	Proteína de susceptibilidad al cáncer de mama tipo 2
CA125	Antígeno del Cáncer 125
cAMP	Adenosín Monofosfato Cíclico
CASP8	Caspasa 8
CD133	Glicoproteína de Superficie celular CD133
CD24	Glicoproteína de Superficie celular CD24
CD44	Glicoproteína de Superficie celular CD44
CDK12	Cinasa Dependiente de Ciclina 12
CDX2	ProteínaTipo Caudal Homeobox 2
CoAct	Coactivador
COE	Cáncer de Ovario Epitelial
CoR	Correguladores
CoRep	Correpresor
CT	Células troncales
CTC	Células Troncales Cancerosas
DBD	Dominio de Unión a DNA
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPN	Diaril propionitrilo (2,3-bis(4-Hidroxifenil)-propionitrilo
E ₁	Estrona
E ₂	17β Estradiol
E ₃	Estriol
EGF	Factor de Crecimiento Epidérmico

EGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico
ER	Receptor de Estrógenos
ERE	Elemento de Respuesta a Estrógenos
ER α	Receptor de estrógenos Alfa
ER β	Receptor de estrógenos Beta
ESA	Antígeno Epitelial Especifico
EtOH	Etanol
FBS	Suero Fetal Bovino
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
FGF	Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FGFR	Receptor del Factor de Crecimiento de Fibroblastos
FITC	Fluorocromo fuoresceína-5-isotiocianato
FIV	Fertilización In Vitro
Flu	Flutamida
FSH	Hormona Folículo Estimulante
FSHR	Receptor de la Hormona Estimulante del Folículo
GnRH	Hormona Liberadora de Gonadotropina
G-patch	Dominio Rico en Residuos de Glicina
GPER1	Receptor de Estrógeno Acoplado a Proteína G
GPR30	Receptor 1 de Estrógeno Acoplado a Proteína G
GREB1	Proteína de Unión al Receptor de Estrógeno que Regula el Crecimiento 1
hCG	Hormona Coriónica Humana
HE4	Proteína 4 del Epidídimo Humano
HGSC	Carcinoma Seroso de Alto Grado
HIF-1 α	Facto Inducible por Hipoxia, subunidad alfa
HNF-1 β	Factor Nuclear de Hepatocitos 1 Beta
HRE	Elemento de Respuesta a Hormona
HSP	Proteína de Choque Térmico
IGF-1	Factor de Crecimiento Similar a la Insulina 1
IKK α	Subunidad Alfa de la Cinasa I κ B
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
KRAS	Protooncogén KRAS, GTPasa
LBC	Hendidura de Unión del Ligando
LBD	Dominio de Unión a Ligando
LDL	Lipoproteínas de Baja Densidad
LGSC	Carcinoma Seroso de Bajo Grado
LH	Hormona Luteinizante
LHCGR	Hormona Luteinizante/Receptor de Coriogonadotropina

LMA	Leucemia Mieloide Aguda
MAPK	Proteína Cinasa Activada por Mitógenos
MAML1	Coactivador Transcripcional Tipo Mastermind 1
MMP	1,3-bis (4-hidroxifenil) Dihidrocloruro de -4-metil-5- [4- (2-piperidiniletotoxi) fenol] - 1H-pirazol
MUC	Mucina Asociada a la Superficie Celular
NF1	Neurofibromina 1
NOTCH	Receptor NOTCH
NR	Receptores Nucleares
OCT4	Proteína 3 de Unión a DNA que Contiene Homeodominio Tipo POU
OC3	Consortio de Cohortes de Cáncer de Ovario
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAX-8	Proteína de Caja Pareada Pax-8
PI-9	Inhibidor de la Peptidasa Serpina, Clado B, Miembro 9
PIK3	Subunidad Alfa Catalítica de Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-cinasa
PinX1	Proteína 1 de Interacción con Pin2/TRF1
PinX1L	Proteína 1 de Interacción con Pin2/TRF1, isoforma larga (completa) de PinX1
PinX1S	Isoforma corta de PinX1
PKA	Proteína Cinasa A
PPT	4,4',4''-(4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-tril) trisfenol
PR	Receptor de Progesterona
pS2	Factor de Trébol 1
PTM	Modificaciones Postraduccionales
RB1	Correpresor Transcripcional RB 1
SERM	Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos
sFBS	Suero Fetal Bovino Tratado con Carbón Activado/Dextran
SHR	Receptores de Hormonas Esteroides
shRNA	RNA en Horquilla Pequeño
SOX2	Factor de Transcripción SOX2
SRC	Protooncogén SRC, Tirosina Cinasa
StAR	Proteína Reguladora Aguda Esteroidogénica
Tbx3	Caja-T Proteína 3
TER	RNA de la Telomerasa
TERT	Transcriptasa Inversa de la Telomerasa
TID	Dominio de Inhibición a la Telomerasa
TP53	Proteína Supresora de Tumores
VEGF α	Factor de Crecimiento Endotelial Vascular α
WT-1	Proteína supresora de tumores asociado con el desarrollo del Tumor de Wilms

Resumen

El cáncer de ovario ocupa el noveno lugar en incidencia a nivel mundial, mientras que en la población mexicana ocupa el sexto lugar en incidencia y en mortalidad. Se ha sugerido que el cáncer de ovario está regulado por hormonas esteroides, sus receptores y proteínas denominadas correguladoras. Además, se ha descrito que PinX1 es un corregulador del receptor de estrógenos, reprimiendo su actividad en cáncer de mama por lo que inhibe su proliferación; sin embargo, en el cáncer de ovario epitelial (COE) su expresión disminuida se relaciona con la progresión de la enfermedad, sugiriendo que tiene una función crítica en esta neoplasia.

Para determinar la relación que tiene PinX1 con el COE se realizó un estudio *in silico* en donde se observó una aparente disminución del RNAm conforme avanzan los estadios y una disminución del RNAm y proteína en tumores ováricos epiteliales malignos en comparación con tejido de ovario normal. Además, se demostró que la alta expresión del receptor de estrógenos alfa (ER α) es de mal pronóstico para las pacientes mientras que la alta expresión del receptor de estrógenos β (ER β) es de buen pronóstico.

De forma experimental el silenciamiento de PinX1 fue capaz de incrementar la proliferación celular en líneas celulares de cáncer de ovario epitelial en monocapa. Además, se utilizó un modelo tridimensional a través de la generación de ovario-esferas, las cuales simulan a la masa tumoral y están enriquecidas de células troncales cancerosas que promueven una mayor malignidad del tumor, el enriquecimiento de células troncales cancerosas se determinó midiendo marcadores de superficie celular característicos: CD44 y CD133. Sorprendentemente el silenciamiento de PinX1 genera un mayor número y tamaño de ovario-esferas en las condiciones óptimas en las cuales se determinó un mayor enriquecimiento de CTC, mientras que la sobreexpresión causa un efecto contrario, presumiblemente por sus múltiples acciones que tiene PinX1: ejerciendo una inhibición de la telomerasa y por su acción como proteína correpresora del receptor de estrógenos alfa, como se muestra en células de cáncer de mama.

Abstract

Ovarian cancer ranks ninth in incidence worldwide, while in the Mexican population it ranks sixth in incidence and mortality. It has been suggested that ovarian cancer is regulated by steroid hormones, their receptors and proteins called coregulators. In addition, it has been described that PinX1 is a coregulator of the estrogen receptor, repressing its activity in breast cancer and thus inhibiting its proliferation; however, in epithelial ovarian cancer (EOC) its decreased expression is related to the progression of the disease, suggesting that it has a critical role in this disease.

To determine the relationship that PinX1 has with EOC, an *in silico* study was performed in which an apparent decrease in mRNA as stages progress and a decrease in mRNA and protein were observed in malignant epithelial ovarian tumors compared to normal ovarian tissue. In addition, high expression of estrogen receptor alpha (ER α) was shown to be of poor prognosis for patients while high expression of estrogen receptor β (ER β) was shown to be of good prognosis.

Experimentally, PinX1 silencing was able to increase cell proliferation in epithelial ovarian cancer cell lines in monolayer. In addition, a three-dimensional model was used through the generation of ovarian spheres, which simulate the tumor mass and are enriched in cancer stem cells that promote increased tumor malignancy, the enrichment of cancer stem cells was determined by measuring characteristic cell surface markers: CD44 and CD133. Surprisingly, PinX1 silencing generates a greater number and size of ovary-spheres under the optimal conditions in which increased CTC enrichment was determined, whereas overexpression causes an opposite effect, presumably because of its multiple actions that PinX1 has: exerting an inhibition of telomerase and because of its action as an estrogen receptor alpha co-repressor protein, as shown in breast cancer cells.

1. Introducción

1.1 Fisiología del Ovario

Los ovarios son órganos pares del sistema reproductor femenino, cuya función principal es nutrir y preparar a los ovocitos para el proceso de ovulación, es decir, la ruptura del folículo y liberación del óvulo maduro. La unidad fundamental del ovario es el folículo ovárico, el cual contiene al ovocito y además es el encargado de secretar hormonas esteroideas, necesarias para el desarrollo sexual femenino, la regulación del ciclo reproductivo femenino y el mantenimiento del embarazo en varias especies (Bruce, 2019).

En los mamíferos, las células somáticas del ovario rodean a los ovocitos primarios, formando folículos primordiales y tras el nacimiento, éstos están rodeados por una capa de células aplanadas de la granulosa, formando el folículo primario. Varios de los folículos primarios aumentan de tamaño en los años prepúberes, generando más capas de células de la granulosa, dando lugar al folículo secundario. Posteriormente, se empieza a formar alrededor de las capas de las células de la granulosa una cubierta celular derivada del tejido conjuntivo ovárico (estroma), denominada teca folicular, la cual se diferencia en dos capas: 1) una teca interna, la cual es muy vascularizada y glandular y 2) una teca externa. La maduración folicular, conforme se acerca la pubertad, requiere la acción de hormonas gonadotrópicas, como lo son la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH). La primera, tiene acción sobre las células de la teca interna, las cuales producen andrógenos, que llegan a las células de la granulosa al atravesar la membrana basal. La FSH actúa sobre las células de la granulosa, induciendo la síntesis de la enzima aromatasa, para que los andrógenos provenientes de las células de la teca se conviertan en estrógenos, principalmente 17β estradiol (E_2), los cuales actúan en tejidos diana, -incluyendo al ovario. Gracias a estos estímulos hormonales, el folículo aumenta rápidamente de tamaño, presionando hacia la superficie ovárica y en este instante es denominado, folículo terciario o folículo de Graaf. Posteriormente, el folículo sobresale de la superficie del ovario disrumpiendo el epitelio superficial y ocasionando la salida del ovocito secundario hacia las fimbrias para su posterior transporte hacia el útero, fenómeno que se denomina ovulación (Bruce, 2019).

1.2 Epidemiología del cáncer de ovario epitelial

Los carcinomas de ovario son un grupo heterogéneo de neoplasia, caracterizadas en función de las características clínicas, histopatológicas y moleculares que presenten. El cáncer de ovario epitelial (COE) ocupó el noveno lugar a nivel mundial en incidencia (Fig.1), y el octavo lugar en incidencia en población femenina a nivel mundial (Fig. 2), durante el año 2020. Además, es definida como la neoplasia ginecológica más letal, representando el 4% de los cánceres en mujeres (Cho y Shih, 2009; Sung et al., 2021).

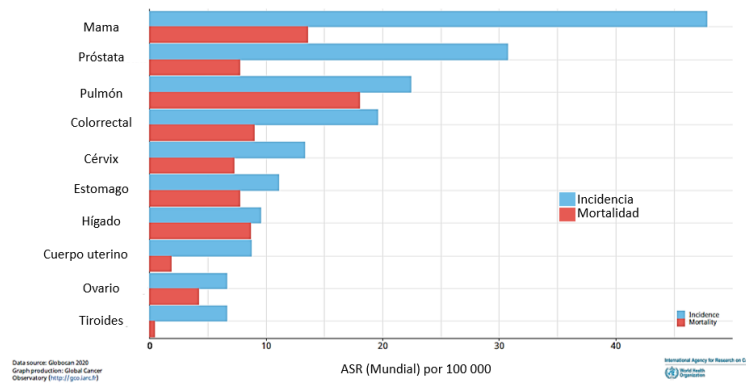


Figura 1. Tasa de incidencia y mortalidad por cada 100,000 habitantes durante el año 2020 en cánceres a nivel mundial, ambos sexos. ASR (World); tasa estandarizada por edad utilizada mundialmente (Sung et al., 2021).

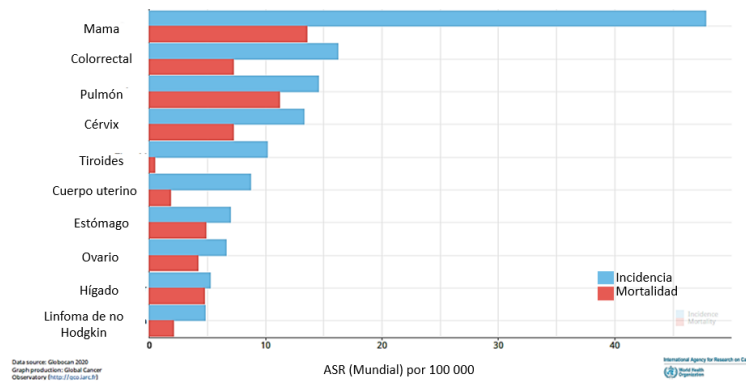


Figura 2. Tasa de incidencia y mortalidad por cada 100,000 habitantes durante el año 2020 en cánceres a nivel mundial, población femenina. ASR (World); tasa estandarizada por edad utilizada mundialmente (Sung et al., 2021).

Debido a la falta de métodos confiables para su detección temprana y la ausencia de síntomas específicos, cerca del 70% de las pacientes son diagnosticadas en etapas tardías. El pronóstico depende en gran medida de la extensión de la enfermedad al momento de la detección, siendo que las mujeres diagnosticadas con metástasis tienen una tasa de supervivencia relativa de 5

años del 29%, mientras que aquellas diagnosticadas con neoplasia local tienen una tasa de supervivencia relativa del 92% (Kufe et al., 2003; Reid et al., 2017).

El COE es poco común en mujeres jóvenes, especialmente en mujeres menores de 30 años; el riesgo aumenta con la edad, con un drástico aumento de la incidencia después de los 50 años, y la edad media de diagnóstico se encuentra entre el rango de 50-70 años, siendo una enfermedad característica de mujeres postmenopáusicas. Esta neoplasia ocurre esporádicamente en la población, únicamente el 5-15% de este cáncer está asociado a componentes hereditarios. Según datos del Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) de 2021, en México, en la población femenina de 15 a 29 años que falleció por tumores malignos, el 9% se debió a tumor maligno de ovario (*ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)*, 2021; Lheureux et al., 2019; C. Stewart et al., 2019).

1.3 Etiología del COE

A la fecha no se ha reportado una única causa exógena o endógena que se relacione con el desarrollo del COE. Sin embargo, se propone que puede haber un agente etiológico o un potenciador oncogénico que ingrese a la cavidad peritoneal a través del canal genital y se distribuya por el útero y las trompas de Falopio. En este sentido, se han estudiado posibles carcinógenos como agentes químicos e infecciosos, y de forma característica, algunos estudios han vinculado componentes ambientales, como la exposición a talcos, utilizados en lavados vaginales para prevención de erupciones o para reducir la fricción, con el desarrollo de tumores epiteliales de ovario. La posible asociación del uso de talco perineal con el COE se estudió inicialmente por Cramer en 1982, encontrándose un riesgo relativo de 1.92 (IC del 95%: 1.27-2.89) de COE cuando las mujeres espolvoreaban el perineo con talco o lo usaban en toallas sanitarias. Desde ese momento ha surgido un interés sobre esta posible asociación y si bien no se ha demostrado una relación causal con el uso del talco perineal, tampoco se puede descartar dicha relación (Cramer et al., 1982; Kufe et al., 2003; Penninkilampi y Eslick, 2018).

Se ha demostrado que el COE está relacionado con componentes hereditarios, ya que aquellas mujeres con mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (genes supresores de tumores asociados

con el cáncer de mama) y con antecedentes familiares de cáncer de ovario o de mama, tienen un riesgo mayor de padecer esta enfermedad. Las mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 aumentan el riesgo de COE del 1.6% al 45% y 18%, respectivamente, y se han identificado como genes causantes del 65% a 75% de COE hereditario. (C. Stewart et al., 2019). En un estudio realizado por Brett en el 2017, a partir de una cohorte de 6,036 mujeres con mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 y de las cuales únicamente eligieron a 5066 mujeres en total de edad mediana (38 años; IQR, 40-55 años), encontraron que 109 mujeres fueron positivas para COE. Además, la incidencia fue mayor para aquellas mujeres portadoras de mutaciones en el gen BRCA1 (HR comparando BRCA1 vs BRCA2, IC del 95%, 2.2-5.9 P<0,001), en comparación con las mujeres que portaban mutaciones del gen BRCA2. Asimismo, el riesgo acumulado de COE durante una vida de 80 años es del 44% (IC del 95%) para las portadoras de mutaciones de BRCA1 y del 17% (IC del 95%) para portadoras de mutaciones de BRCA2. Adicionalmente, las mujeres con mutaciones en los genes de reparación del DNA, como BRIP1, RAD51C y RAD51D tienen un riesgo de padecer COE del 5.8%, 5.2% y 12%, respectivamente (Brett M. et al., 2017; Kuchenbaecker et al., 2017; Kufe et al., 2003; Lheureux et al., 2019; Ramus et al., 2015; C. Stewart et al., 2019).

1.4 Clasificación del cáncer de ovario epitelial

El cáncer de ovario comprende tres tipos principales: de células germinales, de estroma de cordón sexual y carcinoma epitelial. Aproximadamente el 90% de los tumores de ovario son carcinomas epiteliales y con base en su morfología celular se pueden clasificar en 4 tipos histológicos; seroso, endometriode, mucinoso y de células claras. Los carcinomas serosos se clasifican, a su vez, en carcinoma seroso de bajo grado (LGSC; del inglés *Low Grade Ovarian Serous Carcinoma*) y de alto grado (HGSC; del inglés *High Grade Ovarian Serous Carcinoma*), (Cho & Shih, 2009; C. Stewart et al., 2019).

Carcinoma Seroso de Alto Grado (HGSC)

Entre el 70% y 80% de todos los subtipos de COE son del tipo HGSC y generalmente surge de lesiones en la superficie del ovario o de la parte distal de las trompas de Falopio. Está compuesto por células columnares ciliadas que forman papilas, masas sólida o espacios en forma de

hendiduras con atipia nuclear (Fig.3). Con respecto a su origen, se cree que la mayoría se desarrollan a partir de carcinoma intraepitelial tubárico seroso, dentro del extremo fibrilado de las trompas de Falopio, que se implanta en el ovario y que posteriormente forma una masa ovárica serosa invasiva de alto grado (Kossai et al., 2018; C. Stewart et al., 2019; Vang et al., 2013).

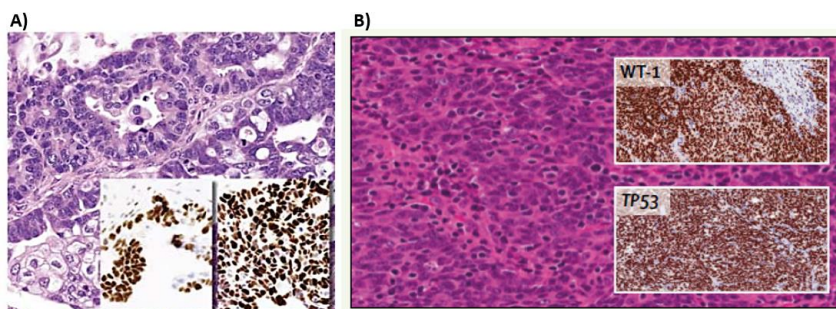


Figura 3. Cortes histológicos de tumores de ovario de tipo HGSC. A) Se aprecian espacios microquísticos en forma de hendidura; perfil de expresión positivo de WT-1, recuadro inferior izquierdo; perfil de expresión positivo de P53, recuadro inferior derecho. B) Se aprecia un patrón de crecimiento papilar, con células irregulares, atípicas y grandes. Tinción con hematoxilina y eosina, 50X. (Modificado de: Assem et al., 2018 y Lheureux et al., 2019)

Los tumores expresan las proteínas WT-1 (Wilm's tumor-1), ER α (receptor de estrógenos alfa) y PAX-8 (factor de transcripción Paired Box 8), en la mayoría de los casos analizados. También presenta un alto índice proliferativo y hasta en el 10% de los casos se presentan alteraciones genéticas en BRCA1 y BRCA2. Las alteraciones genéticas específicas asociadas con este subtipo son de las moléculas: TP53 (hasta en el 96% de los casos), NF1, RB1, CDK12, PTEN y PIK3CA. (Ghoneum et al., 2018; Kurman y Shih, 2016; Vaughan et al., 2011)

Carcinoma Seroso de Bajo Grado (LGSC)

El subtipo histológico LGSC es poco común representando menos del 5% de los cánceres de ovario serosos y el 2% de todos los subtipos de COE. Muestra invasión destructiva, atipia citológica de leve a moderada y una actividad proliferativa relativamente baja, además de no presentar pleomorfismo nuclear como en HGSC. Generalmente se manifiesta como un tumor sólido y quístico que afecta a la superficie y parénquima del ovario, que se caracteriza por una población de células cuboideas, columnares y, a veces, aplanadas (Slomovitz et al., 2020; C. Stewart et al., 2019).

Este tipo de carcinoma evoluciona de forma escalonada desde una neoplasia serosa benigna, citoadenoma seroso/ adenofibroma, a tumores serosos limítrofes de ovario y finalmente a LGSC. Con respecto a su origen, una hipótesis actual indica la probabilidad de que provenga de células epiteliales de las trompas de Falopio que migran a los ovarios durante la ovulación, dando origen a quistes de inclusión serosos y posteriormente a citoadenoma seroso (Slomovitz et al., 2020; Vang et al., 2013).

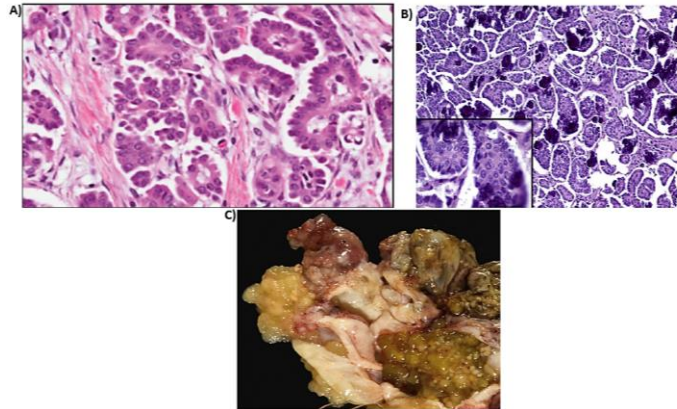


Figura 4. Cortes histológicos y tumor de ovario de tipo LGSC. A) Se observan células con pequeños núcleos uniformes y patrón micropapilar, 50 a 400X. B) Se aprecian células con atipia leve. Tinción con hematoxilina y eosina C) Imagen macroscópica del tumor sólido, el cual está afectando la superficie del parénquima ovárico; se aprecian espacios quísticos y áreas nodulares. (Modificado de: Assem et al., 2018 y Lheureux et al., 2019)

Presenta una tasa proliferativa baja con un índice proliferativo por debajo del 10% y una expresión normal de p53. Expresa WT-1, receptor de estrógenos (ER) y el receptor de progesterona (PR). (Ghoneum et al., 2018; Slomovitz et al., 2020)

Carcinoma endometriode

Representa el 10% de todos los carcinomas epiteliales de ovario. Suelen ser masas sólidas asociados a un buen pronóstico, debido a que es un subtipo común y se diagnostica en un estadio temprano. Se estima que del 84% al 95% de los casos son diagnosticados en estadios tempranos (I y II), mientras del 5 al 16% son diagnosticados en estadios tardíos (III). (S. Chen et al., 2021; Singh et al., 2019) Estos tumores están compuestos por glándulas que se asemejan al epitelio endometrial y, en su mayoría, presentan una arquitectura glandular con diferenciación escamosa, pero también se pueden presentar áreas sólidas (Fig. 5). Este subtipo

histológico es el más frecuente en pacientes con síndrome de Lynch (también llamado cáncer colorrectal (CCR) hereditario no polipósico). La endometriosis adyacente regularmente se manifiesta en el momento del diagnóstico, por lo que se sugiere que es precursora de este carcinoma (Kossai et al., 2018; C. Stewart et al., 2019).

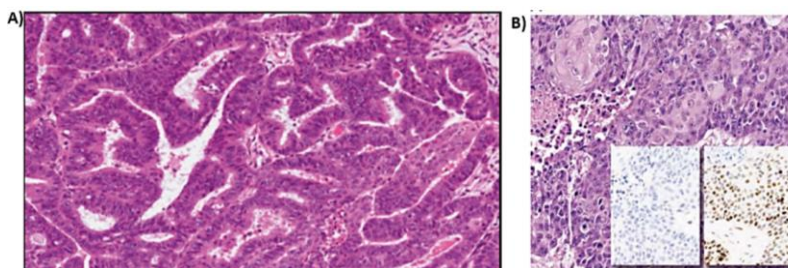


Figura 5. Cortes histológicos de tumores de ovario de tipo endometriode. A) Se observa un patrón quístico con arquitectura glandular, 50 a 400X. B) Formación de islas; perfil de expresión negativo de WT-1, recuadro izquierdo; perfil de expresión positivo de P53, recuadro derecho. Tinción con hematoxilina y eosina. (Modificado de: Assem et al., 2018 y Lheureux et al., 2019)

De manera característica, el carcinoma endometriode expresa, ER, PR, PAX-8 y CA125, pero no expresa WT-1. Además, presentan mutaciones en los genes CTNNB-1 (β -catenina), PTEN, PIK3CA y ARID1A. Frecuentemente, se informa de endometriosis adyacente donde se han encontrado mutaciones en PTEN y ARID1A (Ghoneum et al., 2018; Kossai et al., 2018).

Carcinoma mucinoso

Este subtipo histológico representa el 3% de los casos de COE. Generalmente, son tumores primarios muy grandes (>15 cm de diámetro), por lo que se presentan síntomas cuando el tumor aún está localizado en el ovario. Los tumores están compuestos por quistes y glándulas de tamaño variable, las células son columnares y estratificadas, con un gran citoplasma que contiene mucina. En el 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) introdujo una novedosa clasificación histológica del carcinoma mucinoso, con dos categorías según su patrón de crecimiento tumoral: 1) subtipo expandible y 2) subtipo infiltrativo. El primero está compuesto por un patrón confluyente o expandible de crecimiento glandular, un patrón papilar y con invasión estromal nula o mínima, por lo que tienen buen pronóstico. El segundo subtipo muestra invasión estromal destructiva por glándulas malignas y, a menudo, se asocia con una reacción desmoplásica (colagenización del estroma del tumor), por lo tanto, presenta un mayor

riesgo de diseminación extra ovárica (Fig. 6), (Kossai et al., 2018; Morice et al., 2019; C. Stewart et al., 2019).

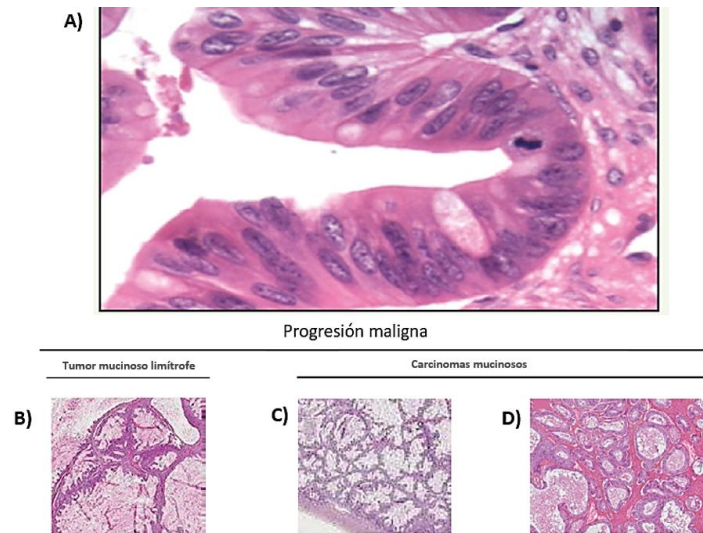


Figura 6. Cortes histológicos de tumores de ovario de tipo mucinoso. A) Se aprecian glándulas de gran tamaño con células columnares, 50 a 400X. B) Tumor mucinoso limítrofe con presencia de glándulas quísticas con invasión estromal nula o mínima. C) Subtipo expandible, presencia de glándulas sin invasión estromal. D) Subtipo infiltrativo, grupo de células malignas con invasión destructiva del estroma. Tinción con hematoxilina y eosina. (Modificado de: Morice et al., 2019 y Lheureux et al., 2019)

Suelen expresar marcadores gastrointestinales CK20, CDX2, CK7 y mutaciones moleculares del gen KRAS. Generalmente, los genes MUC2, MUC3 y MUC17 se expresan en este subtipo. Suelen ser negativos para receptores hormonales (ER, PR y AR; receptor de andrógenos) y WT-1. (Ghoneum et al., 2018; Kossai et al., 2018).

Carcinoma de Células Claras

Estos tumores representan el 10% de todos lo COE y suelen presentarse como una gran masa pélvica caracterizada por estar constituida por células claras (debido a que están llenas de glucógeno), grandes, cubicas, que suelen mostrar una mezcla de patrones de crecimiento que incluyen crecimiento tumoral de patrón sólido, tubulocístico o papilar. Existe una variante oxifílica que muestra un citoplasma eosinófilo (Fig. 7), (Kossai et al., 2018).

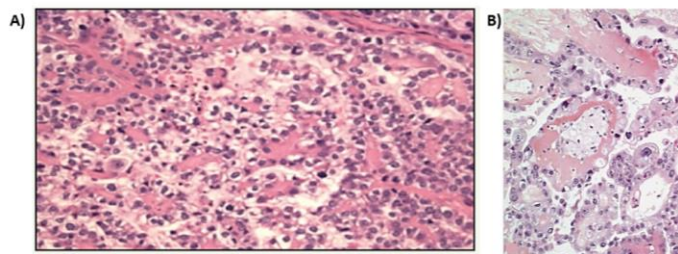


Figura 7. Cortes histológicos de carcinoma de ovario de células claras. A y B) Se observan células grandes con citoplasma claro por el alto contenido de glucógeno, 50 a 400X. Tinción con hematoxilina y eosina. (Modificado de: Kossai et al., 2018 y Lheureux et al., 2019)

Estos tumores no suelen expresar WT-1, p53 ni ER. Expresan el factor alfa inducible por hipoxia 1 (HIF-1 α), el glicopano-3 y el factor nuclear de hepatocitos 1-beta (HNF-1 beta). Además, presenta alteraciones genéticas incluyendo mutaciones en ARD1A, KRAS, PTEN y PIK3CA. (Ghoneum et al., 2018; Kossai et al., 2018)

De manera resumida, en la tabla 1 se muestran las principales características de los 5 subtipos histológicos.

Tabla 1. Características de los subtipos histológicos del COE. (Modificado de: Kossai et al., 2018).

Características de los 5 subtipos histológicos del COE					
	HGSC	LGSC	Endometriode	Mucinoso	Células claras
Frecuencia	~70-80%	~5%	~10%	~3%	~10%
Expresión molecular	WT-1+, ER α + y TP53+	WT-1+, ER α + y PR+	WT-1+, ER α + y PR+	WT-1-, ER α - y PR-	WT-1-, ER α - y, TP53-

1.5 Factores de riesgo y protectores asociados al COE

Dentro de los factores de riesgo, la historia reproductiva y el número de ciclos de ovulación tienen el mayor impacto en el desarrollo de la enfermedad. Así como la endometriosis, la nuliparidad y el tratamiento con fármacos contra la infertilidad para inducir ciclos de ovulación están asociados con un incremento de padecer COE (Bareppady & Nayak, 2019; Kufe et al., 2003; Momenimovahed, Tiznobaik, et al., 2019; Rizzuto et al., 2019).

Durante décadas, se han considerado diversos parámetros de la historia reproductiva dentro de los factores de riesgo. Se ha reportado que la menarquia temprana (≤ 13 años) y la menopausia tardía (≥ 50 años) aumentan el riesgo de padecer COE al aumentar el número de

ciclos ovulatorios. Además, una edad tardía en la menarquia retrasa el incremento de la síntesis y secreción de gonadotropinas (LH y FSH), posiblemente reduciendo el riesgo de COE. Sin embargo, estos hallazgos no son concluyentes, ya que en el 2019 se realizó un estudio para determinar si existía una relación significativa entre la menarquia temprana y el cáncer de ovario, en donde se eligieron a mujeres (n=100) basados en criterios de inclusión (mujeres con cáncer de mama o de ovario). El 36% se encontraba en el grupo de edad de 45 a 54 años, el 56% de las mujeres experimentaron menarquia temprana y el 38% de las mujeres fueron diagnosticadas con cáncer de ovario. Los datos obtenidos demostraron que, el 19% de las mujeres que padecían cáncer de ovario experimentaron menarquia temprana y la diferencia media del cáncer de ovario no fue significativa, rechazando la hipótesis de la existencia de una relación entre la menarquia temprana y el riesgo de padecer cáncer de ovario (Bareppady & Nayak, 2019). Asimismo, en el mismo año Mansha reportó los resultados de su investigación a partir de un estudio de 200 pacientes diagnosticadas con cáncer de ovario a las cuáles se les aplicó un cuestionario en donde incluían la edad de la menarquia y edad de inicio de la menopausia. De acuerdo con lo reportado, no existe una relación significativa ($p=0.53$) entre la menarquia temprana y el cáncer de ovario, al igual que la menopausia tardía ($p=1.0$). Sin embargo, se demostró que la menarquia temprana se asoció significativamente ($p= 0.005$) con antecedentes de cáncer de mama, lo que a su vez aumenta el riesgo de cáncer de ovario. Aquellas pacientes con cáncer de ovario que tuvieron su primera menarquia a una edad ≤ 13 años, presentan 2.8 veces más probabilidad de tener cáncer de mama que las pacientes que experimentaron su primera menarquia a los 13 o más años (Bareppady & Nayak, 2019; Brett M. et al., 2017; Mansha et al., 2019). Dichos reportes se pueden explicar debido a que, al igual que con las mujeres nulíparas, se presenta una ovulación continua por lo que existe un mayor número de lesiones en la superficie epitelial del ovario, por esta razón se considera un factor de riesgo importante en el COE. Asimismo, se ha demostrado que, la ovulación incesante aumenta la tasa de división celular asociada con la reparación del epitelio después de cada ovulación, aumentando las mutaciones espontaneas asociada con el desarrollo de COE. Por otro lado, existen factores que reducen el riesgo de COE, los cuales interrumpen la ovulación como, por

ejemplo, el embarazo, el uso de anticonceptivos orales y la lactancia (Brett M. et al., 2017; Trabert et al., 2020).

La estimación de los ciclos ovulatorios acumulados durante la vida de la mujer se obtiene a través de algoritmos que calculan el tiempo entre la menarquia y la menopausia, restando los presuntos ciclos anovulatorios, debido a la duración del uso de anticonceptivos orales y embarazo(s). En el 2020 se realizó un estudio donde se investigó la asociación del número de ciclos ovulatorios durante la vida de las mujeres utilizando datos prospectivos del Consorcio de Cohortes de Cáncer de Ovario (OC3; del inglés *Ovarian Cancer Cohort Consortium*), en donde reportaron que las mujeres con ≥ 514 ciclos ovulatorios acumulados tienen casi el doble de probabilidades de ser diagnosticadas con cáncer de ovario que las mujeres con menos de 294 ciclos ovulatorios acumulados. Por cada aumento de cinco años, en promedio aumentan 60 ciclos ovulatorios, aumentando el riesgo en un 14% (IC 95%, 1.10-1.17). Cada aumento de cinco años se asoció con un mayor riesgo de padecer cáncer de ovario seroso (IC 95%, 1.09-1.17), endometriode (IC 95%, 1.10-1.32) y de células claras (IC 95%, 1.18-1.58). El mecanismo por el cual el proceso ovulatorio favorece la carcinogénesis es desconocido; sin embargo, se han propuesto varias teorías, que incluyen: un ambiente proinflamatorio agudo, síntesis o secreción alterada de gonadotropinas y/o exposición a hormonas esteroides (Brett M. et al., 2017; Trabert et al., 2020).

Por otro lado, la endometriosis, que es uno de los trastornos ginecológicos más comunes debido a que afecta del 5-10% de las mujeres en edad reproductiva y hace referencia a la presencia de tejido endometrial más allá de la cavidad uterina, es dependiente de estrógenos y causante de síntomas de dolor pélvico crónico, dismenorrea, dispareunia e infertilidad. A pesar de ser considerada como una condición benigna, desde la década de 1920 se ha asociado con el cáncer de ovario. Con el tiempo, se obtuvo evidencia de que el origen del COE de los subtipos histológicos; endometriode y de células claras, era la transformación del epitelio endometrial. Esto sugiere que la inflamación crónica, junto con el estrés oxidativo, puede desempeñar un papel crucial en la transformación maligna. Dicha evidencia se basa en la presencia de endometriosis en el 15-20% de los tumores ováricos de células claras y endometrioides, así como un incremento de dos a tres veces en el COE en mujeres con endometriosis.

Recientemente, Metalliotakis y colaboradores en 2018 reportaron un análisis retrospectivo de datos clínicos-patológicos sobre la relación de la endometriosis ovárica y el carcinoma de ovario en 1000 mujeres que padecían de endometriosis. Los resultados indicaron que el carcinoma endometriode fue más frecuente (60%) seguido del carcinoma de células claras (20%) y de los carcinomas serosos y mucinosos (20%). En la mayoría de los casos, se observó una transformación maligna de la endometriosis en carcinoma endometriode o de células claras. Por lo tanto, se concluyó que las mujeres con endometriosis tienen un mayor riesgo de desarrollar varios subtipos histológicos de COE, más frecuentemente el carcinoma endometriode. Además, se demostró que la endometriosis ovárica se asocia con un riesgo 4 veces mayor de COE, en un estudio de cohorte de 9064 mujeres con endometriosis. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual se lleva a cabo la transformación maligna de la endometriosis continúa siendo controvertido y no se ha esclarecido de manera precisa (Brett M. et al., 2017; Herreros-Villanueva et al., 2019; Kok et al., 2015; Matalliotakis et al., 2018; Su et al., 2020).

La infertilidad es descrita como un grupo heterogéneo de afecciones biológicas que pueden ir desde infecciones del tracto genital y alteraciones de las trompas de Falopio, hasta afecciones médicas como endometriosis y síndrome de ovario poliquístico. Esta parece ser un factor de riesgo de desarrollar COE, sin embargo, no existen datos concluyentes. El efecto de los fármacos para favorecer la fertilidad sobre el COE se ha destacado durante varias décadas. La demanda de estos medicamentos y los procedimientos de fertilidad asistida han ido en incremento en los últimos 20 años debido al aumento de mujeres que posponen su embarazo después de los 35 años. Generalmente, existen dos tipos de medicamentos para favorecer la fertilidad: 1) medicamentos orales que estimulan indirectamente a los ovarios, estimulando la glándula hipofisiaria para una mayor síntesis y secreción de LH y FSH. Entre los medicamentos utilizados se encuentra el citrato de clomifeno, metformina, tamoxifeno, letrozol, anastrozol, pioglitazona y rosiglitazona. Cada uno de estos medicamentos afecta el eje hipotálamo- hipófisis- ovario de manera diferente. Sin embargo, el medicamento predominante para estimular la ovulación en pacientes con ovulación irregular o anovulación es el citrato de clomifeno, que promueve un incremento en la secreción de FSH, provocando la estimulación del desarrollo de los folículos

ováricos que contienen a los ovocitos. 2) Medicamentos inyectables, como FSH, LH, agonistas y antagonistas de GnRH y gonadotropina coriónica humana (hCG), que tienen un efecto directo sobre el ovario (Ali, 2018; Brett M. et al., 2017).

Un estudio de cohorte realizado entre 1988 y 2013 reveló que el riesgo de desarrollar cáncer de ovario aumenta en las personas con antecedentes de tratamientos de fertilización in vitro (FIV), (HR ajustado 3.9; IC del 95%: 1.2-12.6), en comparación con mujeres sin antecedentes de tratamientos de fertilidad. En este estudio de cohorte mostraron un aumento en la incidencia de cáncer de ovario después de la exposición a citrato de clomifeno (IC del 95%; 1.91-13.75), (Kessous et al., 2016). Se demostró en otro estudio de cohorte de 2768 mujeres que, el uso de citrato de clomifeno aumenta el riesgo de cáncer de ovario (IC del 95%; 1.54) (Sanner et al., 2009). Aunque varios estudios han sugerido una relación entre el uso de fármacos inductores de la ovulación y el riesgo de cáncer de ovario, existen estudios que no han mostrado un aumento significativo en el riesgo de cáncer de ovario al tomar fármacos inductores de la ovulación. En un estudio de cohorte de 54,362 mujeres, se informó que el riesgo de cáncer de ovario no aumentó con el uso de citrato de clomifeno, gonadotropinas, hCG y GnRH, y que no existe relación entre la duración del uso del fármaco y el riesgo de cáncer de ovario (Jensen et al., 2009).

Por otra parte, se ha establecido que entre los factores asociados con una disminución del riesgo de desarrollar cáncer de ovario se encuentran el uso de anticonceptivos orales, la paridad obstétrica y la lactancia (Braem et al., 2010; Momenimovahed, Tiznobaik, et al., 2019; Ness, 2000; Riman et al., 2004; Tsilidis et al., 2011).

En un estudio de casos y controles se demostró que el uso de anticonceptivos orales conduce a una disminución significativa en el riesgo de cáncer de ovario en un 20% de reducción por cada 5 años de uso. Además, se reportó que este efecto persiste durante muchos años después de la interrupción de su uso (Riman et al., 2004). Asimismo, la paridad está íntimamente asociada con un efecto protector con respecto al cáncer de ovario. Se ha reportado que las mujeres que tienen hijos presentan un 26% menor de riesgo de cáncer de ovario en relación con las mujeres nulíparas (RR=0,74; IC del 95%: 0,70 a 0,79). Existe una reducción del riesgo de cáncer de ovario

en el primer parto, con una reducción de riesgo de casi el 20% en comparación con las mujeres nulíparas (RR = 0.82; IC del 95%: 0.76 a 0.89). Además, las mujeres nulíparas tienen aproximadamente un 50% más de riesgo de cáncer de ovario endometriode (RR = 1.49, IC del 95%: 1.18-1.89, P = 0.001) y casi un 70% más de riesgo de tumores de células claras (RR = 1.68, IC del 95%: 1.29-2.20, p <0.001), con un menor aumento del riesgo de tumores mucinosos (RR = 1.26, IC 95%: 1.02-1.57, p = 0.03), y un aumento pequeño y no significativo en el riesgo de tumores seroso (RR = 1.10, IC del 95%: 0.99-1.22) (Gaitskell et al., 2018). En otro estudio de cohorte de 441,382 mujeres, se pudieron identificar 454 mujeres diagnosticadas con carcinoma del tipo HGSC, determinando que el aumento de la paridad se asoció con un riesgo reducido de HGSC en mujeres sin antecedentes personales de cáncer de mama (HR 0.57; IC del 95%: 0.44 a 0.73), pero no en mujeres con antecedentes personales de cáncer de mama (HR 1.48; IC del 95%: 0.74)–2.95) (L. M. Stewart et al., 2018). Asimismo, en un estudio donde se incluyeron a mujeres diagnosticada con cáncer de ovario entre los años 1994-2013, se pudieron identificar 5412 casos de cáncer de ovario y se determinó la existencia de una tendencia en la reducción de riesgo para cánceres serosos y de células claras, para aquellas mujeres que tuvieron al menos un embarazo antes de los 55 años (Toufakis et al., 2021). Por otro lado, la relación entre la lactancia materna y el desarrollo de cáncer de ovario indica que el riesgo de desarrollar cáncer de ovario disminuye en un 8% con cada cinco meses de lactancia (Cibula et al., 2011; Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer, 2008; «Evaluation of Local Control in Buccinator Muscle Excision with the Skin Versus Buccinator Muscle Excision without the Skin in Buccal Squamous Cell Carcinoma», 2021; Gaitskell et al., 2018; Iversen et al., 2018; L. M. Stewart et al., 2018; Toufakis et al., 2021).

1.6 Diagnóstico del COE

Durante más de una década se ha buscado mejorar la detección oportuna, así como el tratamiento más eficiente contra el COE, esto porque la mayoría de las pacientes fallece ante la enfermedad. Algunos factores que obstaculizan la lucha es el diagnóstico tardío, así como un alto grado de heterogeneidad molecular en los tumores; sin embargo, se ha logrado un progreso en la comprensión de la biología del COE, así como la capacidad de detectar síntomas (Hunn & Rodriguez, 2012).

Los síntomas de COE suelen ser inespecíficos y fácilmente atribuibles a otras patológicas. Las sospechas de presentar esta neoplasia son acompañadas de la información proveniente de la historia clínica, presentando especial énfasis en los factores de riesgo y de protección para el desarrollo de esta neoplasia. En estudios de casos y controles se ha propuesto un índice pronóstico sintomático que incluye: dolor pélvico, dolor abdominal, incremento del tamaño abdominal, inflamación, dificultades para comer o saciedad temprana. Se ha informado que, la obstrucción intestinal y derrame pleural, generalmente se deben a estadios avanzados de diseminación del cáncer. Los síntomas se evalúan retrospectivamente y se considera positivo si el síntoma ha estado presente al menos 12 veces al mes en el último año. Se demostró que la presencia de estos síntomas tenía una baja sensibilidad (56.7%) para la enfermedad en etapas tempranas, pero alta sensibilidad (79.5%) en la enfermedad en etapas tardías. La especificidad fue del 90% en mujeres de 50 años mayores, y de un 86.7% en mujeres jóvenes (Doubeni et al., 2016; Ghoneum et al., 2018; Goff et al., 2007).

