



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Maestría en Biología de la Reproducción Animal

T E S I S

**“Perfil de Expresión de los Receptores de Hormonas Esteroides
Sexuales y de TGF- β RII en Cáncer Epitelial de Ovario”**

Para obtener el grado de Maestra en Biología de la Reproducción Animal

Biol. Argelia Calvillo Robledo

Codirectores

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano

Asesora

Dra. María del Carmen Méndez Herrera

Ciudad de México, a jueves 14 de septiembre de 2017

COMITÉ TUTORAL

Codirectores

Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura
**Universidad Autónoma Metropolitana
Iztapalapa**



Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano
**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina**



Asesora

Dra. María del Carmen Méndez Herrera
**Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina**



La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, pertenece al padrón de posgrados de excelencia (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con número de referencia 003797.

El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) otorgó una beca al estudiante del posgrado de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal Argelia Calvillo Robledo (CVU): 616297

MIEMBROS DEL JURADO



Presidente

Dr. Javier Esteban Salazar Jiménez
UAM-I Universidad Autónoma Metropolitana
Departamento de Biología de la Reproducción Animal



Secretaria

Dra. María del Carmen Méndez Herrera
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina



Vocal

Dra. Guadalupe Sánchez Bringas
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
Departamento de Embriología



Vocal

Posdoctorante. Rocío Castillo Sánchez
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina

Este trabajo de investigación se llevó a cabo bajo la dirección de los doctores Enrique Antonio Pedrera Astegiano y la doctora Carmen Méndez Herrera del Departamento de Embriología de la Facultad de Medicina, UNAM, en colaboración con la UAM-I con la cotutoría del Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura

Un agradecimiento especial a la Dra. Flavia Morales Vásquez del Instituto Nacional de Cancerología,
por su apoyo en la en la realización de este proyecto.

Por medio del Convenio general de colaboración académica para la investigación entre la Universidad Nacional Autónoma de México y el Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología, de la Secretaría de Defensa Nacional (SEDENA) 2013, se hace mención especial por su valioso apoyo en la elaboración de este y otros proyectos a las siguientes destacables autoridades:

Coronel Médico Cirujano Luis Ignacio Aviña Cueto, Director del Hospital Militar de Especialidades de la Mujer y Neonatología, SEDENA.

Coronel M. C. Azucena del Carmen Hernández Martínez, subdirectora de la de la Secretaría de Defensa Nacional SEDENA.

Sargento Primero ADM Matiana Mil Ramírez Técnico Histotecnólogo de la de la Secretaría de Defensa Nacional (SEDENA), por el manejo histológico de los tumores empleados en este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Metropolitana por brindarme las herramientas necesarias para la conciliación del conocimiento y elaboración de este trabajo, además de su apoyo en la participación y asistencia a Congresos Nacionales. De la misma manera, me permito externar mi agradecimiento a la Maestría en Biología de la Reproducción Animal por el otorgamiento de becas para participar en cursos de formación académica y participación en Congresos Nacionales e Internacionales. A la Universidad Nacional Autónoma de México y a instancias como CONACyT, especialmente al Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por el financiamiento a través de proyectos PAPIIT-IN224116, PAPIIT-IN224617 e INCan080340MI.

A la Dra. Flavia Morales Vásquez y a la Dra. Delia Pérez Montiel por su compromiso de trabajo y apoyo en la obtención de muestras de tejido en el área de Patología Oncológica del Instituto Nacional de Cancerología.

A la Dra. María del Carmen Méndez Herrera por saber ser una guía lo largo de mi formación académica, de la cual aprendí y crecí tanto personal como académicamente, siempre estaré agradecida con ella por ser una figura de respeto y constancia.

Al Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura por su gran compromiso y motivación a seguir investigando y ser una inspiración para mí a lo largo de mi formación académica.

al Dr. Enrique Pedernera Astegiano por enseñarme que siempre hay que ver más allá de lo aparente, a formar en mí una visión más crítica de las cosas y transmitir el gusto y pasión por la investigación.