Tras la historia clínica y la evaluación de la sintomatología, si existe una sospecha de la presencia de esta neoplasia, se realiza un examen físico que incluye la examinación recto-vaginal con la vejiga vacía para evaluar masas pélvicas o abdominales. Las dificultades que presenta esta exploración es que puede resultar inespecífica, sobre todo en pacientes obesas, dificultando la palpación de la masa. También se buscan signos de disfuncionalidad endocrina, síndromes paraneoplásicos y enfermedad metastásica (Doubeni et al., 2016; Timmerman et al., 2010).

Posteriormente se realiza un ultrasonido transvaginal, que determina la arquitectura del ovario y su vascularización, con esto es capaz de diferenciar entre quistes y masas sólidas. La sensibilidad de esta herramienta para discriminar entre lesiones benignas y malignas es del 86 al 94% (Doubeni et al., 2016).

Estos métodos, -se complementan con estudios que incluyen biometría hemática y química sanguínea, con examen de función hepática, también se pueden incluir algunos marcadores de suero como el antígeno de cáncer 125 (CA125) y HE4 (*Human Epididymis Protein 4*), (Doubeni et al., 2016).

1.7 Estadificación del COE

La estadificación del COE se realiza de acuerdo con los parámetros propuestos por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) el cual se ha actualizado a partir del 2014. Los estadios iniciales del cáncer de ovario comprenden los estadios I, II y los estadios avanzados comprenden los estadios III y IV (Forstner et al., 2016; Reid et al., 2017; Zeppernick y Meinhold-Heerlein, 2014).

Estadio I: Cáncer limitado a los ovarios

Estadio IA: Cáncer limitado al ovario, sin ascitis, cápsula intacta, sin tejido tumoral en la superficie externa.

Estadio IB: Cáncer en ambos ovarios, sin ascitis, cápsula intacta, sin tejido tumoral en la superficie externa.

Estadios IC: Cáncer en uno o ambos ovarios y alguna de las siguientes condiciones:

Estadio IC1: Derrame quirúrgico; ruptura de la cápsula externa durante la extirpación quirúrgica.

Estadio IC2: Ruptura de la cápsula externa antes de la intervención quirúrgica o tumor en la superficie.

Estadio IC3: Ascitis o lavado peritoneal con presencia de células malignas.

Estadio II: El tumor afecta a uno o ambos ovarios, o trompas de Falopio con extensión pélvica (debajo del borde pélvico).

Estadio IIA: Diseminación a útero, trompas de Falopio u ovarios

Estadio IIB: Diseminación a otros tejidos pélvicos

Estadio IIC: Estadio IIA o IIB con tejido tumoral en la superficie del ovario o ruptura de la cápsula, ascitis, o lavado peritoneal con presencia de células malignas.

Estadio III: El tumor afecta a uno o ambos ovarios o trompas de Falopio, con diseminación confirmada al peritoneo fuera de la pelvis y metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales.

Estadio IIIA: Diseminación a ganglios linfáticos retroperitoneales y/o metástasis microscópica más allá de la pelvis.

Estadio IIIA1: Metástasis confirmada únicamente a ganglios linfáticos retroperitoneales

Estadio IIIA1 (i): La metástasis miden 10 milímetros (mm) o menos.

Estadio IIIA1(ii): Metástasis miden más de 10 mm.

Estadio IIIA2: Diseminación peritoneal extrapélvica microscópica (por encima del borde pélvico), con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales.

Estadio IIIB: Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis ≤ 2 cm, con o sin metástasis a los ganglios linfáticos retroperitoneales (incluyendo extensión del tumor a la cápsula del hígado y el bazo).

Estadio IIIC: Metástasis peritoneal macroscópica más allá de la pelvis > 2 cm, con o sin metástasis en los ganglios linfáticos retroperitoneales (incluyendo extensión del tumor a la cápsula del hígado y el bazo).

Estadio IV: Metástasis a tejidos distales.

Estadio IVA: Derrame pleural

Estadio IVB: Metástasis a órganos extra abdominales (incluyendo ganglios linfáticos inguinales y ganglios linfáticos fuera de la cavidad abdominal).

1.8. Hormonas esteroides y COE

Las hormonas esteroides y sus receptores esteroides (SHR; del inglés *Steroid Hormone Receptors*), juegan un papel clave tanto en el desarrollo del ovario normal, como en la etiología de tumores epiteliales maligno, sugiriendo un papel crítico en la progresión del COE. Especialmente, estudios *in vitro* y evidencias epidemiológicas, muestran el papel potencial de los estrógenos, la progesterona y los andrógenos en la regulación, proliferación e invasión de las células epiteliales cancerosas del ovario (Akahira et al., 2001; Wada-Hiraike et al., 2006; C. Zhao et al., 2008).

1.8.1 Biosíntesis de estrógenos en el ovario

La estrona (E_1), 17β -estradiol (E_2) y estriol (E_3), pertenecen a un grupo de hormonas femeninas endógenas denominadas estrógenos (Fig. 8). Químicamente, son compuestos orgánicos conocidos como esteroides y su estructura central está formada por 17 enlaces carbono-

carbono dispuestos como cuatro anillos fusionados, formando el núcleo básico de los esteroides, el ciclopentanoperhidrofenantreno (tres anillos de ciclohexano y un anillo de ciclopentano). Los tres estrógenos están compuestos por 18 carbonos; esteroides C18. Consisten en un anillo benceno, un grupo hidroxilo fenólico y un grupo cetona (estrona), o uno (E₂) o dos (E₃) grupos hidroxilo. Si bien las mujeres producen todos los estrógenos durante toda la vida, las concentraciones tienen fluctuaciones en las diversas etapas de la vida (Fuentes & Silveyra, 2019; Samavat & Kurzer, 2015; Watson et al., 2008).

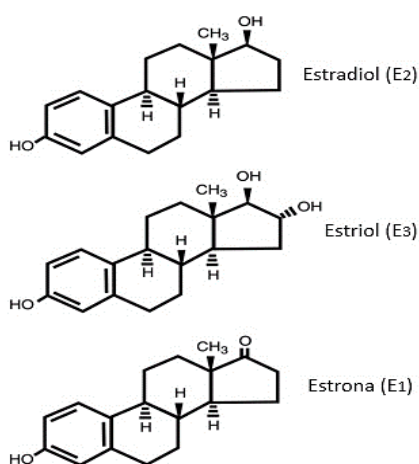


Figura 8. Estructuras químicas de estrógenos endógenos. Estrona (E₁), estradiol (E₂) y estriol (E₃) (Modificado de: Watson et al., 2008).

El término estrógeno deriva del griego *oistros* (estro) y *gennan* (producir). Los tres estrógenos naturales (E₁, E₂ y E₃) tienen la capacidad de unirse a receptores de estrógenos (ER) tanto nucleares como membranales, con diferente afinidad y respuesta celular. Comúnmente la palabra “estrógeno” es usada para referirse sólo al E₂, debido a que es el estrógeno biológicamente más activo, predominando durante los años reproductivos y secretado principalmente por las células de la granulosa de los ovarios, las cuales están situadas junto a las células de la teca. Sin embargo, la concentración de E₃ predomina durante el embarazo y es el estrógeno más abundante en la orina de todas las mujeres. Mientras que el E₁ generalmente se encuentra en concentraciones altas durante la menopausia (Fuentes & Silveyra, 2019; Samavat & Kurzer, 2015; Watson et al., 2008).

El colesterol, específicamente el colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL) es el sustrato principal para la biosíntesis de hormonas esteroides (esteroidogénesis). A través de la

esteroidogénesis el colesterol C₂₇ se metaboliza por varias vías enzimáticas convirtiéndose en hormonas esteroides de 21 carbonos (pregnanos, progestágenos), 19 carbonos (androstanos) y 18 carbonos (estrano) en las gónadas, corteza suprarrenal y el tejido adiposo. Sin embargo, el principal sitio donde se lleva a cabo la síntesis de estrógenos es en los ovarios (Fuentes & Silveyra, 2019; Miller, 2017; Samavat & Kurzer, 2015).

La producción de andrógenos en las células de la teca es regulada por la unión de la LH al receptor de LH (LHCGR, del inglés *luteinizing hormone/choriogonadotropin receptor*). Mientras que la unión de la FSH al receptor de FSH (FSHR, del inglés *follicle-stimulating hormone receptor*), estimula a las células de la granulosa mediante la aromatización de andrógenos a estrógenos, por medio de la aromatasa. El paso inicial y limitante de la esteroidogénesis es la translocación del colesterol hacia la membrana mitocondrial interna, proceso que está regulado por la proteína StAR. La expresión de StAR está regulada por un mecanismo que implica la unión de LH a LHCGR. Dicho receptor se encuentra acoplado a proteínas G en las células de la teca de los ovarios y una vez que la LH se une, promueve la estimulación de adenilato ciclasa, que cataliza la producción de adenosín monofosfato cíclico (cAMP, por sus siglas en inglés) a partir de adenosín trifosfato (ATP, por sus siglas en inglés). El cAMP activa a la proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés), enzima que cataliza la fosforilación de la proteína CREB (proteína que se une al elemento de respuesta al cAMP, por sus siglas en inglés), promoviendo la transcripción de StAR y otros factores que están asociados con la producción de hormonas esteroides (Fig. 9). En la membrana mitocondrial interna, el colesterol se convierte en pregnenolona, hormona que actúa como precursor de todas las hormonas esteroides y puede difundirse entre las células de la granulosa que se encuentran adyacentes y hacia células de la teca. La síntesis continúa con la conversión de pregnenolona en androstenediona, la cual puede convertirse en andrógenos, como testosterona y dihidrotestosterona, o difundirse hacia las células de la granulosa a través de la lámina basal. En las células de la granulosa, la androstenediona se convierte en E₁ por la enzima CYP19A1, también conocida como aromatasa. La E₁ se convierte en E₂ por la enzima 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD). Además, la testosterona se puede metabolizar E₂ y E₁, mediante la acción de la aromatasa en los tejidos periféricos, incluidos las células adiposas y los huesos. En general, los estrógenos normalmente son

producidos por los ovarios y en cantidades pequeñas por otros tejidos como el páncreas, hígado, glándulas suprarrenales, tejido adiposo y la mama. También en condiciones fisiológicas específicas como el embarazo, se pueden sintetizar estrógenos en la placenta. (Barakat et al., 2016; Fuentes & Silveyra, 2019; Simpson et al., 2002)

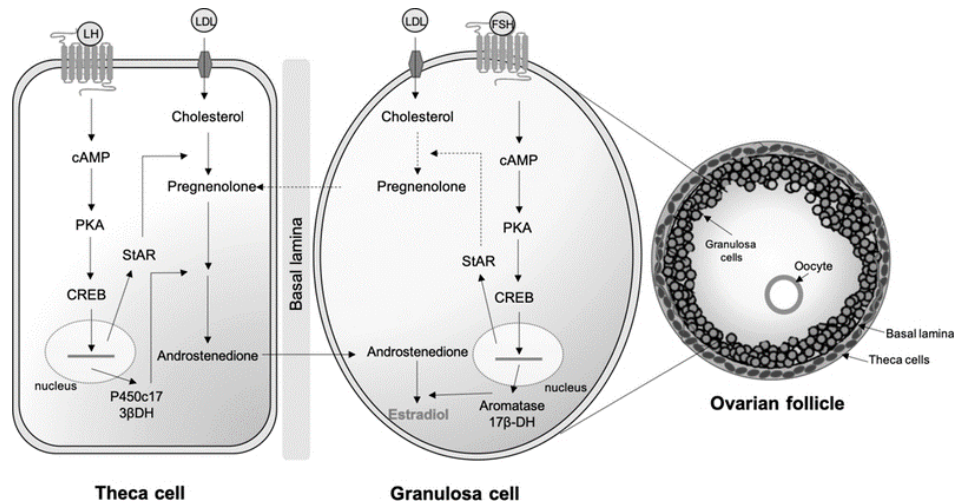


Figura 9. Asociación de las células de la teca y de la granulosa en la biosíntesis de estrógenos. La hormona luteinizante (LH) induce la producción de andrógenos en las células de la teca. La hormona foliculoestimulante (FSH) estimula a las células de la granulosa mediante la aromatización de andrógenos (androstenediona) a estrógenos (estradiol) y mediante el uso de colesterol para producir pregnenolona, la cual es la hormona precursora de todas las hormonas esteroides. El proceso ocurre en el folículo ovárico, compuesto por el ovocito, células de la granulosa, lamina basal y células de la teca. CREB, proteína de unión al elemento de respuesta de AMP cíclico; PKA, proteína cinasa A; LDL, lipoproteínas de baja densidad; cAMP, adenosín monofosfato cíclico; StAR, proteína reguladora aguda de esteroides; P450c17, 17 α , 17 α -hidroxilasa/liasa; 17 β HSD, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Fuentes and Silveyra, 2019).

1.8.2 Estrógenos en el COE

La evidencia que relaciona los estrógenos con el COE es contradictoria. Por una parte, se sabe que el embarazo eleva las concentraciones de estrógenos circulantes, pero reduce las concentraciones intraováricas. Los anticonceptivos reducen las concentraciones de estrógenos endógenos. Las terapias de remplazo hormonal, con correlación positiva para el desarrollo del COE, aumentan los estrógenos circulantes. La endometriosis está asociada con un incremento en la producción de E₂ circulante, así como un incremento en la expresión de ER α . Además, las concentraciones del E₂ circulante aumentan en las etapas de la perimenopausia, comparados con las observadas en la edad reproductiva. Asimismo, las mujeres con edad temprana en la

menarquia y con edad tardía en la menopausia, tienen mayor tiempo de exposición a estrógenos. Estos datos indican que el aumento en las concentraciones circulantes de estrógenos se correlaciona con el riesgo de desarrollar COE (Killick et al., 1987; Prior, 2005; Trabert et al., 2019).

1.9 Receptores de hormonas esteroides y receptores de estrógenos

Gran parte de la regulación de las hormonas esteroides es a través de su interacción con receptores nucleares. La superfamilia de receptores nucleares (NR, por sus siglas en inglés) son factores de transcripción que regulan la expresión génica en respuesta a su ligando y mediante el reclutamiento de correguladores (McKenna & O'Malley, 2002).

Respecto a su estructura, se sabe que estos receptores nucleares contienen una región amino (N) terminal, con un dominio regulador que contiene la función de activación de la transcripción o AF-1, que actúa de manera independiente de ligando, y un dominio dependiente de ligando AF-2, en el extremo carboxilo (C) terminal. En la región central se encuentra el dominio de unión a DNA (DBD, por sus siglas en inglés) el cual tiene una región conservada con dos dedos de zinc que se unen directamente al DNA en secuencias denominadas elementos de respuesta a hormonas (HRE, por sus siglas en inglés). Posteriormente, tiene una región bisagra que conecta el dominio DBD y el dominio de unión al ligando (LBD, por sus siglas en inglés), (Fuentes & Silveyra, 2019; McKenna & O'Malley, 2002).

Existen dos ER generadas por distintos genes: ER α y ER β . Ambos contienen los dominios funcionales que caracterizan a la superfamilia de NR, con un alto grado de homología en sus dominios DBD y LBD, 97 y 60%, respectivamente. El tamaño del ER α completo es de 595 aminoácidos y pesa 67kDa, mientras que el ER β tienen 530 aminoácidos de longitud, con un peso de 59 kDa; la principal diferencia entre ambas proteínas es que el dominio amino (N) terminal es más corto en el ER β en contraste con el ER α (Fig. 10), (RNAal et al., 2017; Fuentes and Silveyra, 2019; Osborne et al., 2001).

Se ha reportado que, en las mujeres en edad fértil, el ER α se localiza principalmente en las células de la teca y el estroma ovárico en el cuerpo lúteo y el epitelio superficial de los ovarios.

Por otro lado, el ER β , se expresa en las células de la granulosa, las células de la teca, e l epitelio de superficie y el cuerpo lúteo (S. P. Langdon et al., 2020; Tang et al., 2019).

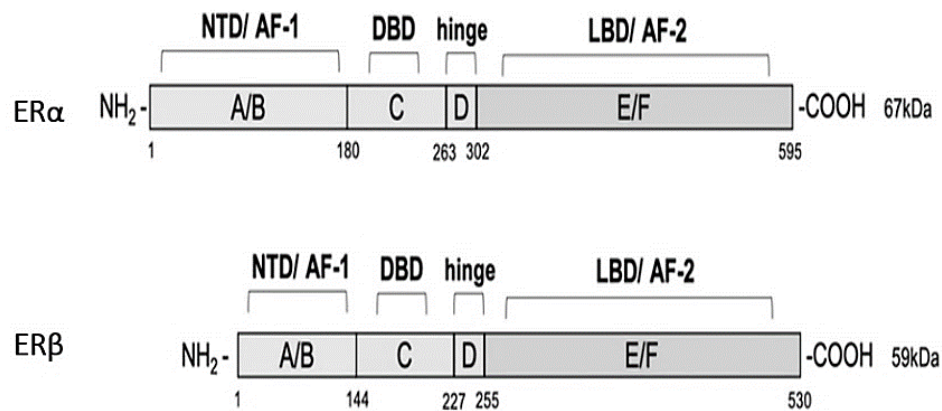


Figura 10. Organización estructural de los receptores de estrógenos. Los dominios estructurales del receptor de estrógeno α (ER α) (595 a.a.) y el receptor de estrógenos β (ER β) (530 a.a.) se etiquetan con la letra A hasta la F. Ambos receptores comparten dominios estructurales: Dominio amino (N) terminal (NTD, dominio A/B, AF-1), dominio de unión al ADN (DBD, dominio C), bisagra (dominio D), dominio carboxilo (C) terminal, que contiene el dominio de unión al ligando (LBD, dominio E/F, AF-2), (Modificado de: Fuentes and Silveyra, 2019).

Además, se han hecho diversos reportes de la expresión del ER α en COE, sin embargo, el estudio más grande se reportó en el 2013, en donde se investigaron a 2,933 mujeres y el porcentaje de positividad de ER α mediante inmunohistoquímica. El subtipo histológico HGSC se identificó con un 81% de positividad, el LGSC con un 88% y los carcinomas endometrioides con un 77%. Por el contrario, la positividad de los carcinomas mucinosos fue menor con un 21% y con el 20% en los carcinomas de células claras. (Sieh et al., 2013) Asimismo, el ER α se ha relacionado con la estimulación proliferativa y para demostrar esta función en células malignas de cáncer de ovario se han realizado experimentos a partir de las líneas celulares ES-2, SKOV-3, OVCAR-3, OVCAR-4 y OVCAR-5 tratados con ligando específicos para el ER α o para el ER β , mostrando que los tratamientos con 4,4',4''-(4-Propil-[1H]-pirazol-1,3,5-tril)trisfenol (PPT), un ligando específico de ER α , pero no con el ligando Diaril propionitrilo (2,3-bis(4-Hidroxifenil)-propionitrile (DPN), específico para ER β , tienen como resultado una estimulación en el crecimiento de estas células, confirmando el papel de ER α en la proliferación mediada por estrógenos. De manera inversa, la sobreexpresión de ER β resulta en una inhibición de la movilidad e invasión de células de cáncer de ovario. Asimismo, Treeck y colaboradores (2007), confirmaron que el ER β disminuye la proliferación y migración en la línea celular de COE SK-OV-3. Mientras que en un estudio

reportado por Schüler-Toprak y colaboradores (2017), en donde utilizaron agonistas de ER β (ERb-040, WAY200070, liquiritigenina y 3 β -adiol) a una concentración de 10 nM, en la línea celular OVCAR-3, demostraron que disminuye significativamente la proliferación celular (Y. Feng, 2011; O'Donnell et al., 2005; Schüler-Toprak et al., 2017, 2018; Treeck et al., 2007).

Se ha sugerido que la proporción de expresión de ER α /ER β va cambiando conforme progresa el carcinoma (ovario normal/ estadios tempranos/metástasis) con la pérdida en la expresión de ER β y un incremento en la expresión de ER α . (Langdon et al., 2020) Se ha reportado que en las líneas celulares de COE, SKOV3 y OV2008, se expresan ambos subtipos de receptores. Ambas líneas celulares se trataron con 1,3-bis (4-hidroxifenil) Dihidrocloruro de -4-metil-5- [4- (2-piperidiniletóxi) fenol] -1H-pirazol (MPP)-antagonista de ER α o el agonista de ER β , DPN resultando en la supresión de la proliferación celular en ambas líneas celulares. Por el contrario, el tratamiento con el agonista de ER α (PPT) o el 4- [2-fenil-5,7- bis (trifluorometil) pirazolo [1,5-a] -pirimidin-3-il] fenol (PHTPP) - antagonista de ER β mejoró significativamente la proliferación celular de ambas líneas celulares. Confirmando que el ER α promueve la proliferación celular mientras que el ER β tiene un efecto inhibitor en células de COE (Chan et al., 2014).

Existe una variedad de genes que están regulados por estrógenos y de manera general, los genes estrógeno regulados pueden ser factores de crecimiento, receptores de factores de crecimiento u otras moléculas de señalización. Su más potente activador en ambos subtipos es el E₂ (Osborne et al., 2001).

1.9.1 Mecanismo y vía de señalización mediada por el receptor de estrógenos (ER)

Los estrógenos pueden atravesar la membrana plasmática e interactuar con el ER α y ER β activándolos, para ejercer efectos directos al unirse a secuencias específicas de DNA. De manera alternativa, los estrógenos pueden activar cascadas de señalización a través de la interacción con GPER1 (Del inglés *G-protein coupled estrogen receptor 1*) y/o ER α y ER β . Los eventos de señalización mediados por estrógenos pueden dividirse en genómicos y no genómicos. Los eventos genómicos implican la traslocación de complejos de estrógeno-receptor al núcleo y la interacción directa con la cromatina en secuencias del DNA específicas conocidas como

elementos de respuesta a estrógenos (ERE, del inglés *estrogen response elements*). Mientras que los eventos no genómicos implican la regulación indirecta de la expresión génica a través de una variedad de eventos de señalización intracelular (Fuentes & Silveyra, 2019).

La vía de señalización genómica también es conocida como el mecanismo clásico de señalización de los estrógenos. Tanto el ER α , como el ER β actúan como factores de transcripción activados por ligandos. Por lo tanto, después de la unión del E₂ a ER α o ER β en el citoplasma, se genera un cambio conformacional del receptor permitiendo que se disocie de complejos de proteínas de choque térmico que lo mantienen estables en el citoplasma y disponible para unirse a su ligando. A continuación, se produce fosforilación del ER que ayuda a la dimerización del complejo receptor-ligando. Posteriormente, el complejo se transloca al núcleo donde se une a la cromatina en las secuencias ERE de genes blanco. El cambio conformacional de receptor inducido por el E₂ facilita la asociación/disociación de complejos de proteínas correguladoras, las cuales van a regular la función de la cromatina y la comunicación con la maquinaria transcripcional (Fig. 11), (Fuentes & Silveyra, 2019; Le Romancer et al., 2011).

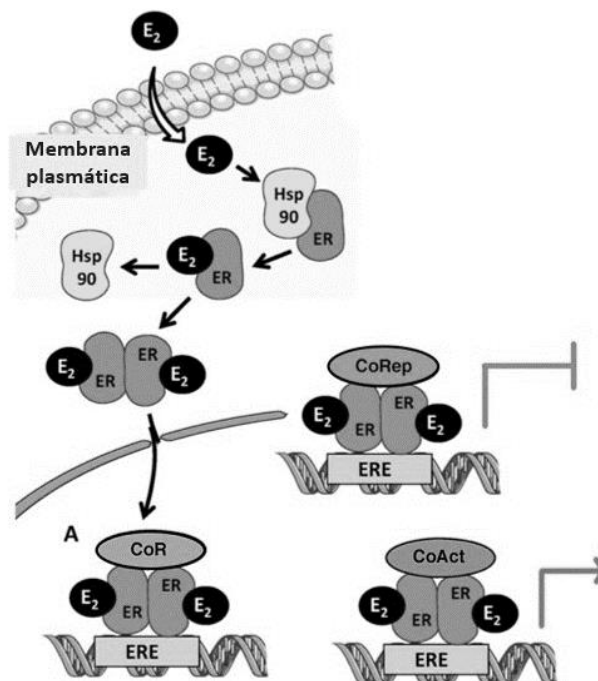


Figura 11. Vía de señalización genómica o clásica. 1) Señalización genómica directa: el estradiol (E₂) se une a los ER (ER α o ER β). El complejo ligando-receptor se dimeriza y se transloca al núcleo donde se unen a ERE y se reclutan proteínas correguladoras. E₂, estradiol; Hsp 90, proteína de choque térmico 90; ER, receptor de estrógenos; ERE,

elemento de respuesta a estrógenos; CoR, correguladores; CoRep, correpresores; y CoAct, coactivadores (Modificado de: Le Romancer et al., 2011).

Adicionalmente, los ER pueden controlar la expresión génica por diferentes mecanismos como son, el mecanismo “genómico no clásico” donde regulan la actividad de otros factores de transcripción, en donde los ER nucleares activados por ligando interactúan con otros factores de transcripción, como la proteína activadora-1 (AP-1, del inglés *Activator Protein-1*). El complejo AP-1 está conformado por homodímeros o heterodímeros de las familias Jun y Fos. Las proteínas AP-1 se unen a sus secuencias específicas de ADN, en las regiones reguladoras de los genes diana y activan la transcripción. Como ejemplos de algunos genes que contienen los sitios AP-1 están los genes que codifican para la colagenasa, el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF-1, del inglés *Insulin-like growth factor 1*) y el gen de la colina acetiltransferasa humana. También existe activación del ER por vías independientes de estrógenos o ligandos, en donde intervienen varias cinasas que se activan a través de receptores de factores de crecimiento, como el factor de crecimiento epidérmico (EGFR, del inglés *Epidermal Growth Factor Receptor*) para lograr la activación de ER y sus proteínas correguladoras mediante su fosforilación. Se sabe que el ER puede ser fosforilado por el receptor de quimiocinas a través de la activación de ERK. Finalmente, existe una vía de activación rápida de ER en donde hay una pequeña fracción de ER localizados cerca de la membrana plasmática y su unión a ligando y dimerización activa múltiples cascadas de señalización a través de interacciones directas con diversas proteínas, incluidas la proteína proto-oncogén tirosina cinasa Src, el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y proteínas adaptadoras. La formación del complejo ER con Src y la subunidad reguladora p85 de PI3K dependiente de E_2 , activa dos vías principales, la vía Src/ras/MAPK y la de PI3K/Akt, desencadenando la actividad transcripcional de genes diana (Fig. 12) (Dahlman-Wright et al., 2012; Fuentes y Silveyra, 2019; Le Romancer et al., 2011).

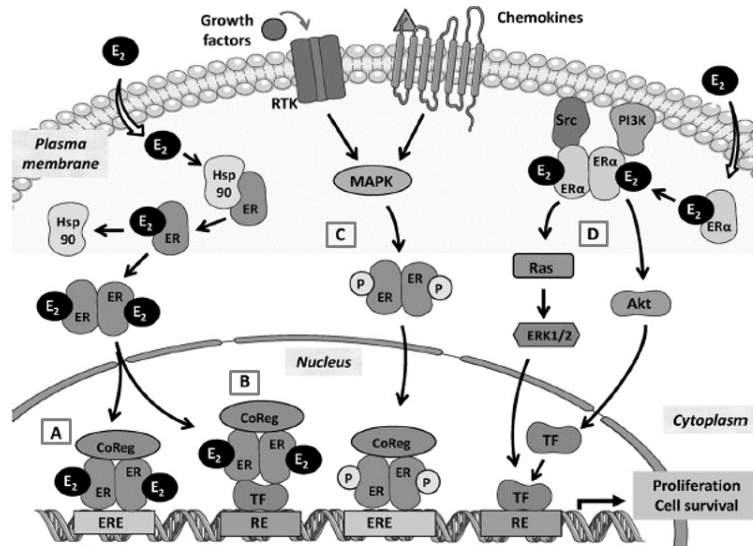


Figura 12. Vías de señalización reguladas por ER. Representación de cuatro vías de señalización distintas mediada a través de ER. A) Vía de señalización genómica o clásica. El E₂ unido a ER genera un cambio conformacional provocando la dimerización del receptor y la traslocación nuclear del complejo ligando-receptor para su unión a ERE y el posterior reclutamiento de proteínas correguladoras. B) Vía no genómica o no clásica, depende de la interacción de ER con otros factores de transcripción, como AP-1. C) Vía independiente de ligando en donde el ER es activado por fosforilaciones inducidas por factores de crecimiento. D) Vía no genómica que involucra un pequeño grupo de ER ubicado cerca de la membrana plasmática que activan cascadas de señalización como Src/ras/MAPK y PI3K/Akt, a partir del reclutamiento de proteínas cinasas (Src y PI3K). E₂, estradiol; Hsp 90, proteína de choque térmico 90; ER, receptor de estrógenos; ER α , receptor de estrógenos α ; ERE, elemento de respuesta a estrógenos; CoR, correguladores; TF, factor de transcripción; Growth factors, factores de crecimiento; Chemokines, quimiocinas; P, fosforilación; MAPK, proteína similar a quinasa activada por mitógenos; Src, proteína proto-oncogén tirosina cinasa; PI3K, fosfatidilinositol 3-quinasa (Modificado de: Le Romancer et al., 2011).

1.9.2 Correguladores de los receptores de hormonas esteroides

Gran parte del efecto que llevan a cabo los NR sobre los elementos de respuesta a hormona depende del reclutamiento de proteínas adicionales denominadas correguladores. Estos han emergido como reguladores esenciales en la expresión génica a través de su interacción y modulación de la actividad de los NR y otros factores de transcripción. Participan en la modificación de la expresión génica, incluida la modificación y remodelación de la cromatina, el inicio de la transcripción, el empalme de RNAm, la traducción génica, el procesamiento de miRNA y la degradación de los complejos NR-correguladores activados. De acuerdo con el resultado funcional que se obtiene de su acción, se han dividido en dos grandes clases: coactivadores, los cuales están asociados con los receptores nucleares unidos a ligandos agonistas y provocan la inducción de la expresión génica. Por otro lado, los correpresores, los

cuales inhiben la expresión génica a través de su interacción con receptores nucleares sin ligando o con ligandos tanto agonistas como antagonistas (Dasgupta et al., 2014; Lonard y O'Malley, 2007).

Tras la unión del ligando agonista a los receptores ocurre un cambio conformacional que ocasiona un incremento de afinidad de unión de las proteínas coactivadoras, las cuales tienen una amplia gama de actividades enzimáticas como acetilación, metilación, ubiquitinación, fosforilación y como remodeladores de la cromatina, generando un ambiente transcripcionalmente favorable (Dasgupta et al., 2014; Lonard y O'Malley, 2006).

El primer coactivador del ER α que se clonó fue el coactivador de receptor de esteroides 1, el cual pertenece a la familia de coactivadores SRC1/p160. En estas proteínas se determinó que existe una caja de receptores nucleares con el motivo LxxLL donde L: leucina y x: cualquier residuo, que se encuentra en muchas proteínas coactivadoras, la cuál es crítica para unirse al ER en la región AF-1 del LBD. Los residuos dentro de la hélice H12 junto con las hélices H3 y H5 son importantes para mediar las interacciones entre el ER y las proteínas coactivadoras. De manera general, los coactivadores, no se unen directamente al DNA, sino que se asocian con otros factores de transcripción que se unen al DNA, como los ER. Una vez que son reclutados al promotor, los coactivadores mejoran la actividad transcripcional (Savkur y Burris, 2004; Smith and O'Malley, 2004).

Por otro lado, la unión de ligandos antagonistas induce un cambio conformacional en los receptores que ocasiona que haya una reducción en la afinidad de unión de proteínas coactivadoras y a su vez un incremento en la unión de proteínas correpresoras, las cuales son capaces de reclutar enzimas como las desacetilasas de histona, reprimiendo la transcripción. Adicionalmente, en ciertos casos, los correpresores pueden unirse en ausencia de ligando o en presencia de ligando agonista (Lonard y O'Malley, 2006; Nagy et al., 1997).

Si bien hay menos proteínas correpresoras estudiadas, estas tienen funciones importantes para regular negativamente la expresión génica dependiente de ligando. Dichas proteínas se unen a los receptores a través de cajas CoRNR, que consisten en motivos LxxxI / HlxxxI / L (donde L:

leucina, I: Isoleucina y x: cualquier residuo). Al unirse E₂ al ER, las proteínas correpressoras se disocian y se asocian coactivadores para estimular la expresión génica (Smith y O'Malley, 2004).

1.9.3 Dominio LBD y ligando del ER

El dominio LBD es un dominio estructural y funcionalmente complejo. Presenta dos sitios de unión que interactúan: 1) hendidura de unión del ligando (LBC, del inglés *ligand binding cleft*) y 2) dominio dependiente de ligando AF-2. La interacción molecular entre LBC y AF-2 determina la actividad del ER α . Un ligando agonista o antagonista se une al dominio LBC promoviendo un cambio de conformación que expone a AF-2 para permitir su interacción con proteínas reguladoras. Como se mencionó anteriormente, en el mecanismo clásico, se genera un cambio conformacional generado por la unión del ligando provocando la disociación del ER α de complejos proteicos de choque térmico y la posterior fosforilación del ER para ayudar la dimerización del receptor y su posterior actividad en la vía de señalización clásica. El reclutamiento diferencial de correguladores contribuye a los efectos específicos de los tejidos (Le Romancer et al., 2011; Ye et al., 2018).

Por otro lado, ahondando en el dominio LBD del ER α , este presenta un pliegue α -helicoidal antiparalelo conformado por 12 hélices (H1-H12) y dos láminas β organizadas en horquilla. Las hélices 3 y 12 son las más importantes para la arquitectura funcional del LBD (Fig. 13). Las 12 hélices están plegadas en un pliegue α -helicoidal antiparalelo de tres capas, comprendiendo las hélices: H5/6, H9 y H10, las cuales se intercalan entre dos capas adicionales de hélices: H1-4 y H7, H8 y H11. Esta disposición helicoidal genera un andamio que mantiene una cavidad de unión al ligando. Dentro del dominio LBD, el dominio LBC está completamente separado del microambiente externo y ocupa una porción relativamente grande del núcleo hidrofóbico del dominio LBD (Fig. 13), comprendiendo los segmentos de H3, H6, H8, H11 y H12. La disposición que comprenden estas hélices crea un dominio LBC tridimensional en el extremo estrecho del dominio LBD con AF-2. Por otro lado, el dominio AF-2 es una hendidura hidrofóbica que está formada por el segmento restante de la hélice H3 y parte de las hélices H5, H4 y H12. Además, la comunicación entre LBC y AF-2, es clave para controlar las funciones mediadas por estrógenos (Arnal et al., 2017; Yaşar et al., 2017 y Ye et al., 2018).

Asimismo, se propone que la unión del agonista E₂, genera que se movilizce la hélice H12, la cual se empaqueta contra la hélice H3, H5/6 y H11, formando una tapa en la cavidad de unión a ligando (Fig. 14). Dicha posición de H12, es un requisito previo para la activación transcripcional ya que genera la activación del dominio AF-2, el cual es capaz de interactuar con coactivadores. La conformación de LBD unido a E₂, puede reconocer el segmento helicoidal corto característico denominado motivo LXXLL de una variedad de proteínas coactivadores. Asimismo, el dominio LBD puede provocar una respuesta diferencial del ER α y es probable que su acción dependa de la fuerza de unión del ligando al dominio LBC. Es decir, si un ligando es capaz de unirse fuertemente pero que no interactúa con los residuos de aminoácidos de una manera que promueva el cambio conformacional del receptor, podría inhibir la actividad agonista del E₂, por lo tanto, bloquea el LBC. Por otro lado, el tamoxifeno, tiene las características moleculares adecuadas para interactuar con el LBC de manera similar a el E₂ (Fanning et al., 2018; Yaşar et al., 2017; Ye et al., 2018).

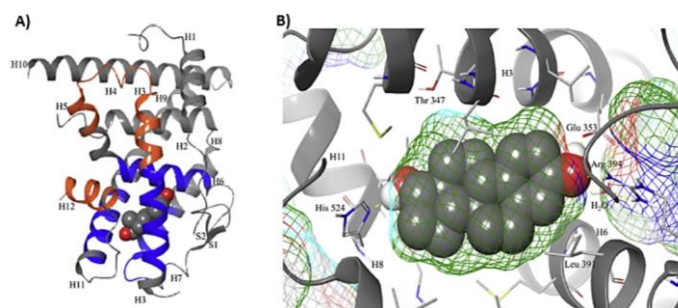


Figura 13. Estructura del dominio de unión al ligando (LBD) del ER α . A) Disposición de las hélices (H1-12), para generar la hendidura de unión del ligando (LBC) y AF-2; Azul, dominio LBC, Anaranjado; dominio AF-2; Círculo grises y rojos, molécula de E₂. B) E₂ acoplado a LBC (Modificado de: Ye et al., 2018).

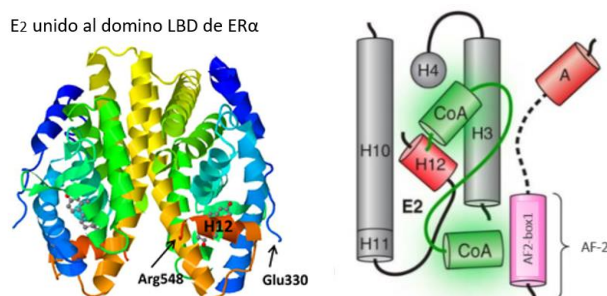


Figura 14. Estructura del dominio de unión al ligando (LBD) del ER α que se une a E₂. A) La unión del agonista E₂ induce un cambio conformacional en el dominio LBD del ER α que coloca la hélice dinámicamente móvil (H12) sobre la hendidura de unión del ligando (LBC). Este cambio conformacional, genera una superficie adecuada para que

existan interacciones con coactivadores. B) Se muestra la posición de las hélices α del dominio LBD. El cilindro rojo (H12), rosa (dominio AF-2) y grises muestran la posición de los dominios. Los dominios interactúan con proteínas coactivadores (CoA) (Modificado de: RNAal et al., 2017 y Yaşar et al., 2017).

Los ER también se unen a una gran variedad de moléculas que tienen propiedades agonistas, antagonistas o mixtas. Aunque la mayoría de los aminoácidos clave en LBC responsables de unir ligandos agonistas o antagonistas son idénticos, cuando se une un modulador selectivo de los receptores de estrógenos (SERM, del inglés *selective estrogen receptor modulator*), estos pueden evitar que la hélice H12 se acople en la conformación agonista. Este cambio conformacional en la hélice H12 conduce a la ocupación de la hendidura de unión a LXXXL, evitando la unión de coactivadores y, por tanto, la activación transcripcional de genes diana. Por otro lado, se sabe que la unión de un ligando antagonista genera que la hélice H12 se ubique en una posición fuera de la región AF-2, lo que genera una interacción con el motivo consenso de proteínas correpresores: LxxxI/ HlxxxI/L (Fig. 15) (Yaşar et al., 2017).

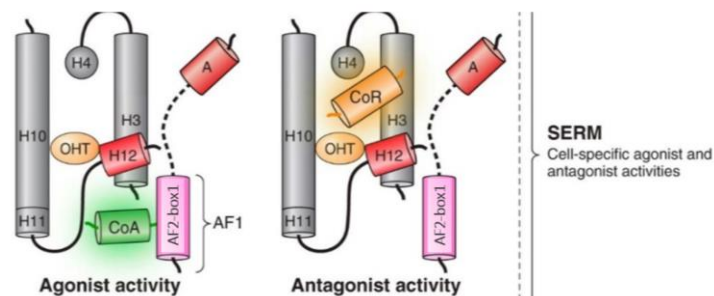


Figura 15. Estructura del dominio LBD del ER α tras unirse un SERM. Los SERM exhiben efectos agonistas o antagonistas de manera dependiente del contexto celular. Si la acción es agonista, genera un cambio conformacional de la hélice 12 (H12) promoviendo la interacción con proteínas coactivadores. Sin embargo, si la acción es antagonista, genera un cambio conformacional de H12 promoviendo la interacción con proteínas correpresores. OHT, 4-hidroxi tamoxifeno; CoA, Coactivadores; CoR, correpresores (Modificado de: RNAal et al., 2017).

El tamoxifeno es un SERM que inicialmente era conocido como un antagonista del ER que reducía los efectos inducidos por los estrógenos al bloquear los receptores en la glándula mamaria, lo cual lo ha colocado como una terapia importante para el cáncer de mama que expresa al ER α . Sin embargo, se demostró que actúa como un agonista del ER en algunos tejidos como: endometrio, hígado y hueso, lo cual tiene la ventaja de que el tratamiento con tamoxifeno reduce los efectos secundarios que se pueden promover por la ausencia de estrógenos, como la osteoporosis, pero la desventaja de que pudiera promover proliferación

endometrial y conllevar a problemas en este tejido. Por lo tanto, se desarrolló un nuevo grupo de SERM, los cuales son moléculas que pueden unirse a el ER α y/o ER β promoviendo acciones similares a moléculas agonistas o antagonistas en varios tejidos y células diana de los estrógenos (Peng et al., 2009; Shagufta & Ahmad, 2018).

Existe un grupo de ligandos denominados antagonistas puros del ER como, por ejemplo, ICI 182 780 o fulvestrant que fue identificado a finales de la década de 1980. Este compuesto es capaz de unirse con el ER α , pero la dimerización del receptor se altera, la degradación del ER α se acelera y tanto AF-1 como AF-2 permanecen inactivos. Estos eventos dan como resultado una localización nuclear interrumpida y una falla para reclutar proteínas coactivadores. Como consecuencia, la transcripción de genes estrógeno regulados se inhibe completamente, conduciendo a la supresión génica (Kocanova et al., 2010; Robertson, 2001; Smith y O'Malley, 2004).

1.9.4 Fosforilaciones del ER α

Si bien la función del ER α es activada por ligando, su función también se encuentra regulada por modificaciones postraduccionales (PTM, del inglés *posttranslational modifications*), como, por ejemplo, fosforilaciones. El ER α , puede ser fosforilado en múltiples sitios, predominando en el dominio N-terminal. Los diversos sitios de fosforilación contribuyen a la regulación de diversas funciones que incluyen la sensibilidad a ligandos, localización nuclear, unión al DNA, interacciones proteína/cromatina, la estabilidad de la transcripción de genes blanco y la interacción con correguladores y, por lo tanto, su actividad en general (Anbalagan y Rowan, 2015; Kastrati et al., 2019).

El ER α puede regular la transcripción génica a través de los dominios AF-1 y AF-2. El dominio AF-2 es activado tras la unión de E₂, sin embargo, el dominio AF-1 es activado por la fosforilación de ER α en varios sitios, en donde, los más destacados son en serina 118 (S118) y serina 167 (S167) (Anbalagan y Rowan, 2015; Le Romancer et al., 2011).

La fosforilación de serina 118 (S118) en el dominio AF-1 es el blanco más estudiado y puede ser fosforilado por varias proteínas cinasas incluyendo las cinasas MAPK, GSK-3, CDK7 y mTOR. La

S118 se fosforila en respuesta al ligando agonista de ER α (E₂) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF, del inglés *epidermal growth factor*). Se ha demostrado que la fosforilación media la interacción del ER α con proteínas correguladores como CBP/p300 y la familia de coactivadores p160 (SRC-1, SRC-2 y SRC-3), para después mediar la activación del receptor tanto dependiente como independiente de ligando. La activación continua de la vía MAPK aumenta la fosforilación del ER α independiente de ligando, lo que hace que algunos tumores sean independientes de hormonas. Sin embargo, existen varias cinasas que son responsables de la fosforilación de S118 dependiente de estrógenos (Anbalagan y Rowan, 2015; Le Romancer et al., 2011).

La serina 167 suele ser fosforilada por las cinasas ERKK1/2, MAPK, AKT, p90RSK, CK2 y mTOR. La fosforilación por parte de CK2 regula la interacción de ER α con los ERE e incrementa la unión a la cromatina, mejorando la unión del coactivador SRC3 en presencia de E₂ y por consecuencia mejora la transcripción génica (Anbalagan y Rowan, 2015; Yamashita et al., 2008).

Los sitios de fosforilación en serina 104 (S104) y serina 106 (S106) son inducidos exclusivamente en presencia de estrógenos y por vías donde estén presentes factores de crecimiento, así como la activación de MAPK. La fosforilación de estos residuos está involucrada en la actividad del ER, y es necesaria para la actividad agonista del tamoxifeno, juntos con S118, por lo que podrían contribuir a la resistencia al tratamiento (Le Romancer et al., 2011; Thomas et al., 2008).

Además, es probable que los cambios conformacionales de ER α que son inducidos por fosforilaciones puedan promover el reclutamiento de correguladores. Se ha demostrado que la activación de la cinasa Src y las respuestas de ER α que son mediadas por fosforilación de Src a través de ERK en S118 mejora la actividad de AF-1. Pero, por otro lado, Src activa a PI3K/AKT y AKT que, a su vez fosforilan a S167, promoviendo la estabilización de la interacción de ER α y correguladores con promotores dianas. Por lo tanto, la fosforilación de S167 promueve la unión al DNA, mientras que la fosforilación de S118 puede afectar la unión de coactivadores a ER α (Anbalagan y Rowan, 2015; Feng et al., 2001).

Se han identificado varias cinasas capaces de fosforilar a la serina 305 (S305), como Pak1 la cual está implicada en la morfogénesis celular, la motilidad, la supervivencia, la angiogénesis y la

mitosis, por lo que participa en la progresión del cáncer, pero también la cinasa PKA dependiente de AMPc fosforila a S305. En presencia de tamoxifeno, PKA promueve la actividad transcripcional de ER a través de la fosforilación de S305, convirtiendo al tamoxifeno de antagonista en agonista (Kastrati et al., 2019).

1.10 Modelo de la contribución de coactivadores y correpresores a la actividad agonista/antagonista de los modulares selectivos del ER

Gracias a la identificación de proteínas coactivadoras y correpresoras y su actividad diferencial tras la unión de ligando, se ha considerado el papel de los corre reguladores en la regulación de la función del ER. De tal manera, surgió el modelo de la contribución de coactivadores y correpresores a la actividad agonista/antagonista de los moduladores selectivos del ER, el cual propone que, en presencia de ligandos agonistas, el ER se encuentra en una conformación activa e interactúan proteínas coactivadores resultando en una actividad transcripcional activa, (Fig. 16) (Jordan y O'Malley, 2007; Peng et al., 2009; Smith y O'Malley, 2004).

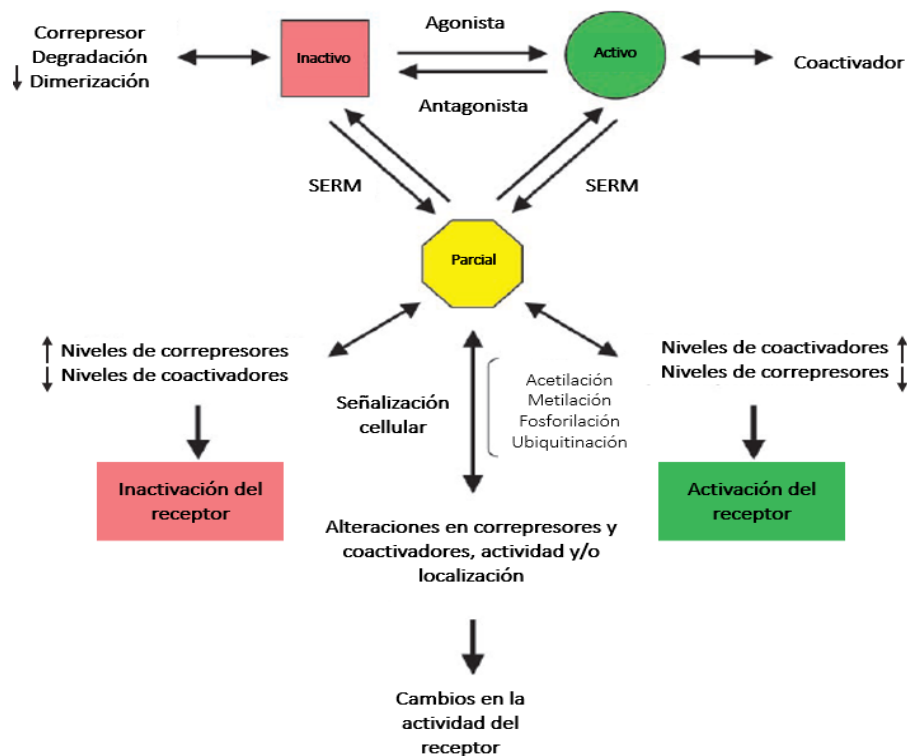


Figura 16. Hipótesis del efecto específico de los moduladores selectivos de estrógenos (SERM). Se observa el modelo de contribución de los coactivadores y correpresores con respecto a las actividades agonistas o antagonistas. En presencia de un ligando antagonista puro, el receptor adquiere una conformación inactiva y se

une preferencialmente a proteínas correpresoras. En presencia de un ligando agonista puro, el receptor adquiere una conformación activa y se une preferencialmente a proteínas coactivadores. En presencia de un SERM, el receptor adquiere una conformación parcial intermedia que no es completamente activa, pero tampoco es completamente inactiva, por lo tanto, el receptor se puede unir a complejos coactivadores o correpresores generando una actividad transcripcional dependiente del contexto celular (Modificado de: Smith y O'Malley, 2004).

En presencia de ligandos antagonistas el ER adapta una conformación inactiva e interactúa de manera preferencial con proteínas correpresores, resultando en la inhibición de la actividad transcripcional. Sin embargo, en presencia de SERMs, el ER adopta una conformación denominada como parcial, ya que se encuentra en un estado activo e inactivo, por lo tanto, tienen el potencial de interactuar tanto con proteínas coactivadores como correpresores y ejercer una actividad agonista o antagonista parcial. La actividad del ER depende de la presencia y concentración de proteínas correguladores en el entorno celular dado y de la señalización mediada por vías de transducción de señales activadas y sus efectos sobre el receptor y sus correguladores (Jordan y O'Malley, 2007; Peng et al., 2009; Smith y O'Malley, 2004).

1.11 Células troncales y células troncales cancerosas

El cáncer es una de las causas de muerte más comunes a nivel mundial debido a que suele ser diagnosticado en etapas avanzadas y con metástasis a otros órganos. Incluso si el cáncer se diagnostica y trata en una etapa temprana, algunas células residuales aún persisten y, después pueden causar recurrencia del tumor. Estas células podrían ser las responsables de causar resistencia terapéutica y poseen propiedades similares a las células troncales (CT) y son denominadas células troncales cancerosas (CTC) (Ayob y Ramasamy, 2018).

Las CT son un grupo de células que tienen la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse hacia distintos subtipos celulares, siendo esenciales para la reparación de tejidos y el mantenimiento de la homeostasis. Estas se encuentran en muy bajas proporciones en los tejidos. Tienen una gran capacidad de replicación, además de poseer una larga vida. Además, estas células se han convertido en candidatas para dar respuesta al origen de diferentes tipos de cánceres, pues la mayoría de los cánceres surgen de una célula que presentó una transformación maligna impulsada por diversas mutaciones, por lo que surgen de células que muestran un comportamiento agresivo (Bjerkvig et al., 2005; Boyer et al., 2005; Smalley y Ashworth, 2003).

Se suelen clasificar de acuerdo con su capacidad de diferenciación: 1) Totipotenciales, aquellas que tienen una capacidad de generar todos los linajes del organismo; por lo que en los mamíferos el cigoto y los blastómeros tempranos son las únicas células que pueden ser totipotenciales, pues tienen la capacidad de generar todo el organismo. 2) Pluripotenciales, las que tienen la capacidad de generar la mayoría de los linajes del embrión, incluyendo las células troncales embrionarias, derivadas de la masa interna del blastocisto en desarrollo, pero no pueden generar a un individuo. 3) Multipotenciales, las cuales tienen la capacidad de generar células de una capa embrionaria en particular. 4) Unipotentes, son las que tiene la capacidad de generar exclusivamente un tipo específico de células (Boyer et al., 2005; Guo et al., 2006).

Otra clasificación se basa en su origen: 1) CT embrionarias, son células totipotenciales y se derivan de la masa interna del blastocisto, tienen la capacidad de formar a todos los tejidos excepto a estructuras extraembrionarias. 2) CT germinales, las cuales son las encargadas de producción de espermatozoides y óvulos en adultos. 3) CT somáticas, pueden ser multipotenciales, bipotentes o unipotentes y son responsables de la reparación y regeneración de tejidos (Boyer et al., 2005; Guo et al., 2006).

Un cuarto grupo está formado por las CTC, las cuales hacen referencia a una subpoblación celular dentro de un tumor, por lo que se diferencian en CTC y CT normales. Las primeras tienen la capacidad de diferenciarse y autorrenovarse, por lo que se cree que son las responsables de la iniciación, crecimiento y recurrencia del tumor (Reya et al., 2001).

1.11.1 Características de las células troncales cancerosas

Las CTC se encontraron por primera vez en la leucemia mieloide aguda (LMA), en 1997, demostrando que una subpoblación celular es capaz de iniciar la LMA en ratones diabéticos no obesos con enfermedad inmunodeficiente combinada grave (SCID), dicha subpoblación celular es poseedora de una capacidad de diferenciación, proliferación y autorrenovación. En la LMA, las CTC tienen la capacidad de diferenciarse en blastos leucémicos e independiente de la heterogeneidad en las características de la maduración de los blastos leucémicos, presentan exclusivamente fenotipo de las proteínas de superficie positivas a CD34 (+) y negativas a CD38

(-). El descubrimiento de las CTC y su papel en la biología del cáncer indican que juegan un papel importante en la progresión de la enfermedad, además de contribuir a la heterogeneidad del tumor, así como a la invasión, metástasis y resistencia a agentes citotóxicos (Reya et al., 2001; Wang et al., 2018).

Las CTC tienen la capacidad de adquirir características similares a las CT, proporcionando pruebas de que estas células tienen un papel en la carcinogénesis. Las características que comparten se muestran en la Figura 17 e incluyen: 1) capacidad de autorrenovación, 2) capacidad de diferenciación, 3) actividad de la telomerasa (sólo observada en células germinales), 4) activación de rutas anti apoptóticas, 5) incremento en la actividad de transportadores de membrana, 6) supervivencia independiente de anclaje, 7) capacidad de migrar. Adicionalmente, para establecer la existencia de CTC se han establecido criterios consenso, en donde se incluye, la expresión de marcadores distintivos de la superficie celular, lo que permite un aislamiento celular (Dontu et al., 2003; Zhang et al., 2008).

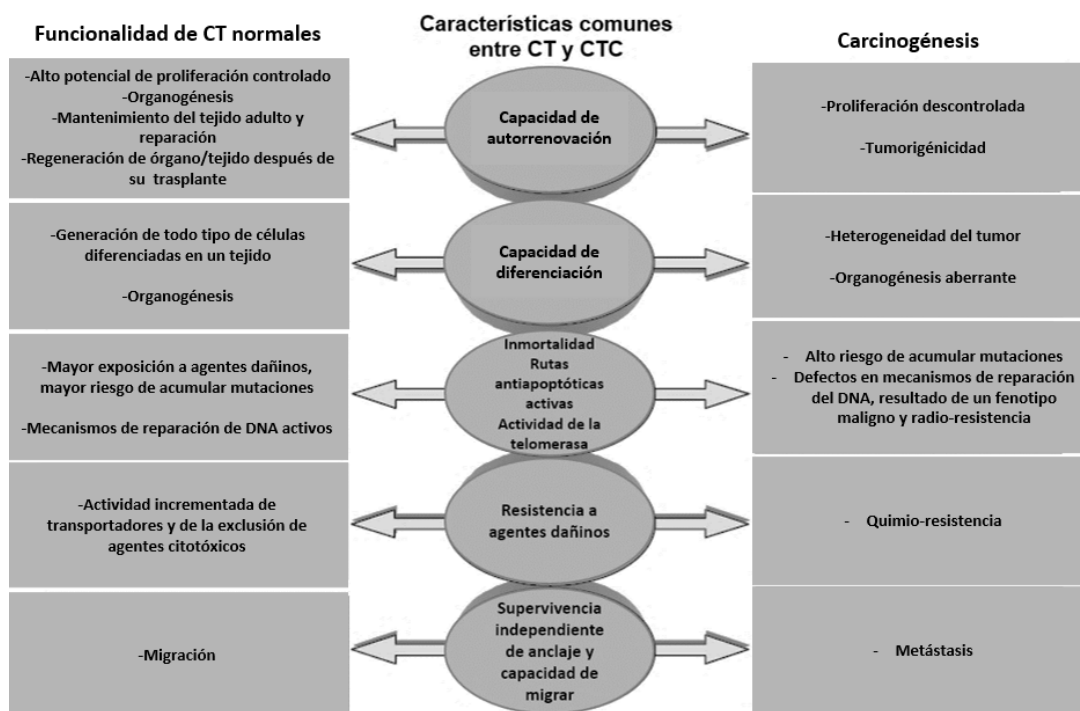


Figura 17. Características comunes entre CT y CTC (Modificado de Dontu et al., 2003).

1.11.2 Células troncales cancerosas y formación de tumores

Si el crecimiento de tumores sólidos está impulsado por CTC, esto generaría diversas implicaciones para la terapia del cáncer. En ocasiones se suelen detectar pequeñas proporciones de células cancerosas que se diseminaron a sitios distantes del tumor primario en pacientes que nunca manifestaron enfermedad metastásica. Esto puede ser explicado a través de la eficiencia de la vigilancia inmunológica, que se encarga de destruir las células cancerosas diseminadas antes de que sean capaces de formar un tumor detectable. Otra posibilidad es que la mayoría de las células cancerosas carecen de la capacidad de generar un tumor, de tal modo que solo la diseminación de CTC puede conducir a una enfermedad metastásica. Si este fuera el caso, el objetivo de la terapia debe ser identificar y destruir esta población de CTC (Reya et al., 2001).

1.12 Formación de esferoides

En los últimos años, se han utilizado ensayos de formación de esferoides para enriquecer o expandir células con características de CT, a partir de cultivos primarios y líneas celulares, lo que permite una mejor caracterización *in vitro* de células con estas características. Estas células son cultivadas bajo condiciones no adherentes, utilizando un medio libre de suero, que es suplementado con distintos factores de crecimiento. Bajo este tipo de cultivo las células que exhiben un potencial de autorenovación, comienzan a dividirse generando células que entran en proceso de diferenciación formando un conjunto de células también llamadas esferoides o tumoroesferas. Estos esferoides generalmente están enriquecidos en células que poseen características de CTC, como expresión de marcadores, potencial proliferativo, capacidad de autorrenovación y diferenciación (Liu et al., 2013).

2. Antecedentes

2.1 CTC en cáncer de ovario epitelial y marcadores de superficie

Las células presentes en el COE muestran una gran heterogeneidad. Específicamente, dentro de un tumor o una línea de células tumorales, existen abundantes poblaciones de células tumorales distintas que expresan diferentes marcadores. Estas poblaciones de células únicas

tienen capacidades diferenciales de crecimiento, supervivencia, metástasis y resistencia a quimioterapia y radioterapia. Las CTC de COE constituyen una pequeña proporción de células malignas dentro de un tumor, del 0.01 al 1% (Fig. 18). Esta subpoblación celular es capaz de generar un tumor completo y tienden a ser quimio y radio resistentes. Las CTC pueden evadir al sistema inmunológico y tienen mecanismos eficientes de reparación de daños del DNA. (Bregenzner et al., 2019; Burgos-Ojeda et al., 2012)

Se sabe que el líquido ascítico (Fig. 18) contiene células tumorales y no tumorales, además puede estar presente en todos los subtipos de cáncer de ovario. (Canaz et al., 2019; Krugmann et al., 2019; Szender et al., 2017) Por otro lado, se ha reportado que la presencia de esferoides en el líquido ascítico es un factor importante que influye a la quimio-resistencia. Las esferoides pueden variar en su estructura y tamaño en el COE y en un estudio se demostró que había hasta 4 veces mayor resistencia al cisplatino en una población celular de ovario-esferas obtenidas de las líneas celulares SK-OV-3, UL-3C y UL-1 en comparación con las poblaciones cultivadas en monocapa (Ford et al., 2020; Makhija et al., 1999).

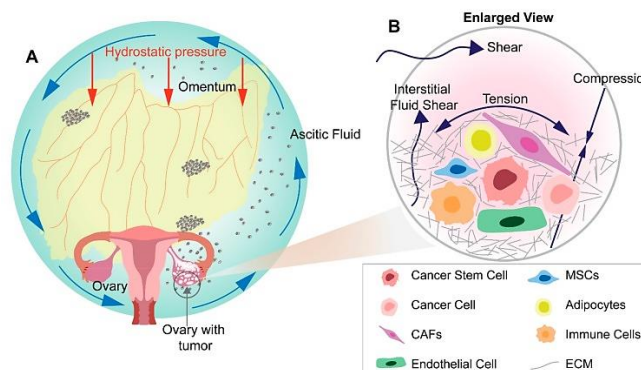


Figura 18. Subpoblación de CTC en COE. A) El círculo verde/azulado representa la cavidad peritoneal y las flechas azules indican el flujo de líquido intersticial, mientras que las flechas rojas indican presión hidrostática. B) Se observa el microambiente tumoral, compuesto por células cancerosas, células troncales cancerosas (CTC), fibroblastos asociados al cáncer (CAF), células endoteliales, células mesenquimales (MSC), adipocitos y células inmunitarias (Modificado de: Burgos-Ojeda et al., 2012).

Dado que se cree que las CTC son la fuente de cáncer de ovario recurrente y se ha postulado que pueden surgir de cambios genéticos en las CT normales, es de importancia poder identificarlas. Para esto, se ha realizado la caracterización celular a partir de marcadores de la

superficie celular para identificar y aislar subpoblaciones celulares conformadas por las CTC. En la actualidad no existe un conjunto de marcadores que sean capaces de identificar específica ni sensiblemente a la población de CTC, pero como se muestra en la tabla 2, se han utilizado marcadores para describir a las CTC en diferentes tipos de cánceres sin ser específicos ni universales. (Burgos-Ojeda et al., 2012; Mitra et al., 2016; Murphy, 2010; Naora, 2005)

Con base en la información anterior, un marcador reconocido que se utiliza para identificar a las CTC de ovario es CD44, una glicoproteína de superficie celular que se une al ácido hialurónico; su señalización celular se encuentra involucrada en adhesión, movilidad, migración e invasión. Otro marcador es CD133, una glicoproteína transmembranal cuya localización preferentemente es en hendiduras y microvellosidades de la membrana plasmática, por lo que puede unirse directamente a las balsas lipídicas que contienen colesterol y, por lo tanto, participar en varias cascadas de señalización. Se ha demostrado ampliamente que, si se detectan ambos marcadores de superficie celular, CD44 y CD133 pueden identificar poblaciones de CTC en el cáncer de ovario (Burgos-Ojeda et al., 2012; Glumac y LeBeau, 2018; Herrera-Gayol y Jothy, 1999; Zhao et al., 2020).

Tabla 2. Poblaciones de CTC y sus correspondientes marcadores en diferentes tipos de cáncer. Modificado de Barbato et al., 2019.

Tumour	Biomarkers
Breast cancer	CD44 ⁺ /CD24 ^{-low} /ALDH ⁺
Prostate cancer	CD44 ⁺ /a2b1 ⁺ /ALDH ⁺
Melanoma	ABC5 ⁺ CD20 ⁺ CD271 ⁺
Glioblastoma	CD133 ⁺
Colon cancer	CD133 ⁺ /CD44 ⁺ /ALDH ⁺ EpCAM ⁺ /CD44 ⁺ /CD166 ⁺ CD44 ⁺ /CD24 ⁺ CD133 ⁺ /CD24 ⁺
Lung cancer	CD133 ⁺ CD44 ⁺ ALDH ⁺ CD117 ⁺
Gastric cancer	CD133 ⁺ CD44 ⁺ /CD24 ⁺ CD90 ⁺ CD44 ⁺ /CD54 ⁺
Head and neck cancer	CD44 ⁺ /ALDH ⁺ CD44 ⁺ /CD66 ⁺
Ovarian cancer	CD133 ⁺ CD44 ⁺ ALDH ⁺ CD117 ⁺
Pancreatic cancer	CD133 ⁺ /CD44 ⁺ /CD24 ⁺ /ESA ⁺

2.1.1 Marcador de superficie CD44

Existe un grupo de moléculas compuestas por una proteína unida a uno o varios glúcidos denominadas glicoproteínas. Las glicoproteínas transmembranales CD44 o antígeno Hermes forman parte de una gran familia de moléculas de adhesión celular. Las funciones de las moléculas de adhesión celular son controlar el comportamiento celular mediando el contacto entre las células o entre la matriz extracelular y participa en la motilidad celular, la migración celular, la diferenciación celular, la señalización celular y la transcripción de genes, por lo tanto, son esenciales para mantener el tumor. Cerca de la región transmembranal, se puede incluir una parte variable que es codificada por diversas combinaciones de exones, dando origen a diversas variantes de CD44 (CD44v). Los exones 1 a 5 y 16 a 20 se empalman dando lugar a la isoforma estándar CD44, la cual es la proteína más abundante conformada por 363 aminoácidos y tiene un peso molecular teórico de 85-90 kDa. Todas las isoformas constan principalmente de tres dominios; un dominio citoplasmático C-terminal conformado por 72 aminoácidos, un dominio transmembranal de 21 aminoácidos y un dominio extracelular de 270 aminoácidos. (Fig. 19) La mayor parte de la proteína se localiza extracelularmente y el extremo C-terminal es intracelular formando parte del dominio citoplasmático, el cual está codificado por el exón 10 o 9. El dominio transmembranal es específicamente codificado por el exón 8 y proporciona una vía para interactuar con cofactores y proteínas adaptadoras. Mientras que el dominio extracelular es considerado como un dominio variable, conocido también como dominio medio, ya que las diferentes isoformas expresan variantes codificadas por los exones variantes v2-v10 (entre el exón 5 y el exón 16) y es el encargado de interactuar con el microambiente externo, además de detectar estímulos externos. Adicionalmente, contiene un dominio amino-terminal el cual es un dominio de unión a hialuronano (Mishra et al., 2019; Orian-Rousseau, 2010; Senbanjo y Chellaiah, 2017).

Es bien sabido que CD44 es el principal receptor del hialuronano, un componente principal de la matriz extracelular, pero también de otros componentes de la matriz extracelular, como, por ejemplo, la laminina, colágeno y fibronectina, así como citocinas y factores de crecimiento. El receptor transmembranal es multifuncional y controla diversas funciones biológicas implicadas

en la diseminación y metástasis de células cancerosas (Fig. 20). Se ha determinado que, CD44 es escindido por metaloproteasas de matriz tipo 1 de membrana (MT1-MMP, del inglés Membrane Type 1 Matrix Metalloprotease) y luego por presenilina-1/ y secretasa inducida por ligandos (osteopontina, ácido hialuronano (HA), etc.). Dicha escisión produce un fragmento del dominio extracelular y un péptido similar a CD44 β o al dominio transmembranal, y un fragmento del dominio intracelular. El dominio intracelular se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes diana importantes para la metástasis y la supervivencia celular (Morath et al., 2016; Senbanjo y Chellaiah, 2017).

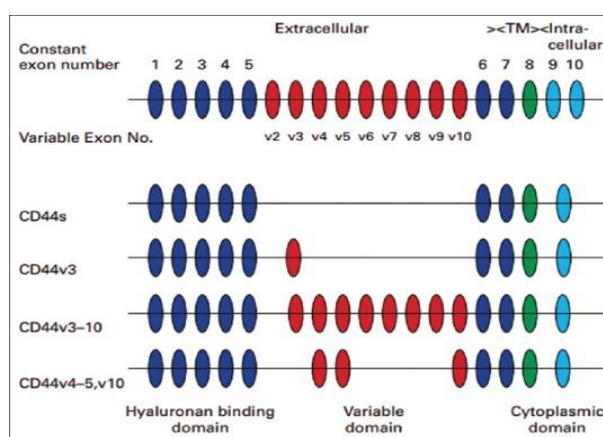


Figura 19. Estructura genómica de CD44 y sus isoformas. Color azul; dominio de unión a hialuronano, color rojo; dominio extracelular o dominio variable (dominio medio), codificado por los exones variantes v2-v10, color verde; dominio transmembranal codificado por el exón 8, color azul claro; dominio citoplásmico C-terminal (intracelular) codificado por el exón 10 o 9, CD44s; isoforma CD44 estándar, CD44v3, CD44v3-10, CD44v4-5, v10; isoforma CD44 variante (Mishra et al., 2019).

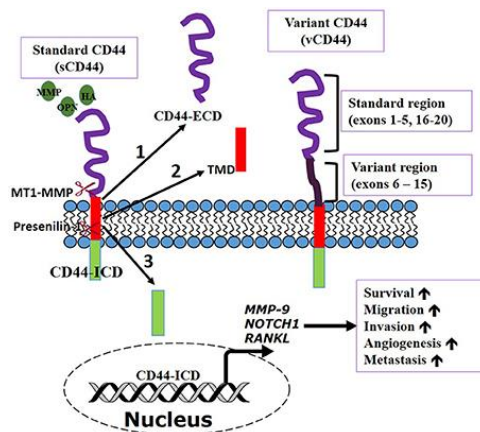


Figura 20. Función del receptor transmembranal CD44. sCD44, isoforma CD44 estándar; vCD44, isoforma variante CD44; MT1-MMP, metaloproteasas de matriz tipo 1 de membrana; Presenilina-1, presenilina-1/ y secretasa inducida

por ligando. 1) La escisión produce fragmentos del dominio extracelular (CD44-ECD), 2) TMD, dominio transmembranal y 3) CD44-ICD, fragmento de dominio intracelular que se transloca al núcleo para activar la transcripción de genes específicos que promueve la supervivencia, migración e invasión celular, así como la angiogénesis y metástasis (Senbanjo y Chellaiah, 2017).

CD44 se ha postulado como un marcador de CTC. En tumores sólidos, se ha demostrado que CD44 es un destacado marcador de CTC en varios tipos de cánceres (Tabla 3) (Barbato et al., 2019; C. Chen et al., 2018; Morath et al., 2016).

2.1.2 Marcador de superficie CD133

Uno de los marcadores de CTC ováricos más ampliamente utilizados y descritos es CD133 o prominina 1. Es una glicoproteína de membrana detectada por primera vez como marcador de células troncales hematopoyéticas y desde entonces se ha demostrado que es un marcador de diversas poblaciones de células troncales y CTC. También se expresa en las células epiteliales de diversos tejidos (mama, testículos, tracto digestivo, tranquea y placenta), pero también se encuentra en células no epiteliales como, por ejemplo, en células fotorreceptoras y en muchos tipos de cánceres incluidos el COE (Tabla 3) (Barzegar Behrooz et al., 2019; Burgos-Ojeda et al., 2012; Z. Li, 2013).

CD133 está conformada por cinco dominios transmembranales (~250 residuos de aminoácidos) con dos grandes bucles extracelulares glicosilados más dos bucles intracelulares pequeños (~20 residuos de aminoácidos), con un peso molecular de ~115/120 kDa. El extremo N-terminal está expuesto al medio extracelular, mientras que el extremo C-terminal se encuentra en el citoplasma (Fig. 21) (Barzegar Behrooz et al., 2019).

Se sabe que la expresión de CD133 es mayor en el cáncer de ovario seroso avanzado en comparación con ovarios normales y tumores benignos. Además, se ha reportado que las células tumorales que presentan el marcador CD133 tienen mayor capacidad de migración y quimio resistencia. Asimismo, se ha determinado que la expresión de CD133 desempeña un papel en la localización celular durante la metástasis al incrementar la adhesión celular en el tejido peritoneal en modelos de cáncer de ovario (Ferrandina et al., 2008; Glumac y LeBeau, 2018).

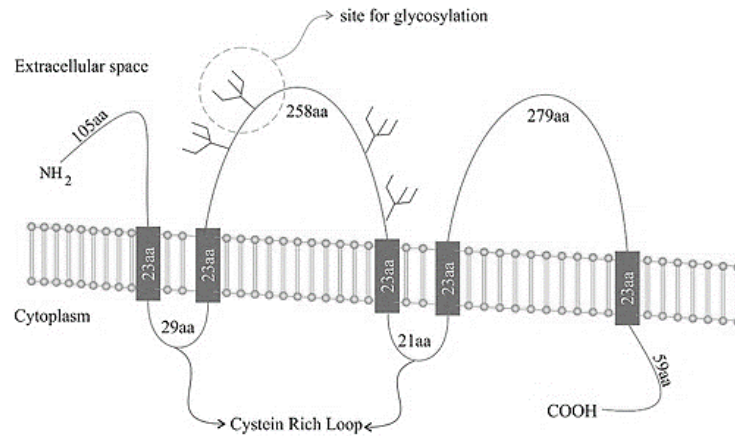


Figura 21. Estructura de la glicoproteína CD133. Está conformada por cinco dominios transmembranales. El extremo N-terminal es extracelular mientras que el extremo C-terminal se encuentra en el citoplasma (Modificado de: Barzegar Behrooz et al., 2019).

2.2 PinX1, un nuevo corregulador del ER α

En el Instituto Nacional de Cancerología, en el laboratorio a cargo de la Dra. Elizabeth Langley McCarron, se ha caracterizado a la proteína 1 de interacción con Pin2/TRF1 (PinX1), como un nuevo corregulador de los SHR en cáncer de próstata y de mama, el cual se ha visto involucrado en proliferación y migración celular. (Flores-Ramírez et al., 2021; Noriega-Reyes et al., 2015a) PinX1 se había caracterizado inicialmente como un inhibidor de la telomerasa por Zhou y Lu en 2001. La elongación telomérica es un evento común en una gran variedad de cánceres epiteliales y se relaciona con etapas avanzadas de progresión del cáncer y mal pronóstico. Los telómeros son estructuras que están compuestas por repeticiones en tándem de una secuencia TTAGGG. Cubren los extremos de los cromosomas, protegiéndolos del ataque exonucleolítico, la recombinación inapropiada y el mantenimiento de una longitud óptima de los telómeros, que es crucial para las células. La enzima denominada telomerasa se encuentra en el núcleo de los telómeros y está compuesta de proteínas y componente de RNA. La subunidad catalítica principal es la transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT); el componente de RNA de la telomerasa (TER), proporciona una plantilla de RNA para que TERT codifique la repetición del telómero. Después de la división celular, los telómeros eventualmente se acortan, los extremos de los cromosomas se pierden, las células detienen la división celular y se produce la senescencia replicativa. Sin embargo, la telomerasa se activa en el 90% de todos los cánceres

humanos y la subunidad catalítica TERT se reactiva, por lo tanto, las células cancerosas presentan inmortalidad replicativa (Johnson, 2011; Li et al., 2016; Shay and Bacchetti, 1997).

PinX1, una proteína identificada como un inhibidor de la telomerasa, y posible supresora de tumores, constantemente se ha encontrado desregulada en diversos tipos de cánceres como; próstata, mama, cervicouterino, ovario, gástrico, entre otros. Existe una desregulación de PinX1 que generalmente se encuentra en carcinomas, donde su expresión es reducida en comparación con tejido normal (Banik & Counter, 2004; Cai et al., 2010; Kondo et al., 2005; Zhou, 2011; Z. Zhou & Lu, 2001).

En células no cancerosas de mamífero, la vigilancia de la acción de la telomerasa es llevada a cabo por 3 proteínas de unión al DNA: Pin2/TRF1, TRF2 y POT1, así como sus proteínas asociadas. TRF2 y POT1 mantienen la integridad de los telómeros y Pin2/TRF1 mantiene los telómeros en la longitud adecuada, por lo que proteínas que interaccionan con Pin2/TRF1 tienen influencia sobre la longitud del telómero. PinX1 regula directamente la función de mantenimiento de Pin2/TRF1 a través de un mecanismo de retroalimentación negativo y por su interacción con TERT. Cuando la telomerasa extiende la región telomérica, ésta permite la unión de TRF1 que a su vez recluta PinX1, esta proteína inhibe la actividad de la telomerasa evitando la adición de más repeticiones al telómero. Pero cuando la región extendida es más corta, se unirá menos TRF1 que a su vez reclutará a menos PinX1 por lo que no habrá una inhibición de la adición de repeticiones, creando una secuencia telomérica más larga, de esta manera se mantiene una longitud adecuada de esta región. En células cancerosas, una expresión reducida de PinX1 evita la inhibición de la acción de la telomerasa ocasionando alargamiento de los telómeros y causando inestabilidad cromosómica (Fig. 22) (Zhou, 2011; Zhou y Lu, 2001).

PinX1 se encuentra ubicado en el cromosoma 8p23 y respecto a su estructura, se han descrito dos isoformas: una proteína de longitud completa (PinX1L) de 328 aminoácidos, cuyo peso molecular experimental es de 45 KDa, y una isoforma más corta (PinX1S) de 174 aminoácidos, con un peso molecular experimental de 37 kDa (Fig. 23). En su segmento carboxilo terminal, PinX1L contiene el dominio de inhibición a la telomerasa (TID), el cual contiene 74 aminoácidos y va de la posición 254 a 328, mientras que la isoforma PinX1S carece de este dominio.

Específicamente la región 254-289 es la que se une a Pin2/TRF1, esta interacción tiene un papel fundamental en la estabilización de los telómeros. La región 290-328 contiene una señal de localización nucleolar, y es aquella que se puede asociar con TERT para efectuar la inhibición de la actividad de telomerasa. Su segmento amino-terminal contiene un dominio rico en residuos de glicina (*G-patch*) que va de la posición 24 a 69, y está involucrado en el proceso de maduración de rRNA. De manera paralela el G-patch tiene una influencia negativa sobre la localización nucleolar de PinX1. Entre su segmento C- y N-terminal, se localiza un dominio central, el cual tiene cierto efecto mediando la localización nucleolar de TERT (Chen et al., 2011; Guglielmi y Werner, 2002; Li et al., 2016; Liao, 2002).

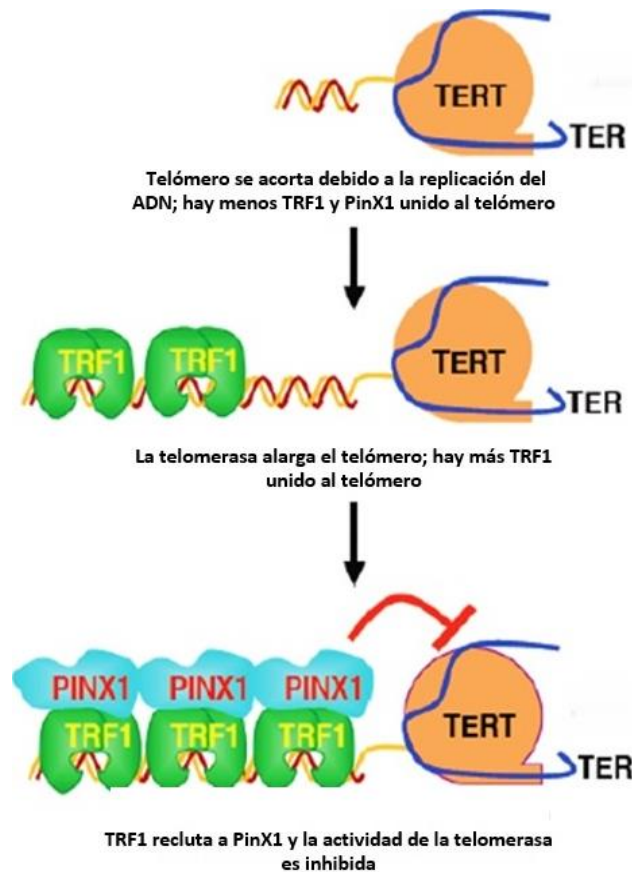


Figura 22. Mecanismo de PinX1 sobre la telomerasa. TERT, telomerasa transcriptasa inversa; TERC, RNA de la telomerasa; TRF1; proteína unida al ADN telomérico, PINX1; proteína 1 de interacción con TRF1 (Modificado de Zhou, 2011).

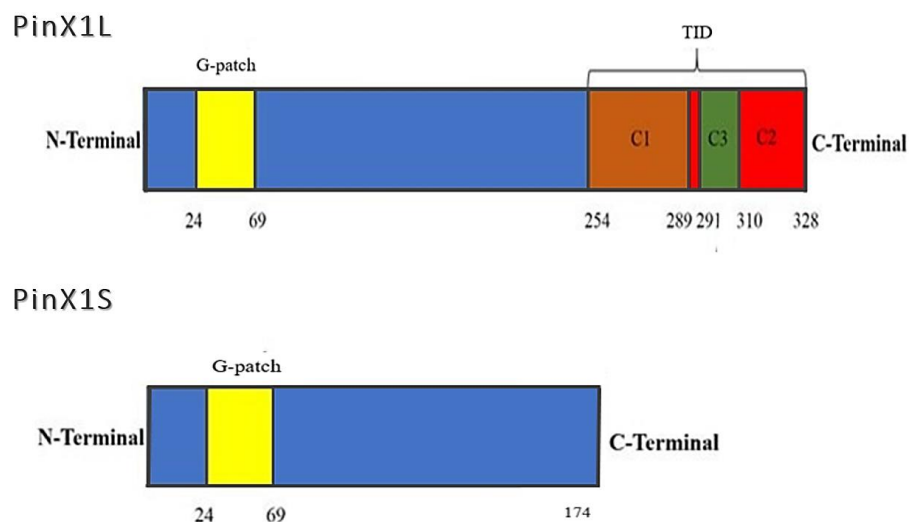


Figura 23. Principales dominios de la proteína PinX1S y PinX1L. El G-patch es un dominio rico en residuos de glicina, ubicado en la región N-terminal (24-69 a.a.). El TID es el dominio de inhibición a la telomerasa ubicado en la región C-terminal y está conformado por 74 aminoácidos (254-328 a.a.) y contiene 3 subdominios (C1, C2 y C3). La región C1 (254-289aa) se une específicamente a Pin2/TRF1, la región C2 (310-328aa) contiene una señal de localización al nucleolo y se puede asociar con TERT, la región C3 (291-310aa) es reconocida específicamente por ser la región hidrófoba (Modificado de Li et al., 2016).

PinX1 se ha involucrado en los procesos tumorigénicos en diversos tipos de cánceres. Específicamente, para el COE se ha demostrado que existe una expresión disminuida de la proteína PinX1. Dicha disminución está correlacionada con el desarrollo tumoral y como un factor de mal pronóstico. En un análisis de tejidos de tumores de ovario epiteliales se encontró un 100% de positividad para PinX1 en tejidos catalogados como normales, sin embargo el porcentaje de positividad para PinX1 disminuye para cistoadenomas benignos (84%), tumores limítrofes (75.9%) y para carcinomas de ovario invasivos (66.2%), demostrando una fuerte correlación entre la expresión reducida de PinX1 con pacientes que tienen mal pronóstico, caracterizado por metástasis a nódulo linfático, metástasis distante y etapa tardía según FIGO (Fig. 24 y Tabla 2) (Cai et al., 2010; Liu et al., 2013; Shi, et al., 2014; Zhou, et al., 2014; Wu et al., 2014).

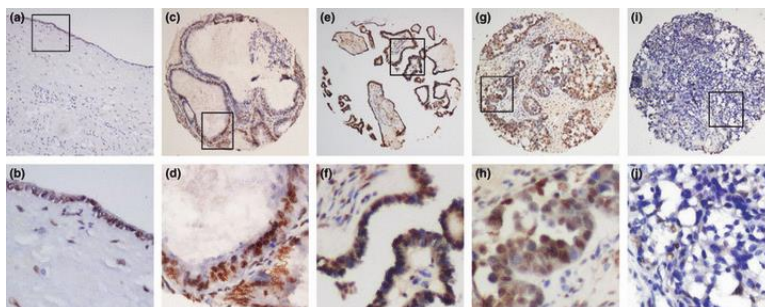


Figura 24. Inmunohistoquímica de PinX1 en microarreglos de tejidos tumorales de COE y tejido de ovario normal. a y b) Células epiteliales normales; c y d) cistoadenoma; e y f) tumor limítrofe; g y h) carcinoma invasivo; i y j) carcinoma de ovario. Recuadros superiores, aumento 100X. Recuadros inferiores, aumento 400X. Positividad de PinX1; color marrón (Cai et al., 2010).

Tabla 3. Expresión de PinX1 en tejido de ovario normal y tumores ováricos epiteliales (Modificado de: Cai et al., 2010).

	Proteína PinX1		
	Todos los casos	Expresión negativa (%)	Expresión positiva (%)
Ovarios normales	12	0 (0)	12 (100)
Cistoadenoma	25	4 (16)	21 (84)
Tumores limítrofes	29	7 (24.1)	22 (75.9)
Carcinoma invasivo	157	53 (33.8)	104 (66.2)

Se observa una disminución significativa de la frecuencia de expresión de PinX1 en cistoadenomas, tumores limítrofes y carcinomas invasivos ($p=0.029$) (Cai et al., 2010).

En nuestro laboratorio, se identificó que la proteína PinX1S interactúa de forma directa con el ER α en su dominio amino (N) terminal, en la región AF-1 (1 a 180 a.a.) y funge como un correpresor en células de cáncer de mama, MCF7 y MDA-MB-453, reprimiendo la actividad transcripcional de manera dependiente de E $_2$ y se observa que es reclutado a promotores de genes diana de ER α , como pS2, E2F, WISP2, y GREB1. Asimismo, la sobreexpresión de PinX1 en presencia de E $_2$, inhibe la expresión del RNAm de genes diana de ER α ; IGFBP2, CASP8, pS2 y PR. La sobreexpresión de PinX1 en la línea celular MCF7 inhibe la proliferación celular de manera dependiente de E $_2$, y el silenciamiento de PinX1 incrementa la proliferación celular, en presencia y ausencia de E $_2$. De igual manera, el silenciamiento de PinX1 incrementa significativamente la formación de colonias en la línea celular MCF7, lo que sugiere que PinX1 funge como un supresor de tumores en este tejido (Noriega-Reyes et al., 2015).

Por otra parte, se encontró que el dominio TID de PinX1L no está involucrado en la unión con ER α , por lo que al utilizar la isoforma corta se puede profundizar sobre el papel que ejerce PinX1 como corregulador y separar su función inhibidora de la telomerasa. Recientemente se reportó que PinX1S es capaz de interactuar de forma directa con el receptor de andrógenos (AR), específicamente en su dominio LBD en presencia de EtOH (etanol), DHT (dihidrotestosterona) o Flu (flutamida). A diferencia de su efecto sobre el ER α , funge como un coactivador de AR en células de cáncer de próstata, 22Rv1 y DU-145, promoviendo la actividad transcripcional de AR de manera dependiente de DHT y con menor significancia en ausencia de ligando. En la línea celular 22Rv1 la sobreexpresión de PinX1S o PinX1L incrementan la proliferación celular de manera dependiente de DHT y en menor significancia en ausencia de ligando, mientras que el silenciamiento de PinX1 disminuye la proliferación celular, en presencia de DHT. Asimismo, la sobreexpresión de PinX1S en la línea celular 22Rv1 y HPrEC (línea celular epitelial de próstata no cancerosa) promueve la formación de colonias, en ausencia y presencia de ligando, mientras que en la línea celular 22Rv1 aumenta significativamente la migración celular en presencia y ausencia de DHT. Estos datos mostrados en cáncer de mama y cáncer de próstata dan indicios de la importancia de estudiar a la proteína PinX1 en un contexto celular específico, en el cual sus funciones como coactivador o correpresor de la actividad transcripcional mediada por receptores de hormonas esteroides dependen del receptor sobre el cual actúa y del tejido analizado (Flores-Ramírez et al., 2021; Noriega-Reyes et al., 2015).

Estudios preliminares a este proyecto determinaron los efectos sobre la proliferación celular en líneas celulares de COE al sobreexpresar PinX1S. Se realizaron ensayos de proliferación celular en líneas celulares de COE que sobreexpresan establemente a PinX1S. En la línea celular TOV-112D la sobreexpresión de PinX1S, inhibe significativamente la proliferación celular, en presencia como en ausencia de E₂. La línea celular parece ser sensible a E₂, al observarse un incremento significativo en la proliferación celular en presencia de E₂, en comparación con el grupo control. Asimismo, en la línea celular SK-OV-3 se observa el mismo comportamiento que en la línea celular TOV-112D, al observarse una inhibición clara en la proliferación celular tras la sobreexpresión estable de PinX1S tanto en presencia como en ausencia de E₂ de la misma manera, parece ser sensible a E₂, al encontrarse un aumento significativo en la proliferación

celular en presencia de E₂. Esto sugiere que la sobreexpresión de PinX1S, independientemente de la presencia de ligando agonista, inhibe significativamente la proliferación celular en las líneas celulares de COE, TOV-112D y SK-OV-3, Figura 25. Por lo tanto, estos datos respaldan estudios anteriores que proponen a PinX1 como un supresor de tumores, al menos en células de cáncer de ovario (*Datos en proceso de publicación*).

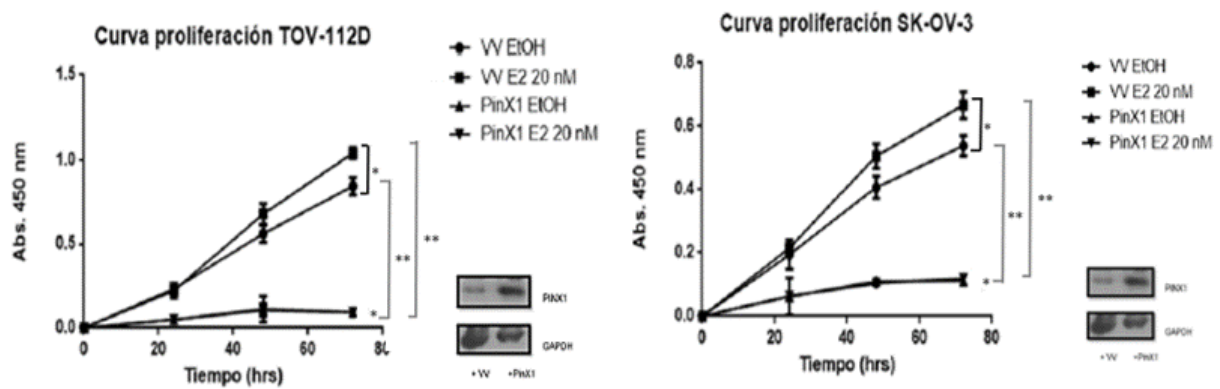


Figura 25. Curva de proliferación en la línea celular TOV-112D y SK-OV-3 a 72 horas, bajo tratamiento con etanol (EtOH) y estradiol (E₂) 20 nM. Para las dos líneas celulares (TOV-112D y SK-OV-3) se compararon grupos con la prueba paramétrica t-student; VV EtOH vs PVV E₂ 20n nM, PinX1S EtOH vs PinX1S E₂ 2n nM, VV EtOH vs PinX1S EtOH y VV E₂ vs PinX1S E₂ 20 nM. Graficas obtenidas con datos de 5 repeticiones en donde * p<0.01, ** p<0.005 (*Datos en proceso de publicación*).

De igual manera, el tratamiento de estas líneas celulares, que sobreexpresan a PinX1S, con el andrógeno DHT muestran el mismo comportamiento al inhibir drásticamente la proliferación celular. Esto es sorprendente, ya que se ha demostrado un papel de PinX1S como coactivador de AR en células de cáncer de próstata. Esto sugiere un papel de PinX1 sobre la proliferación celular que va más allá de su papel como corregulador de SHR.

3. Planteamiento del problema

El COE es un problema de salud pública por lo que es importante estudiar los factores que incrementan los riesgos de desarrollarlo y entender sus mecanismos. Uno de ellos tiene que ver con la actividad de los estrógenos y sus receptores nucleares y correguladores (activadores y represores). Entre estos últimos se encuentra PinX1, el cual tiene un papel dual en distintos tipos de cánceres regulados por hormonas esteroides. Uno de los problemas en el COE es que

se detecta en estadios tardíos, cuando la enfermedad está muy avanzada y las opciones terapéuticas son menos. Por ello se decidió estudiar el papel que tiene PinC1 sobre la proliferación del COE en un modelo de líneas celulares y la formación de ovario-esferas, como modelo tridimensional de estudio.