Al Banco de Tumores del Instituto Nacional de Cancerología por la recolección adecuada dentro de los lineamientos de los bancos internacionales en el manejo de tejidos para este trabajo.

A la C. D. María José Gómora Herrera por su invaluable apoyo en la asesoría de las técnicas de inmunohistoquímica e inmunofluorescencia y asistencia en el manejo del microscopio Confocal.

A la QFB. Isabel Arce Camacho por el manejo de residuos químicos y anatomopatológicos derivados de este proyecto

A la Técnico académico Verónica Rodríguez Mata por su gran disposición en la asistencia de la realización de técnicas histológicas.

Al Doctor Antonio Villa Romero, por su asesoría en el análisis estadístico del presente trabajo.

DEDICATORIA

El presente trabajo es dedicado especialmente a mis padres Rosa Ma. Robledo García y Ramón Calvillo Cardona, quienes me han apoyado siempre en las decisiones de mi vida profesional y personal, gracias a ellos he llegado a ser la persona que ahora soy y siempre estaré agradecida con ellos por brindarme su apoyo incondicional.

A mi segunda mami Silvia Hortensia Robledo García, la cual ha sido siempre mi inspiración y ejemplo a seguir, por su tenacidad, fortaleza y gran humildad, donde quiera que este sabe que la llevo en mi corazón y sé que si estuviera aquí conmigo estaría muy orgullosa por quien me he convertido, siempre estaré agradecida contigo... mi Silvina.

A mis hermanos Marcela Alejandra Calvillo Robledo y Juan Ramón Calvillo Robledo, quienes me han acompañado y apoyado en todas las decisiones y etapas de mi vida.

A mi viejita chula Carmen García Acosta, a quien quiero y admiro, por enseñarme que siempre hay que moverse en la vida para conseguir y alcanzar lo que cada uno desea.

Al Maestro en Ciencias Cuauhtémoc Cruz Valencia, por ser mi apoyo y fortaleza, por ser mi mejor amigo y mi pareja entrañable, a quien admiro y sigo sus pasos por su inquebrantable deseo de superación.

A la D. C. María José Gómora Herrera por llegar a formar parte de mi vida en una etapa de transición y adaptación, ella me ha enseñado que a pesar de tener un vasto conocimiento, siempre hay que ser humilde y agradecido con la vida y con los demás, le agradezco por llegar a convertirse en una excelente compañera y sobre todo una gran amiga.

Por último deseo hacer una dedicatoria especial a todas las mujeres que están pasando por una situación difícil como lo es el cáncer de ovario, gracias a esas mujeres valientes que siempre tratan de sobrellevar la situación de la mejor manera a pesar de las dificultades y pronósticos, agradezco a cada una, ya que por ellas posible realizar este tipo de trabajos, de los cuales espero que en un futuro no muy lejano se puedan emplear estrategias clínicas más favorables y eficaces para las pacientes que atraviesen por una situación similar.

ÍNDICE

Contenido	Página
Resumen	14
Abstract	15
Introducción	16
Morfología del Ovario	16
Cambios en los ovarios durante la vida de la mujer	18
Epidemiología del Cáncer de Ovario	19
§ Cáncer de cordones sexuales y Cáncer de células germinales	21
Etiología del Cáncer Epitelial de Ovario	22
Estadios de CEO	23
Clasificación de Cáncer Epitelial de Ovario	24
§ Cáncer de ovario Seroso Límitrofe	24
§ Cáncer de ovario Seroso de Alto Grado	25
§ Cáncer de ovario Endometriode	26
§ Cáncer de ovario Mucinoso	26
§ Cáncer de ovario de Células Claras	27
Hormonas Esteroides Sexuales del Ovario	28
§ Andrógenos	28
§ Estrógenos	28
§ Progesterona	29
Receptores de Hormonas esteroides sexuales	29
§ Receptor de Andrógenos	30
§ Receptor de Estrógenos	30
§ Receptor de Progesterona	31
Factores de Crecimiento	32
§ Factor de Crecimiento Transformante beta (TGF-β)	32