4. Justificación

Se ha observado que la disminución en la expresión de la proteína PinX1 está relacionada con la progresión del COE y con un mal pronóstico de las pacientes. Además, es un correpresor del ER α en células de cáncer de mama y un coactivador de AR en células de cáncer de próstata. Sin embargo, su sobreexpresión en células de cáncer de ovario inhibe la proliferación celular independientemente de cuál receptor hormonal sea activado. Por lo tanto, es de importancia esclarecer las funciones de PinX1 sobre la regulación de esta neoplasia al disminuir o incrementar su expresión y observar sus efectos en términos de proliferación celular y formación de ovario-esferas.

5. Pregunta de investigación

¿Qué efecto causa el silenciamiento de PinX1 sobre la proliferación celular y la formación de ovario-esferas?

6. Hipótesis

El silenciamiento de PinX1, un corregulador de receptores hormonales, promoverá la proliferación celular y se incrementará el número y tamaño de ovario-esferas.

7. Objetivos

7.1 Objetivo General

Determinar el efecto que ejerce PinX1 sobre la proliferación celular y formación de esferoides de células de COE.

7.2 Objetivos Particulares

1) Realizar un estudio *in silico* sobre la expresión de PinX1 en COE

- 2) Evaluar el efecto del silenciamiento de PinX1 sobre la proliferación celular de las líneas celulares de cáncer de ovario TOV-112D y SK-OV-3 en presencia o ausencia de E₂.
- 3) Evaluar las condiciones óptimas de formación de ovario-esferas, a través de los marcadores de superficie celular CD44 y CD133.
- 4) Determinar el efecto del silenciamiento o sobreexpresión de PinX1 en el número y tamaño de ovario-esferas formadas.

8. Material y métodos

8.1 Ensayo *in silico*

A partir de la base de datos Oncomine (www.oncomine.org) en donde hay registros de microarreglos se eligió la base de datos de Lu y Yoshihara para determinar la expresión relativa del RNAm de PinX1 en tejidos provenientes de distintos subtipos histológicos de COE (adenocarcinomas serosos, células claras, endometrioides y mucinosos) y comparar su expresión contra la expresión del tejido normal de ovario. Asimismo, se determinó si la expresión relativa del RNAm de PinX1 cambiaba conforme avanzan los estadios reportados por la FIGO en adenocarcinomas serosos, endometrioides y de manera general en el COE en comparación con el tejido normal de ovario. Por otro lado, de acuerdo con la plataforma de extracción de datos integrada del cáncer, UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/>) que contiene datos de muestras obtenidas de TCGA se determinó la expresión relativa del RNAm de PinX1, ER α y ER β conforme avanzan los estadios en el COE y la supervivencia de las pacientes cuando hay una alta o baja/media expresión de PinX1, ER α y ER β . Por último, se obtuvo una red de interacción de PinX1 con diversos genes, incluyendo a ER α a partir del servidor de predicción GeneMANIA (<https://genemania.org/>).

8.2 Cultivo celular

Se utilizaron las líneas celulares de COE: TOV-112D, SK-OV-3 y OVCAR-3, las cuales se cultivaron en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 5% y 100 U/mL penicilina y 100 mg/mL de estreptomina, CO₂ al 5%, en atmósfera humidificada a 37°C. Para todos los tratamientos hormonales, el medio de cultivo se reemplazó por medio libre de rojo fenol

suplementado con suero fetal bovino tratado con carbón activado/dextran (sFBS) para eliminar las hormonas del suero.

- TOV-112D: Tejido de ovario, morfología epitelial, grado 3; etapa IIC, carcinoma endometriode, propiedades de crecimiento adherentes con aplicación en cultivo 3D. (ATCC; <https://www.atcc.org/products/crl-11731>)
- SK-OV-3: Tejido de ovario (ascitis), morfología epitelial, adenocarcinoma, propiedades de crecimiento adherentes con aplicación en cultivo 3D. (ATCC; <https://www.atcc.org/products/crl-11731>)
- OVCAR-3: Tejido de ovario, morfología epitelial, adenocarcinoma, propiedades de crecimiento adherentes con aplicación en cultivo 3D. (ATCC; <https://www.atcc.org/products/crl-11731>)

8.3 Ensayos de proliferación celular con el silenciamiento de PinX1

Para el silenciamiento de PinX1, las líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3 fueron transfectadas con el reactivo lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del proveedor con 5µg de una mezcla de shRNA específico para PinX1 o control: shPinX1#1 (shPinX1 #084 + shPinX1 #817), 2) shPinX1#2 (shPinX1 #607 + shPinX1 #817) y, shPinX1#3(shPinX1 #817 + shPinX1 #771) (Sigma-Aldrich) o shE1 (control). Al día siguiente las células se recuperaron con tripsina 1X y se sembraron 1,000 células/mililitro de células transfectadas con el shRNA específico para PinX1 en placas de 96 pozos en medio libre de rojo fenol suplementado con 3% de sFB por 6 días. Los tratamientos se realizaron cada 24 horas con E₂ 20nM. Para los ensayos de proliferación celular se utilizó el ensayo XTT ,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilida. Las células se incubaron con 25 µl de 1 mg/ml de XTT (Thermo Fisher Scientific) y con 2.5 µl de PMS (N-Metil Dibenzopirazina Metil Sulfato) por cada mililitro de XTT durante 1.5 horas a 37°C. Finalmente, el ensayo se leyó a una absorbancia de 450 nm usando el lector de microplacas (Synergy H1, Biotek).

Secuencias de shRNA específico para PinX1:

- shPinX1 #817:
CCGGGCAAGGAGCCACAGATCATATCTCGAGATATGATCTGTGGCTCCTTGCTTTTTG.

Dirigido a PinX1S y PinX1L. Región codificante.

- shPinX1 #084:

CCGGGCTACTACTAGAAGAAACGCTACTCGAGTAGCGTTTCTTCTAGTGTAGCTTTTTTG.

Dirigido a PinX1S y PinX1L. Región codificante.

- shPinX1 #771:

CCGGCCTTCAGCAAGAGAGTTTAATCTCGAGATTAACTCTTGTGCTGAAGGTTTTTTG.

Dirigido a PinX1S y PinX1L. Región 3'UTR.

- shPinX1 #607:

CCGGCAGGTAAAGATGTGGAAAGTTCTCGAGAACTTCCACATCTTTACCTGTTTTTTG.

Dirigido a PinX1S y PinX1L. Región codificante.

8.4 Obtención de ovario-esferas

El ensayo se realizó a partir del cultivo celular en monocapa de las líneas celulares TOV-112D, SK-OV-3 y OVCAR-3 en confluencia no mayor al 80%. Las células se recuperaron con verseno (EDTA 200mg/L, PBS 1X). Para la estandarización inicial, se sembraron 10×10^3 , 15×10^3 , 20×10^3 , 30×10^3 , 40×10^3 o 50×10^3 células en placas Petri de 6 cm estériles tratadas con poli (metacrilato de 2-hidroxietilo) (Poly HEMA)- (Sigma Aldrich) (1% en etanol absoluto) durante toda la noche a 37°C en agitación constante, en medio DMEM libre de rojo fenol, suplementando con 10% de *serum replacement* (Thermo Fisher Scientific-108280) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/mL. Se documentó la obtención de ovario-esferas a los 3, 5 y 7 días de incubación.

8.5 Citometría de flujo

Se obtuvieron las ovario-esferas a partir de las líneas celulares TOV-112D, SK-OV-3 y OVCAR-3 a los 3, 5 y 7 días de incubación en las condiciones anteriormente descritas. Posteriormente se recolectaron en tubos de centrifuga de 15 ml y se les realizó un lavado con *flow buffer* (BSA 1% y EDTA 0.5 mM). Las muestras se centrifugaron a 2,500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, se les retiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 200 μ l de *flow buffer*. Se tomaron 100 μ l para la muestra control y 100 μ l para la tinción de superficie CD44 y CD133. Posteriormente se añadió 1 μ l de anticuerpo FITC-CD44 y 2.5 μ l de anticuerpo APC-CD133, las muestras se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. Finalmente, se les añadió 100 μ l de *flow buffer* y, se centrifugaron de nueva cuenta a 2,500 rpm por 5

minutos a 4°C, se eliminó el sobrenadante y se les añadió 400 µl de paraformaldehído al 4%. Las muestras se guardaron a 4°C hasta ser adquiridas en el citómetro de flujo FACS Aria con el software FACSDiva 6.5.

- Anticuerpo CD44 anti-Humano/Ratón acoplado al fluorocromo FITC (Tonbo biosciences)
- Anticuerpo CD133 anti-Humano acoplado al fluorocromo APC (EXBIO Antibodies)

8.6 Transfección estable de PinX1S

La línea celular TOV-112D fueron cultivadas 24 horas antes de la transfección en cajas de 6 pozos, en medio DMEM libre de rojo fenol, suplementado con 3% de sFBS. Una vez obtenido el 80% de confluencia celular se utilizó el reactivo TransIT-LT1 Transfection Reagent Mirus (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del proveedor y realizando la transfección para PinX1S o vector vacío (pcDNA). El constructo de plásmido de PinX1S tiene como base el plásmido pcDNA3.1/His/A, al cual se le insertó la secuencia de PinX1S y como vector vacío se utilizó pcDNA3.1/His/A, (Noriega-Reyes et al., 2015). Se transfectó 3µg de plásmido de PinX1S y pcDNA. La transfección se retiró a las 24 horas y se seleccionaron las células con expresión estable de PinX1S y pcDNA con el antibiótico G418 a una concentración de 2 mg/mL durante 1 mes.

8.7 Western Blot

Se utilizaron 40 µg de proteína total las cuales se separaron por electroforesis en gel desnaturizante de poliacrilamida SDS-PAGE a 75V en el gel concentrador (5%) y 100V en el gel separador (12%). Las proteínas se transfirieron a membranas de difluoruro de polivinilideno (PVDF) durante 1h, 15 min a 75V en una cámara húmeda, en frío. Las membranas se incubaron en solución de bloqueo (leche en polvo semidescremada al 5% en *buffer* de lavado TBS-Tween 0.1%) durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación suave. Las membranas se incubaron con anticuerpos primarios a una dilución 1:5,000 en *buffer* de lavado TBS-Tween 0.1% durante toda la noche a 4°C. Transcurrido el tiempo, las membranas se lavaron con *buffer* de lavado TBS-Tween 0.1% tres veces durante 5 min con agitación y posteriormente se incubaron con anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante (HRP) a una dilución 1:10,000 durante 1 h a temperatura ambiente, en agitación constante. Se realizaron tres lavados de 5

minutos cada uno. Las proteínas se identificaron mediante quimioluminiscencia con los sustratos de la peroxidasa y se revelaron por autorradiografía en placas de quimioluminiscencia de alto rendimiento. Para normalizar las diferencias en la proteína cargada, se utilizó la proteína GAPDH como control de carga. Las membranas se incubaron en solución *mild-stripping* (15g glicina, 1g SDS, 10mL Tween 20, c.b.p de H₂O para 1L, pH: 2.2) durante 5 minutos a temperatura ambiente, se lavaron con TBS-Tween 0.1%, se incubaron en solución de bloqueo durante 1h a temperatura ambiente y se les añadió anticuerpo primario anti-GAPDH a una dilución 1: 5 000 en solución de lavado durante toda la noche a 4°C. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa de rábano picante a una dilución 1:10 000 durante 1 h a temperatura ambiente y en agitación constante. Las proteínas se identificaron nuevamente por quimioluminiscencia y se revelarán de acuerdo con lo descrito anteriormente.

- Anticuerpo PinX1 (D-3): sc-37411 α -mouse monoclonal (Santa Cruz Biotechnology)
- Anticuerpo GAPDH (L-18): sc-48167 α -goat policlonal (Santa Cruz Biotechnology)

8.8 Número y tamaño de ovario-esferas

Las líneas celulares TOV-112D y OVCAR-3 fueron utilizadas para ver el efecto del silenciamiento o sobreexpresión de PinX1 sobre el número y tamaño de ovario-esferas. Para el silenciamiento de PinX1, TOV-112D fueron transfectadas con el reactivo lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del proveedor con el plásmido shPinX1 #2 y shE1. Mientras que, para la sobreexpresión de PinX1S se utilizaron las células con la transfección estable. Las células transfectadas se recuperaron con verseno (EDTA 200mg/L, PBS 1X) y se sembraron 10,000 células en placas Petri de 6 cm estériles tratadas con Poly HEMA (Sigma Aldrich). Para la sobreexpresión de PinX1S de la línea celular OVCAR-3 se sembraron 500,000 células en placas de 6 pozos, una vez obtenido el 80% de confluencia celular se transfectaron con 3 μ g de PinX1S o vector vacío (pcDNA) con el reactivo lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific) según las instrucciones del proveedor. Transcurridas 24 horas se retiró la transfección y las células se recuperaron con verseno y se sembraron 50,000 células en placas Petri de 6mm estériles tratadas con Poly HEMA.

Las ovario-esferas estuvieron bajo tratamiento hormonal de E₂ 20 nM en medio DMEM libre de rojo fenol, suplementado con 10% de *serum replacement* (Thermo Fisher Scientific-108280) y factor de crecimiento epidérmico (EGF) 10 ng/mL. Las ovario-esferas obtenidas de la línea celular TOV-112D se recolectaron al quinto día y las obtenidas de la línea celular OVCAR-3 se recolectaron al tercer día. Posteriormente se documentó el tamaño de las ovario-esferas con la cámara ZEISS Axiocam 305 color acoplada al microscopio Carl Zeiss™ Microscopio invertido Axio Vert.A1 y las imágenes se analizaron con el programa Zeiss Zen Versión 3.4.91.00000. Mientras que, el número de ovario-esferas se documentó con el microdissector PALM Combi System y las imágenes se analizaron con el programa de procesamiento de imagen digital Image J.

9. Análisis Estadístico

Cada ensayo se realizó por triplicado y las diferencias significativas se definieron con una $p < 0.05$.

Para los análisis de densitometría de PinX1 por Western Blot en las líneas celulares TOV-112D, SK-OV-3 y OVCAR-3 se realizó un análisis ANOVA unidireccional y Tukey Kramer post hoc para determinar líneas celulares con diferencia significativa.

Para los ensayos de proliferación celular se ocupó una prueba ANOVA de dos vías y Tukey Kramer post hoc para determinar diferencias significativas entre los grupos tratados con EtOH y E₂ 20nM.

Para la evaluación de las condiciones óptimas de enriquecimiento de los marcadores de superficie celular CD44 y CD133 de las ovario-esferas se utilizó una prueba t-student para observar la diferencia significativa entre el control y las ovario-esferas formadas.

Para los ensayos de número y tamaño de ovario-esferas formadas se ocupó una prueba ANOVA de dos vías y Tukey Kramer post hoc para determinar diferencias significativas entre los diferentes grupos.

10. Resultados

10.1 Ensayo *in silico*

Para poder identificar genes candidatos para nuevos marcadores en COE, Lu y colaboradores en el 2004 utilizaron microarreglos de 42 muestras de ovario congeladas instantáneamente obtenidas de diferentes subtipos histológicos (serosos, endometrioides, células claras y mucinosos) según los criterios estándar de la FIGO y las cuales fueron proporcionadas por la Universidad de Duke (Durham, NC) y la Clínica Mayo (Rochester, MN), a partir de esto, observamos que existe una aparente sobreexpresión del RNAm de PinX1 en varios subtipos histológicos en comparación con tejido normal. A través de un metaanálisis *in silico* a partir de la plataforma Oncomine (www.oncomine.org) se determinó que existe un incremento en la expresión del RNAm de PinX1 en muestras obtenidas de adenocarcinoma de células claras de ovario (Fig. 26), de adenocarcinomas serosos (Fig. 27), pero no en adenocarcinomas endometrioides (Fig.28) ni en adenocarcinomas mucinosos (Fig. 29). Además, se registra una aparente disminución en la expresión de RNAm de PinX1 conforme avanza el estadio en adenocarcinomas serosos, pero no en endometrioides (Fig. 30 y 31) (Lu et al., 2004; Oncomine Login, s. f.).

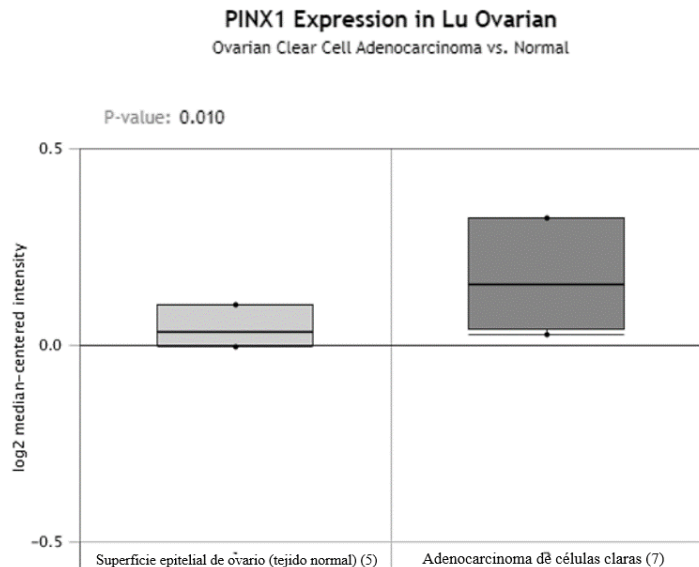


Figura 26. Expresión del RNAm de PinX1 en adenocarcinoma de células claras. Se observa la expresión de PinX1 en muestras de tejidos normales obtenidas usando un citocepillo de cinco pacientes y muestras de siete tejidos de

adenocarcinoma de células claras. Se registra una mediana de 0.032 para el grupo 1 y una mediana de 0.154 para el grupo 2, $p=0.010$ (Modificado de: Oncomine).

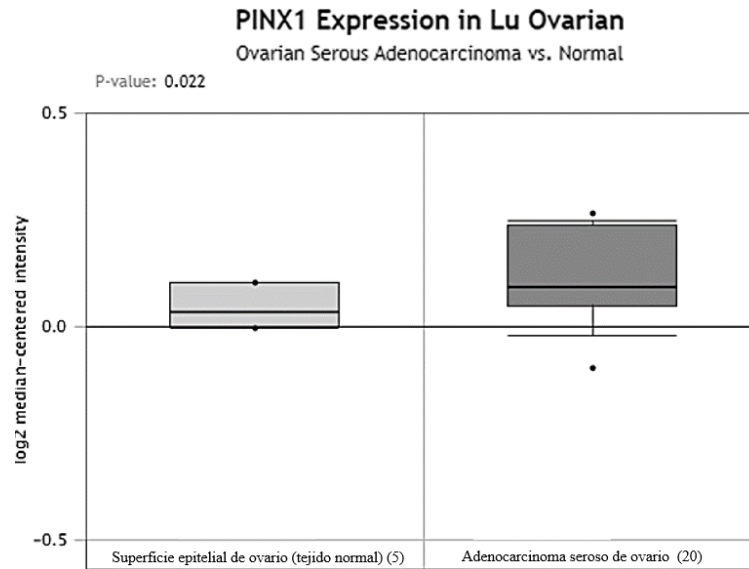


Figura 27. Expresión del RNAm de PinX1 en adenocarcinomas serosos. Se observa la expresión de PinX1 en muestras de tejidos normales obtenidas usando un citocepillo de cinco pacientes y muestras de tejidos de adenocarcinomas serosos de veinte pacientes. Se registra una mediana de 0.032 para el grupo 1 y una mediana de 0.091 para el grupo 2, $p=0.022$ (Modificado de: Oncomine).

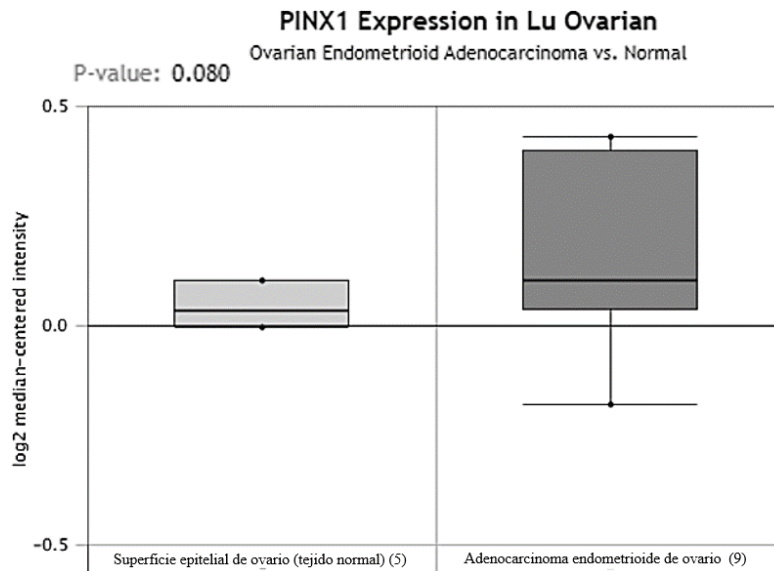


Figura 28. Expresión del RNAm de PinX1 en adenocarcinomas endometrioides. Se observa la expresión de PinX1 en muestras de tejidos normales obtenidas usando un citocepillo de cinco pacientes y muestras de tejidos de adenocarcinomas endometrioides de nueve pacientes. Se registra una mediana de 0.032 para el grupo 1 y una mediana de 0.036 para el grupo 2, $p=0.080$ (Modificado de: Oncomine).

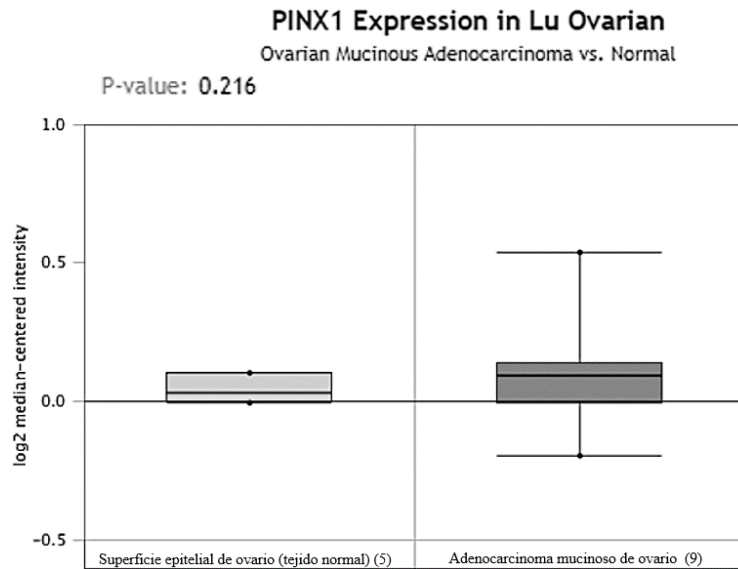


Figura 29. Expresión del RNAm de PinX1 en adenocarcinomas mucinosos. Se observa la expresión de PinX1 en muestras de tejidos normales obtenidas usando un citocepillo de cinco pacientes y muestras de tejidos de adenocarcinomas mucinosos de nueve pacientes. Se registra una mediana de 0.032 para el grupo 1 y una mediana de 0.093 para el grupo 2, $p=0.216$ (Modificado de: Oncomine).

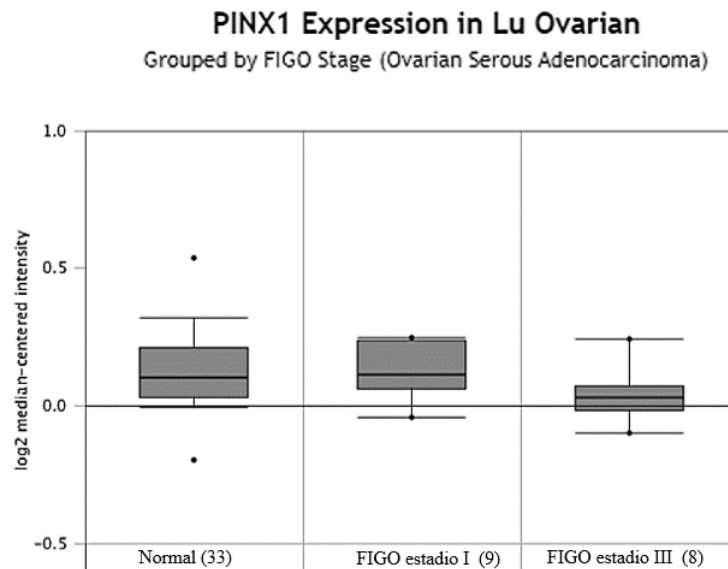


Figura 30. Expresión del RNAm de PinX1 en diferentes estadios en adenocarcinomas serosos. Se observa la expresión de PinX1 en muestras de tejidos normales obtenidas usando un citocepillo de 33 pacientes (normal), muestras de tejidos de adenocarcinoma de ovario seroso en estadio I de 9 pacientes (FIGO estadio I) y en estadio III de 8 pacientes (FIGO estadio III). Se registra una mediana de 0.101 para el grupo 0, 0.111 para el grupo 1 y 0.028 para el grupo 2 (Modificado de: Oncomine).

PINX1 Expression in Lu Ovarian Grouped by FIGO Stage (Ovarian Endometrioid Adenocarcinoma)

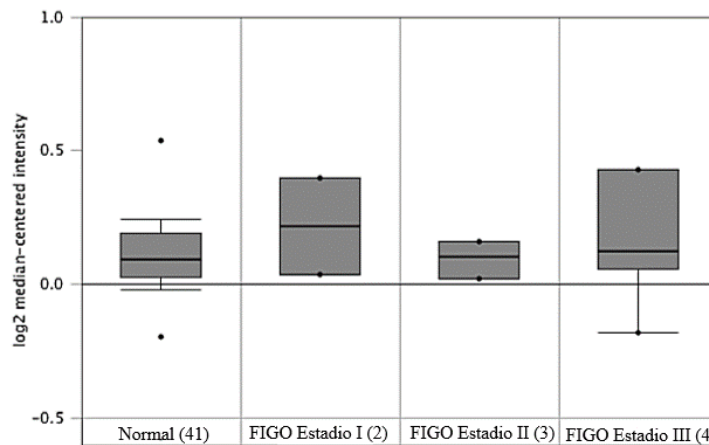


Figura 31. Expresión del RNAm de PinX1 en diferentes estadios en adenocarcinomas endometrioides. Se observa la expresión de PinX1 en muestras de tejidos normales obtenidas usando un citocepillo de 41 pacientes normal (0), muestras de tejidos de adenocarcinoma de ovario seroso en estadio I de 2 pacientes (1), en estadio II de 3 pacientes (2) y en estadio III de 4 pacientes (3). Se registra una mediana de 0.093 para el grupo 0, 0.210 para el grupo 1, 0.102 para el grupo 1 y 0.124 para el grupo 3 (Modificado de: Oncomine).

Los datos registrados por Lu y colaboradores en el 2004 no son concluyentes, ya que en el 2009 Yoshihara y colaboradores llevaron a cabo un análisis para poder dilucidar los mecanismos que participan en la progresión rápida del cáncer de ovario de tipo seroso, en donde diagnosticaron los perfiles de expresión génica de 43 tejidos de COE que comprendían ocho tejidos en estadio temprano y 35 en estadio avanzado utilizando microarreglos de oligonucleótidos de 18,716 genes. De acuerdo con la plataforma Oncomine, Yoshihara y colaboradores reportaron una tendencia a disminución en los niveles de PinX1 a nivel de RNAm en tejidos de adenocarcinoma seroso de ovario en comparación con tejido normal (Fig. 32), además de una disminución del RNAm conforme avanza el estadio (Fig. 33) (Oncomine Login, s. f.; Yoshihara et al., 2009).

PINX1 Expression in Yoshihara Ovarian

Ovarian Serous Adenocarcinoma vs. Normal

P-value: 0.996

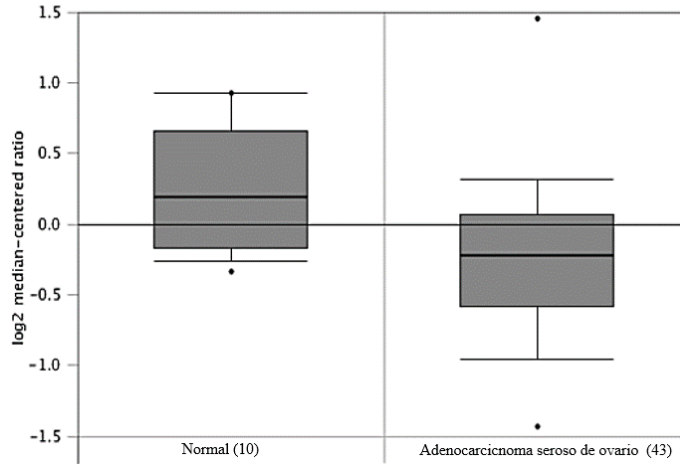


Figura 32. Expresión del RNAm de PinX1 en adenocarcinomas serosos. Se observa la expresión de PinX1 en muestras de tejidos normales obtenidos del peritoneo de 10 pacientes (1) y muestras de tejidos de adenocarcinoma de ovario seroso de 43 pacientes (2). Se registra una mediana de 0.19 para el grupo 1 y una mediana de -0.218 para el grupo 2, $p=0.996$ (Modificado de: Oncomine).

PINX1 Expression in Yoshihara Ovarian

Grouped by Stage

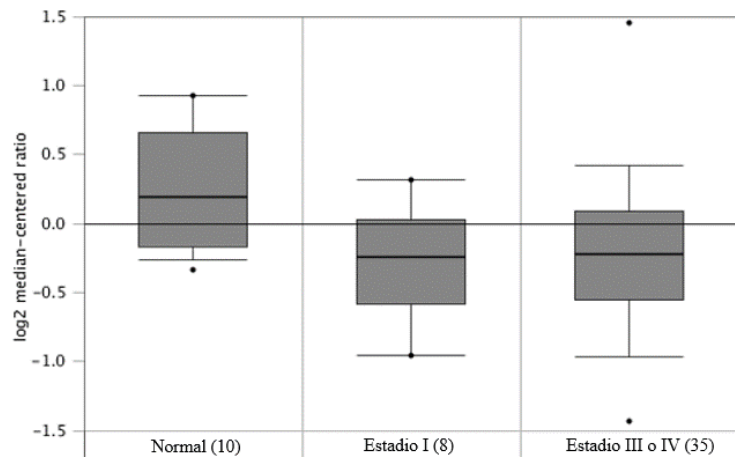


Figura 33. Expresión del RNAm de PinX1 en diferentes estadios. Se observa la expresión de PinX1 en muestras de tejidos normales obtenidos del peritoneo de 10 pacientes, muestras de tejidos de adenocarcinoma de ovario seroso en estadio I de 8 pacientes y en estadio III o IV de 35 pacientes. Se registra una mediana de 0.19 para el grupo 0, -0.239 para el grupo 1 y -0.218 para el grupo 2 (Modificado de: Oncomine).

De acuerdo con la plataforma de extracción de datos integrada para facilitar el análisis integral del transcriptoma del cáncer, UALCAN se reporta que la expresión del RNAm de PinX1 tiende a disminuir conforme avanzan los estadios en cistadenocarcinoma seroso de ovario (Fig. 34).

Mientras que no se registran cambios significativos en la expresión del RNAm del ER α (ESR1) conforme avanzan los estadios (Fig. 35), sin embargo, la expresión del RNAm de ER β (ESR2) disminuye significativamente del estadio II al estadio III y del estadio II al estadio IV (Fig. 36), (UALCAN).

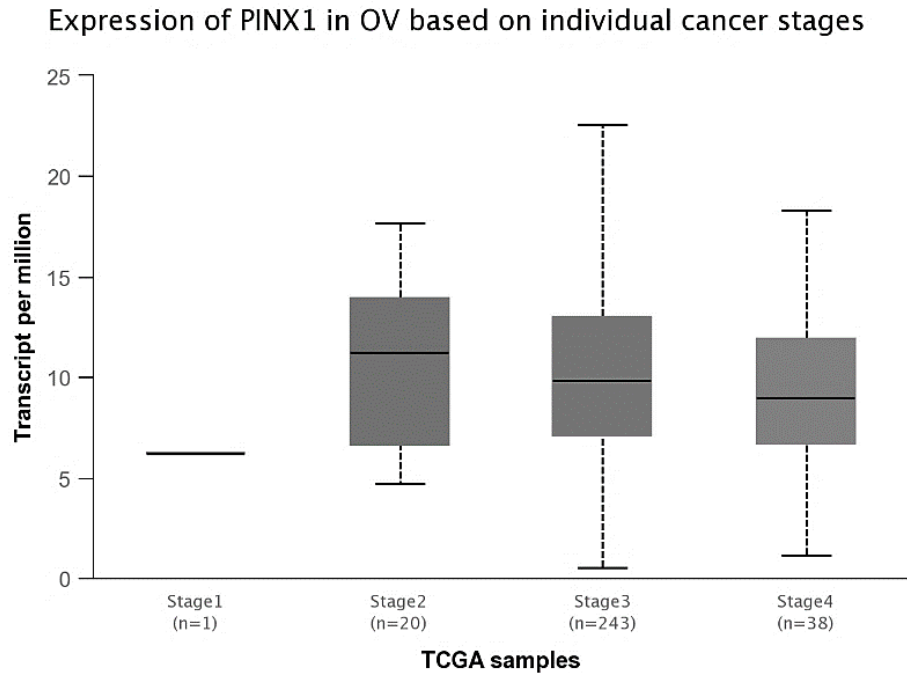


Figura 34. Expresión del RNAm de PinX1 en cistadenocarcinoma seroso en diferentes estadios de cáncer de ovario. De acuerdo con las muestras reportadas en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) se observa la expresión de PinX1 en muestras de estadio I (n=1), estadio II (n=20), estadio III (n=243) y estadio 4 (n=38). Para el estadio I se registra una mediana de 6.245, para el estadio II de 11.286, para el estadio III de 9.892 y para el estadio IV de 9.03. Estadío I vs Estadío II (estadística no aplicable), Estadío I vs Estadío II (estadística no aplicable), Estadío I vs Estadío IV (estadística no aplicable), Estadío II vs Estadío III (p=0.917), Estadío II vs Estadío IV (p=0.429) y Estadío III vs Estadío IV (P=0.286), (UALCAN).

Expression of ESR1 in OV based on individual cancer stages

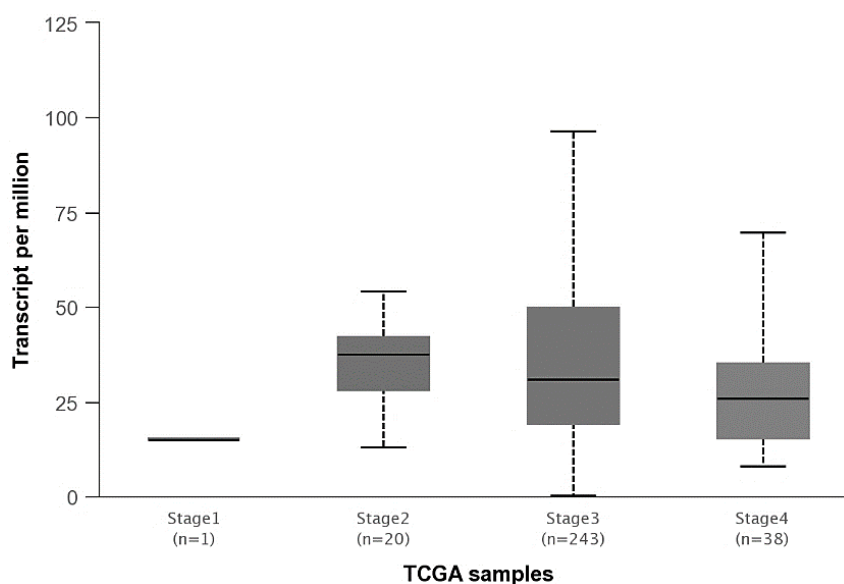


Figura 35. Expresión del RNAm de ER α en cistadenocarcinoma seroso en diferentes estadios de cáncer de ovario. De acuerdo con las muestras reportadas en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) se observa la expresión de ER α en muestras de estadio I (n=1), estadio II (n=20), estadio III (n=243) y estadio 4 (n=38). Para el estadio I se registra una mediana de 15.238, para el estadio II de 37.507, para el estadio III de 31.141 y para el estadio IV de 25.948. Estadío I vs Estadío II (estadística no aplicable), Estadío I vs Estadío III (estadística no aplicable), Estadío I vs Estadío IV (estadística no aplicable), Estadío II vs Estadío III (p=0.528), Estadío II vs Estadío IV (p=0.856) y Estadío III vs Estadío IV (P=0.582), (UALCAN).

Expression of ESR2 in OV based on individual cancer stages

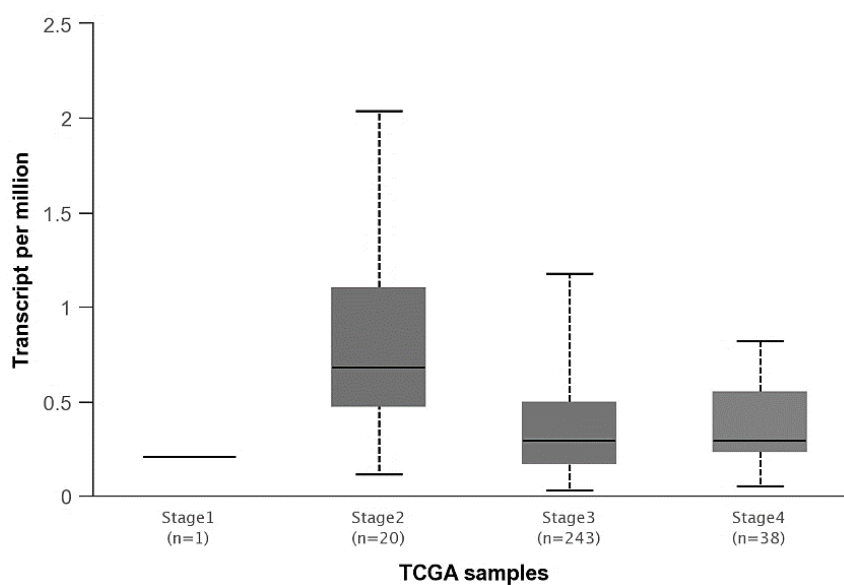


Figura 36. Expresión del RNAm de ER β en cistadenocarcinoma seroso en diferentes estadios de cáncer de ovario. De acuerdo con las muestras reportadas en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) se observa la expresión de

PinX1 en muestras de estadio I (n=1), estadio II (n=20), estadio III (n=243) y estadio 4 (n=38). Para el estadio I se registra una mediana de 0.207, para el estadio II de 0.681, para el estadio III de 0.293 y para el estadio IV de 0.297. Estadío I vs Estadío II (estadística no aplicable), Estadío I vs Estadío II (estadística no aplicable), Estadío I vs Estadío IV (estadística no aplicable), Estadío II vs Estadío III (p=0.006), Estadío II vs Estadío IV (p=0.03) y Estadío III vs Estadío IV (P=0.932). (Ualcan.path.uab.edu/home, s. f.)

Asimismo, se buscó la coexpresión entre PinX1 y el ER α y ER β , sin embargo, no se encontró en la base de datos dicha relación.

Por otro lado, a partir de la misma plataforma (UALCAN) se reporta la supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario a nivel de expresión de PinX1, mostrándose que la alta expresión de PinX1 promueve una mayor sobrevida de las pacientes en aproximadamente los primeros 1000 días, sin embargo, posterior a ese tiempo se reporta una menor sobrevida en comparación con las pacientes que presentan una baja expresión de PinX1. Estos datos no son concluyentes ya que no hay diferencia significativa, Fig. 37, (UALCAN). Para todas la graficas de Kaplan-Meier se tomó en cuenta los datos de supervivencia de pacientes de TCGA, considerando como “día de último seguimiento” si la paciente estaba viva y “día de muerte” si la persona había fallecido. Las muestras de tumores primarios se dividieron en un grupo de “expresión alta” (muestras con valores de expresión génica iguales o superiores al valor del tercer cuartil) y un grupo de “expresión baja” (muestras con valores de expresión génica inferiores al valor del tercer cuartil).

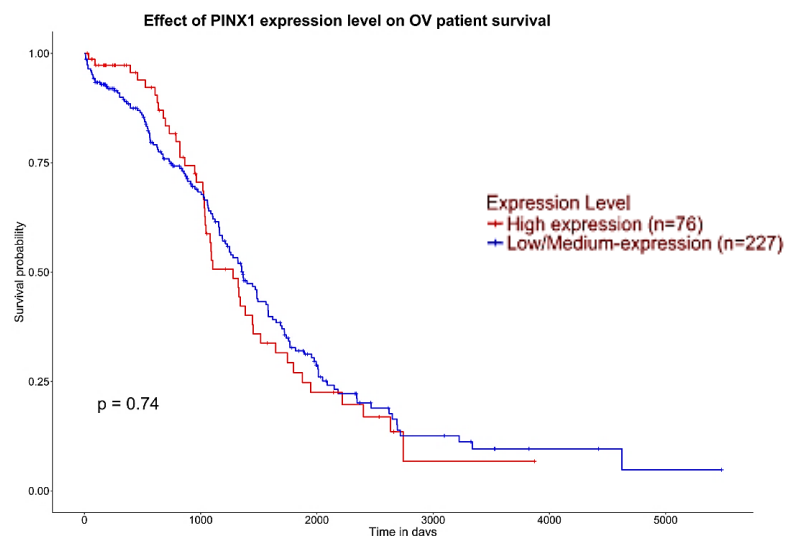


Figura 37. Supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario a nivel de expresión de PinX1. De acuerdo con las muestras reportadas en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) se registra una alta expresión de PinX1 en 76 pacientes (línea roja) y una baja expresión de PinX1 en 227 pacientes (línea azul). Se observa que la alta expresión

de PinX1 inicialmente promueve una mayor supervivencia de las pacientes en comparación con la baja expresión de PinX1, sin embargo, posterior a 1000 días, se observa un efecto inverso. $P=0.74$, (UALCAN).

Además, se reporta la supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario a nivel de expresión de ER α (ESR1), mostrándose que la baja expresión promueve una mayor supervivencia de las pacientes en comparación con aquellas que presentan una alta expresión de ER α . (Fig. 38), (UALCAN).

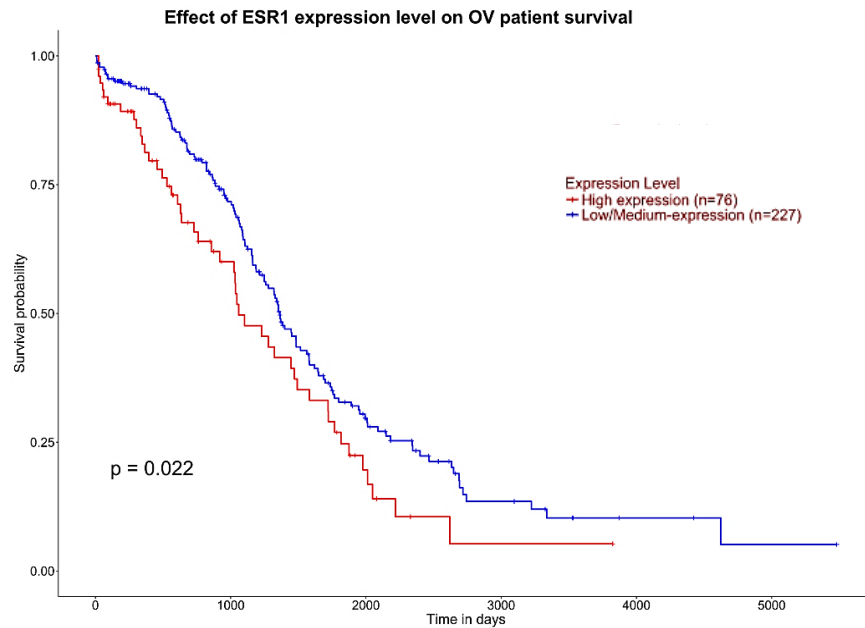


Figura 38. Supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario a nivel de expresión de ER α . De acuerdo con las muestras reportadas en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) se registra una alta expresión de ER α en 76 pacientes (línea roja) y una baja expresión de ER α en 227 pacientes (línea azul). Se observa que la baja expresión de ER α promueve una mayor supervivencia de las pacientes en comparación con la alta expresión de ER α . $P=0.022$, (UALCAN).

La supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario a nivel de expresión de ER β (ESR2), sugiere que la alta expresión de ER β promueve una mayor supervivencia de las pacientes en comparación con aquellas que presentan una baja expresión de ER β , aunque no es significativo ($p=0.07$), (Fig. 39), (UALCAN)

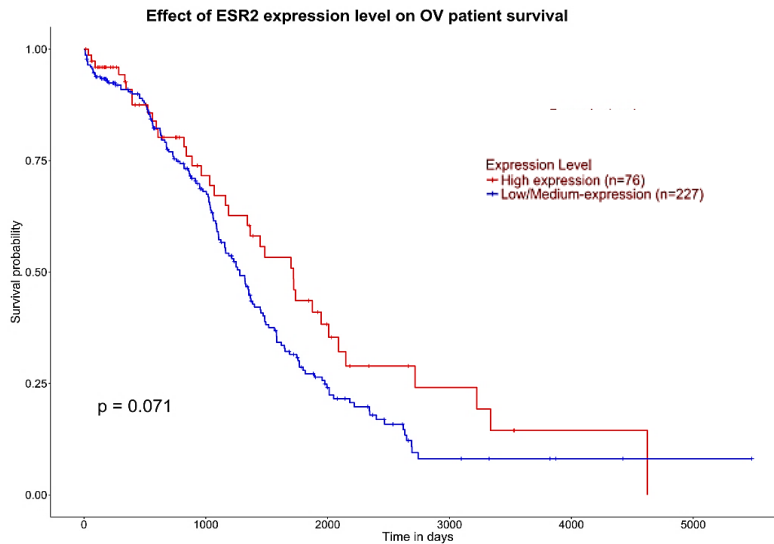


Figura 39. Supervivencia de las pacientes con cáncer de ovario a nivel de expresión de ER β . De acuerdo con las muestras reportadas en el Atlas del Genoma del Cáncer (TCGA) se registra una alta expresión de ER β en 76 pacientes (línea roja) y una baja expresión de ER β en 227 pacientes (línea azul). Se observa que la baja expresión de ER β promueve una menor supervivencia de las pacientes en comparación con la alta expresión de ER β . P=0.071, (UALCAN).