Antecedentes	35
Receptores de Hormonas esteroides sexuales en cáncer de ovario	36
§ Receptor de andrógenos y su relación con procesos cancerígenos	36
§ Receptor de estrógenos y su relación con procesos cancerígenos	38
§ Receptor de progesterona y su relación con procesos cancerígenos	38
TGF-β y su relación con cáncer de ovario	39
§ Receptores de TGF- β y su relación con procesos cancerígenos	41
Planteamiento del Problema	42
Justificación	42
Pregunta de Investigación	43
Hipótesis	43
Objetivos	43
§ Objetivo General	43
§ Objetivos Particulares	43
Material y Método	44
Resultados	48
Discusión	59
Conclusiones	66
Perspectivas	68
Bibliografía	69
Anexos	76

Abreviaturas empleadas

<u>AF1</u>	Dominio de activación 1
<u>AF2</u>	Dominio de activación 2
<u>AR</u>	Receptor de andrógenos
<u>BRCA 1</u>	Cáncer de mama 1
<u>BRCA1</u>	Cáncer de mama 2
<u>CCC</u>	Carcinomas de células claras
<u>CEO</u>	Cáncer epitelial de ovario
<u>CKI</u>	Inhibidores dependientes de cinasas
<u>DBD</u>	Dominio de unión al ADN
<u>DHEA</u>	Dehidroepiandrosterona
<u>DHT</u>	Dihidrotestosterona
<u>E2</u>	Estradiol
<u>EC</u>	Carcinomas de tipo endometrioide
<u>EGFa</u>	Factores de crecimiento fibroblástico
<u>EMT</u>	Transición epitelio mesénquima
<u>ER</u>	Receptor de estrógenos
<u>ERα</u>	Receptor de estrógenos alfa
<u>ERβ</u>	Receptor de estrógenos beta
<u>ESO</u>	Epitelio superficial del ovario
<u>ESR1</u>	Gen que codifica al ER α
<u>ESR2</u>	Gen que codifica al ER β
<u>FIGO</u>	Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia
<u>GR</u>	Receptor de glucocorticoides
<u>GS</u>	Residuos ricos en glicina/serina
<u>HGSC</u>	Carcinomas serosos de alto grado
<u>IGF-I</u>	Factor de crecimiento similar a la insulina I
<u>IGF-II</u>	Factor de crecimiento similar a la insulina II
<u>LAP</u>	Proteína asociada a latencia
<u>LBD</u>	Dominio de unión al ligando
<u>LGSC</u>	Carcinomas serosos de bajo grado
<u>LTBP</u>	Proteína de unión al TGF- β latente
<u>MC</u>	Carcinomas de tipo mucinoso
<u>MO</u>	Mesotelio del ovario
<u>MOGT</u>	Tumores malignos de células germinales
<u>MR</u>	Receptor de mineralocorticoides
<u>NTD</u>	Dominio amino terminal
<u>PR</u>	Receptor de progesterona
<u>SCSTS</u>	Tumores de ovario de cordones sexuales
<u>TGF-β</u>	Factor de crecimiento transformante beta
<u>TGF-βRI</u>	Receptor uno del factor de crecimiento transformante beta
<u>TGF-βRII</u>	Receptor dos del factor de crecimiento transformante beta
<u>VEGF</u>	Factor de crecimiento del endotelio vascular

RESUMEN

El cáncer epitelial de ovario (CEO) es la neoplasia ginecológica más letal, ya que se detecta de forma tardía y suele presentar reincidencia debido, principalmente, a que genera mecanismos de resistencia a la quimioterapia. El CEO está asociado a eventos hormonales y reproductivos, pero hasta la fecha no se ha demostrado una correlación entre los receptores de hormonas esteroides sexuales, ya que en la mayoría de los estudios no toman en cuenta la expresión de los receptores de hormonas en las células tumorales, específicamente los receptores de estrógenos (ER), andrógenos (AR) y de progesterona (PR) con el subtipo histológico de cada tumor y el grado de progresión metastática de la enfermedad. Por otra parte, se sabe que la isoforma 1 del Factor de Crecimiento Transformante Beta (TGF β) juega un papel importante en la tumorigénesis en el ovario, ya que regula la proliferación celular, migración y metástasis; por ello, el análisis de su receptor 2 (TGF- β RII) tiene relevancia debido a que puede ser utilizado como biomarcador molecular en la predicción y el pronóstico del cáncer de ovario, así como permitir la selección de tratamientos más efectivos contra el CEO recurrente.

En el presente estudio se determinó la expresión de los AR, ER, PR y TGF- β RII, asociados con los subtipos histológicos del CEO y el grado de proliferación tumoral determinada a través de la expresión del marcador Ki-67. Se observó que en los tumores del subtipo seroso los cuatro receptores analizados disminuyen de manera inversamente proporcional con el grado de malignidad. La disminución en la presencia del ER α y de la forma activa de pTGF- β RII pueden ser utilizados como marcadores moleculares en este subtipo de CEO. En los tumores del subtipo endometriode poco diferenciados no se detectó el TGF- β RII, por lo que se propone que se tome en cuenta el cociente TGF- β RII / Ki-67, como un nuevo marcador tumoral, para confirmar el grado de malignidad.

Estos resultados pueden ser tomados en cuenta para mejorar el diagnóstico y así ayudar a que las terapias sean más específicas y menos agresivas para la población femenina que presenta esta neoplasia.

ABSTRACT

Epithelial Ovarian Cancer (EOC) is the most lethal gynecologic neoplasia since it is most commonly detected in an advanced stage, and often recurs after treatment, mainly because of the development of drug resistance (chemoresistance). EOC is clearly associated to hormonal and reproductive factors; however, no relationship has been found between the expressions of steroid hormone receptors and this pathology, since most studies do not take into account the expression of the hormone receptors in tumor cells, specifically the estrogen, androgen and/or progesterone receptors (ER, AR, PR respectively) status related to histologic subtypes and metastatic disease progression. On the other hand, it is well known that Transforming Growth Factor-beta (TGF β) plays an important role in ovarian tumorigenesis, and its expression also regulates proliferation, migration and tumor cell metastasis; accordingly, type II TGF- β receptor (TGF- β RII) can be used as a predictive and prognostic molecular ovarian cancer biomarker, and an aid for selecting optimally effective treatment(s) for recurrent EOC.

The objective of this study was to investigate whether tumor expression of the AR, ER, PR and TGF- β RII was associated with histologic subtypes of EOC and malignant degree, determined by the Ki-67 labeling index and the tumor grade. The expression of all four receptors was inversely correlated with the malignant degree of the serous subtype of ovarian carcinoma. Decreased expression of ER α and the active form of pTGF- β RII may be used as molecular markers in this specific subtype of EOC. Moreover, since all poorly differentiated endometrioid tumors demonstrated no expression of TGF- β RII, our findings allow the proposal of a novel tumor marker (TGF- β RII/Ki-67 ratio) in order to confirm malignant degree.

Our results could be useful for improving diagnostic accuracy in ovarian cancer and are a promising approach for more specific and less aggressive treatments against human EOC.