A partir del servidor de predicción GeneMANIA se muestra un diseño lineal detallada de la red de interacciones entre diversos genes, en donde se resalta la interacción entre PinX1 y ER α y las funciones de los genes asociados (Fig. 40), (GeneMANIA).

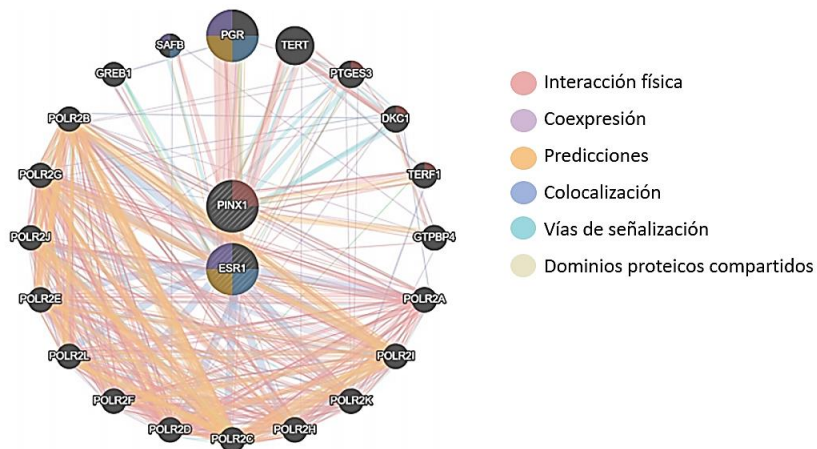


Figura 40. Red de interacción de PinX1 con diversos genes. De acuerdo con los registrado en Gene MANIA se observa una interacción directa de PinX1 con ER α (ESR1). Receptor de estrógeno 1 (ER α), PGR; Receptor de progesterona, TERT; telomerasa transcriptasa inversa, PTGES3; Prostaglandina E sintasa 3, DKC1; disquerina pseudouridina sintasa 1, TERF1; Factor de unión de interacción telomérica 1, GTPBP4; proteína de unión a GTP 4, POLR; RNAs polimerasa II y GREB1; proteína de unión al receptor de estrógeno que regula el crecimiento 1. (GeneMANIA)

10.2 Presencia de PinX1 en las líneas celulares de COE

De acuerdo con lo reportado se ha descrito que PinX1 tiene una expresión variable en diversos tipos de cánceres y dicha expresión depende del estadio. Dada la información reportada, es importante determinar la presencia y cantidad de esta proteína en las líneas celulares TOV-112D, SK-OV-3 y OVCAR-3. A partir de ensayos de Western blot se determinó que las tres líneas celulares presentan a la proteína PinX1S y PinX1L, sin embargo, la línea celular TOV-112D tienen una menor presencia de ambas isoformas de PinX1, mientras que la línea celular SK-OV-3 tiene una mayor presencia de estas, (Figura 41).

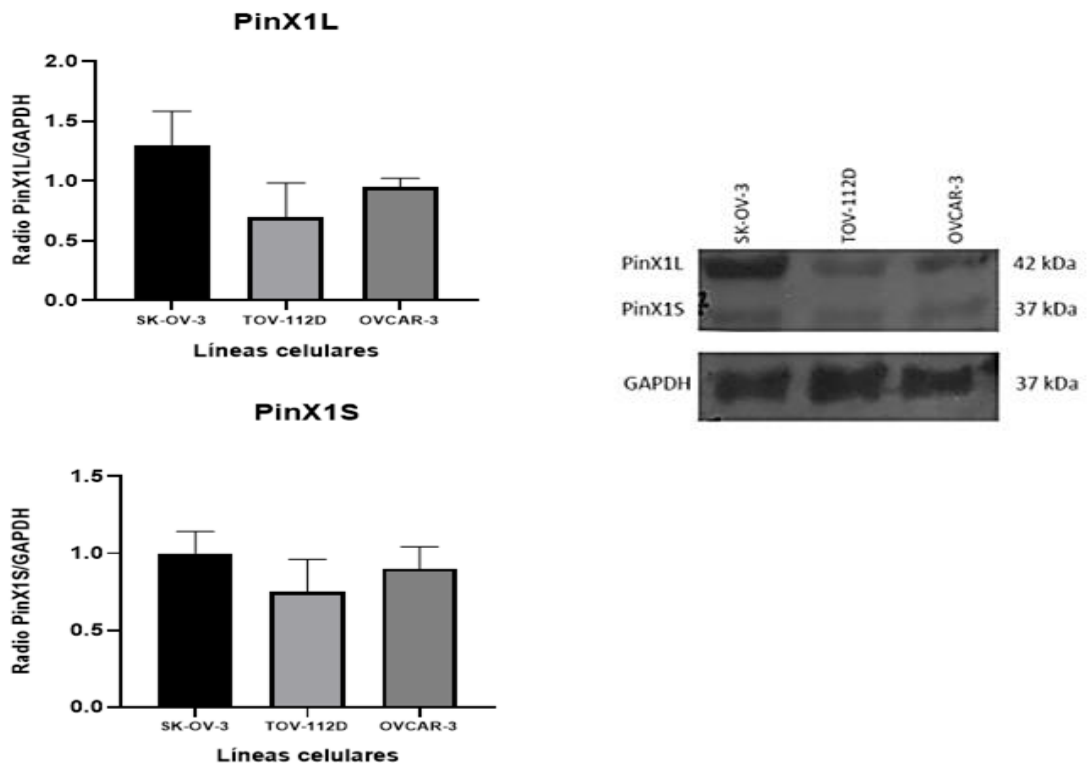


Figura 41. Análisis por densitometría de la presencia de la proteína PinX1 por Western Blot en la línea celular TOV-112D, SK-OV-3 y OVCAR-3. Se muestra una gráfica representativa, así como un blot de la expresión de la presencia de la proteína PinX1. Se utilizó una prueba ANOVA unidireccional y post hoc Tukey Kramer, sin diferencias significativas.

10.3 Estandarización del silenciamiento de la proteína PinX1 en las líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3

Las líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3 se transfectoron con plásmidos específicos para silenciar a PinX1 (shPinX1#084, shPinX1#607, shPinX1#817 y shPinX1#771), una vez que se

comprobó el funcionamiento de todos los plásmidos se utilizaron las siguientes mezclas para ver su eficiencia de silenciamiento:

shPinX1#1: shPinX1#084 + shPinX1#817

shPinX1#2: shPinX1#607 + shPinX1#817

shPinX1#3: shPinX1#817 + shPinX1#771

Para la línea celular TOV-112D se determinó utilizar la mezcla para el silenciamiento de PinX1 #2 y #3 (Figura 42). Mientras que para la línea celular SK-OV-3 se determinó utilizar la mezcla #1 y #2 (Figura 43), al observarse una mayor disminución en la presencia de la proteína.

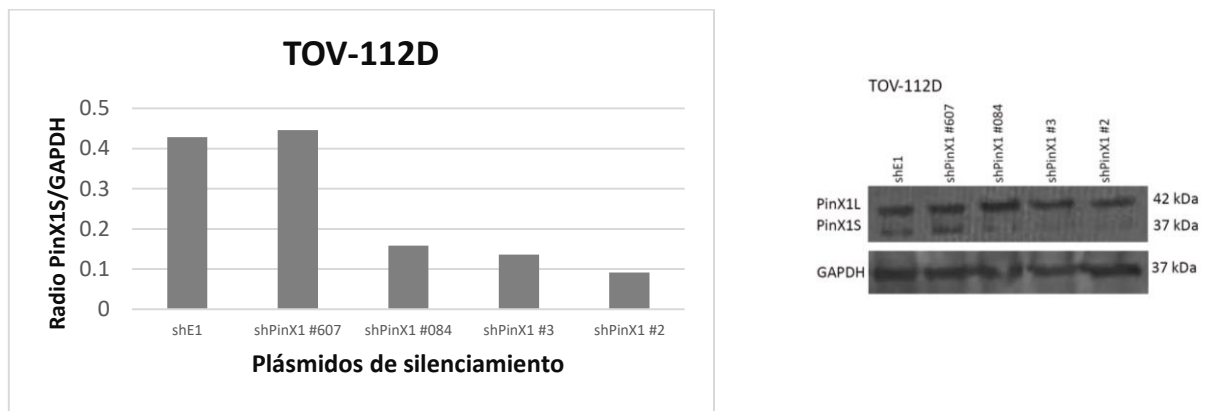


Figura 42. Análisis por densitometría de la presencia de la proteína PinX1 por Western Blot en la línea celular TOV-112D. Se muestra una gráfica representativa, así como un blot de la expresión de la proteína PinX1 al transfectar las células con plásmidos específicos para el silenciamiento de PinX1.

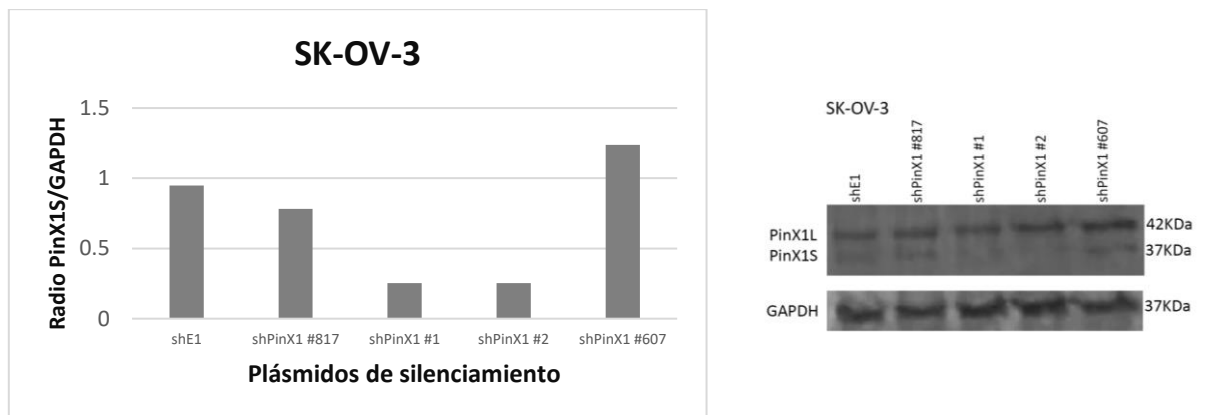


Figura 43. Análisis por densitometría de la presencia de la proteína PinX1 por Western Blot en la línea celular SK-OV-3. Se muestra una gráfica representativa, así como un blot de la expresión de la proteína PinX1 al transfectar las células con plásmidos específicos para el silenciamiento de PinX1.

Una vez que se determinó cuáles son los plásmidos de silenciamiento más eficientes para cada línea celular, se corroboró su eficiencia de cada uno para ver si el silenciamiento era reproducible y utilizar los plásmidos para los ensayos de proliferación celular y formación de ovario-esferas. Se demostró que en ambas líneas celulares se logró exitosamente el silenciamiento parcial de PinX1, sin embargo, la eficiencia de silenciamiento fue mayor para la línea celular TOV-112D en comparación con la línea celular SK-OV-3. Asimismo, la mezcla de shPinX1 #2 muestra una mayor eficiencia al observarse un mayor silenciamiento en ambas líneas celulares, (Fig. 44).

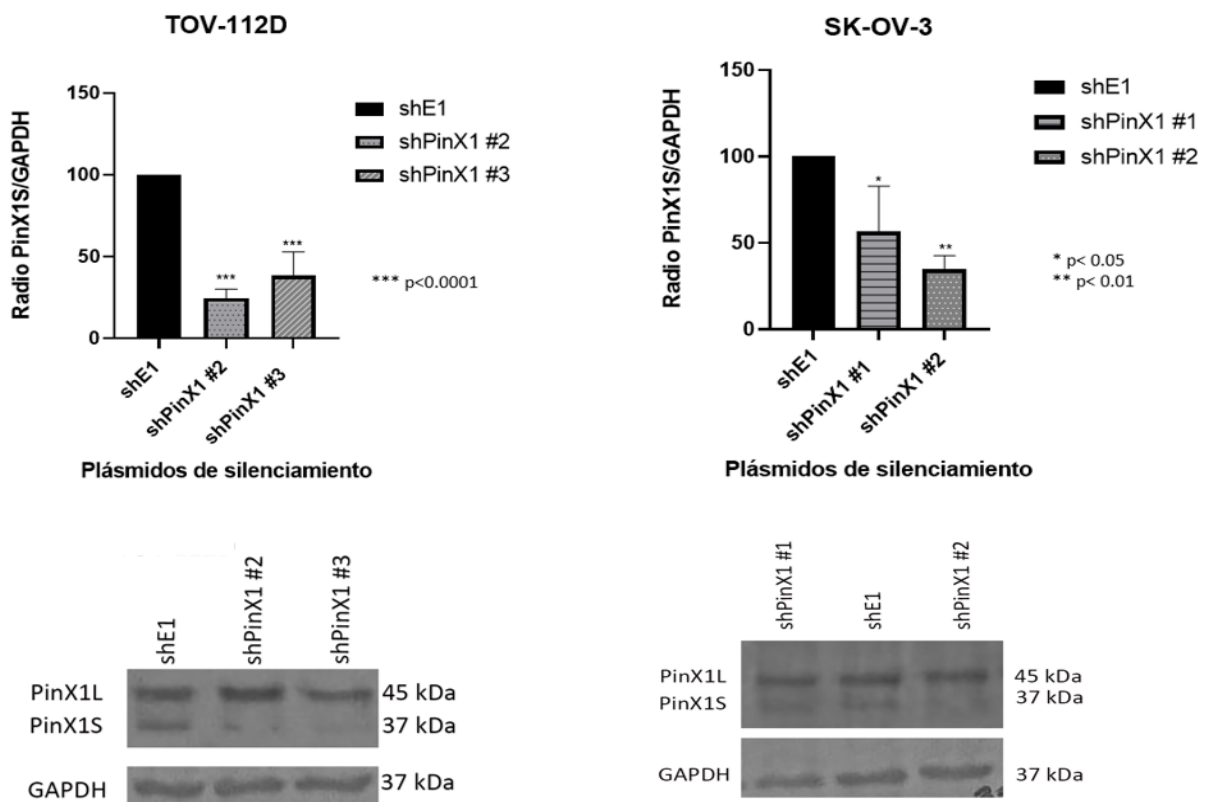


Figura 44. Análisis por densitometría de la presencia de la proteína PinX1 por Western Blot en la línea celular TOV-112D y SKOV-3. Se muestra media y desviación estándar de 3 experimento independientes. Se observa una disminución significativa de la proteína PinX1S al ser transfetadas con las mezclas de los plásmidos de silenciamiento de PinX1. Se utilizó una prueba ANOVA unidireccional y post hoc Tukey Kramer; *p<0.05, **p<0.01 y ***p<0.0001.

10.4 Estandarización de sobreexpresión de la proteína PinX1

La línea celular TOV-112D se transfectó con el reactivo TransIT-LT1 Transfection Reagent Mirus (Thermo Fisher Scientific) siguiendo las indicaciones del proveedor con un plásmido vacío:

pcDNA3.1/His/A y, el plásmido de sobreexpresión de PinX1S: pcDNA3.1-PinX1S. Se realizó una transfección ascendente de 3, 5 y 7 μg y se confirmó el funcionamiento del plásmido de sobreexpresión. Mediante el ensayo de western blot se determinó el funcionamiento de los plásmidos y la concentración a la cual hay una mayor sobreexpresión de PinX1S (Fig.45).

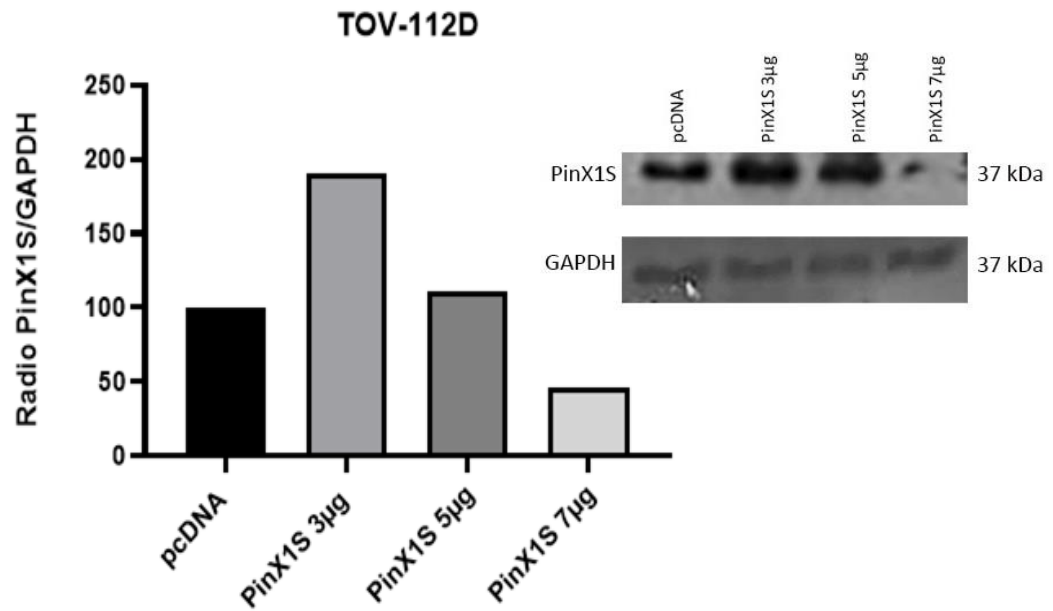


Figura 45. Análisis por densitometría de la sobreexpresión de la proteína PinX1S. Se muestra una gráfica representativa de la sobreexpresión de PinX1S con 3, 5 y 7 μg en comparación con un plásmido vacío (pcDNA), así como un blot de la expresión PinX1S tras realizar la transfección.

10.5 Ensayos de proliferación celular de las líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3

Para demostrar que las líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3 son sensibles a E_2 , se realizaron ensayos de proliferación celular en ambas líneas celulares de manera basal mediante el método XTT en presencia y ausencia de ligando agonista (E_2 20nM), demostrando su sensibilidad a esta hormona, al observarse un incremento de la proliferación celular tanto en la línea celular TOV-112D (Fig. 46), como en la línea celular SK-OV-3 (Fig.47) a los 6 días de exposición a E_2 .

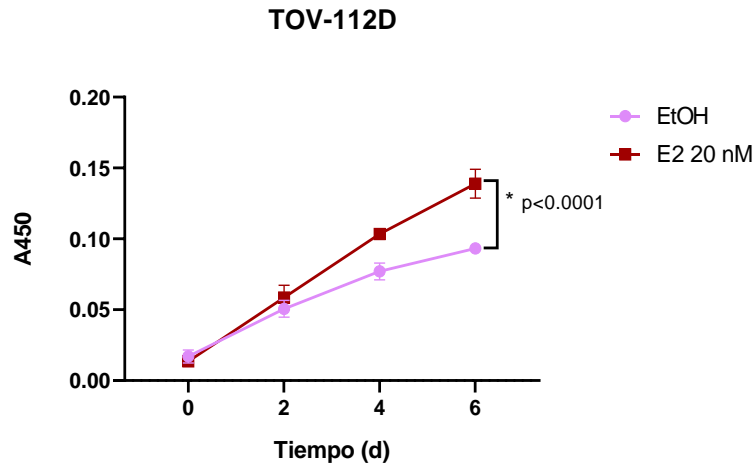


Figura 46. Curva de proliferación celular de la línea celular TOV-112D durante 6 días de tratamiento con etanol (EtOH) o estradiol 20 nM (E₂). Se muestra grafica con datos de 5 repeticiones con media y desviación estándar de 3 experimentos independientes con la misma tendencia. Se utilizó una prueba ANOVA de dos vías y Tukey Kramer post hoc: *p<0.0001.

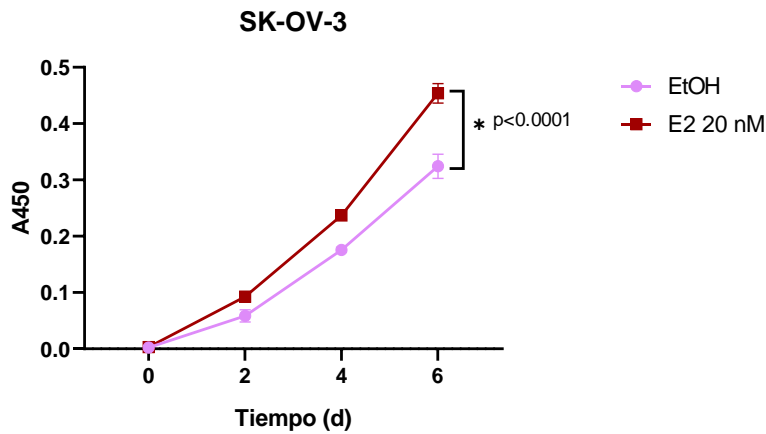


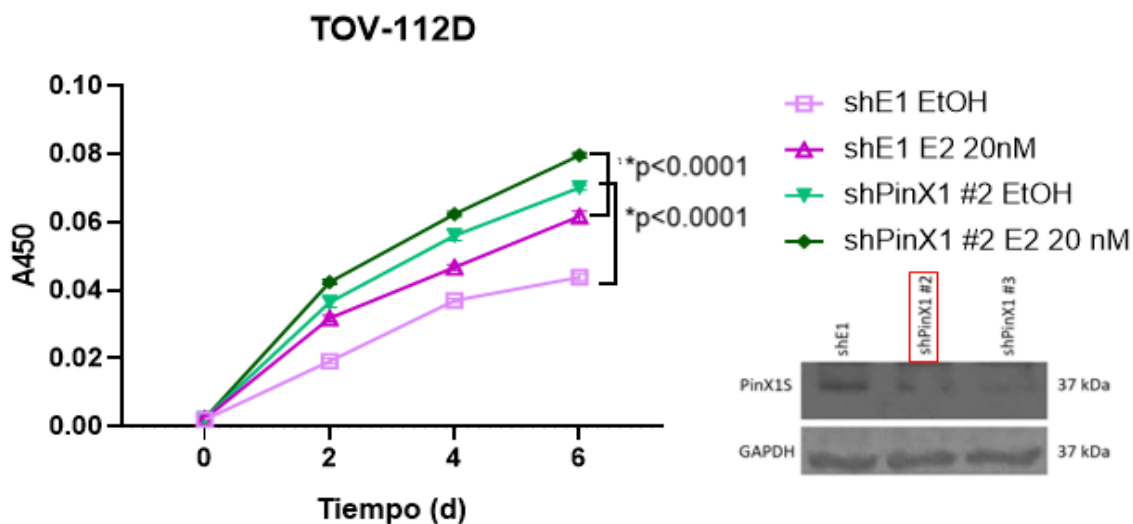
Figura 47. Curva de proliferación celular de la línea celular SK-OV-3 durante 6 días de tratamiento con etanol (EtOH) o estradiol 20 nM (E₂). Se muestra grafica con datos de 5 repeticiones con media y desviación estándar de 3 experimentos independientes con la misma tendencia. Se utilizó una prueba ANOVA de dos vías y Tukey Kramer post hoc: *p<0.0001.

10.6 Ensayos de proliferación celular de líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3 con el silenciamiento de PinX1

Se ha descrito una importante disminución en la expresión de PinX1 en diversos tipos de cánceres, incluido el gástrico (Kondo et al., 2005), el de mama (Zhou et al., 2011) y en ovario (Cai et al., 2010a). De acuerdo con lo reportado por Cai y colaboradores en conjunto con los

resultados obtenidos *in silico* en el COE existe una disminución del RNAm y de la proteína de PinX1, dicha disminución está relacionada con un incremento en la agresividad del tumor y un mal pronóstico de las pacientes. Además, se ha reportado la interacción de PinX1 con los SHR la cual está relacionada con la proliferación celular, la formación de colonias y la migración celular en líneas celulares de cáncer de mama y de próstata en ausencia y presencia de hormonas, por lo que se realizaron ensayos de proliferación celular en la línea celular TOV-112D y SK-OV-3 con el silenciamiento parcial de PinX1 en presencia y ausencia de ligando agonista (E₂).

Los ensayos de proliferación celular se realizaron a diferentes tiempos hasta los 6 días, al silenciar parcialmente a PinX1 con los plásmidos shPinX1#1, shPinX1#2 o shPinX1#3. En ambas líneas celulares se observa un incremento significativo en la proliferación celular en ausencia o presencia de E₂ en comparación con el control (shE1), (Fig. 48, y 49). Por lo tanto, existe un efecto mediado por su rol como correpresor de ER α (en presencia de E₂) como se reporta en líneas celulares de cáncer de mama (Noriega-Reyes et al., 2015), pero también un efecto independiente de estrógenos (en ausencia de E₂). Sugiriendo un papel proliferativo independiente de ER.



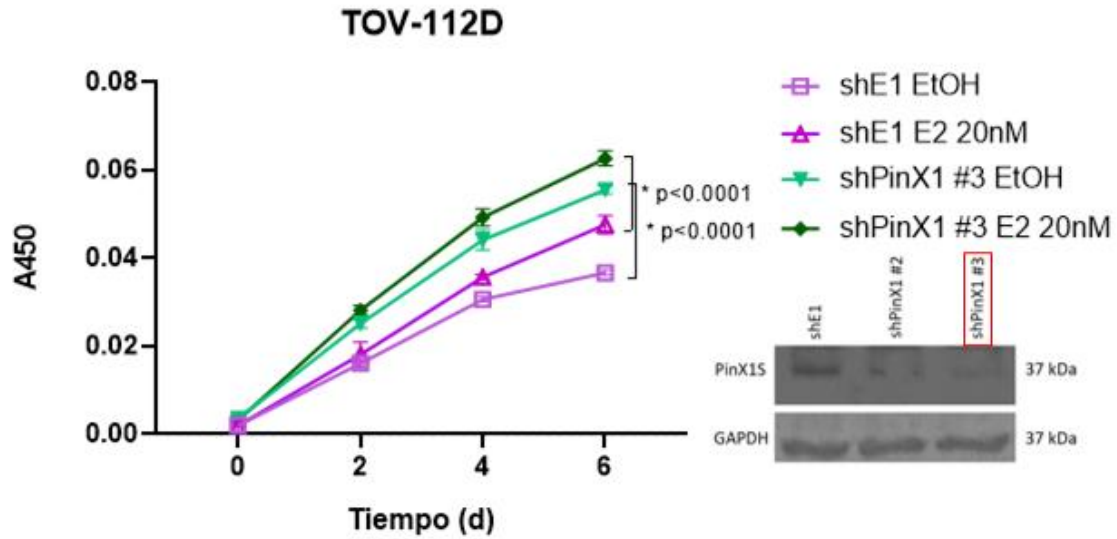
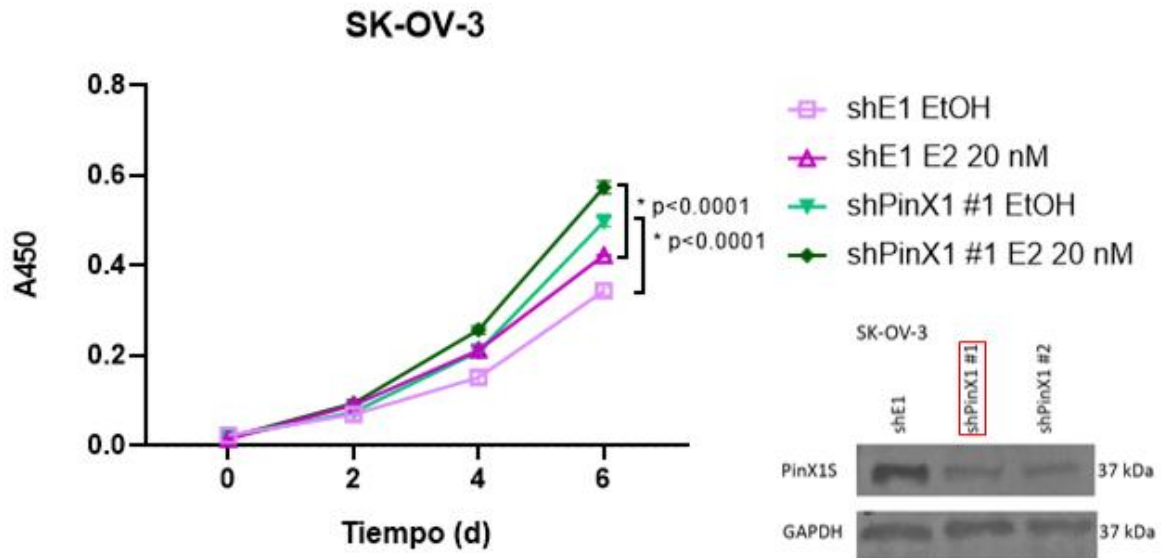


Figura 48. Curva de proliferación celular de la línea celular TOV-112D a 6 días con el silenciamiento parcial de PinX1, bajo tratamiento con etanol (EtOH) o estradiol 20 nM (E₂). Las células se transfectaron transitoriamente con el plásmido control shE1, shPinX1#2 o shPinX1#3. Se muestra grafica con datos de 5 repeticiones con media y desviación estándar de 3 experimentos independientes con la misma tendencia. Se utilizó una prueba ANOVA de dos vías y Tukey Kramer post hoc: *p<0.0001 shE1 EtOH vs shPinX1#2 EtOH, shE1 EtOH vs shPinX1#3 EtOH, shE1 E₂ vs shPinX1#2 E₂ o shE1 E₂ vs shPinX1#3 E₂.



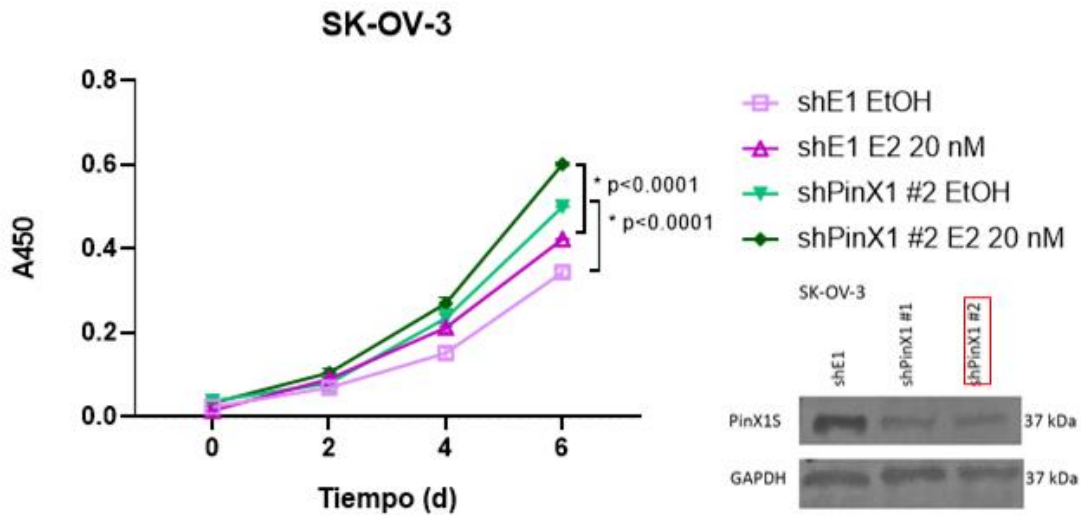


Figura 49. Curva de proliferación celular de la línea celular SK-OV-3 a 6 días con el silenciamiento parcial de PinX1, bajo tratamiento con etanol (EtOH) o estradiol 20 nM (E₂). Las células se transfectaron transitoriamente con el plásmido control shE1, shPinX1#1 o shPinX1#2. Se muestra grafica con datos de 5 repeticiones con media y desviación estándar de 3 experimentos independientes con la misma tendencia. Se utilizó una prueba ANOVA de dos vías y Tukey Kramer post hoc: *p<0.0001 shE1 EtOH vs shPinX1#2 EtOH, shE1 EtOH vs shPinX1#3 EtOH, shE1 E₂ vs shPinX1#2 E₂ o shE1 E₂ vs shPinX1#3 E₂.

10.7 Estandarización para formación de ovario-esferas

Se realizaron ensayos de formación de ovario-esferas para determinar el número de células que se deben sembrar y cuántos días de incubación son los indicados para determinar las condiciones óptimas de enriquecimiento de las CTC mediante la identificación de los marcadores de superficie CD44 y CD133. Estos marcadores se han utilizado como marcadores de CTC en cáncer de ovario (Barbato et al., 2019). El conocer los días y porcentaje de expresión fue importante para determinar el modelo adecuado para obtener el mayor número de posibles CTC para realizar los próximos experimentos.

Como control se utilizaron las líneas celulares en monocapa. A partir de la línea celular TOV-112D (Fig. 50) se sembraron 10,000 células (Fig. 51), 15,000 células (Fig. 52) y 25,000 células (Fig. 53) en las condiciones descritas en la metodología para enriquecer a las CTC, posteriormente las ovario-esferas se recolectaron a los 3, 5 y 7 días y se evaluó la expresión de los marcadores de superficie celular CD44 y CD133. De acuerdo con lo obtenido, se tiene una mayor expresión de los marcadores CD44 y CD133 en el quinto día al sembrar 10,000 células

con una media de 78.95 de células dobles positivas en comparación con el cultivo en monocapa que presenta una media de 32.3, de acuerdo con tres experimentos independientes, (Fig. 54).

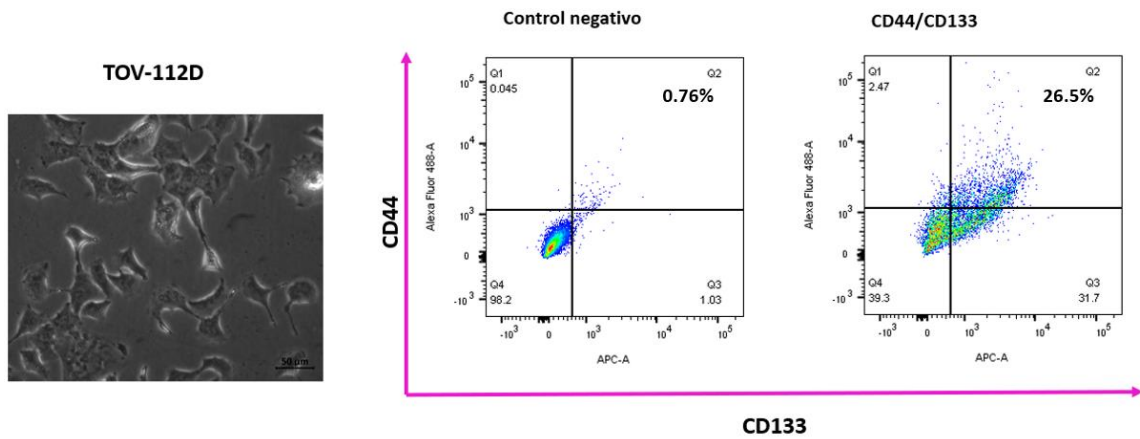


Figura 50. Determinación de marcadores de CTC en células TOV-112D cultivadas en monocapa. Se presenta un experimento representativo de tres repeticiones independientes. El porcentaje de células CD44 y CD133 positivas fue analizado por citometría de flujo a través de los fluoróforos Alexa Fluor 488 y APC. Se observa un 26.5% de células positivas para CD44 y CD133 señalado en el cuadrante 2 (Q2).

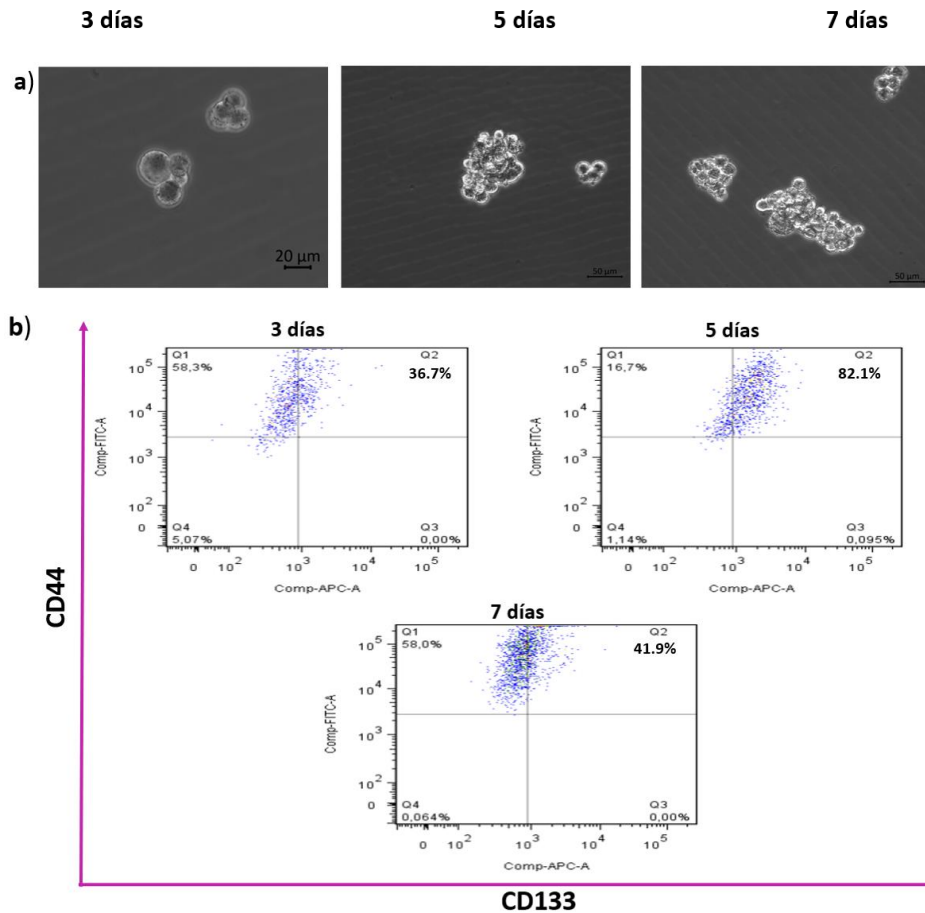


Figura 51. Cinética de enriquecimiento de las CTC al cultivar 10,000 células bajo condiciones no adherentes. a) Microscopía de ovario-esferas obtenidas a partir de la línea celular TOV-112D al día 3 (20X), 5 (40X) y 7 (40X) de enriquecimiento de las CTC mediante cultivo tridimensional. b) Citometría de flujo que compara la expresión de los marcadores CD44 y CD133 en ovario-esferas. El porcentaje de células CD44 y CD133 positivas fue analizada por citometría de flujo a través de los fluoróforos acoplados a FITC-A y APC. Se observa un 36.7%, 82.1% y 41.9% de células doble positivas en el cuadrante 2 (Q2) en el día 3, 5 y 7, respectivamente.

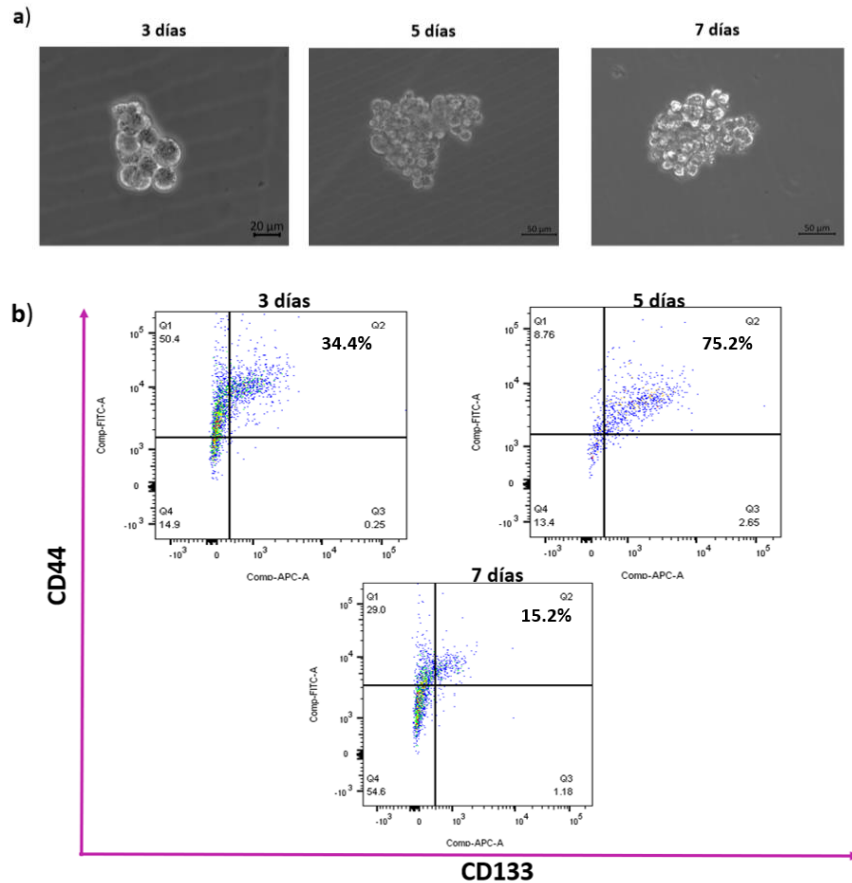


Figura 52. Cinética de enriquecimiento de las CTC al cultivar 15,000 células bajo condiciones no adherentes. a) Microscopía de ovario-esferas obtenidas a partir de la línea celular TOV-112D al día 3 (20X), 5 (40X) y 7 (40X) de enriquecimiento de las CTC mediante cultivo tridimensional. b) Citometría de flujo que compara la expresión de los marcadores CD44 y CD133 en ovario-esferas. El porcentaje de células CD44 y CD133 positivas fue analizada por citometría de flujo a través de los fluoróforos acoplados a FITC-A y APC. Se observa un 34.4%, 75.2% y 15.2% de células doble positivas en el cuadrante 2 (Q2) en el día 3, 5 y 7, respectivamente.