Introducción

Morfofisiología del ovario humano

Con la finalidad de entender mejor el origen de diversas alteraciones que pudiesen desencadenar ciertas neoplasias en los ovarios, primero es importante hacer su descripción anatómica y fisiológica. Los ovarios son órganos pares, están situados, uno a cada lado del útero, dentro de la fosa ovárica en la cavidad pélvica, tienen forma ovoide, con aspecto de almendra, de aproximadamente 3 cm de largo y 1 cm de ancho (Leung y Adashi, 2003). Hasta la pubertad son de color blanquecino a rosado, de superficie lisa; durante la vida fértil adquiere paulatinamente más cicatrices y se tornan irregulares a causa de las ovulaciones consecutivas. En mujeres posmenopáusicas los ovarios forman quistes corticales de inclusión, tienen menor tamaño con respecto a la etapa reproductiva y se tornan de un aspecto grisáceo debido a la disminución en la irrigación sanguínea (Ross y Pawlina, 2007). Histológicamente los ovarios se dividen en tres regiones tisulares principales: el epitelio superficial, la corteza y la médula ovárica (Leung y Adashi, 2003); en la (fig. 1) se observan claramente cada una de las estructuras que conforman al ovario de una mujer en etapa reproductiva.

El epitelio superficial del ovario (ESO) o también denominado mesotelio del ovario (MO), durante el desarrollo embrionario forma parte del epitelio celómico, que se describe como un tejido inconspicuo que recubre al ovario, no se le ha atribuido alguna otra función específica, sin embargo, presenta gran relevancia ya que se ha visto relacionado con diversas patologías ginecológicas; en cáncer epitelial de ovario, es el que se presenta con mayor frecuencia y es el más letal de los carcinomas ováricos (Leung y Adashi, 2003).

La corteza ovárica (también llamada región cortical) se encuentra en la periferia del ovario y rodea a la médula, contiene folículos ováricos que están incluidos en el tejido conjuntivo (Ross y Pawlina, 2007). En la etapa reproductiva pueden distinguirse los folículos en distintas etapas de desarrollo, cuerpos lúteos y blancos, siendo los primeros los encargados de la síntesis de progesterona (Boron y Boulpaep, 2012); así mismo, el folículo ovárico es considerado como la unidad morfológica y funcional del ovario, ya que es responsable de la maduración del ovocito y la producción de hormonas esteroides sexuales (esteroidogénesis). De tal manera que al inicio de cada ciclo reproductivo de la mujer, los folículos comienzan una serie de cambios en su desarrollo y maduración, en la primera etapa de este proceso participa el folículo primordial, el cual presenta una sola capa de células aplanadas que rodean al ovocito primario; a medida que pasa el tiempo estas células van cambiando su conformación de planas

a cuboides hasta formar un estrato multilaminar, es en esta fase que el folículo es denominado como primario, seguido de los de tipo preantral o secundarios, los cuales se distinguen por la presencia de líquido folicular entre las células de la granulosa, las cuales son las responsables de la síntesis de 17β -estradiol (E₂); en la periferia de dichos estratos celulares se encuentra la teca, que se divide en la teca interna (productora de andrógenos, sustratos para la síntesis de estrógenos) y teca externa, la cual aísla al folículo en crecimiento del estroma ovárico. Una vez alcanzada la maduración tanto del ovocito secundario como del folículo, este se denomina como terciario o de D'Graff, el cual es el responsable de la liberación del ovocito maduro durante la ovulación; no obstante, aquellos folículos que no alcancen la madurez, entran en un proceso de atrofia denominado atresia folicular (Strauss y Barbieri, 2013).

La médula del ovario (región medular) se divide en: médula yuxtacortical (por debajo de la corteza) y médula profunda, esta región se encuentra en el centro del ovario y se compone de tejido conjuntivo laxo y de vasos sanguíneos tortuosos, contiene vasos linfáticos y nervios (Strauss y Barbieri, 2013).

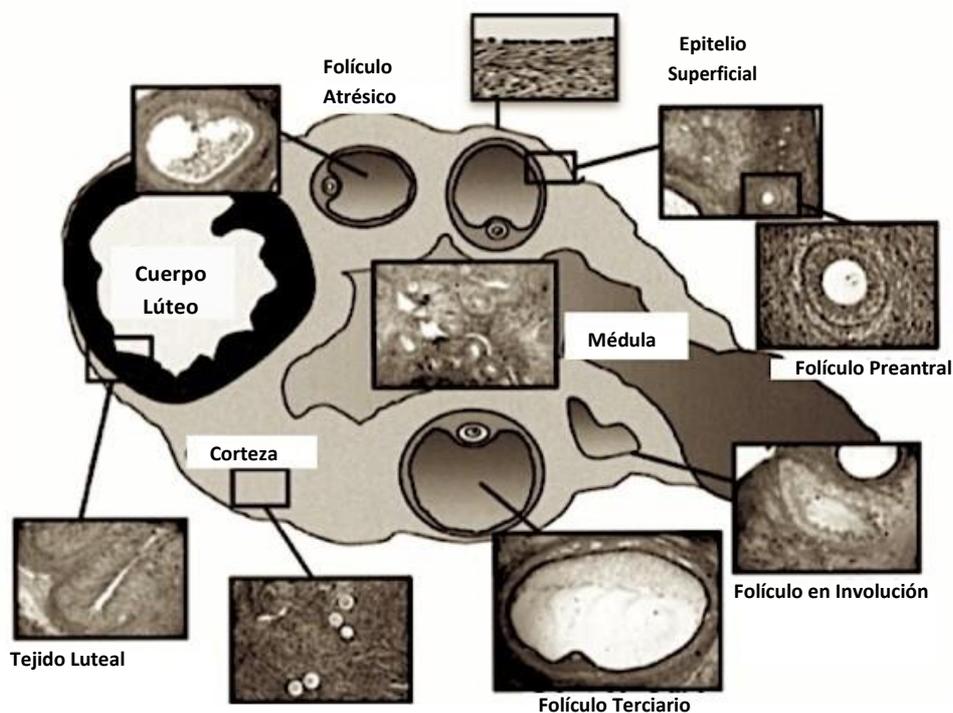


Figura 1. Representación esquemática del ovario de mujer en etapa reproductiva, se observan los folículos en distintos estadios de maduración, la corteza ovárica, médula ovárica y epitelio superficial, además de la morfología histológica de cada sección representada. Modif. de (Leung y Adashi, 2003).

Cambios en los ovarios durante la vida de la mujer

La formación y desarrollo de los folículos ováricos comienza durante la vida fetal, en un inicio se forman alrededor de 6 a 7 millones de células germinales, de las cuales tras el nacimiento permanecen aproximadamente 2 millones de folículos, de estos únicamente 400 mil ovocitos logran ser viables durante la vida reproductiva de la mujer; en esta etapa se observa un claro desarrollo y maduración de folículos, los cuales están provistos de vasos sanguíneos y gran inervación que le confieren una tonalidad rosada a los ovarios. Sin embargo, en una edad aproximada a los 40 años, la reserva folicular disminuye considerablemente, llegando a estimarse de 100 a 1000 folículos por cada ovario; esto se atribuye a que se reduce la tasa de maduración folicular y aumenta la apoptosis, lo cual incrementa la atresia en los folículos en etapa de maduración, siendo los ovocitos los primeros en desaparecer, marcando el inicio de la menopausia, sin embargo, es posible que el ovario al inicio de esta etapa presente todavía algunos folículos primarios y secundarios (Leung y Adashi, 2003).

No obstante, comienza a presentarse la pérdida de la función folicular por lo que hay una disminución drástica de las hormonas ováricas, principalmente de estradiol y progesterona (fig. 2), aumenta la cantidad de tejido conectivo y la formación de quistes corticales de inclusión (Auersperg et al., 2001), además, de que se observa una notable disminución del tamaño de los ovarios adquiriendo una tonalidad grisácea. El inicio de la menopausia se atribuye a diversos factores como la edad, alimentación, ambiente y genética (Boron y Boulpaep, 2012; Leung y Adashi, 2003).