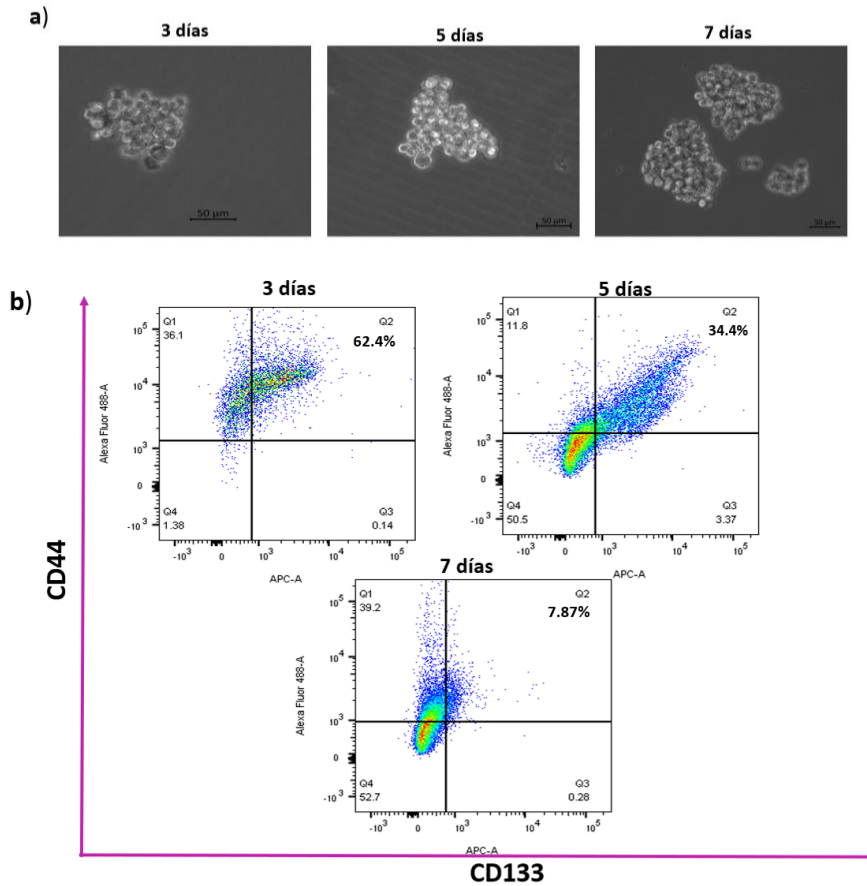
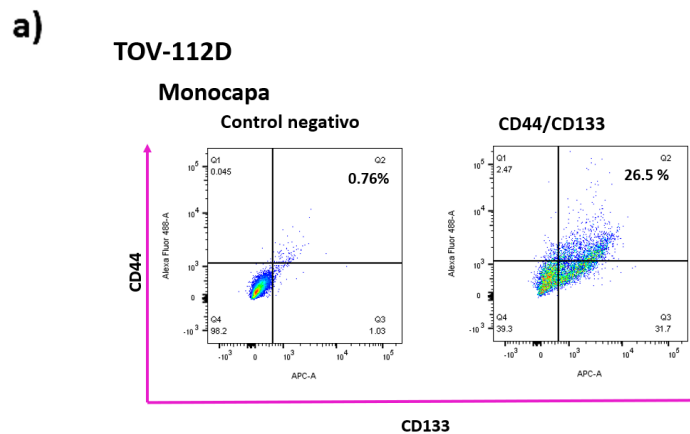
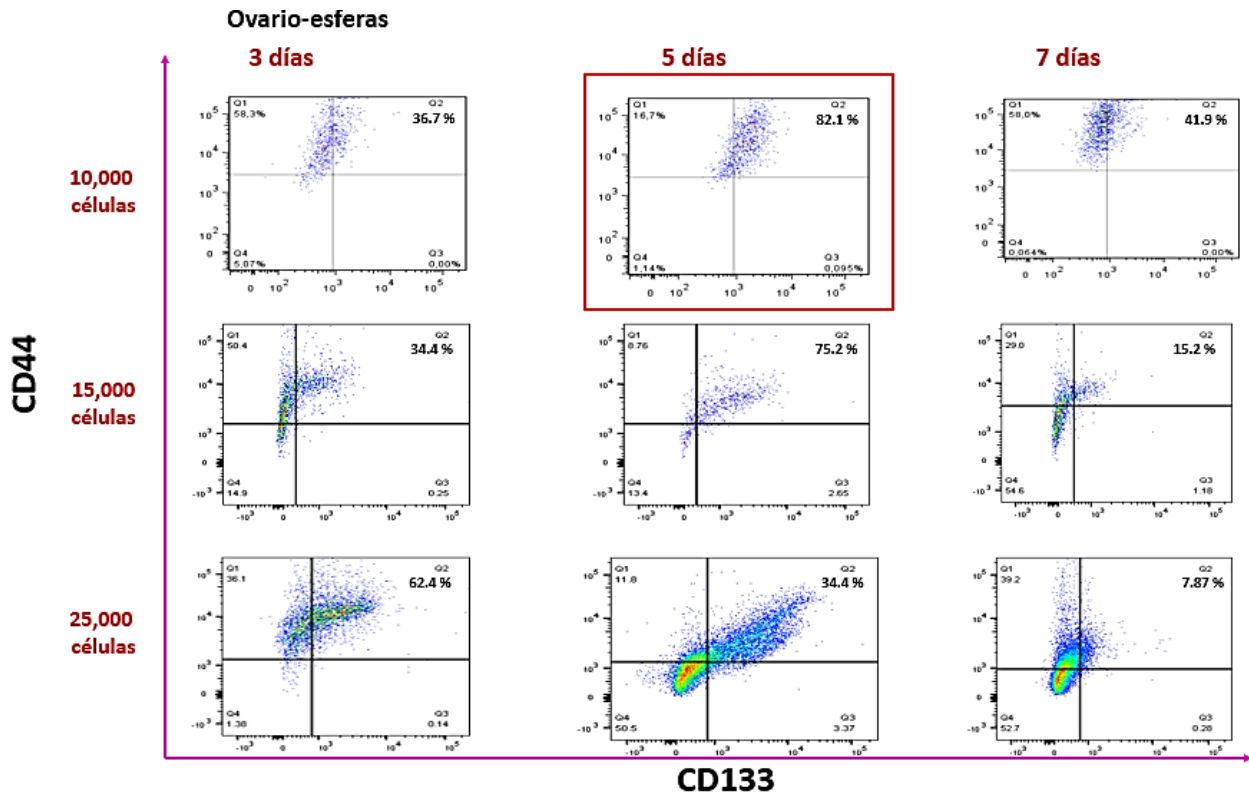


Figura 53. Cinética de enriquecimiento de las CTC al cultivar 25,000 células bajo condiciones no adherentes. a) Microscopía de ovario-esferas obtenidas a partir de la línea celular TOV-112D al día 3 (40X), 5 (40X) y 7 (40X) de enriquecimiento de las CTC mediante cultivo tridimensional. b) Citometría de flujo que compara la expresión de los marcadores CD44 y CD133 en ovario-esferas. El porcentaje de células CD44 y CD133 positivas fue analizada por citometría de flujo a través de los fluoróforos acoplados a FITC-A y APC. Se observa un 62.4%, 34.4% y 7.87% de células doble positivas en el cuadrante 2 (Q2) en el día 3, 5 y 7, respectivamente.





b)

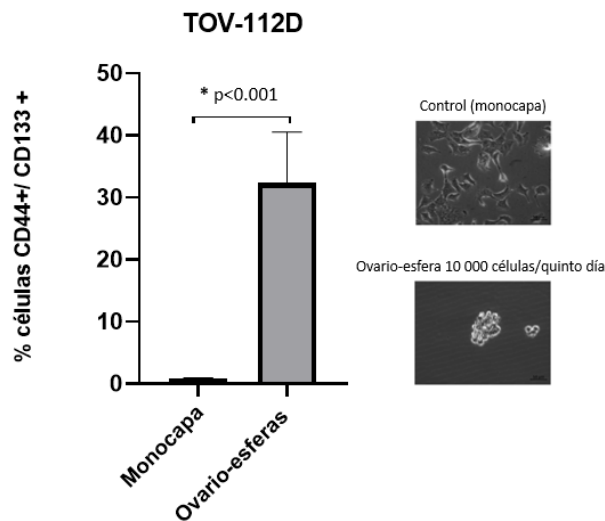


Figura 54. Cinética de enriquecimiento de las CTC al cultivar 10 000, 15 000 y 25 000 células y condiciones óptimas de la línea celular TOV-112D para obtener un mayor porcentaje de CTC. a) Citometría de flujo que compara la expresión de los marcadores CD44 y CD133 en ovario-esferas formadas a partir de diferentes condiciones. El recuadro rojo representa las condiciones óptimas de enriquecimiento de CTC (10 000 células/ 5 días). b) Gráfica representativa en donde se observa una media del 32.3% de células dobles positivas en el grupo control (monocapa) y 78.95% de células dobles positivas en el grupo de ovario-esferas generadas al sembrar 10 000 células y recolectarlas al quinto día. Se muestra gráfica con datos de dos experimentos independientes con media y desviación estándar. Se utilizó una prueba t-student control vs ovario-esferas (*P<0.001).

Asimismo, se pretendió realizar ensayos de formación de ovario-esferas a partir de la línea celular SK-OV-3. Dado que el control (monocapa) presenta un alto porcentaje de los marcadores de superficie celular CD44 y CD133 (Fig. 55), se determinó que este no es un buen modelo para este ensayo.

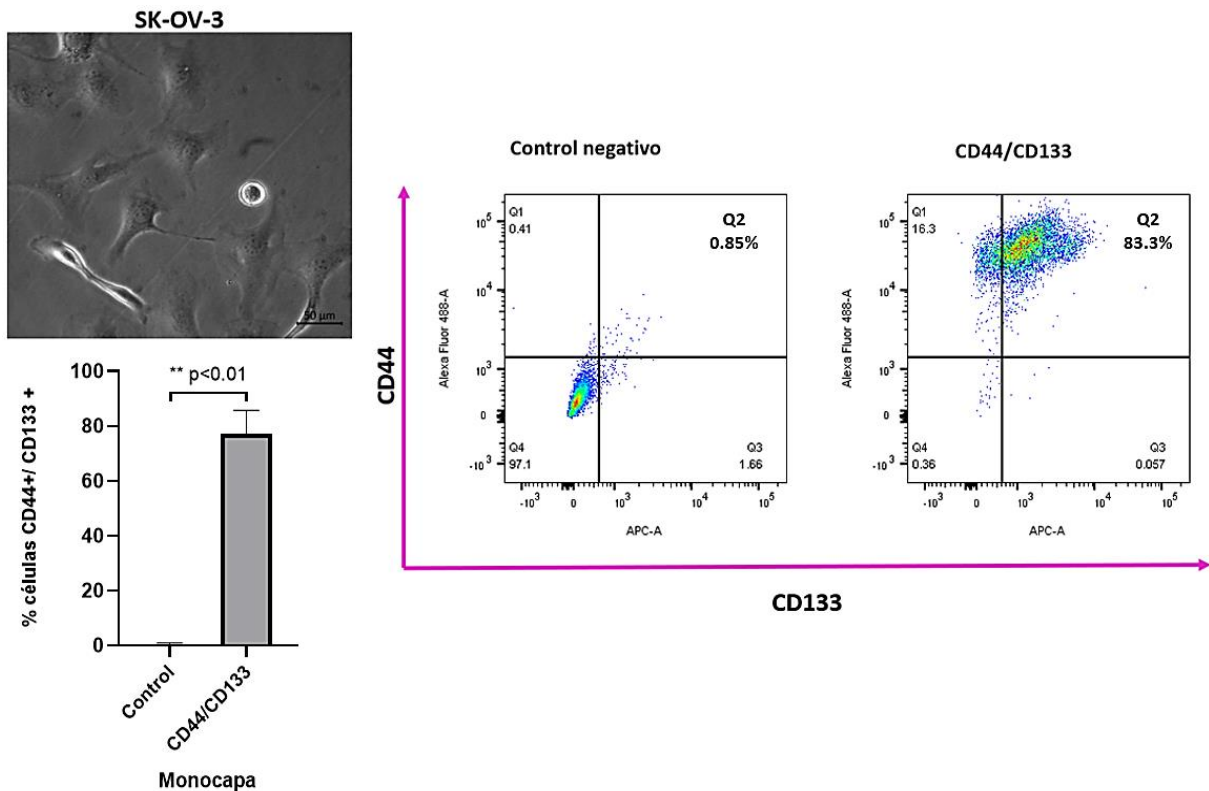


Figura 55. Enriquecimiento de CTC en línea celular SK-OV-3 en monocapa. El porcentaje de células CD44 y CD133 fue analizada por citometría de flujo a través de los fluoróforos Alexa Fluor 488 y APC. Gráfica representativa en donde se observa una media de 0.59% de células dobles positivas en el grupo control (monocapa) y 78.95% de células dobles positivas en el grupo teñido. Se muestra gráfica con datos de dos experimentos independientes con media y desviación estándar. Se utilizó una prueba t-student control vs control teñido (**p<0.01).

Por otro lado, como línea celular alternativa, se realizaron ensayos de formación de ovario-esferas de la línea celular OVCAR-3 para determinar el número de células óptimas para sembrar y a los cuantos días de incubación son los indicados en donde hay un mayor porcentaje de enriquecimiento de los marcadores de CTC.

Como control se utilizó a la línea celular en monocapa (Fig. 56) y posteriormente se sembraron 10,000 células (Fig. 57), 20,000 (Fig. 58), 40,000 (Fig. 59) y, 50,000 (Fig. 60) en las condiciones

descritas anteriormente para enriquecer a las CTC, posteriormente las ovario-esferas se recolectaron después de 3, 5 y 7 días y se evaluaron los marcadores de superficie celular CD44 y CD133. De acuerdo con lo obtenido, se tiene una mayor expresión del marcador de superficie celular CD44 en el tercer día al sembrar 50,000 células con una media de 89.45 de expresión positiva en comparación con el cultivo en monocapa que presenta una media de 42.25% (Fig.61).

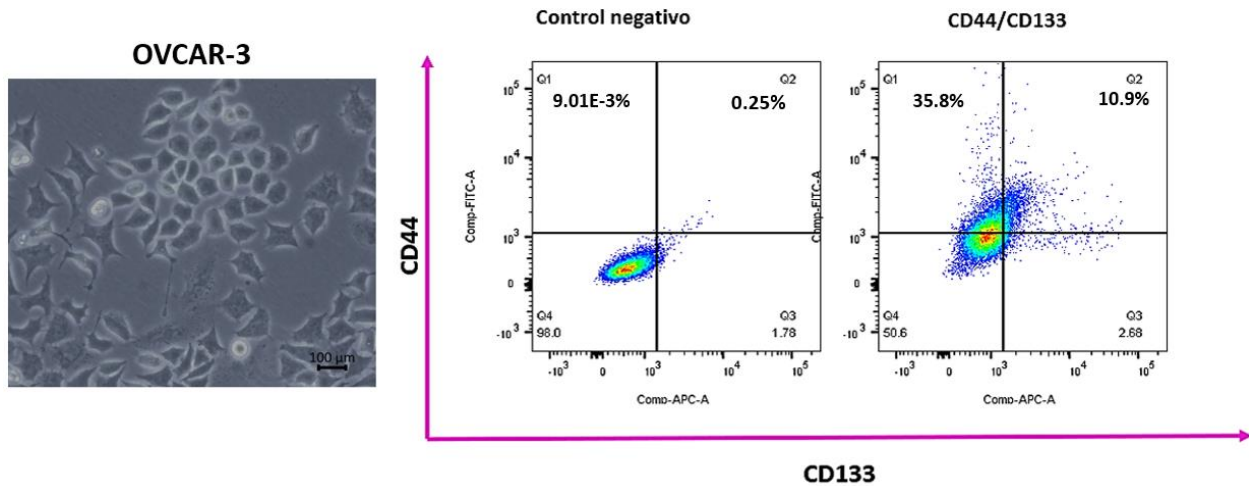
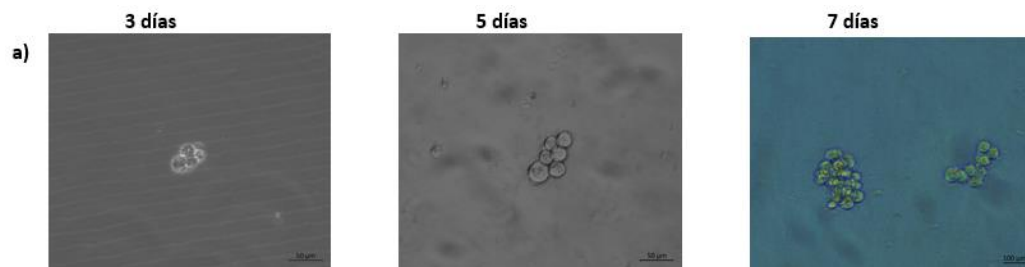


Figura 56. Determinación de marcadores de CTC en células OVCAR-3 cultivadas en monocapa. Se presenta un experimento representativo de tres repeticiones independientes. El porcentaje de células CD44 y CD133 positivas fue analizada por citometría de flujo a través de los fluoróforos FITC y APC. Se observa un 10.9 % de células positivas para CD44 y CD133 señalado en el cuadrante 2 (Q2) y 35.8% de células positivas para CD44 en el cuadrante 1 (Q1).



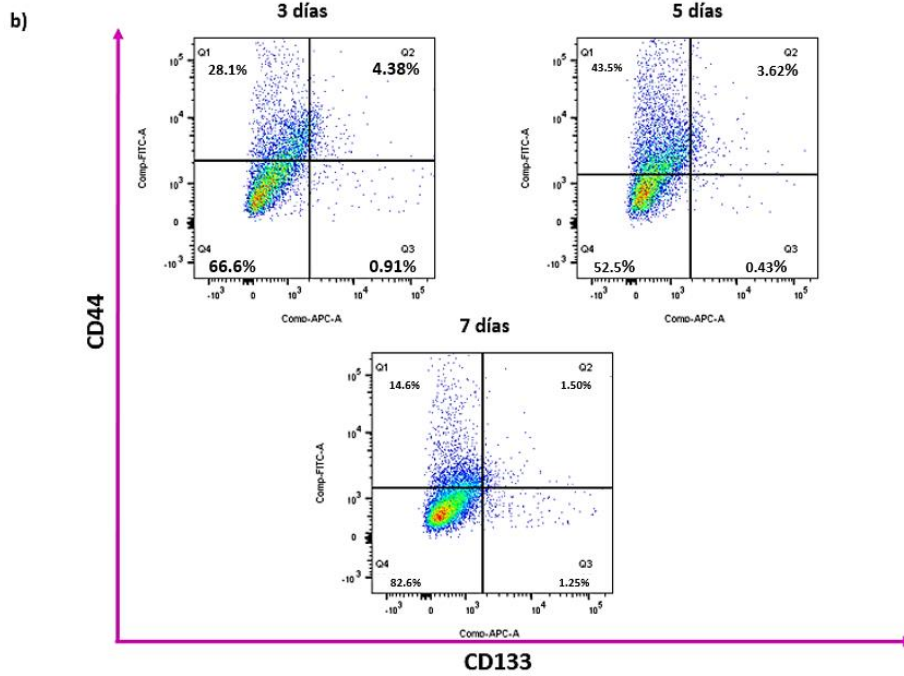
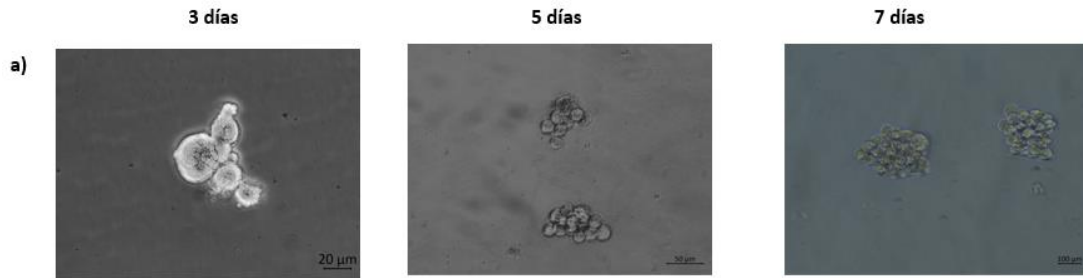


Figura 57. Cinética de enriquecimiento de las CTC al cultivar 10,000 células bajo condiciones no adherentes. a) Microscopía de ovario-esferas obtenidas a partir de la línea celular OVCAR-3 al día 3 (20X), 5 (20X) y 7 (20X) de enriquecimiento de las CTC mediante cultivo tridimensional. b) Citometría de flujo que compara la expresión de los marcadores CD44 y CD133 en ovario-esferas. El porcentaje de células CD44 y CD133 positivas fue analizada por citometría de flujo a través de los fluoróforos acoplados a FITC-A y APC. Se observa un 28.1%, 3.62% y 1.50% de células CD44+ en el cuadrante 1 (Q1), en el día 3, 5 y 7, respectivamente.



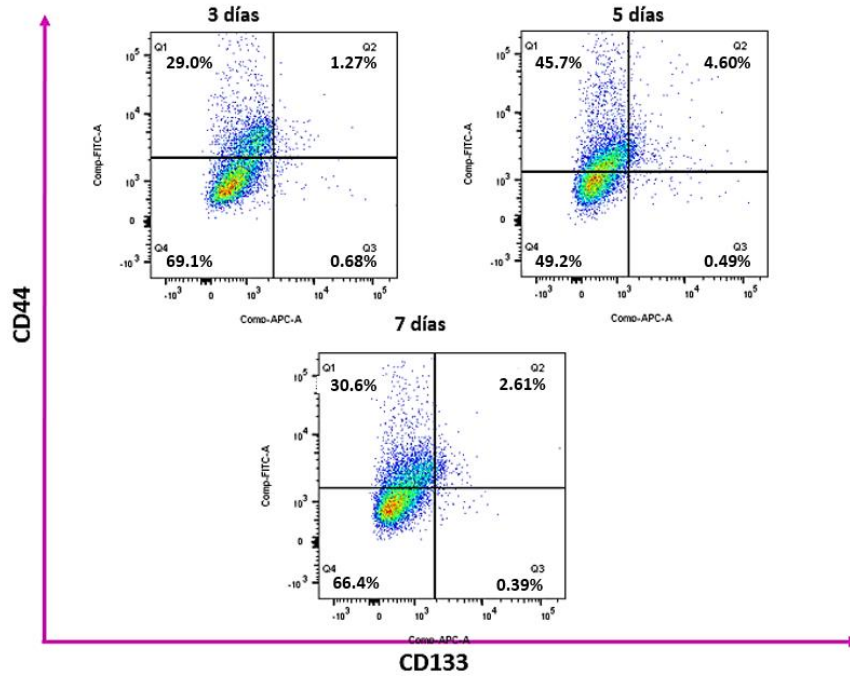
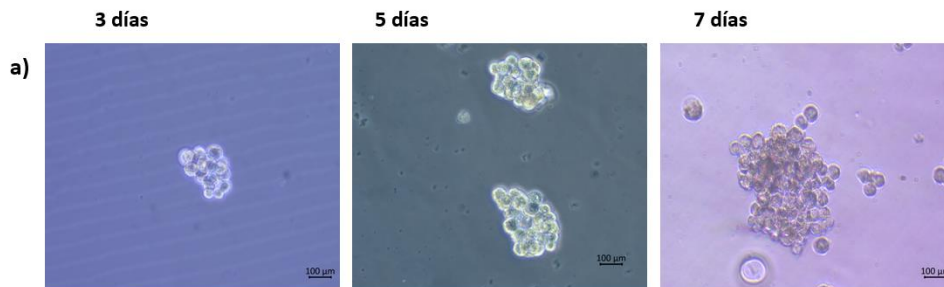


Figura 58. Cinética de enriquecimiento de las CTC al cultivar 20,000 células bajo condiciones no adherentes. a) Microscopía de ovario-esferas obtenidas a partir de la línea celular OVCAR-3 al día 3 (20X), 5 (20X) y 7 (20X) de enriquecimiento de las CTC mediante cultivo tridimensional. b) Citometría de flujo que compara la expresión de los marcadores CD44 y CD133 en ovario-esferas. El porcentaje de células CD44 y CD133 positivas fue analizada por citometría de flujo a través de los fluoróforos acoplados a FITC-A y APC. Se observa un 29%, 45.7% y 30.6% de células CD44+ en el cuadrante 1 (Q1), en el día 3, 5 y 7, respectivamente.



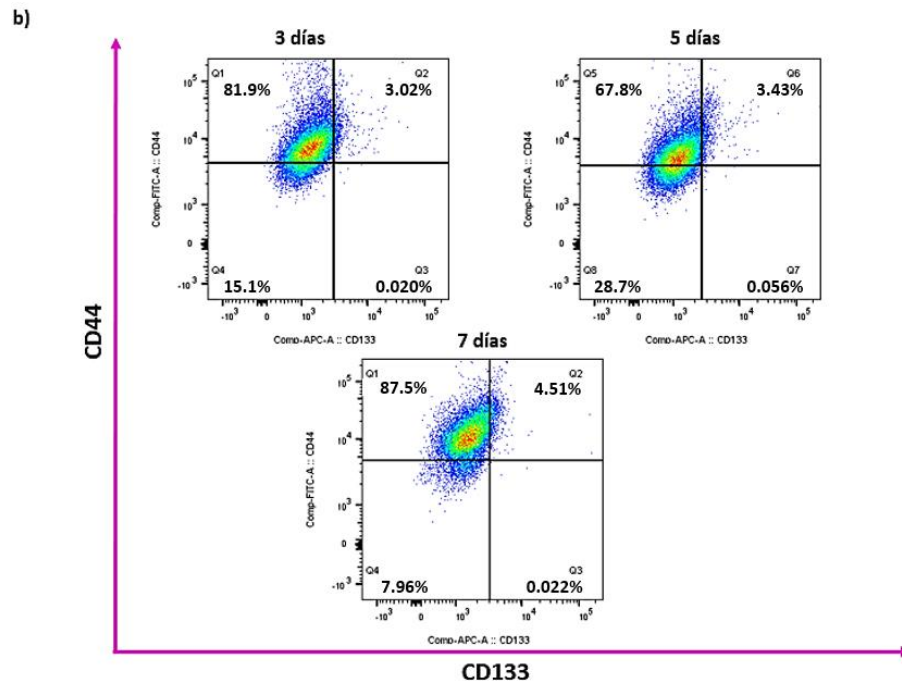


Figura 59. Cinética de enriquecimiento de las CTC al cultivar 40,000 células bajo condiciones no adherentes. a) Microscopía de ovario-esferas obtenidas a partir de la línea celular OVCAR-3 al día 3 (20X), 5(20X) y 7(20X) de enriquecimiento de las CTC mediante cultivo tridimensional. b) Citometría de flujo que compara la expresión de los marcadores CD44 y CD133 en ovario-esferas. El porcentaje de células CD44 y CD133 positivas fue analizada por citometría de flujo a través de los fluoróforos acoplados a FITC-A y APC. Se observa un 81.9, 67.8% y 87.5% de células CD44+ en el cuadrante 1 (Q1), en el día 3, 5 y 7, respectivamente.



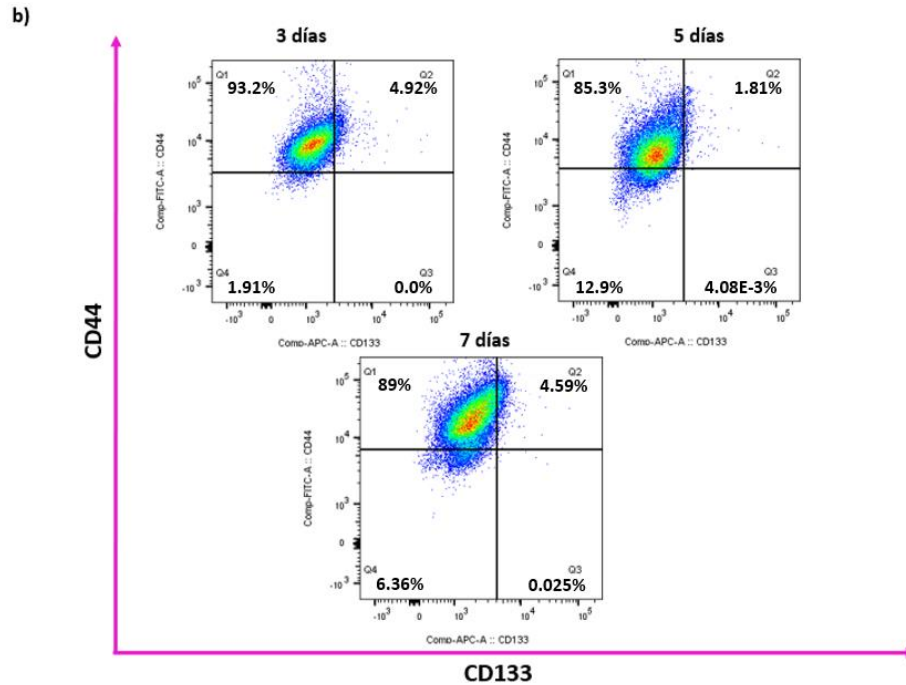
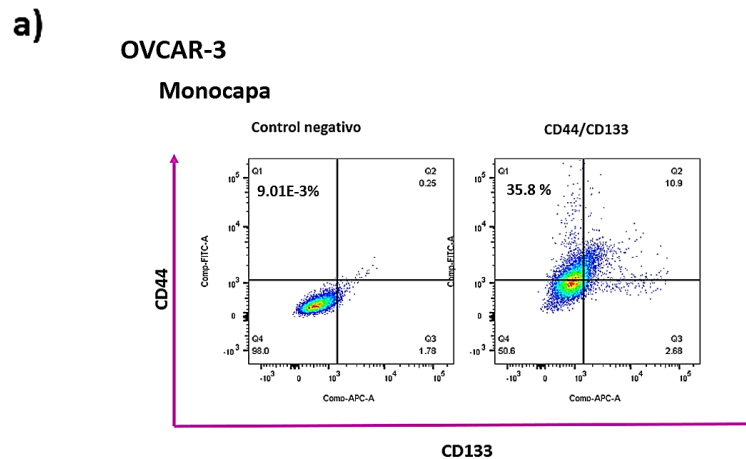


Figura 60. Cinética de enriquecimiento de las CTC al cultivar 50,000 células bajo condiciones no adherentes. a) Microscopía de ovario-esferas obtenidas a partir de la línea celular OVCAR-3 al día 3 (20X), 5(20X) y 7(20X) de enriquecimiento de las CTC mediante cultivo tridimensional. b) Citometría de flujo que compara la expresión de los marcadores CD44 y CD133 en ovario-esferas. El porcentaje de células CD44 y CD133 positivas fue analizada por citometría de flujo a través de los fluoróforos acoplados a FITC-A y APC. Se observa un 93.2, 85.3% y 89.0% de células CD44+ en el cuadrante 1 (Q1), en el día 3, 5 y 7, respectivamente.

Dado que no se pudo enriquecer ovario-esferas CD133+ en ninguna de las condiciones anteriormente descritas, se decidió utilizar las condiciones en donde había un mayor enriquecimiento de células CD44+ puesto que, se observó una tendencia a aumentar el porcentaje de ovario-esferas CD44+ cuando se incrementaba el número de células sembradas en los días 3, 5 y 7.



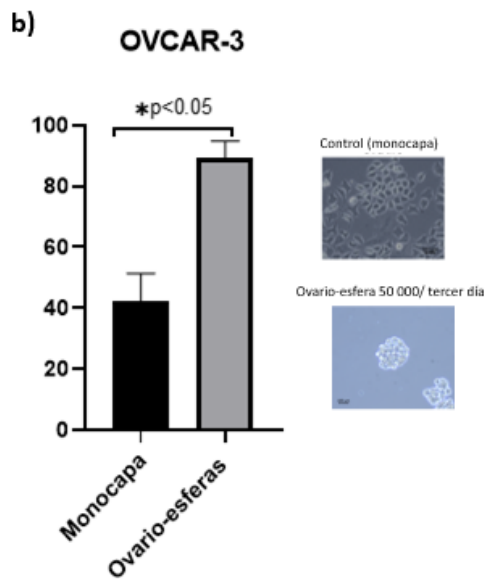
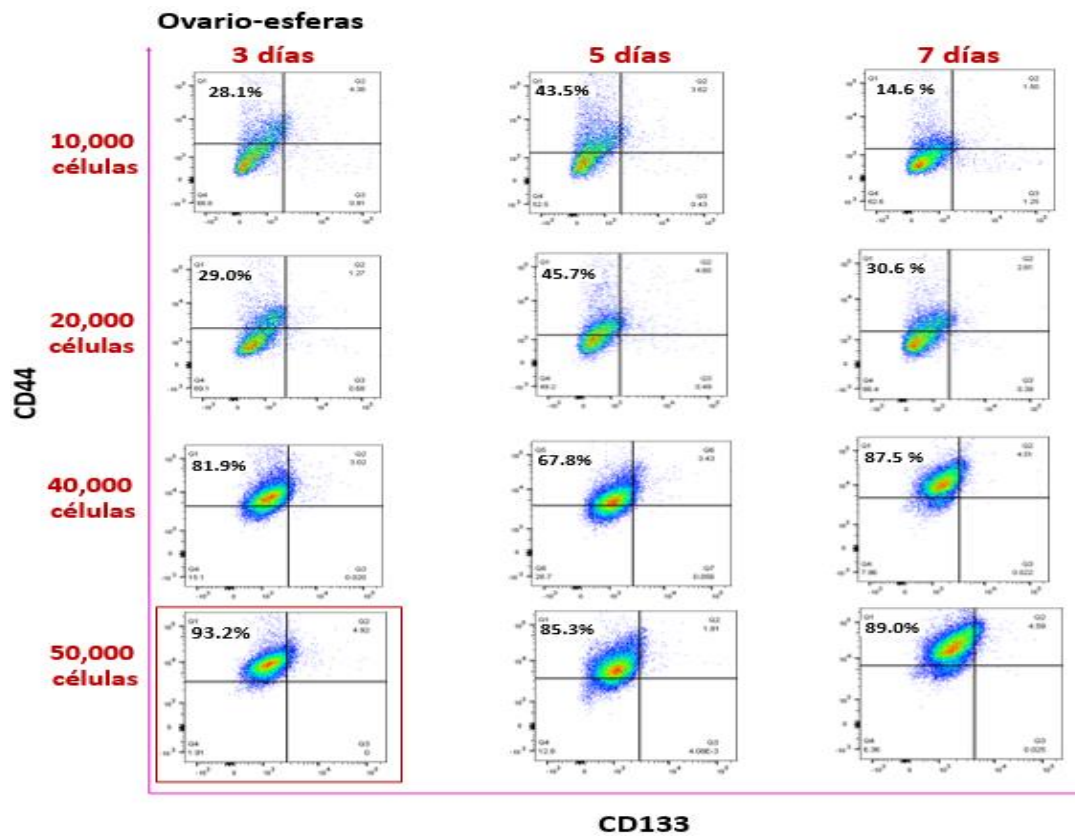


Figura 61. Cinética de enriquecimiento de las CTC al cultivar 10 000, 20 000, 40 000 y 50 000 células y condiciones óptimas de la línea celular OVCAR-3 para obtener un mayor porcentaje de CTC CD44+. a) Citometría de flujo que compara la expresión del marcador CD44 en ovario-esferas formadas a partir de diferentes condiciones. El recuadro rojo representa las condiciones óptimas de enriquecimiento de CTC CD44+ (50 000 células/ 3 días). b)

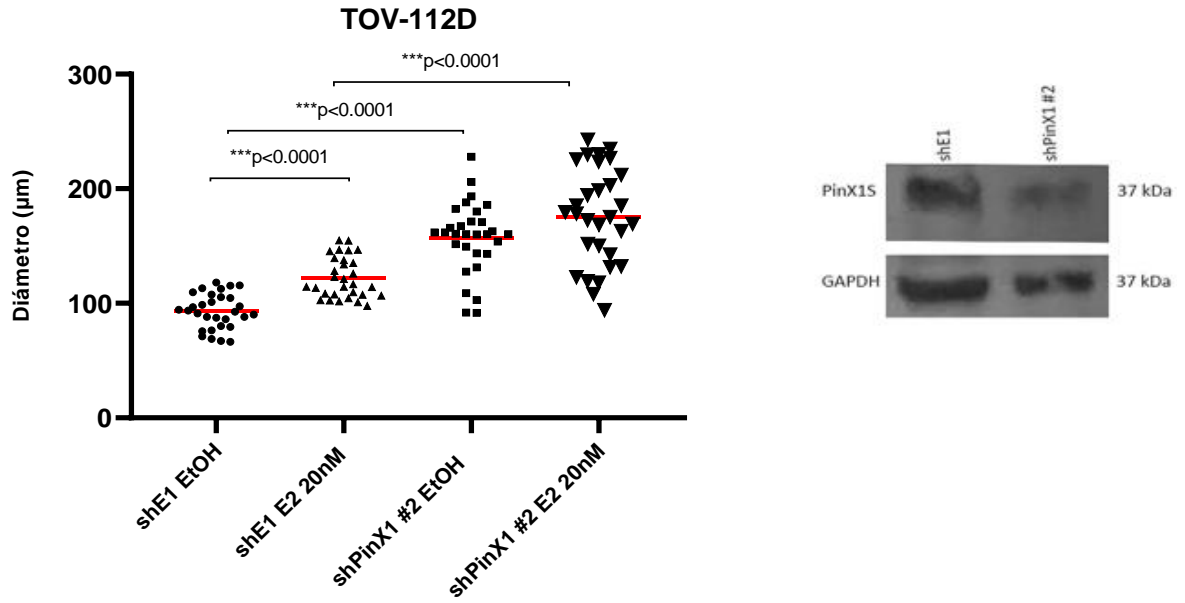
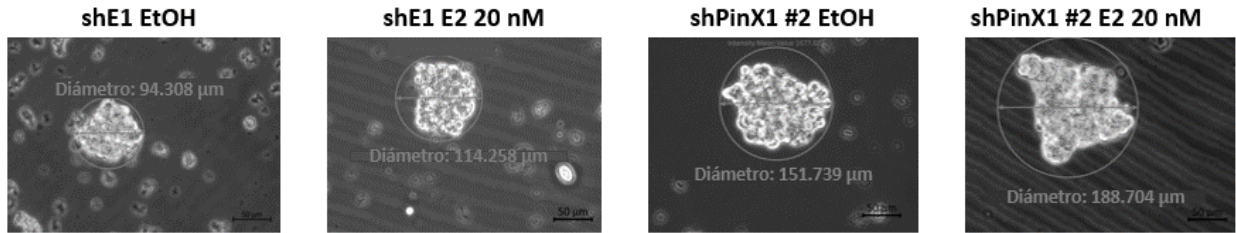
Gráfica representativa en donde se observa una media de 42.2% de células CD44+ en el grupo control (monocapa) y 89.4% de células dobles positivas en el grupo de ovario-esferas generadas al sembrar 50 000 células y recolectarlas al tercer día. Se muestra gráfica con datos de dos experimentos independientes con media y desviación estándar. Se utilizó una prueba t-student control vs ovario-esferas (*p<0.05).

10.8 Ensayos de formación de ovario-esferas y efecto de PinX1 sobre el número y tamaño de ovario-esferas generadas

Dado que la sobreexpresión de PinX1 en líneas celulares de COE (OVCAR-3, TOV-112D y SKOV-3) disminuye significativamente la proliferación celular y el silenciamiento incrementa significativamente la proliferación de manera dependiente e independiente de estrógenos (E₂), resulta de interés ver el efecto que tiene PinX1 sobre la formación de ovario-esferas a partir de la línea celular TOV-112D y OVCAR-3, para comenzar a dilucidar la acción que ejerce esta proteína en el COE. Además, PinX1 ha sido reportado como corregulador de SHR y ya que el ER efectúa su acción canónica en presencia de E₂, resulta de importancia observar el efecto de PinX1 en presencia de E₂ sobre el número y tamaño de ovario-esferas formadas.

Para la línea celular TOV-112D se realizaron ensayos de formación de ovario-esferas, comparando el efecto que ejerce el silenciamiento parcial o la sobreexpresión estable de PinX1 contra la expresión control de un plásmido vacío. Las ovario-esferas se obtuvieron al quinto día al sembrar 10,000 células/mililitro. Se observa un incremento significativo tanto en el tamaño (diámetro) como el número de ovario-esferas formadas al silenciar a PinX1 en presencia y ausencia de E₂, Fig. 62. Por otro lado, la sobreexpresión estable de PinX1 muestra un efecto contrario, al observarse una disminución significativa en el tamaño de las ovario-esferas en comparación con el control, Fig. 63.

a)



b)

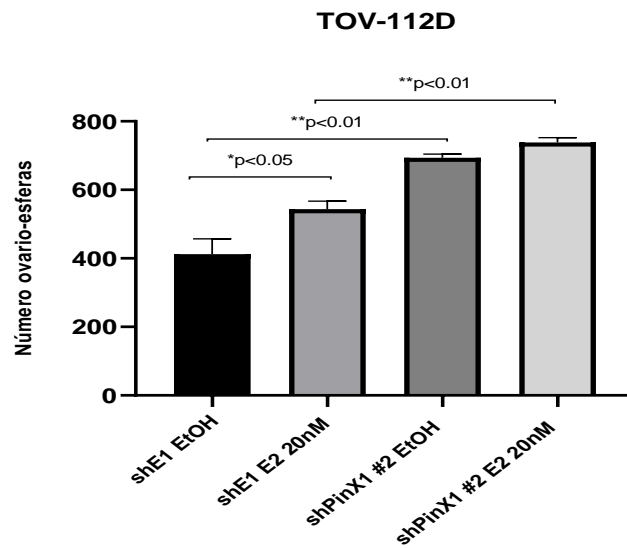
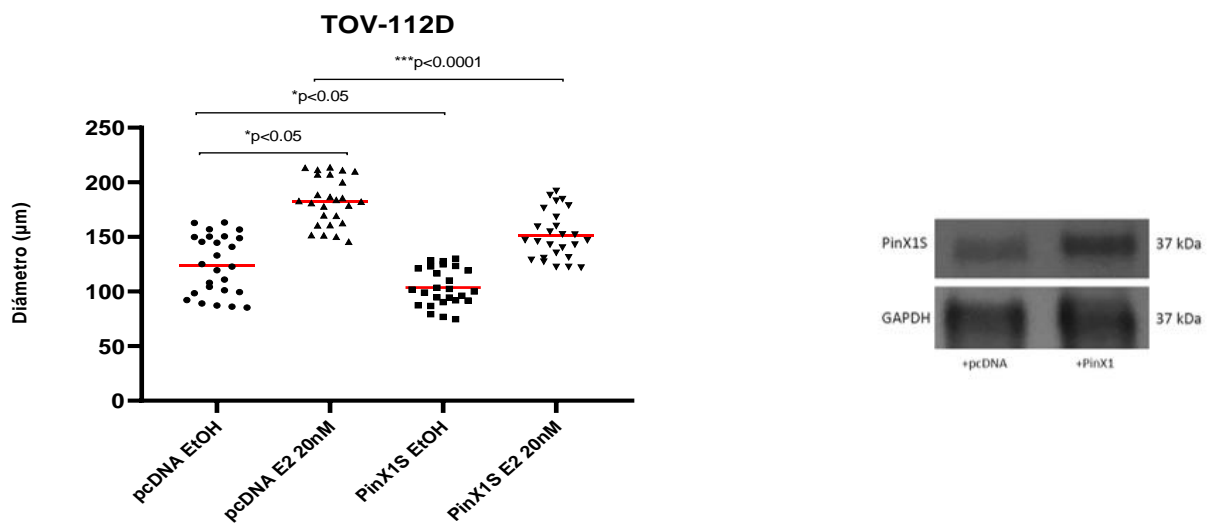
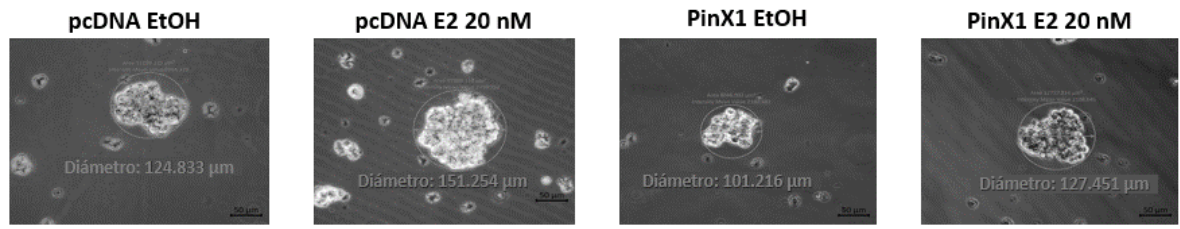


Figura 62. Formación de ovario-esferas a partir de la línea celular TOV-112D. Gráficas e imágenes representativas bajo tratamiento con EtOH o E₂ 20 nM e imágenes obtenidas mediante microscopía (20X). Efecto que ejerce el silenciamiento de PinX1 sobre el a) tamaño y b) número de ovario-esferas. Se utilizó una prueba de ANOVA

unidireccional y Tukey Kramer post hoc: * $p < 0.05$ y * $p < 0.0001$ shE1 EtOH vs shE1 E₂ 20 nM, ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$ shE1 EtOH vs shPinX1#2 EtOH y ** $p < 0.01$ y *** $p < 0.0001$, shE1 E₂ 20 nM vs shPinX1#2 E₂ 20nM.

a)



b)

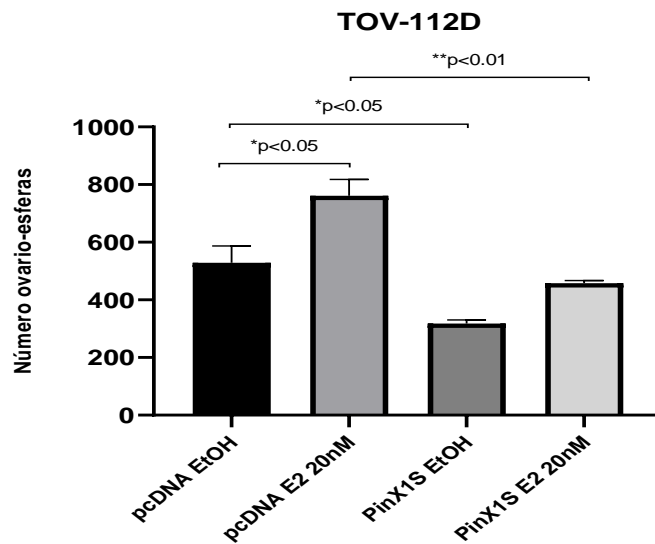
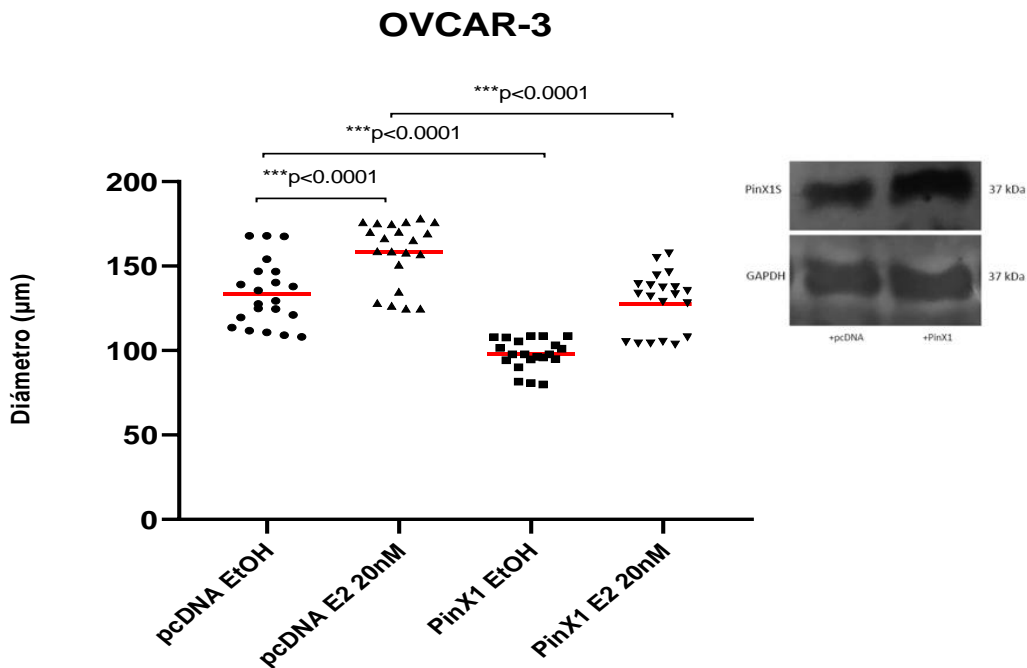
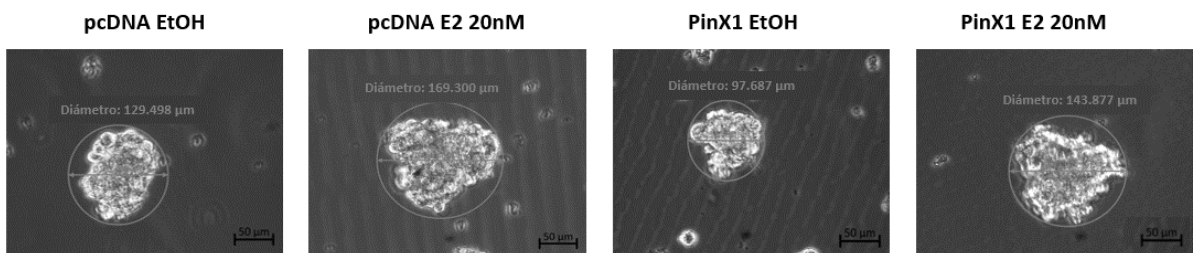


Figura 63. Formación de ovario-esferas a partir de la línea celular TOV-112D. Gráficas e imágenes representativas bajo tratamiento con EtOH o E₂ 20 nM e imágenes obtenidas mediante microscopía (20X). Efecto que ejerce la sobreexpresión estable de PinX1 sobre el a) tamaño y b) número de ovario- esferas. Se utilizó una prueba de ANOVA unidireccional y Tukey Kramer post hoc: *p<0.05 pcDNA EtOH vs pcDNA E₂ 20 nM, *p<0.05 pcDNA EtOH vs PinX1S EtOH y ** p<0.01 y *** p<0.0001 pcDNA E₂ 20 nM vs PinX1S E₂ 20 nM.