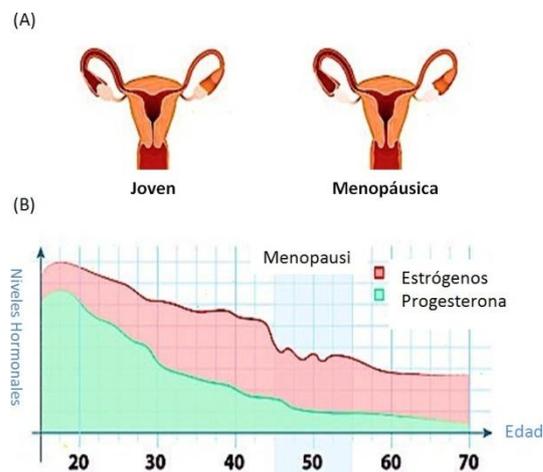


Figura 2. (A) Cambios en los ovarios de una mujer en etapa reproductiva y en etapa menopáusica. Al inicio de la menopausia el tamaño de los ovarios disminuye y se tornan de una coloración blanquecina, en cambio, en una mujer joven la irrigación sanguínea permanece constante por lo tanto los ovarios presentan una tonalidad rosada. **(B)** Variaciones en los niveles de hormonas sexuales durante la vida de la mujer, se observa que al inicio de la menopausia comienza el descenso de los estrógenos y la progesterona a medida que avanza la edad de la mujer ambas hormonas tienden a disminuir.

Tomado de: http://es.123rf.com/photo_45121638_fluctuacion-de-las-hormonas-que-se-produce-durante-la-menopausia-la-menopausia-como-una-etapa-en-la-.html

Epidemiología del Cáncer de ovario

En México, en el 2003 se registraron más de 4,000 nuevos casos de cáncer de ovario los cuales representaron la cuarta causa de muerte por cáncer en mujeres. Estudios epidemiológicos comprendidos entre los años de 1980 al 2011 indican que la cantidad de fallecimientos reportados en mujeres de entre 35 y 64 años se han elevado en un 1.4% (Torres-Sánchez et al., 2014). En México, el cáncer de ovario es el segundo tipo de cáncer ginecológico más frecuente, ya que se calcula que se diagnostican alrededor de 4 mil casos nuevos al año en México, lo que se traduce en 10 casos diarios y un diagnóstico nuevo cada 2 horas y siete muertes diarias (Programa de Cáncer de Ovario del INCan-México, 2016;<http://www.cancerdeovario.org.mx/info/image-styles.html>).

A nivel mundial, es la séptima causa de muerte por cáncer en las mujeres (World Cancer Research Fund International, 2016) pero es la neoplasia ginecológica más letal debido a que en la mayoría de las mujeres se diagnostica en estadios tardíos de la enfermedad (Jelovac y Armstrong, 2011; Song et al., 2014; Torres-Sánchez et al., 2014). En 2012, se diagnosticaron cerca de 239,000 nuevos casos, siendo la tasa de supervivencia a 5 años del 30 al 50% (World Cancer Research Fund International, 2016). Entre los países que presentan una mayor incidencia de este cáncer, se encuentran los europeos, seguidos de EUA, Canadá y México y de menor incidencia Colombia, Uruguay, Australia seguido por Brasil y Argentina.

El tumor maligno más frecuente de ovario es el tipo epitelial, cerca del 85 al 90% corresponden a carcinomas ováricos epiteliales, seguidos por los de variedad de línea germinal y tumores de estroma que suelen afectar a mujeres jóvenes (figs. 3 y 4) (De León, 2011); estos carcinomas son detectados en estadios avanzados de la enfermedad, ya que no presentan síntomas que determinen su rápida detección, en la mayoría de las ocasiones se confunde con síndrome de colon irritable y aunque cerca del 80% de los casos responde al tratamiento primario; entre el 60-70% de las mujeres presenta una recaída que se vuelve refractaria a la quimioterapia, aunado a que las pacientes se dirigen con médicos oncólogos que carecen de la preparación requerida para el tratamiento, aumentando el riesgo de tener una cirugía que conlleve a un mal pronóstico para las pacientes (De León, 2011; Gallardo-Rincón et al., 2016).