Asimismo, para la línea celular OVCAR-3 se hicieron ensayos de formación de ovario-esferas para determinar el efecto que ejerce el silenciamiento de PinX1 sobre el número y tamaño de ovario-esferas en comparación con la expresión control de un plásmido vacío. Las ovario-esferas se obtuvieron al tercer día al sembrar 50,000 células/mililitro. Se observa un incremento significativo tanto en el tamaño (diámetro) como el número de ovario-esferas formadas al silenciar a PinX1 en presencia y ausencia de E₂, Fig. 64

a)



b)

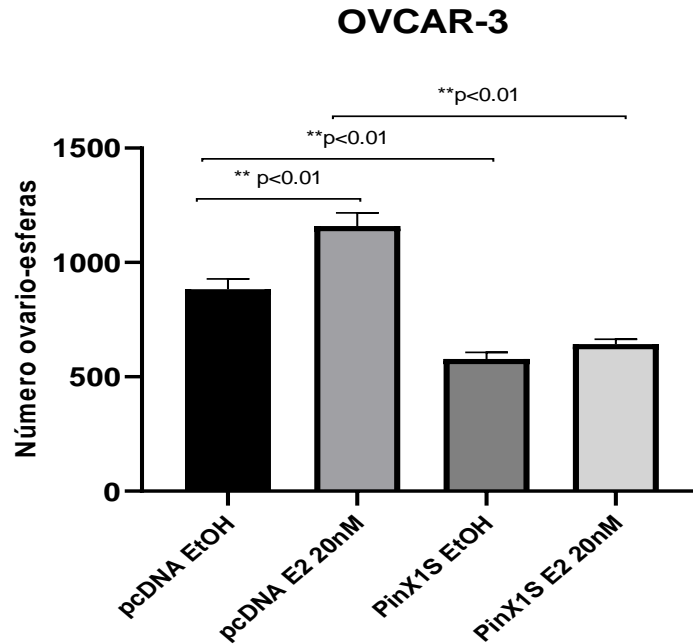


Figura 64. Formación de ovario-esferas a partir de la línea celular OVCAR-3. Gráficas e imágenes representativas bajo tratamiento con EtOH o E₂ 20 nM e imágenes obtenidas mediante microscopía (20X). Efecto que ejerce la sobreexpresión estable de PinX1 sobre el a) tamaño y b) número de ovario- esferas. Se utilizó una prueba de ANOVA unidireccional y Tukey Kramer post hoc: **p<0.01 y ***p<0.0001 pcDNA EtOH vs pcDNA E₂ 20 nM, **p<0.01 y ***p<0.0001 pcDNA EtOH vs PinX1S EtOH, y ** p<0.01 y *** p<0.0001 pcDNA E₂ 20 nM vs PinX1S E₂ 20 nM.

Si bien no está registrado que el E₂ incremente el número y tamaño de ovario-esferas provenientes de líneas celulares de COE, existen reportes de que el ER α puede mediar la señalización de estrógenos en CTC de líneas celulares de cáncer de mama y mejorar la transcripción de genes relacionados con las células troncales (Gelsomino et al., 2018). Además, al observar un incremento en el número y tamaño de ovario-esferas de manera dependiente e independiente de E₂, se puede sugerir que los estrógenos y PinX1 tienen un papel no sólo en la proliferación de líneas celulares de COE en monocapa, sino que también en CTC, aunque su función aún no es clara.

11. Discusión de Resultados

El COE es una neoplasia ginecológica que está relacionada con las hormonas esteroides como lo es el estradiol, se ha postulado que los receptores nucleares pueden participar en la formación de complejos proteicos involucrados en la progresión de la enfermedad. Como se

mencionó anteriormente, esto se puede llevar a cabo a través de la señalización hormonal en donde pueden estar involucradas proteínas correguladoras, las cuales inhiben o potencian la función de los factores de transcripción como, por ejemplo, el ER. Ya que los correguladores interactúan físicamente con los factores de transcripción y modulan su actividad, la desregulación de estas proteínas puede generar un incremento en la proliferación y migración de las células cancerosas.

Recientemente, nuestro grupo demostró que PinX1S es un corregulador del ER α al interactuar físicamente con éste y modificar su actividad transcripcional. Además, se ha reportado que PinX1S tiene efectos inversos en el cáncer de mama y de próstata (Flores-Ramírez et al., 2021 y Noriega-Reyes et al., 2015). Por tal motivo, nos interesó realizar un estudio para determinar la relación que existe entre PinX1 y la progresión del COE.

Con la finalidad de analizar el papel de PinX1 en la progresión del COE y la formación de ovarioesferas, en primer lugar, se realizó un estudio *in silico* para revisar la relación entre la expresión de PinX1 con los diferentes tipos histológicos y estadios del COE. Dado que existe una aparente expresión diferencial de PinX1 en el COE, ha sido de interés determinar la expresión diferencial en distintas líneas celulares de COE y poder asociar características específicas de cada subtipo histológico con posibles mecanismos que estén involucrados con PinX1 y la progresión y desarrollo de la enfermedad, por lo que se analizaron dos estudios al respecto para el estudio *in silico* empleando la plataforma Oncomine, uno reportado por Lu en el 2004 y otro por Yoshihara en 2009. De acuerdo con los datos obtenidos de la plataforma Oncomine, Lu y colaboradores reportaron un incremento significativo en la expresión del RNAm de PinX1 en adenocarcinoma de células claras y serosos de COE (Fig. 26 y 27), además de una aparente sobreexpresión en adenocarcinoma endometriode y mucinosos (Fig. 28 y 29), en comparación con tejido normal. Por el contrario, Yoshihara y colaboradores (2009) reportaron una aparente disminución del RNAm de PinX1 en tejidos de adenocarcinomas serosos en comparación con tejido normal (Fig. 32), datos que contradicen lo reportado por Lu, sin embargo, es importante destacar que el número de muestras analizadas suelen ser pocas tanto en el estudio de Lu como de Yoshihara, lo que pudiera ser una variable que afecte los resultado *in silico*. (Lu et al., 2004 y Yoshihara et al., 2009)

Por otro lado, Lu y colaboradores reportaron una aparente disminución del RNAm de PinX1 en adenocarcinomas serosos y endometrioides (Fig. 30 y 31) conforme avanzan los estadios. Esta aparente disminución en adenocarcinomas serosos se observa en los datos reportados por Yoshihara (Fig. 33). Asimismo, de acuerdo con los datos obtenidos de la plataforma UALCAN, la cual realiza un análisis profundo de datos de expresión génica de TCGA (Del inglés Cancer Genome Atlas), se observa la misma tendencia (Fig. 35), (Lu et al., 2004, UALCAN y Yoshihara et al., 2009).

Tomando en cuenta todos estos datos analizados se puede sugerir que la aparente disminución del RNAm de PinX1 puede estar relacionada con la progresión de la enfermedad, al menos en adenocarcinomas serosos y endometrioides, los cuales tienen como factor común en que se expresa el ER, lo que permite suponer que PinX1 tiene un papel inhibitorio y el hecho de que esté disminuido favorece la progresión de estos subtipos de tumores de COE. Esto se refuerza a partir de los datos de supervivencia de las pacientes con COE, obtenida a partir de la plataforma UALCAN (Fig. 37), donde se puede observar que las pacientes con COE que tienen una alta expresión de PinX1 en los primeros 1000 días muestran una mayor supervivencia, sin embargo, si está alta expresión se mantiene, la supervivencia de las pacientes es menor. Este efecto dual se puede explicar en función de que en un inicio puede actuar como un inhibidor de la telomerasa y posiblemente como un coactivador del ER β . De acuerdo con Noriega-Reyes y colaboradores en cáncer de mama PinX1 incrementa la actividad transcripcional de este receptor nuclear, funcionando como un coactivador y dado que su activación por un ligando agonista específico (DPN) inhibe la movilidad e invasión de las células de COE, así como la proliferación y migración celular, se puede sugerir la asociación entre PinX1 y ER β , (Treeck et al., 2007, Feng, 2011 y Noriega-Reyes 2015).

En el mismo estudio *in silico* se observó una disminución en la expresión del RNAm del ER β conforme avanzan los estadios (Fig. 36) y existe una tendencia a una mayor supervivencia de las pacientes cuando existe una alta expresión (Fig. 39), mostrándose como un factor protector.

Está bien establecido que el ER α es de mal pronóstico en el COE mientras que el ER β es de buen pronóstico y esto se puede corroborar al observar que la alta expresión de ER α promueve una

menor sobrevida (Fig. 38) de las pacientes, mientras que la alta expresión de ER β promueve una mayor sobrevida (Fig. 39). De acuerdo con la literatura el ER α en el COE actúa como un promotor de tumores y el ER β actúa como un supresor (Bossard et al., 2012). Además, se encontró que tanto ER α como ER β están presentes en tejidos de ovario normal pero también en tejidos con COE, con una posible reducción de la expresión de ER β a medida que progresa la enfermedad. Ya que existe pérdida de la expresión de ER β , esto podría indicar que ejerce funciones supresoras de tumores. Además, Zhu en el 2011 informó que la reexpresión de ER β inhibe la proliferación de las células de adenocarcinoma de células claras de ovario y es un potencial marcador para la supresión de tumores. (Chan et al., 2014b, Chan et al., 2008, Feng, 2011b y Ng and Wong, 2022)

Por último, mediante la plataforma GeneMANIA se obtuvo un mapa de interacción en donde se confirma que PinX1 está relacionado con la regulación de la actividad de la telomerasa y con la regulación de hormonas esteroides, al observarse una relación con ESR1 o ER α (Fig. 40). (GeneMANIA, 2022)

El ensayo *in silico* permitió empezar a esclarecer la relación de PinX1 en el COE, aunque los resultados no son contundentes dado que las bases de datos no excluyen aquellos subtipos histológicos que expresan los receptores hormonales y las isoformas de PinX1, permitió determinar que la tendencia a disminuir el RNAm y la proteína de PinX1 en muestras de cáncer de ovario en comparación con tejido normal concuerda con lo reportado por Cai en 2010. Además, se confirmó que existe una relación de PinX1 con ER α y que la alta expresión de este receptor es de mal pronóstico para las pacientes, (Cai et al., 2010).

Lo primero que se realizó en forma experimental fue la caracterización de las líneas celulares para determinar la presencia de PinX1 en las tres líneas celulares estudiadas (TOV-112D, SK-OV-3 y OVCAR-3) mediante la técnica de Western Blot. Todas las líneas celulares presentan ambas isoformas de PinX1 (PinX1L y PinX1S) aunque con diferentes intensidades. La línea celular TOV-112D, caracterizada como adenocarcinoma primario de ovario, del subtipo endometriode y que tiene características semejantes a los observados en tumores en etapa IIIC, muestra una baja expresión de ambas isoformas, mientras que la línea celular SK-OV-3, caracterizada como

adenocarcinoma seroso, muestra una mayor expresión. Al igual que SK-OV-3, la línea celular OVCAR-3 es caracterizada como adenocarcinoma seroso y muestra una expresión intermedia a la que se muestra para TOV-112D y SK-OV-3. Dado que, la línea celular TOV-112D proviene de adenocarcinoma maligno; Grado 3, etapa IIIC, se puede sugerir que la baja presencia de PinX1 se relaciona con su estadificación avanzada, dicha hipótesis se ve reforzada al observar la gráfica de Kaplan Meier de pacientes con COE en donde la baja expresión de PinX1 genera una menor supervivencia de estas (Fig.39). Asimismo, si tomamos en cuenta su función de PinX1 como inhibidor de la telomerasa y que la elongación telomérica es un proceso común en diversos tipos de cánceres epiteliales avanzados y es de mal pronóstico, se puede sugerir que los cánceres con estadificación avanzada presentan una menor expresión de PinX1 en comparación de cánceres tempranos.

Las células que se ocuparon para este proyecto expresan el ER α , por lo que a las líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3 al incubarse con E₂ incrementaron la proliferación celular a los 6 días de estimulación (Fig. 47 y 48), indicando que son estrógeno reguladas. Esto concuerda con lo demostrado en células de COE que son ER α positivas y estimuladas con E₂, donde se observó que incrementan su proliferación celular significativamente a los 4 días de estímulo (K. K.-L. Chan et al., 2014). Asimismo, existen informes en donde se confirma que las células de COE responden a E₂ tras un incremento proliferativo (Langdon et al., 1990 y Langdon et al., 1994).

Dado que existe una expresión diferencial de PinX1 en tejidos neoplásicos y en las células de COE, es importante determinar el efecto que ejerce PinX1 sobre estas. Conjuntamente con estos datos, se ha observado en biopsias de COE invasivo (Tabla 2) en donde la expresión de PinX1 se ve reducida en comparación con el tejido normal. Ahondando con la función que puede tener PinX1 sobre el COE, estudios previos en nuestro grupo determinaron que la sobreexpresión de PinX1S es capaz de reducir la proliferación celular desde el día 1 y disminuye notablemente tras 48 y 72 horas (Fig. 27). Por lo que para esclarecer el papel de PinX1S se silenció su expresión en dos líneas celulares de COE, observándose que en la línea celular TOV-112D desde el día 4 hay un incremento en la proliferación celular, con un máximo en el día 6 (Fig. 48), mientras que para la línea celular SK-OV-3 se observa un incremento de la proliferación celular a partir del día 6 (Fig. 49), esta respuesta celular puede ser explicada debido a que el

silenciamiento de PinX1 es más evidente para la línea celular TOV-112D que para SK-OV-3. Nuestro grupo de investigación ha reportado mediante ensayos “pull-down” que PinX1S interacciona con la región N-terminal del ER α y ER β y mediante ensayos de co-inmunoprecipitación se confirmó la interacción que existe entre PinX1 y ER α , en conjunto con estos hallazgos y mediante ensayos de expresión, empleando el gen reportero de la luciferasa en células de cáncer de mama, se comprobó que PinX1S tiene un efecto inhibitorio sobre la activación transcripcional de ER α de manera dependiente de E₂ y su silenciamiento promueve un incremento en la actividad transcripcional de este receptor. Además es reclutado en promotores de genes dianas del complejo ER α -ligando, fungiendo como un correpresor en líneas celulares de cáncer de mama (Noriega-Reyes et al., 2015). De acuerdo con estos datos y que el silenciamiento de PinX1 va dirigido principalmente para PinX1S, se sugiere que el incremento en la proliferación celular dependiente de E₂ está mediado por la isoforma corta y es a través de su actividad como correpresor de ER α como se observa en líneas celulares de cáncer de mama.

Está bien esclarecido que los telómeros son estructuras que se encuentran al final de los cromosomas en células eucariotas conformadas por secuencias tándem TTAGGG. Cuando las células se dividen existe una pérdida de DNA telomérico y por lo tanto un desgaste del telómero, cuando éste alcanza una longitud crítica, el ciclo celular se detiene mediante la activación de vías de señalización de apoptosis y senescencia celular. (Button et al., 2022) Si no existe una correcta regulación en este proceso, los telómeros se siguen elongando y este proceso está relacionado con la inmortalización celular y con el inicio de enfermedades como el cáncer. Teniendo en cuenta que PinX1 es una proteína inhibidora de la telomerasa al interactuar con TRF1 mediante un mecanismo de retroalimentación negativa (Fig.23), PinX1 podría estar fungiendo su acción a través de su actividad canónica, pues al silenciarla se sugiere que no puede inhibir la actividad de la telomerasa, dando como resultado un incremento en la proliferación celular independiente de ligando agonista. Aunque esto es debatible, ya que el silenciamiento de PinX1 está preferentemente dirigido para PinX1S.

Recientemente se reportó que la inhibición de PinX1L, mediante siRNAs específicos, en la línea celular de pulmón LLC dio como resultado un incremento en la proliferación celular, de la misma

manera como se observa en líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3. Además, se ha reportado que su silenciamiento también promueve la migración y viabilidad celular (Yao et al., 2022). Asimismo, se han descrito vías de señalización en donde PinX1 se encuentra involucrado y por las cuales puede modular su acción proliferativa. Se realizaron ensayos en líneas celulares de cáncer de pulmón de células no pequeñas en donde se silenció a PinX1 mediante siRNA teniendo como resultado un incremento en la expresión de la proteína Bcl-2 (proteína antiapoptótica) y reduce la expresión de la proteína Bax (proteína apoptótica). Además, existe un incremento en la presencia de CDK4, Ciclina D1, Ciclina D2 y p-Rb, demostrando que el efecto que tiene sobre la proliferación celular está mediado por el aumento o disminución de proteínas involucradas con la apoptosis y con la modulación de vías de señalización P15/ciclina D1 (Tian et al., 2017).

Por otro lado, existen hallazgos en tumores malignos que identifican la pérdida de la expresión de PinX1 como una característica clave en el desarrollo del tumor, junto con la pérdida de heterocigosidad, la cual está correlacionada con una expresión reducida de PinX1 en los casos de cáncer (Kondo et al., 2005). Zhou y colaboradores informaron que la expresión de PinX1 se redujo en la mayoría de los tejidos y líneas celulares de cáncer de mama, la pérdida del alelo PinX1 provocó que la mayoría de los ratones desarrollaran una variedad de cánceres epiteliales. El mecanismo implica inestabilidad cromosómica: pérdida del alelo 8p23 (Shi et al., 2014 y Zhou, 2011). No sólo en el cáncer de mama se ha visto una expresión reducida de PinX1, sino que también se ha visto en el cáncer de ovario (Cai et al., 2010), gástrico (Kondo et al., 2005 y Ma et al., 2009) y en hígado (Park et al., 2002). En el COE, Cai y colaboradores indicaron que la expresión disminuida de PinX1 funciona como un marcador de resultados desfavorables para las pacientes y parece afectar el tiempo de supervivencia. Mientras que Shi y colaboradores reportaron que la expresión reducida de PinX1 juega un papel clave en la tumorigénesis del cáncer de próstata, demostrando que la expresión del RNAm estaba regulado a la baja en los tejidos de cáncer de próstata en comparación con tejido normal (Shi et al., 2014). Además, PinX1 se ha visto involucrado en la quimioresistencia, Qian y colaboradores reportaron que PinX1 se encontraba sobreexpresado frecuentemente en tejidos de carcinoma de células escamosas de esófago y se correlaciona positivamente con la resistencia a la quimioresistencia.

Por lo tanto, propusieron que la eliminación de PinX1 por shRNA podría aumentar la sensibilidad de las células escamosas de esófago, sin embargo, no tuvo impacto en las células al 5-fluorouracil y al cisplatino (Qian et al., 2013). Al observar que en diversos estudios utilizan líneas celulares en monocapa, en donde se ha observado que el silenciamiento de PinX1 incrementa la proliferación celular, además dicha disminución también se observa en tejidos de diversos cánceres correlacionándose con un mal pronóstico, quisimos determinar el efecto que ejerce PinX1 sobre un modelo tridimensional enriquecido de CTC, ya que de acuerdo con los resultados obtenidos en líneas celulares de COE en monocapa se determinó que PinX1S juega un papel en la proliferación celular de manera dependiente e independiente de estrógenos (E_2), por consiguiente especulamos que PinX1S podría tener influencia sobre el tamaño y número de ovario-esferas, y si esto es correcto, se podría dar una posible explicación del efecto quimiorresistente que se le atribuye.

Las CTC se encuentran en una pequeña subpoblación de células cancerosas en el tumor, teniendo la capacidad de autorrenovarse y diferenciarse. Son conocidas por su resistencia a la quimioterapia y radioterapia, y al mismo tiempo se cree que son las responsables de la iniciación, crecimiento y recurrencia del tumor, por lo que han despertado un reciente interés para su investigación. El COE tiene una tasa de supervivencia baja, debido a que las pacientes son detectadas en etapas avanzadas (FIGO III o IV), esto quiere decir que es detectado cuando hay presencia de metástasis. La mayoría de las pacientes inicialmente responden a la quimioterapia, pero la tasa de recaída es de aproximadamente el 85% después de 2 años posteriores a una cirugía citorréductora y quimioterapia (Al-Hajj et al., 2003 y Liao et al., 2014). Asimismo, la principal forma de metástasis del COE implica el desprendimiento de células del tumor primario hacia la cavidad abdominal, seguido de la implantación en el revestimiento mesotelial del peritoneo (Liao et al., 2014). Dado que actualmente hay datos en donde demuestran que las ovario-esferas se encuentran comúnmente en la ascitis, y se encuentran enriquecidas de CTC, las cuales son capaces de formar tumores teniendo una baja respuesta a fármacos, dado que cuentan con características de malignidad, propusimos a las ovario-esferas como modelo de estudio novedoso (Gunay et al., 2020).

Para generar las ovario-esferas se generó un modelo de cultivo celular que nos permitiera enriquecer el número de células con características de CTC. Para lograr esto, las células fueron cultivadas en condiciones no adherentes de modo que se tuvo como resultado la generación de ovario-esferas, producto de la autorrenovación celular. De acuerdo con lo reportado, la identificación de las CTC se basa en la presencia de marcadores de superficie celular. En el COE, se utilizan diversos marcadores como: CD133, CD44, CD24, CD117 y ALDH (Suster y Virant-Klun, 2019). CD44 y CD133 son marcadores de superficie en el COE más comunes por lo que se estableció utilizarlos para la identificación de las CTC en las ovario-esferas obtenidas a partir de las líneas celulares TOV-112D y OVCAR-3.

CD133 es una glicoproteína transmembranal que promueve la formación de tumores, la progresión de la enfermedad, la quimio resistencia y un mal pronóstico, tanto en el COE como en glioblastoma, colon y pulmón. Por otro lado, CD44 también es una glicoproteína transmembranal que está asociada con la formación de tumores, metástasis, mal pronóstico, quimio resistencia y recurrencia de la enfermedad, no solo en el COE, sino que también en cáncer de próstata, gástrico, mama, colon, pulmón, páncreas, cabella y cuello. Los primero que se realizó fue la cinética que se realizó para conocer en qué días las ovario-esferas expresan una mayor cantidad de marcadores de superficie CD44, CD133 o CD44/CD133 en la línea celular TOV-112D y OVCAR-3.

Los primeros resultados obtenidos fueron provenientes de la cinética que se realizó para conocer el número de células que se deben sembrar y el día en que las ovario-esferas en cultivo expresan una mayor cantidad de marcadores de superficie. Para la línea celular TOV-112D se determinó que las condiciones adecuadas para tener un mayor porcentaje de células dobles positivas (CD44/CD133) era al sembrar 10 000 células y recolectarlas al quinto día obteniendo 78.95% de células dobles positivas en comparación con el 32.3% en el control (monocapa). Mientras que para la línea celular OVCAR-3 se obtuvo un 42.2% en el control y al sembrar 50 000 células y recolectarlas al tercer día se tiene un enriquecimiento del 89.4% de células positivas para CD44, pero no se enriquecieron celular CD133+. Además, en un inicio se pretendió realizar ensayos de formación de ovario-esferas para la línea celular SK-OV-3, sin embargo, el control mostraba 83.3% de células doble positivas, por lo tanto, se descartó este

modelo de estudio. Realizar la cinética de expresión de los marcadores de superficie fue de vital importancia ya que de acuerdo con la literatura la mayoría no reportan la cinética de enriquecimiento. De acuerdo con Liu en el 2020 quién a partir de la cinética de dos líneas celular de COE (OVCAR-3 y SK-OV-3) reportó que no existe un incremento significativo en el porcentaje de CD44 y CD133 a los 4 y 6 días en ovario-esferas obtenidas de la línea celular OVCAR-3 en comparación con el día cero (monocapa), la cinética de expresión de CD133 concuerda con nuestros resultados, dado que al sembrar 10 000, 20 000, 40 000 y 50 000 células no hubo enriquecimiento de este marcador; sin embargo se logró enriquecer células CD44+. Además, cabe destacar que el que no se haya obtenido un enriquecimiento de CD133 se puede deber a que, si bien existen marcadores para detectar a las CTC en diferentes tipos de cánceres, estos no son específicos ni universales para cada uno (Adorno-Cruz et al., 2015 y Liu et al., 2020), por lo que se podría utilizar otro marcador para CTC como por ejemplo, CD177 o ALDH. Por otro lado, de acuerdo con Liu para la línea celular SK-OV-3 no hubo enriquecimiento del porcentaje de células positivas para CD44 a los 4 y 6 días, pero sí para CD133, los datos reportados en el control concuerdan con nuestros resultados dado que Liu muestra aproximadamente el 100% y 10% de positividad para CD44 y CD133 respectivamente. Al igual que Liu, Nam estableció que las células SK-OV-3 en monocapa presentan un alto porcentaje de células CD44 positivas con un 97.8% (Nam et al., 2012). Es curioso que la línea celular SK-OV-3 presente una alta expresión de marcadores de CTC, sin embargo, esto puede tener relación con su capacidad que tiene para generar tumores en ratones inmunodeficientes y ser una línea altamente quimiorresistente (Ma et al., 2010). Sin embargo, se necesita más investigaciones debido a la complejidad para definir la población de CTC y las funciones que tienen en líneas celulares en monocapa (Liu et al., 2020). Para la línea celular TOV-112D, Nam demostró la capacidad de crecimiento independiente de anclaje y la capacidad de formar ovario-esferas en esta línea celular al sembrar 5 000 células y al recolectarlas al día 14, observando mediante citometría de flujo que existe un incremento significativo en células positivas para CD133 (5.07%) y CD44 (10.69%) en comparación con el cultivo en monocapa (CD133 0.29% y CD44 10.69%) y aunque nuestros resultados tuvieron una cinética de 3, 5 y 7 días, encontramos un enriquecimiento para células dobles positivas (Nam et al., 2012).

Por último y no menos relevante se determinó el efecto que ejerce PinX1 sobre la formación de ovario-esferas en términos de número y tamaño. El E_2 es un potente mitógeno en células hormono reguladas, como son las células de COE las cuales incrementan su proliferación celular en presencia de E_2 . En la línea celular TOV-112D y OVCAR-3 se demostró que el estímulo con E_2 incremento el número y tamaño de ovario-esferas y se encontró que la expresión aumentada de PinX1S es capaz de disminuir la formación de ovario-esferas al disminuir significativamente el número y tamaño de estas de manera dependiente e independiente de ligando agonista, mientras que el silenciamiento incrementa el número y tamaño de ovario-esferas en la línea celular TOV-112D. Estos datos son de relevancia ya que no existen reportes del efecto que tiene PinX1 en ovario-esferas ni el efecto que tiene el ER sobre estas. Sin embargo, se ha aceptado la idea de que las hormonas esteroides mantienen a la población de CTC en tejido de mama normal y neoplásicas, pero esto aún es debatible (Morimoto et al., 2009).

A través de estos resultados se puede sugerir que existe una vía dependiente e independiente de estrógenos por la cual PinX1S está llevando a cabo su acción. De manera independiente dado que se observa que al estar sobreexpresando o silenciando a PinX1S disminuye o incrementa el número y tamaño de ovario-esferas, respectivamente, indicando que la respuesta no depende de tratamiento hormonal. Por otro lado, se puede sugerir que existe una vía hormono regulada, dado que al estimular las células con E_2 cuando PinX1S esta sobreexpresado disminuye el número y tamaño de ovario-esferas y cuando se silencia se ve un efecto contrario. La vía de señalización podría implicar la acción que tiene PinX1S como proteína correpresora de $ER\alpha$, como se muestra en el cáncer de mama, si se inhibe a PinX1 se tendría un incremento en la activación de $ER\alpha$, favoreciendo un incremento en el número y tamaño de ovario-esferas. Sin embargo, esto no es concluyente ya que se requiere esclarecer si PinX1S actúa como una proteína coactivadora o correpresora en células de COE y a través de qué receptor de estrógenos ($ER\alpha$ o $ER\beta$) está llevando a cabo su acción.

En el cáncer de mama se han detectado mutaciones en el dominio LBD del $ER\alpha$ en estadios donde existe metástasis y en los cánceres resistentes a terapia endocrina. Se sabe que la mayoría de las mutaciones ocurren especialmente en el bucle que conecta las hélices α 11 y 12, promoviendo un cambio conformacional agonista en el receptor y modificando el reclutamiento

dinámico de coactivadores/correpresores, dando como resultado una activación del ER α independiente de estrógenos. Según Gelsomino y colaboradores, en líneas celulares con expresión normal de ER α (MCF-7) se observa una menor proporción de células CD44+, niveles de RNAm característicos de CTC (CD44, OCT4 y SOX2) y menor eficiencia de formación de mamíferas en comparación con líneas celulares que presentaban el ER α mutante (Y537S, Y537N y D538G), estimulando la progresión de la enfermedad.

Aunque en el cáncer de mama se sabe completamente que el estrógeno (E₂) y su receptor son cruciales para la regulación del crecimiento y progresión de la enfermedad, el papel que tienen sobre las CTC no está completamente definido y aún sigue siendo controvertido. Estudios han demostrado una regulación directa de la actividad de las CTC por parte de estrógenos, mientras que otros informes han descrito que los estrógenos inducen la actividad de las CTC de forma paracrina a través de FGF/FGFR/Tbx3 (Fillmore et al., 2010). Según Fillmore y colaboradores, la estimulación con E₂ 1nM durante seis días induce significativamente la expansión de las CTC (CD44+, CD24- bajo y ESA: antígeno epitelial específico) y formación de mamoesferas de la línea celular MCF-7 en comparación con el control (EtOH). Además, comprobaron que la señalización de FGF/Tbx3 es necesaria para modular la expansión de CTC inducida por E₂. Al unirse el E₂ al ER α induce la secreción de FGF9 y la expresión de Tbx3, además la presencia de Tbx3 conduce una mayor expresión de Wnt y FGF para perpetuar la señalización y finalmente la expansión del CTC (Fillmore et al., 2010). Por otro lado, existen datos que apoyan la idea de que los estrógenos tienen influencia a través de mecanismo paracrinos, ya que se ha demostrado que las CTC CD44+/ CD24- bajo y ALDH+ carecen de la expresión de ER o lo expresan en niveles muy bajos, aunque estos datos no son concluyentes (Simões et al., 2015). Además, se ha investigado la señalización de Notch como una probable vía paracrina, ya que se ha informado que la actividad de la vía de Notch1 se aumenta después de la exposición a estrógenos, posiblemente porque desempeña un papel importante en células progenitoras luminales tempranas en lugar de las CT de la mama (Harrison et al., 2013). En el COE las vías de señalización responsables de la troncalidad son clave para la supervivencia de las CTC, incluyendo la vía NOTCH y se ha registrado que alrededor de un cuarto de los tumores presentan una expresión alterada de genes responsables de la regulación de esta vía, incluyendo la sobreexpresión de Notch, además

está vía también puede regular a OCT4 y NANOG (Wilczyński et al., 2022), genes característicos de las CTC. Existe registro de que la vía NOTCH podría estar regulada por la actividad del ER directa o indirectamente (Bai et al., 2020). Hao y colaboradores informaron que genes blanco del complejo ER α /E₂ como VEGF α , CD44, pS2 y ciclina-D1 aumentaban su expresión del RNAm en ausencia de E₂. Por lo que buscaron identificar los mecanismos moleculares mediante los cuales Notch activó la transcripción dependiente de ER α independiente de E₂ utilizando el modelo transcripcional pS2, descubriendo que Jageed-1 estimuló el reclutamiento de Notch1, IKK α , MAML1, p300/CBP y ER α en el promotor pS2 (Hao et al., 2010). Por otro lado, se ha informado que los estrógenos pueden influir en las CTC en cáncer de mama a través de una señalización no genómica por la participación del receptor 30 acoplado a la proteína G (GPR30), aunque esto aún no está claro (Zhou et al., 2015).

Otros estudios apoyan la idea de que las CTC no presentan el ER α y más bien el receptor surge del cáncer de mama original, es decir, se expresará en las CTC derivadas de cáncer de mama ER α -positivas, mientras que estará ausente en CTC derivadas de ER α -negativas (Xu et al., 2011). De acuerdo con la literatura, los estrógenos actúan activando ER α en esferoides tumorales derivados de células MCF-7 recolectadas en el día 21. Se ha observado que con la estimulación de E₂ aumenta los niveles de PI-9, un inhibidor de la granzima B, perjudicando la vigilancia inmunológica e incrementando el número y tamaño de esferoides (Lauricella et al., 2016). Además, las esferoides derivadas de células de cáncer de mama en aproximadamente el 50% presentan el ER β y se coexpresa con CD44 y ALDH1 en ausencia de ER α . ER β fue responsable del crecimiento de las esferoides, por lo que podría considerarse como un marcador de CTC en cáncer de mama (Ma et al., 2017). Dado que todavía no están completamente establecidas las funciones del ER α en las CTC de cáncer de mama y mucho menos en el COE, queda mucho por investigar. Además, no se tiene reporte del efecto que tienen los receptores nucleares en las CTC de COE, sería de interés caracterizar estos efectos, así como determinar qué relación tiene PinX1 con otros marcadores de troncalidad como SOX2, NANOG y OCT4 los cuales son factores de transcripción que están presentes en las CTC que regulan distintos procesos como la autorrenovación, diferenciación y proliferación. Siendo esto de suma importancia dado que no

se ha reportado ninguna relación entre PinX1 y estos factores de transcripción característicos de CTC.

Dado que el 61-79% de las pacientes con COE expresan el ER (Langdon et al., 2017) y de manera general el tratamiento por excelencia es la cirugía citorreductora y quimioterapia combinada basada en platino (cisplatino) y taxanos (paclitaxel), dejando a la terapia hormonal como un tratamiento poco usado, se propone ver el efecto del SERM tamoxifeno sobre la proliferación celular en células en monocapa de COE. De acuerdo con lo reportado ya se ha establecido que en líneas celulares en monocapa (SK-OV-3 y OV2008) el tratamiento con tamoxifeno 100 nM y 1 μ m inhibe la proliferación celular a los 4 días de tratamiento con respecto al control (DMSO), (K. K.-L. Chan et al., 2014). Sería de utilidad determinar el efecto que tiene el tamoxifeno de manera basal en líneas celulares de COE y cuando está sobreexpresado o inhibido PinX1S. Además, determinar el efecto que tiene el tratamiento de tamoxifeno en ovario-esferas enriquecidas con CTC y con la sobreexpresión o inhibición de PinX1S, dado que se ha estipulado que son quimioresistentes.

12. Conclusiones y perspectivas

12.1 Conclusiones

- De acuerdo con los resultados *in silico* la expresión del RNAm y de la proteína tiende a bajar, como se observa con lo reportado por Cai en 2010, aunque estos datos no son contundentes.
- Existe una tendencia en disminuir la expresión del RNAm de PinX1 en adenocarcinoma seroso de ovario en comparación con tejido normal y dicha disminución se asocia a estadios avanzados.
- La alta expresión del ER α en pacientes con COE es de mal pronóstico, pero la alta expresión del ER β es de buen pronóstico.
- Las líneas celulares TOV-112D, SK-OV-3 y OVCAR-3 se reportan positivas para la presencia de la proteína PinX1L y PinX1S, donde TOV-112D presenta una menor expresión de ambas isoformas, mientras que SK-OV-3 una mayor expresión.
- El silenciamiento de PinX1 preferencialmente va dirigido a PinX1S y el plásmido más eficiente es shPinX1#2 para las líneas celulares TOV-112D y SK-OV-3, además el silenciamiento es más evidente para TOV-112D.

- El silenciamiento de PinX1 incrementa la proliferación celular en ambas líneas celulares de manera dependiente e independiente de E_2 , posiblemente por su acción como proteína correguladora de receptores hormonales.

-Las líneas celulares SK-OV-23, TOV-112D y OVCAR-3 tienen la capacidad de formar ovario-esferas.

-El enriquecimiento de CTC no es directamente proporcional con el número de células cultivadas ni con el tiempo de recolecta y los marcadores de superficie celular no son específicos ni universales.

-Las condiciones óptimas para obtener ovario-esferas enriquecidas con CTC de la línea celular TOV-112D es cultivando 10 000 células y recolectándolas al 5to día, mientras que para la línea celular OVCAR-3 es cultivando 50 000 células y recolectándolas al 3er día.

-La sobreexpresión de PinX1S disminuye el número y tamaño de ovario-esferas en la línea celular TOV-112D y OVCAR-3 de manera dependiente e independiente de ligando agonista, mientras que el silenciamiento incrementa el número y tamaño de ovario-esferas en la línea celular TOV-112D.

12.2 Perspectivas

-De acuerdo con los datos reportados, se sugiere una aparente expresión diferencial de PinX1 en COE, por lo que sería de relevancia determinar cuantitativamente la expresión de PinX1 en biopsias de diferentes subtipos histológicos.

-Dado que PinX1 es un corregulador de receptores hormonales, se debe determinar a través de qué receptor de estrógenos ($ER\alpha$ o $ER\beta$) está llevando a cabo su acción y las vías de señalización por las cuales está actuando, mediante ensayos de luciferasa utilizando ligandos agonistas para cada ER (PPT y DPN).

-Se requiere determinar si la sobreexpresión o el silenciamiento de PinX1 cambia el porcentaje de CTC a través de los marcadores de superficie celular.

-Ya que la sobreexpresión de PinX1S disminuye el número y tamaño de ovario-esferas y su silenciamiento muestra en efecto contrario, se requiere determinar por qué vías de señalización

está llevando a cabo su acción y determinar cuantitativamente la expresión de marcadores de troncalidad: SOX2, OCT4 y NANOG.

-Dado que las CTC son quimioresistentes, se sugiere dar un tratamiento hormonal dirigido al ER α a las ovario-esferas cuando está sobreexpresado o silenciado PinX1 y ver su efecto.

13. Referencias

- Adorno-Cruz, V., Kibria, G., Liu, X., Doherty, M., Junk, D. J., Guan, D., Hubert, C., Venere, M., Mulkearns-Hubert, E., Sinyuk, M., Alvarado, A., Caplan, A. I., Rich, J., Gerson, S. L., Lathia, J., & Liu, H. (2015). Cancer Stem Cells: Targeting the Roots of Cancer, Seeds of Metastasis, and Sources of Therapy Resistance. *Cancer Research*, 75(6), 924-929. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-3225>
- Akahira, J.-I., Yoshikawa, H., Shimizu, Y., Tsunematsu, R., Hirakawa, T., Kuramoto, H., Shiromizu, K., Kuzuya, K., Kamura, T., Kikuchi, Y., Kodama, S., Yamamoto, K., & Sato, S. (2001). Prognostic Factors of Stage IV Epithelial Ovarian Cancer: A Multicenter Retrospective Study. *Gynecologic Oncology*, 81(3), 398-403. <https://doi.org/10.1006/gyno.2001.6172>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(7), 3983-3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Ali, A. T. (2018). Fertility Drugs and Ovarian Cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 18(6), 567-576. <https://doi.org/10.2174/1568009617666170620102049>
- Anbalagan, M., & Rowan, B. G. (2015). Estrogen receptor alpha phosphorylation and its functional impact in human breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 418, 264-272. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.01.016>
- Arnal, J.-F., Lenfant, F., Metivier, R., Flouriot, G., Henrion, D., Adlanmerini, M., Fontaine, C., Gourdy, P., Chambon, P., Katzenellenbogen, B., & Katzenellenbogen, J. (2017). Membrane and Nuclear Estrogen Receptor Alpha Actions: From Tissue Specificity to Medical Implications. *Physiological Reviews*, 97(3), 1045-1087. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2016>
- Ayob, A. Z., & Ramasamy, T. S. (2018). Cancer stem cells as key drivers of tumour progression. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 20. <https://doi.org/10.1186/s12929-018-0426-4>
- Bai, J.-W., Wei, M., Li, J.-W., & Zhang, G.-J. (2020). Notch Signaling Pathway and Endocrine Resistance in Breast Cancer. *Frontiers in Pharmacology*, 11, 924. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00924>
- Banik, S. S. R., & Counter, C. M. (2004). Characterization of Interactions between PinX1 and Human Telomerase Subunits hTERT and hTR. *Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 51745-51748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408131200>
- Barakat, R., Oakley, O., Kim, H., Jin, J., & Ko, C. J. (2016). Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. *BMB Reports*, 49(9), 488-496. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2016.49.9.141>
- Barbato, L., Bocchetti, M., Di Biase, A., & Regad, T. (2019). Cancer Stem Cells and Targeting Strategies. *Cells*, 8(8), 926. <https://doi.org/10.3390/cells8080926>

- Bareppady, S., & Nayak, S. (2019). Relation of Menarche, and Breast and Ovarian Cancer in Women. *Journal of Health and Allied Sciences NU*, 09(02), 76-80. <https://doi.org/10.1055/s-0039-1700665>
- Barzegar Behrooz, A., Syahir, A., & Ahmad, S. (2019). CD133: Beyond a cancer stem cell biomarker. *Journal of Drug Targeting*, 27(3), 257-269. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1479756>
- Bjerkvig, R., Tysnes, B. B., Aboody, K. S., Najbauer, J., & Terzis, A. J. A. (2005). Opinion: The origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nature Reviews. Cancer*, 5(11), 899-904. <https://doi.org/10.1038/nrc1740>
- Bossard, C., Busson, M., Vindrieux, D., Gaudin, F., Machelon, V., Brigitte, M., Jacquard, C., Pillon, A., Balaguer, P., Balabanian, K., & Lazennec, G. (2012). Potential role of estrogen receptor beta as a tumor suppressor of epithelial ovarian cancer. *PLoS One*, 7(9), e44787. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044787>
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005). Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 122(6), 947-956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Braem, M. G. M., Onland-Moret, N. C., van den Brandt, P. A., Goldbohm, R. A., Peeters, P. H. M., Kruitwagen, R. F. P. M., & Schouten, L. J. (2010). Reproductive and Hormonal Factors in Association With Ovarian Cancer in the Netherlands Cohort Study. *American Journal of Epidemiology*, 172(10), 1181-1189. <https://doi.org/10.1093/aje/kwq264>
- Bregenzler, M. E., Horst, E. N., Mehta, P., Novak, C. M., Repetto, T., & Mehta, G. (2019). The Role of Cancer Stem Cells and Mechanical Forces in Ovarian Cancer Metastasis. *Cancers*, 11(7), E1008. <https://doi.org/10.3390/cancers11071008>
- Brett M., R., Jennifer B., P., Thomas A., S., Brett M., R., Jennifer B., P., & Thomas A., S. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: A review. *Cancer Biology & Medicine*, 14(1), 9-32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>
- Bruce, C. (2019). *Embriología humana y biología del desarrollo* (6th ed.). Elsevier.
- Burgos-Ojeda, D., Rueda, B. R., & Buckanovich, R. J. (2012). Ovarian cancer stem cell markers: Prognostic and therapeutic implications. *Cancer Letters*, 322(1), 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2012.02.002>
- Button, L., Rogers, B., Thomas, E., Bradfield, A., Alnafakh, R., Drury, J., & Hapangama, D. K. (2022). Telomere and Telomerase-Associated Proteins in Endometrial Carcinogenesis and Cancer-Associated Survival. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(2), 626. <https://doi.org/10.3390/ijms23020626>
- Cai, M.-Y., Zhang, B., He, W.-P., Yang, G.-F., Rao, H.-L., Rao, Z.-Y., Wu, Q.-L., Guan, X.-Y., Kung, H.-F., Zeng, Y.-X., & Xie, D. (2010a). Decreased expression of PinX1 protein is correlated with tumor development and is a new independent poor prognostic factor in ovarian carcinoma. *Cancer Science*, 101(6), 1543-1549. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01560.x>
- Cai, M.-Y., Zhang, B., He, W.-P., Yang, G.-F., Rao, H.-L., Rao, Z.-Y., Wu, Q.-L., Guan, X.-Y., Kung, H.-F., Zeng, Y.-X., & Xie, D. (2010b). Decreased expression of PinX1 protein is correlated with tumor development and is a new independent poor prognostic factor in ovarian

- carcinoma. *Cancer Science*, 101(6), 1543-1549. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01560.x>
- Calderon-Margalit, R., Friedlander, Y., Yanetz, R., Kleinhaus, K., Perrin, M. C., Manor, O., Harlap, S., & Paltiel, O. (2008). Cancer Risk After Exposure to Treatments for Ovulation Induction. *American Journal of Epidemiology*, 169(3), 365-375. <https://doi.org/10.1093/aje/kwn318>
- Canaz, E., Grabowski, J. P., Richter, R., Braicu, E. I., Chekerov, R., & Sehouli, J. (2019). Survival and prognostic factors in patients with recurrent low-grade epithelial ovarian cancer: An analysis of five prospective phase II/III trials of NOGGO metadata base. *Gynecologic Oncology*, 154(3), 539-546. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.06.014>
- Chan, K. K. L., Wei, N., Liu, S. S., Xiao-Yun, L., Cheung, A. N., & Ngan, H. Y. S. (2008). Estrogen Receptor Subtypes in Ovarian Cancer: A Clinical Correlation. *Obstetrics & Gynecology*, 111(1), 144-151. <https://doi.org/10.1097/01.AOG.0000296715.07705.e9>
- Chan, K. K.-L., Leung, T. H.-Y., Chan, D. W., Wei, N., Lau, G. T.-Y., Liu, S. S., Siu, M. K.-Y., & Ngan, H. Y.-S. (2014a). Targeting estrogen receptor subtypes (ER α and ER β) with selective ER modulators in ovarian cancer. *The Journal of Endocrinology*, 221(2), 325-336. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0500>
- Chan, K. K.-L., Leung, T. H.-Y., Chan, D. W., Wei, N., Lau, G. T.-Y., Liu, S. S., Siu, M. K.-Y., & Ngan, H. Y.-S. (2014b). Targeting estrogen receptor subtypes (ER α and ER β) with selective ER modulators in ovarian cancer. *Journal of Endocrinology*, 221(2), 325-336. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0500>
- Chan, K. K.-L., Leung, T. H.-Y., Chan, D. W., Wei, N., Lau, G. T.-Y., Liu, S. S., Siu, M. K.-Y., & Ngan, H. Y.-S. (2014c). Targeting estrogen receptor subtypes (ER α and ER β) with selective ER modulators in ovarian cancer. *Journal of Endocrinology*, 221(2), 325-336. <https://doi.org/10.1530/JOE-13-0500>
- Chen, C., Zhao, S., Karnad, A., & Freeman, J. W. (2018). The biology and role of CD44 in cancer progression: Therapeutic implications. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), 64. <https://doi.org/10.1186/s13045-018-0605-5>
- Chen, G., Da, L., Wang, H., Xu, Y., Chen, G., Sun, C., Wang, L., Zhao, J., Zhang, F., Feng, J., Wang, Y., Tiollais, P., Li, T., & Zhao, M. (2011). HIV-Tat-Mediated Delivery of an LPTS Functional Fragment Inhibits Telomerase Activity and Tumorigenicity of Hepatoma Cells. *Gastroenterology*, 140(1), 332-343. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.08.046>
- Chen, S., Li, Y., Qian, L., Deng, S., Liu, L., Xiao, W., & Zhou, Y. (2021). A Review of the Clinical Characteristics and Novel Molecular Subtypes of Endometrioid Ovarian Cancer. *Frontiers in Oncology*, 11, 668151. <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.668151>
- Cho, K. R., & Shih, I.-M. (2009). Ovarian Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 4(1), 287-313. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.4.110807.092246>
- Cibula, D., Widschwendter, M., Zikan, M., & Dusek, L. (2011). Underlying mechanisms of ovarian cancer risk reduction after tubal ligation: Ovarian cancer risk after tubal ligation. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 90(6), 559-563. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0412.2011.01114.x>
- Collaborative Group on Epidemiological Studies of Ovarian Cancer. (2008). Ovarian cancer and oral contraceptives: Collaborative reanalysis of data from 45 epidemiological studies

- including 23 257 women with ovarian cancer and 87 303 controls. *The Lancet*, 371(9609), 303-314. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)60167-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60167-1)
- Cramer, D. W., Welch, W. R., Scully, R. E., & Wojciechowski, C. A. (1982). Ovarian cancer and talc: A case-control study. *Cancer*, 50(2), 372-376. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19820715\)50:2<372::aid-cnrcr2820500235>3.0.co;2-s](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19820715)50:2<372::aid-cnrcr2820500235>3.0.co;2-s)
- Dahlman-Wright, K., Qiao, Y., Jonsson, P., Gustafsson, J.-Å., Williams, C., & Zhao, C. (2012). Interplay between AP-1 and estrogen receptor α in regulating gene expression and proliferation networks in breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 33(9), 1684-1691. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs223>
- Dasgupta, S., Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2014). Nuclear Receptor Coactivators: Master Regulators of Human Health and Disease. *Annual Review of Medicine*, 65(1), 279-292. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-051812-145316>
- Dontu, G., Al-Hajj, M., Abdallah, W. M., Clarke, M. F., & Wicha, M. S. (2003). Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Proliferation*, 36 Suppl 1, 59-72. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2184.36.s.1.6.x>
- Doubeni, C. A., Doubeni, A. R., & Myers, A. E. (2016). Diagnosis and Management of Ovarian Cancer. *American Family Physician*, 93(11), 937-944.
- ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DEL DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO) (N.º 105/21; p. 2). (2021). INEGI. https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2021/cancer2021_Nal.pdf
- Evaluation of Local Control in Buccinator Muscle Excision with the Skin Versus Buccinator Muscle Excision without the Skin in Buccal Squamous Cell Carcinoma: A Randomized Clinical Trial. (2021). *Indian Journal of Public Health Research & Development*. <https://doi.org/10.37506/ijphrd.v12i2.14086>
- Fanning, S. W., Hodges-Gallagher, L., Myles, D. C., Sun, R., Fowler, C. E., Plant, I. N., Green, B. D., Harmon, C. L., Greene, G. L., & Kushner, P. J. (2018). Specific stereochemistry of OP-1074 disrupts estrogen receptor alpha helix 12 and confers pure antiestrogenic activity. *Nature Communications*, 9(1), 2368. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04413-3>
- Feng, W., Webb, P., Nguyen, P., Liu, X., Li, J., Karin, M., & Kushner, P. J. (2001). Potentiation of estrogen receptor activation function 1 (AF-1) by Src/JNK through a serine 118-independent pathway. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 15(1), 32-45. <https://doi.org/10.1210/mend.15.1.0590>
- Feng, Y. (2011). Re-expression of estrogen receptor β inhibits the proliferation and migration of ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1430>
- Ferrandina, G., Bonanno, G., Pierelli, L., Perillo, A., Procoli, A., Mariotti, A., Corallo, M., Martinelli, E., Rutella, S., Paglia, A., Zannoni, G., Mancuso, S., & Scambia, G. (2008). Expression of CD133-1 and CD133-2 in ovarian cancer. *International Journal of Gynecologic Cancer*, 18(3), 506-514. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2007.01056.x>
- Fillmore, C. M., Gupta, P. B., Rudnick, J. A., Caballero, S., Keller, P. J., Lander, E. S., & Kuperwasser, C. (2010). Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50), 21737-21742. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007863107>

- Flores-Ramírez, I., Rivas-Torres, M. Á., Rodríguez-Dorantes, M., Gutiérrez-Sagal, R., Baranda-Avila, N., & Langley, E. (2021). Oncogenic role of PinX1 in prostate cancer cells through androgen receptor dependent and independent mechanisms. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *210*, 105858. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2021.105858>
- Ford, C. E., Werner, B., Hacker, N. F., & Warton, K. (2020). The untapped potential of ascites in ovarian cancer research and treatment. *British Journal of Cancer*, *123*(1), 9-16. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0875-x>
- Forstner, R., Meissnitzer, M., & Cunha, T. M. (2016). Update on Imaging of Ovarian Cancer. *Current Radiology Reports*, *4*(6), 31. <https://doi.org/10.1007/s40134-016-0157-9>
- Fuentes, N., & Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. En *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* (Vol. 116, pp. 135-170). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/bs.apcsb.2019.01.001>
- Gaitskell, K., Green, J., Pirie, K., Barnes, I., Hermon, C., Reeves, G. K., Beral, V., & Million Women Study Collaborators. (2018). Histological subtypes of ovarian cancer associated with parity and breastfeeding in the prospective Million Women Study: Childbearing and ovarian cancer risk. *International Journal of Cancer*, *142*(2), 281-289. <https://doi.org/10.1002/ijc.31063>
- Gelsomino, L., Panza, S., Giordano, C., Barone, I., Gu, G., Spina, E., Catalano, S., Fuqua, S., & Andò, S. (2018). Mutations in the estrogen receptor alpha hormone binding domain promote stem cell phenotype through notch activation in breast cancer cell lines. *Cancer Letters*, *428*, 12-20. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2018.04.023>
- Ghoneum, A., Afify, H., Salih, Z., Kelly, M., & Said, N. (2018). Role of tumor microenvironment in ovarian cancer pathobiology. *Oncotarget*, *9*(32), 22832-22849. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25126>
- Glumac, P. M., & LeBeau, A. M. (2018). The role of CD133 in cancer: A concise review. *Clinical and Translational Medicine*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/s40169-018-0198-1>
- Goff, B. A., Mandel, L. S., Drescher, C. W., Urban, N., Gough, S., Schurman, K. M., Patras, J., Mahony, B. S., & Andersen, M. R. (2007). Development of an ovarian cancer symptom index: Possibilities for earlier detection. *Cancer*, *109*(2), 221-227. <https://doi.org/10.1002/cncr.22371>
- Guglielmi, B., & Werner, M. (2002). The Yeast Homolog of Human PinX1 Is Involved in rRNA and Small Nucleolar RNA Maturation, Not in Telomere Elongation Inhibition. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(38), 35712-35719. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205526200>
- Gunay, G., Kirit, H. A., Kamatar, A., Baghdasaryan, O., Hamsici, S., & Acar, H. (2020). The effects of size and shape of the ovarian cancer spheroids on the drug resistance and migration. *Gynecologic Oncology*, *159*(2), 563-572. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.09.002>
- Guo, W., Lasky, J. L., & Wu, H. (2006). Cancer Stem Cells. *Pediatric Research*, *59*, 59R-64R. <https://doi.org/10.1203/01.pdr.0000203592.04530.06>
- Hao, L., Rizzo, P., Osipo, C., Pannuti, A., Wyatt, D., Cheung, L. W.-K., Sonenshein, G., Osborne, B. A., & Miele, L. (2010). Notch-1 activates estrogen receptor- α -dependent transcription via IKK α in breast cancer cells. *Oncogene*, *29*(2), 201-213. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.323>

- Harrison, H., Simões, B. M., Rogerson, L., Howell, S. J., Landberg, G., & Clarke, R. B. (2013). Oestrogen increases the activity of oestrogen receptor negative breast cancer stem cells through paracrine EGFR and Notch signalling. *Breast Cancer Research*, *15*(2), R21. <https://doi.org/10.1186/bcr3396>
- Herrera-Gayol, A., & Jothy, S. (1999). CD44 modulates Hs578T human breast cancer cell adhesion, migration, and invasiveness. *Experimental and Molecular Pathology*, *66*(1), 99-108. <https://doi.org/10.1006/exmp.1999.2236>
- Herreros-Villanueva, M., Chen, C.-C., Tsai, E.-M., & Er, T.-K. (2019). Endometriosis-associated ovarian cancer: What have we learned so far? *Clinica Chimica Acta*, *493*, 63-72. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.02.016>
- Hunn, J., & Rodriguez, G. C. (2012). Ovarian Cancer: Etiology, Risk Factors, and Epidemiology. *Clinical Obstetrics & Gynecology*, *55*(1), 3-23. <https://doi.org/10.1097/GRF.0b013e31824b4611>
- Iversen, L., Fielding, S., Lidegaard, Ø., Mørch, L. S., Skovlund, C. W., & Hannaford, P. C. (2018). Association between contemporary hormonal contraception and ovarian cancer in women of reproductive age in Denmark: Prospective, nationwide cohort study. *BMJ*, *k3609*. <https://doi.org/10.1136/bmj.k3609>
- Jensen, A., Sharif, H., Frederiksen, K., & Kjaer, S. K. (2009). Use of fertility drugs and risk of ovarian cancer: Danish population based cohort study. *BMJ*, *338*(feb05 2), b249-b249. <https://doi.org/10.1136/bmj.b249>
- Johnson, F. B. (2011). PinX1 the tail on the chromosome. *Journal of Clinical Investigation*, *121*(4), 1242-1244. <https://doi.org/10.1172/JCI57024>
- Jordan, V. C., & O'Malley, B. W. (2007). Selective Estrogen-Receptor Modulators and Antihormonal Resistance in Breast Cancer. *Journal of Clinical Oncology*, *25*(36), 5815-5824. <https://doi.org/10.1200/JCO.2007.11.3886>
- Kastrati, I., Semina, S., Gordon, B., & Smart, E. (2019). Insights into how phosphorylation of estrogen receptor at serine 305 modulates tamoxifen activity in breast cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *483*, 97-101. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.01.014>
- Kessous, R., Davidson, E., Meirovitz, M., Sergienko, R., & Sheiner, E. (2016). The risk of female malignancies after fertility treatments: A cohort study with 25-year follow-up. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, *142*(1), 287-293. <https://doi.org/10.1007/s00432-015-2035-x>
- Killick, S., Eyoung, E., & Elstein, M. (1987). Ovarian follicular development in oral contraceptive cycles**Supported by Wyeth International, Philadelphia, Pennsylvania. *Fertility and Sterility*, *48*(3), 409-413. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(16\)59407-2](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(16)59407-2)
- Kocanova, S., Mazaheri, M., Caze-Subra, S., & Bystricky, K. (2010). Ligands specify estrogen receptor alpha nuclear localization and degradation. *BMC Cell Biology*, *11*(1), 98. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-11-98>
- Kok, V. C., Tsai, H.-J., Su, C.-F., & Lee, C.-K. (2015). The Risks for Ovarian, Endometrial, Breast, Colorectal, and Other Cancers in Women With Newly Diagnosed Endometriosis or Adenomyosis: A Population-Based Study. *International Journal of Gynecologic Cancer*, *25*(6), 968-976. <https://doi.org/10.1097/IGC.0000000000000454>

- Kondo, T., Oue, N., Mitani, Y., Kuniyasu, H., Noguchi, T., Kuraoka, K., Nakayama, H., & Yasui, W. (2005a). Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Oncogene*, *24*(1), 157-164. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207832>
- Kondo, T., Oue, N., Mitani, Y., Kuniyasu, H., Noguchi, T., Kuraoka, K., Nakayama, H., & Yasui, W. (2005b). Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Oncogene*, *24*(1), 157-164. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207832>
- Kondo, T., Oue, N., Mitani, Y., Kuniyasu, H., Noguchi, T., Kuraoka, K., Nakayama, H., & Yasui, W. (2005c). Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. *Oncogene*, *24*(1), 157-164. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207832>
- Kossai, M., Leary, A., Scoazec, J.-Y., & Genestie, C. (2018). Ovarian Cancer: A Heterogeneous Disease. *Pathobiology*, *85*(1-2), 41-49. <https://doi.org/10.1159/000479006>
- Krugmann, J., Schwarz, C. L., Melcher, B., Sterlacci, W., Ozalinskaite, A., Lermann, J., Agaimy, A., & Vieth, M. (2019). Malignant ascites occurs most often in patients with high-grade serous papillary ovarian cancer at initial diagnosis: A retrospective analysis of 191 women treated at Bayreuth Hospital, 2006–2015. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, *299*(2), 515-523. <https://doi.org/10.1007/s00404-018-4952-9>
- Kuchenbaecker, K. B., Hopper, J. L., Barnes, D. R., Phillips, K.-A., Mooij, T. M., Roos-Blom, M.-J., Jervis, S., van Leeuwen, F. E., Milne, R. L., Andrieu, N., Goldgar, D. E., Terry, M. B., Rookus, M. A., Easton, D. F., Antoniou, A. C., and the BRCA1 and BRCA2 Cohort Consortium, McGuffog, L., Evans, D. G., Barrowdale, D., ... Olsson, H. (2017). Risks of Breast, Ovarian, and Contralateral Breast Cancer for *BRCA1* and *BRCA2* Mutation Carriers. *JAMA*, *317*(23), 2402. <https://doi.org/10.1001/jama.2017.7112>
- Kufe, D. W., E Pollock, R., R Weichselbaum, R., C Bast, R., S Gansler, T., F Holland, J., & Frei, E. (2003). *Holland-Frei Cancer Medicine, : Vol. Cancer medicine 6*. (6th ed.). BC Decker.
- Kurman, R. J., & Shih, I.-M. (2016). The Dualistic Model of Ovarian Carcinogenesis: Revisited, Revised, and Expanded. *The American Journal of Pathology*, *186*(4), 733-747. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.11.011>
- Langdon, S., Hawkes, M., Lawrie, S., Hawkins, R., Tesdale, A., Crew, A., Miller, W., & Smyth, J. (1990). Oestrogen receptor expression and the effects of oestrogen and tamoxifen on the growth of human ovarian carcinoma cell lines. *British Journal of Cancer*, *62*(2), 213-216. <https://doi.org/10.1038/bjc.1990.263>
- Langdon, S. P., Gourley, C., Gabra, H., & Stanley, B. (2017). Endocrine therapy in epithelial ovarian cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *17*(2), 109-117. <https://doi.org/10.1080/14737140.2017.1272414>
- Langdon, S. P., Herrington, C. S., Hollis, R. L., & Gourley, C. (2020). Estrogen Signaling and Its Potential as a Target for Therapy in Ovarian Cancer. *Cancers*, *12*(6), 1647. <https://doi.org/10.3390/cancers12061647>
- Lauricella, M., Carlisi, D., Giuliano, M., Calvaruso, G., Cernigliaro, C., Vento, R., & D'Anneo, A. (2016). The analysis of estrogen receptor- α positive breast cancer stem-like cells unveils a high expression of the serpin proteinase inhibitor PI-9: Possible regulatory

- mechanisms. *International Journal of Oncology*, 49(1), 352-360. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3495>
- Le Romancer, M., Poulard, C., Cohen, P., Sentis, S., Renoir, J.-M., & Corbo, L. (2011). Cracking the Estrogen Receptor's Posttranslational Code in Breast Tumors. *Endocrine Reviews*, 32(5), 597-622. <https://doi.org/10.1210/er.2010-0016>
- Lheureux, S., Gourley, C., Vergote, I., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer. *Lancet (London, England)*, 393(10177), 1240-1253. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32552-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32552-2)
- Li, H.-L., Song, J., Yong, H.-M., Hou, P.-F., Chen, Y.-S., Song, W.-B., Bai, J., & Zheng, J.-N. (2016). PinX1: Structure, regulation and its functions in cancer. *Oncotarget*, 7(40), 66267-66275. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11411>
- Li, Z. (2013). CD133: A stem cell biomarker and beyond. *Experimental Hematology & Oncology*, 2(1), 17. <https://doi.org/10.1186/2162-3619-2-17>
- Liao, C. (2002). Over-expression of LPTS-L in hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721 induces crisis. *World Journal of Gastroenterology*, 8(6), 1050. <https://doi.org/10.3748/wjg.v8.i6.1050>
- Liao, J., Qian, F., Tchabo, N., Mhawech-Fauceglia, P., Beck, A., Qian, Z., Wang, X., Huss, W. J., Lele, S. B., Morrison, C. D., & Odunsi, K. (2014). Ovarian Cancer Spheroid Cells with Stem Cell-Like Properties Contribute to Tumor Generation, Metastasis and Chemotherapy Resistance through Hypoxia-Resistant Metabolism. *PLoS ONE*, 9(1), e84941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084941>
- Liu, C. L., Chen, Y. J., Fan, M. H., Liao, Y. J., & Mao, T. L. (2020). Characteristics of CD133-Sustained Chemoresistant Cancer Stem-Like Cells in Human Ovarian Carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 6467. <https://doi.org/10.3390/ijms21186467>
- Liu, J., Ma, L., Xu, J., Liu, C., Zhang, J., Liu, J., Chen, R., & Zhou, Y. (2013). Spheroid body-forming cells in the human gastric cancer cell line MKN-45 possess cancer stem cell properties. *International Journal of Oncology*, 42(2), 453-459. <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1720>
- Liu, J.-Y., Qian, D., He, L.-R., Li, Y.-H., Liao, Y.-J., Mai, S.-J., Tian, X.-P., Liu, Y.-H., Zhang, J.-X., Kung, H.-F., Zeng, Y.-X., Zhou, F.-J., & Xie, D. (2013). PinX1 suppresses bladder urothelial carcinoma cell proliferation via the inhibition of telomerase activity and p16/cyclin D1 pathway. *Molecular Cancer*, 12(1), 148. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-148>
- Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2006). The Expanding Cosmos of Nuclear Receptor Coactivators. *Cell*, 125(3), 411-414. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.021>
- Lonard, D. M., & O'Malley, B. W. (2007). Nuclear Receptor Coregulators: Judges, Juries, and Executioners of Cellular Regulation. *Molecular Cell*, 27(5), 691-700. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.08.012>
- Lu, K. H., Patterson, A. P., Wang, L., Marquez, R. T., Atkinson, E. N., Baggerly, K. A., Ramoth, L. R., Rosen, D. G., Liu, J., Hellstrom, I., Smith, D., Hartmann, L., Fishman, D., Berchuck, A., Schmandt, R., Whitaker, R., Gershenson, D. M., Mills, G. B., & Bast, R. C. (2004). Selection of Potential Markers for Epithelial Ovarian Cancer with Gene Expression Arrays and Recursive Descent Partition Analysis. *Clinical Cancer Research*, 10(10), 3291-3300. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-03-0409>

- Luke, B., Brown, M. B., Spector, L. G., Missmer, S. A., Leach, R. E., Williams, M., Koch, L., Smith, Y., Stern, J. E., Ball, G. D., & Schymura, M. J. (2015). Cancer in women after assisted reproductive technology. *Fertility and Sterility*, *104*(5), 1218-1226. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.07.1135>
- Ma, L., Lai, D., Liu, T., Cheng, W., & Guo, L. (2010). Cancer stem-like cells can be isolated with drug selection in human ovarian cancer cell line SKOV3. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, *42*(9), 593-602. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmq067>
- Ma, R., Karthik, G.-M., Lövrot, J., Haglund, F., Rosin, G., Katchy, A., Zhang, X., Viberg, L., Frisell, J., Williams, C., Linder, S., Fredriksson, I., & Hartman, J. (2017). Estrogen Receptor β as a Therapeutic Target in Breast Cancer Stem Cells. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, *109*(3). <https://doi.org/10.1093/jnci/djw236>
- Makhija, S., Taylor, D. D., Gibb, R. K., & Gerçel-Taylor, C. (1999). Taxol-induced bcl-2 phosphorylation in ovarian cancer cell monolayer and spheroids. *International Journal of Oncology*. <https://doi.org/10.3892/ijo.14.3.515>
- Mansha, M., Gill, A., & Thomson, P. C. (2019). Potential risk factors of ovarian cancer and analysis of CA125, a biomarker used for its monitoring and diagnosis. *Molecular Biology Reports*, *46*(3), 3325-3332. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-04794-8>
- Matalliotakis, M., Matalliotaki, C., Goulielmos, G., Patelarou, E., Tzardi, M., Spandidos, D., Arici, A., & Matalliotakis, I. (2018). Association between ovarian cancer and advanced endometriosis. *Oncology Letters*. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8287>
- McKenna, N. J., & O'Malley, B. W. (2002). Combinatorial Control of Gene Expression by Nuclear Receptors and Coregulators. *Cell*, *108*(4), 465-474. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00641-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00641-4)
- Miller, W. L. (2017). Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, *28*(11), 771-793. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.09.002>
- Mishra, M., Chandavarkar, V., Sharma, R., & Bhargava, D. (2019). Structure, function and role of CD44 in neoplasia. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, *23*(2), 267. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_246_18
- Momenimovahed, Z., Taheri, S., Tiznobaik, A., & Salehiniya, H. (2019). Do the Fertility Drugs Increase the Risk of Cancer? A Review Study. *Frontiers in Endocrinology*, *10*, 313. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00313>
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., & Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: Epidemiology and risk factors. *International Journal of Women's Health*, *11*, 287-299. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604>
- Morath, I., Hartmann, T. N., & Orian-Rousseau, V. (2016). CD44: More than a mere stem cell marker. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *81*, 166-173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>
- Morice, P., Gouy, S., & Leary, A. (2019). Mucinous Ovarian Carcinoma. *New England Journal of Medicine*, *380*(13), 1256-1266. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1813254>
- Morimoto, K., Kim, S. J., Tanei, T., Shimazu, K., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., Terada, N., & Noguchi, S. (2009). Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Science*, *100*(6), 1062-1068. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01151.x>

- Murphy, S. (2010). Targeting Ovarian Cancer-Initiating Cells. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 10(2), 157-163. <https://doi.org/10.2174/187152010790909272>
- Nagy, L., Kao, H. Y., Chakravarti, D., Lin, R. J., Hassig, C. A., Ayer, D. E., Schreiber, S. L., & Evans, R. M. (1997). Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3A, and histone deacetylase. *Cell*, 89(3), 373-380. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80218-4](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80218-4)
- Nam, E. J., Lee, M., Yim, G. W., Kim, J. H., Kim, S., Kim, S. W., & Kim, Y. T. (2012). MicroRNA profiling of a CD133+spheroid-forming subpopulation of the OVCAR3 human ovarian cancer cell line. *BMC Medical Genomics*, 5(1), 18. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-5-18>
- Naora, H. (2005). Developmental Patterning in the Wrong Context: The Paradox of Epithelial Ovarian Cancers. *Cell Cycle*, 4(8), 1033-1035. <https://doi.org/10.4161/cc.4.8.1906>
- Ness, R. B. (2000). Risk of Ovarian Cancer in Relation to Estrogen and Progestin Dose and Use Characteristics of Oral Contraceptives. *American Journal of Epidemiology*, 152(3), 233-241. <https://doi.org/10.1093/aje/152.3.233>
- Noriega-Reyes, M. Y., Rivas-Torres, M. A., Oñate-Ocaña, L. F., Vallés, A. J., Baranda-Avila, N., & Langley, E. (2015a). Novel role for PINX1 as a coregulator of nuclear hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 414, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.011>
- Noriega-Reyes, M. Y., Rivas-Torres, M. A., Oñate-Ocaña, L. F., Vallés, A. J., Baranda-Avila, N., & Langley, E. (2015b). Novel role for PINX1 as a coregulator of nuclear hormone receptors. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 414, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.07.011>
- O'Donnell, A. J. M., Macleod, K. G., Burns, D. J., Smyth, J. F., & Langdon, S. P. (2005). Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocrine-Related Cancer*, 12(4), 851-866. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01039>
- Orian-Rousseau, V. (2010). CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *European Journal of Cancer*, 46(7), 1271-1277. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.024>
- Osborne, C. K., Schiff, R., Fuqua, S. A., & Shou, J. (2001). Estrogen receptor: Current understanding of its activation and modulation. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 7(12 Suppl), 4338s-4342s; discussion 4411s-4412s.
- Park, W. S., Lee, J. H., Park, J. Y., Jeong, S. W., Shin, M. S., Kim, H. S., Lee, S. K., Lee, S. N., Lee, S. H., Park, C. G., Yoo, N. J., & Lee, J. Y. (2002). Genetic analysis of the liver putative tumor suppressor (LPTS) gene in hepatocellular carcinomas. *Cancer Letters*, 178(2), 199-207. [https://doi.org/10.1016/S0304-3835\(01\)00841-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3835(01)00841-2)
- Peng, J., Sengupta, S., & Jordan, V. C. (2009). Potential of Selective Estrogen Receptor Modulators as Treatments and Preventives of Breast Cancer. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 9(5), 481-499. <https://doi.org/10.2174/187152009788451833>
- Penninkilampi, R., & Eslick, G. D. (2018). Perineal Talc Use and Ovarian Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Epidemiology*, 29(1), 41-49. <https://doi.org/10.1097/EDE.0000000000000745>

- Prior, J. C. (2005). Ovarian Aging and the Perimenopausal Transition: The Paradox of Endogenous Ovarian Hyperstimulation. *Endocrine*, 26(3), 297-300. <https://doi.org/10.1385/ENDO:26:3:297>
- Qian, D., Zhang, B., He, L.-R., Cai, M.-Y., Mai, S.-J., Liao, Y.-J., Liu, Y.-H., Lin, M. C., Bian, X.-W., Zeng, Y.-X., Huang, J.-J., Kung, H.-F., & Xie, D. (2013). The telomere/telomerase binding factor PinX1 is a new target to improve the radiotherapy effect of oesophageal squamous cell carcinomas: PinX1 in oesophageal squamous cell carcinoma. *The Journal of Pathology*, 229(5), 765-774. <https://doi.org/10.1002/path.4163>
- Ramus, S. J., Song, H., Dicks, E., Tyrer, J. P., Rosenthal, A. N., Intermaggio, M. P., Fraser, L., Gentry-Maharaj, A., Hayward, J., Philpott, S., Anderson, C., Edlund, C. K., Conti, D., Harrington, P., Barrowdale, D., Bowtell, D. D., Alsop, K., Mitchell, G., Cicek, M. S., ... Gayther, S. A. (2015). Germline Mutations in the BRIP1, BARD1, PALB2, and NBN Genes in Women With Ovarian Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 107(11). <https://doi.org/10.1093/jnci/djv214>
- Reid, B. M., Permuth, J. B., & Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: A review. *Cancer Biology & Medicine*, 14(1), 9-32. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0084>
- Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*, 414(6859), 105-111. <https://doi.org/10.1038/35102167>
- Riman, T., Nilsson, S., & Persson, I. R. (2004). Review of epidemiological evidence for reproductive and hormonal factors in relation to the risk of epithelial ovarian malignancies. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 83(9), 783-795. <https://doi.org/10.1111/j.0001-6349.2004.00550.x>
- Rizzuto, I., Behrens, R. F., & Smith, L. A. (2019). Risk of ovarian cancer in women treated with ovarian stimulating drugs for infertility. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD008215.pub3>
- Robertson, J. F. (2001). ICI 182,780 (Fulvestrant)—The first oestrogen receptor down-regulator—Current clinical data. *British Journal of Cancer*, 85 Suppl 2, 11-14. <https://doi.org/10.1054/bjoc.2001.1982>
- Samavat, H., & Kurzer, M. S. (2015). Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Letters*, 356(2), 231-243. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.04.018>
- Sanner, K., Conner, P., Bergfeldt, K., Dickman, P., Sundfeldt, K., Bergh, T., Hagenfeldt, K., Janson, P. O., Nilsson, S., & Persson, I. (2009). Ovarian epithelial neoplasia after hormonal infertility treatment: Long-term follow-up of a historical cohort in Sweden. *Fertility and Sterility*, 91(4), 1152-1158. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2008.01.073>
- Savkur, R. S., & Burris, T. P. (2004). The coactivator LXXLL nuclear receptor recognition motif. *Journal of Peptide Research*, 63(3), 207-212. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3011.2004.00126.x>
- Schüler-Toprak, S., Moehle, C., Skrzypczak, M., Ortmann, O., & Treeck, O. (2017). Effect of estrogen receptor β agonists on proliferation and gene expression of ovarian cancer cells. *BMC Cancer*, 17(1), 319. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3246-0>
- Schüler-Toprak, S., Weber, F., Skrzypczak, M., Ortmann, O., & Treeck, O. (2018). Estrogen receptor β is associated with expression of cancer associated genes and survival in ovarian cancer. *BMC Cancer*, 18(1), 981. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4898-0>

- Senbanjo, L. T., & Chellaiah, M. A. (2017). CD44: A Multifunctional Cell Surface Adhesion Receptor Is a Regulator of Progression and Metastasis of Cancer Cells. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00018>
- Shagufta, & Ahmad, I. (2018). Tamoxifen a pioneering drug: An update on the therapeutic potential of tamoxifen derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 143, 515-531. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.056>
- Shay, J. W., & Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *European Journal of Cancer*, 33(5), 787-791. [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(97\)00062-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(97)00062-2)
- Shi, R., Zhao, Z., Zhou, H., Wei, M., Ma, W.-L., Zhou, J.-Y., & Tan, W.-L. (2014a). Reduced expression of PinX1 correlates to progressive features in patients with prostate cancer. *Cancer Cell International*, 14(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-46>
- Shi, R., Zhao, Z., Zhou, H., Wei, M., Ma, W.-L., Zhou, J.-Y., & Tan, W.-L. (2014b). Reduced expression of PinX1 correlates to progressive features in patients with prostate cancer. *Cancer Cell International*, 14(1), 46. <https://doi.org/10.1186/1475-2867-14-46>
- Shi, R., Zhou, J.-Y., Zhou, H., Zhao, Z., Liang, S.-H., Zheng, W.-L., & Ma, W.-L. (2014). The Role of PinX1 in Growth Control of Breast Cancer Cells and Its Potential Molecular Mechanism by mRNA and lncRNA Expression Profiles Screening. *BioMed Research International*, 2014, 1-10. <https://doi.org/10.1155/2014/978984>
- Sieh, W., Köbel, M., Longacre, T. A., Bowtell, D. D., deFazio, A., Goodman, M. T., Høgdall, E., Deen, S., Wentzensen, N., Moysich, K. B., Brenton, J. D., Clarke, B. A., Menon, U., Gilks, C. B., Kim, A., Madore, J., Fereday, S., George, J., Galletta, L., ... Ramus, S. J. (2013). Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: An Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *The Lancet. Oncology*, 14(9), 853-862. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(13\)70253-5](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(13)70253-5)
- Simões, B. M., Alferez, D. G., Howell, S. J., & Clarke, R. B. (2015). The role of steroid hormones in breast cancer stem cells. *Endocrine-Related Cancer*, 22(6), T177-T186. <https://doi.org/10.1530/ERC-15-0350>
- Simpson, E. R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W. C., Robertson, K., Britt, K., Speed, C., & Jones, M. (2002). Aromatase—A brief overview. *Annual Review of Physiology*, 64, 93-127. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.64.081601.142703>
- Singh, N., Hirschowitz, L., Zaino, R., Alvarado-Cabrero, I., Duggan, M. A., Ali-Fehmi, R., Euscher, E., Hecht, J. L., Horn, L.-C., Ioffe, O., Matias-Guiu, X., McCluggage, W. G., Mikami, Y., Ordi, J., Parkash, V., Quddus, M. R., Quick, C. M., Staebler, A., Zaloudek, C., ... Oliva, E. (2019). Pathologic Prognostic Factors in Endometrial Carcinoma (Other Than Tumor Type and Grade): *International Journal of Gynecological Pathology*, 38, S93-S113. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000524>
- Slomovitz, B., Gourley, C., Carey, M. S., Malpica, A., Shih, I.-M., Huntsman, D., Fader, A. N., Grisham, R. N., Schlumbrecht, M., Sun, C. C., Ludemann, J., Cooney, G. A., Coleman, R., Sood, A. K., Mahdi, H., Wong, K. K., Covens, A., O'Malley, D. M., Lecuru, F., ... Gershenson, D. M. (2020). Low-grade serous ovarian cancer: State of the science. *Gynecologic Oncology*, 156(3), 715-725. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2019.12.033>
- Smith, C. L., & O'Malley, B. W. (2004). Coregulator Function: A Key to Understanding Tissue Specificity of Selective Receptor Modulators. *Endocrine Reviews*, 25(1), 45-71. <https://doi.org/10.1210/er.2003-0023>

- Stewart, C., Ralyea, C., & Lockwood, S. (2019). Ovarian Cancer: An Integrated Review. *Seminars in Oncology Nursing*, 35(2), 151-156. <https://doi.org/10.1016/j.soncn.2019.02.001>
- Stewart, L. M., Spillsbury, K., Jordan, S., Stewart, C., Holman, C. D. J., Powell, A., Reekie, J., & Cohen, P. (2018). Risk of high-grade serous ovarian cancer associated with pelvic inflammatory disease, parity and breast cancer. *Cancer Epidemiology*, 55, 110-116. <https://doi.org/10.1016/j.canep.2018.05.011>
- Su, K.-M., Wang, P.-H., Yu, M.-H., Chang, C.-M., & Chang, C.-C. (2020). The recent progress and therapy in endometriosis-associated ovarian cancer. *Journal of the Chinese Medical Association*, 83(3), 227-232. <https://doi.org/10.1097/JCMA.0000000000000262>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, caac.21660. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Suster, N. K., & Virant-Klun, I. (2019). Presence and role of stem cells in ovarian cancer. *World Journal of Stem Cells*, 11(7), 383-397. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v11.i7.383>
- Szender, J. B., Emmons, T., Belliotti, S., Dickson, D., Khan, A., Morrell, K., Khan, A. N. M. N., Singel, K. L., Mayor, P. C., Moysich, K. B., Odunsi, K., Segal, B. H., & Eng, K. H. (2017). Impact of ascites volume on clinical outcomes in ovarian cancer: A cohort study. *Gynecologic Oncology*, 146(3), 491-497. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.06.008>
- Tang, Z.-R., Zhang, R., Lian, Z.-X., Deng, S.-L., & Yu, K. (2019). Estrogen-Receptor Expression and Function in Female Reproductive Disease. *Cells*, 8(10), 1123. <https://doi.org/10.3390/cells8101123>
- Thomas, R. S., Sarwar, N., Phoenix, F., Coombes, R. C., & Ali, S. (2008). Phosphorylation at serines 104 and 106 by Erk1/2 MAPK is important for estrogen receptor-alpha activity. *Journal of Molecular Endocrinology*, 40(4), 173-184. <https://doi.org/10.1677/JME-07-0165>
- Tian, X.-P., Jin, X.-H., Li, M., Huang, W.-J., Xie, D., & Zhang, J.-X. (2017). The depletion of PinX1 involved in the tumorigenesis of non-small cell lung cancer promotes cell proliferation via p15/cyclin D1 pathway. *Molecular Cancer*, 16(1), 74. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0637-4>
- Timmerman, D., Van Calster, B., Testa, A. C., Guerriero, S., Fischerova, D., Lissoni, A. A., Van Holsbeke, C., Fruscio, R., Czekierdowski, A., Jurkovic, D., Savelli, L., Vergote, I., Bourne, T., Van Huffel, S., & Valentin, L. (2010). Ovarian cancer prediction in adnexal masses using ultrasound-based logistic regression models: A temporal and external validation study by the IOTA group. *Ultrasound in Obstetrics and Gynecology*, 36(2), 226-234. <https://doi.org/10.1002/uog.7636>
- Toufakis, V., Katuwal, S., Pukkala, E., & Tapanainen, J. S. (2021). Impact of parity on the incidence of ovarian cancer subtypes: A population-based case-control study. *Acta Oncologica*, 1-6. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2021.1919754>
- TOV-112D | ATCC. (s. f.). Recuperado 3 de enero de 2022, de <https://www.atcc.org/products/crl-11731>
- Trabert, B., Coburn, S. B., Falk, R. T., Manson, J. E., Brinton, L. A., Gass, M. L., Kuller, L. H., Rohan, T. E., Pfeiffer, R. M., Qi, L., Stefanick, M. L., Wentzensen, N., Anderson, G. L., & Xu, X. (2019). Circulating estrogens and postmenopausal ovarian and endometrial cancer risk among current hormone users in the Women's Health Initiative Observational Study.

- Cancer Causes & Control: CCC*, 30(11), 1201-1211. <https://doi.org/10.1007/s10552-019-01233-8>
- Trabert, B., Tworoger, S. S., O'Brien, K. M., Townsend, M. K., Fortner, R. T., Iversen, E. S., Hartge, P., White, E., Amiano, P., Arslan, A. A., Bernstein, L., Brinton, L. A., Buring, J. E., Dossus, L., Fraser, G. E., Gaudet, M. M., Giles, G. G., Gram, I. T., Harris, H. R., ... Wentzensen, N. (2020). The Risk of Ovarian Cancer Increases with an Increase in the Lifetime Number of Ovulatory Cycles: An Analysis from the Ovarian Cancer Cohort Consortium (OC3). *Cancer Research*, 80(5), 1210-1218. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-19-2850>
- Trecek, O., Pfeiler, G., Mitter, D., Lattrich, C., Piendl, G., & Ortmann, O. (2007). Estrogen receptor β 1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *Journal of Endocrinology*, 193(3), 421-433. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0087>
- Tsilidis, K. K., Allen, N. E., Key, T. J., Dossus, L., Lukanova, A., Bakken, K., Lund, E., Fournier, A., Overvad, K., Hansen, L., Tjønneland, A., Fedirko, V., Rinaldi, S., Romieu, I., Clavel-Chapelon, F., Engel, P., Kaaks, R., Schütze, M., Steffen, A., ... Riboli, E. (2011). Oral contraceptive use and reproductive factors and risk of ovarian cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *British Journal of Cancer*, 105(9), 1436-1442. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.371>
- Vang, R., Shih, I.-M., & Kurman, R. J. (2013). Fallopian tube precursors of ovarian low- and high-grade serous neoplasms. *Histopathology*, 62(1), 44-58. <https://doi.org/10.1111/his.12046>
- Vaughan, S., Coward, J. I., Bast, R. C., Berchuck, A., Berek, J. S., Brenton, J. D., Coukos, G., Crum, C. C., Drapkin, R., Etemadmoghadam, D., Friedlander, M., Gabra, H., Kaye, S. B., Lord, C. J., Lengyel, E., Levine, D. A., McNeish, I. A., Menon, U., Mills, G. B., ... Balkwill, F. R. (2011). Rethinking ovarian cancer: Recommendations for improving outcomes. *Nature Reviews Cancer*, 11(10), 719-725. <https://doi.org/10.1038/nrc3144>
- Wada-Hiraike, O., Hiraike, H., Okinaga, H., Imamov, O., Barros, R. P. A., Morani, A., Omoto, Y., Warner, M., & Gustafsson, J.-A. (2006). Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta-/- mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(48), 18350-18355. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608861103>
- Wang, L., Xu, T., & Cui, M. (2018). Are ovarian cancer stem cells the target for innovative immunotherapy? *OncoTargets and Therapy*, Volume 11, 2615-2626. <https://doi.org/10.2147/OTT.S155458>
- Watson, C. S., Jeng, Y., & Kochukov, M. Y. (2008). Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. *The FASEB Journal*, 22(9), 3328-3336. <https://doi.org/10.1096/fj.08-107672>
- Wilczyński, J. R., Wilczyński, M., & Paradowska, E. (2022). Cancer Stem Cells in Ovarian Cancer—A Source of Tumor Success and a Challenging Target for Novel Therapies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2496. <https://doi.org/10.3390/ijms23052496>
- Wu, G., Liu, D., Jiang, K., Zhang, L., Zeng, Y., Zhou, P., Zhong, D., Gao, M., He, F., & Zheng, Y. (2014). PinX1, a novel target gene of p53, is suppressed by HPV16 E6 in cervical cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1839(2), 88-96. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2014.01.004>

- Xu, W.-R., Lin, H.-S., Chen, X.-Y., & Zhang, Y. (2011). Estrogen receptor of breast cancer stem cells depending on the original breast cancers. *Medical Hypotheses*, 77(1), 71-73. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.03.028>
- Yamashita, H., Nishio, M., Toyama, T., Sugiura, H., Kondo, N., Kobayashi, S., Fujii, Y., & Iwase, H. (2008). Low phosphorylation of estrogen receptor (ER) serine 118 and high phosphorylation of ER serine 167 improve survival in ER-positive breast cancer. *Endocrine Related Cancer*, 15(3), 755-763. <https://doi.org/10.1677/ERC-08-0078>
- Yao, Y., Lin, M., Liu, Z., Liu, M., Zhang, S., & Zhang, Y. (2022). Hesperidin Inhibits Lung Cancer In Vitro and In Vivo Through PinX1. *Frontiers in Pharmacology*, 13, 918665. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.918665>
- Yaşar, P., Ayaz, G., User, S. D., Güpür, G., & Muyan, M. (2017). Molecular mechanism of estrogen-estrogen receptor signaling. *Reproductive Medicine and Biology*, 16(1), 4-20. <https://doi.org/10.1002/rmb2.12006>
- Ye, H., Dudley, S. Z., & Shaw, I. C. (2018). Intimate estrogen receptor- α /ligand relationships signal biological activity. *Toxicology*, 408, 80-87. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2018.07.003>
- Yoshihara, K., Tajima, A., Komata, D., Yamamoto, T., Kodama, S., Fujiwara, H., Suzuki, M., Onishi, Y., Hatae, M., Sueyoshi, K., Fujiwara, H., Kudo, Y., Inoue, I., & Tanaka, K. (2009a). Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates *ZEB2* in tumor progression and prognosis. *Cancer Science*, 100(8), 1421-1428. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01204.x>
- Yoshihara, K., Tajima, A., Komata, D., Yamamoto, T., Kodama, S., Fujiwara, H., Suzuki, M., Onishi, Y., Hatae, M., Sueyoshi, K., Fujiwara, H., Kudo, Y., Inoue, I., & Tanaka, K. (2009b). Gene expression profiling of advanced-stage serous ovarian cancers distinguishes novel subclasses and implicates *ZEB2* in tumor progression and prognosis. *Cancer Science*, 100(8), 1421-1428. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01204.x>
- Zeppernick, F., & Meinhold-Heerlein, I. (2014). The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 290(5), 839-842. <https://doi.org/10.1007/s00404-014-3364-8>
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M. W., Lai, H.-C., Matei, D., Schilder, J. M., Yan, P. S., Huang, T. H.-M., & Nephew, K. P. (2008). Identification and Characterization of Ovarian Cancer-Initiating Cells from Primary Human Tumors. *Cancer Research*, 68(11), 4311-4320. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0364>
- Zhao, C., Dahlman-Wright, K., & Gustafsson, J.-A. (2008). Estrogen receptor beta: An overview and update. *Nuclear Receptor Signaling*, 6, e003. <https://doi.org/10.1621/nrs.06003>
- Zhao, Y., He, M., Cui, L., Gao, M., Zhang, M., Yue, F., Shi, T., Yang, X., Pan, Y., Zheng, X., Jia, Y., Shao, D., Li, J., He, K., & Chen, L. (2020). Chemotherapy exacerbates ovarian cancer cell migration and cancer stem cell-like characteristics through GLI1. *British Journal of Cancer*, 122(11), 1638-1648. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0825-7>
- Zhou, X., Wang, S., Wang, Z., Feng, X., Liu, P., Lv, X.-B., Li, F., Yu, F.-X., Sun, Y., Yuan, H., Zhu, H., Xiong, Y., Lei, Q.-Y., & Guan, K.-L. (2015). Estrogen regulates Hippo signaling via GPER in breast cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 125(5), 2123-2135. <https://doi.org/10.1172/JCI79573>

- Zhou, X. Z. (2011). PinX1: A sought-after major tumor suppressor at human chromosome 8p23. *Oncotarget*, 2(10), 810-819. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.339>
- Zhou, X. Z., Huang, P., Shi, R., Lee, T. H., Lu, G., Zhang, Z., Bronson, R., & Lu, K. P. (2011). The telomerase inhibitor PinX1 is a major haploinsufficient tumor suppressor essential for chromosome stability in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 121(4), 1266-1282. <https://doi.org/10.1172/JCI43452>
- Zhou, X. Z., & Lu, K. P. (2001). The Pin2/TRF1-Interacting Protein PinX1 Is a Potent Telomerase Inhibitor. *Cell*, 107(3), 347-359. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00538-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00538-4)



Efecto de PinX1, corregulador del receptor de estrógenos alfa, en la formación de ovario-esferas de células de cáncer de ovario.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 7 del mes de diciembre del año 2022 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS
DRA. NOEMI BARANDA AVILA
DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL DOMINGUEZ GOMEZ
DR. ERNESTO SOTO REYES SOLIS

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: MIRIAM CRUZ CASTILLO

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.



MIRIAM CRUZ CASTILLO
ALUMNA

REVISÓ

MTRA. ROSALÍA SERRANO DE LA PAZ
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISION DE CBS

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA

DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO
CASTELLANOS

VOCAL

DRA. NOEMI BARANDA AVILA

VOCAL

DRA. MARIA GUADALUPE ISABEL
DOMINGUEZ GOMEZ

SECRETARIO

DR. ERNESTO SOTO REYES SOLIS