La detección oportuna de los tumores malignos de ovario es un factor esencial para un buen pronóstico, tal es el caso de las mujeres que en etapas tempranas reflejan una sobrevivencia de 90% a los 10 años posteriores a su diagnóstico; sin embargo, la mayoría de las mujeres en etapas avanzadas de la enfermedad presentan una sobrevivencia a los 5 años del 50%-60% (Hennessy et al., 2009; Malek y Tchernitsa, 2013).

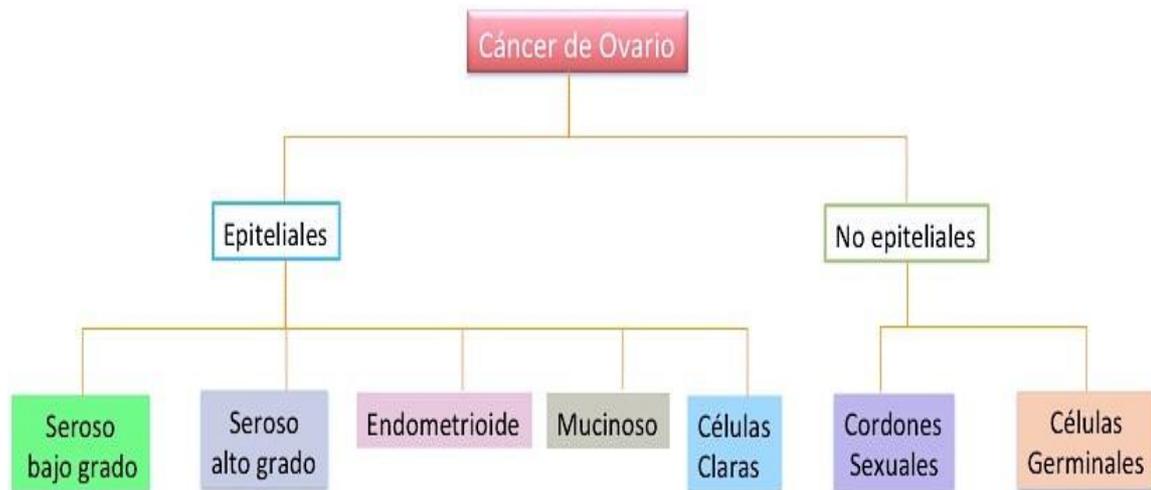


Figura 3. Clasificación del cáncer de ovario de acuerdo a su origen, entre los que derivan del epitelio superficial del ovario (ESO) se encuentran: los tumores serosos de bajo grado, serosos alto grado, endometrioides, mucinosos y células claras; los de tipo no epitelial (derivan de estructuras diferentes al ESO) cordones sexuales de tejido estromal y de células germinales, éstos últimos son los que se presentan en menor frecuencia de los tumores ováricos.



Figura 4. Ilustración esquemática de la localización de los diversos tipos de cáncer de ovario que pueden presentarse en la mujer. El tumor de tipo epitelial es el más frecuente de los tipos de cáncer de ovario, éste se desarrolla en etapas de menopausia y posmenopausia en la mujer, suele ser detectado en etapas tardías y representa el de mayor riesgo, en cambio, los de tipo de células germinales y células estromales, son menos comunes y suelen desarrollarse en mujeres jóvenes, además de tener un pronóstico favorable para las mujeres que los desarrollan. Tomado de: <http://www.gicom.org.mx/en/cancerdeovario/cancerdeovario-2.html>

Cáncer de cordones sexuales

El cáncer de cordones sexuales (SCSTs por sus siglas en inglés, de Ovarian Sex Cord-Stromal Tumors), derivan de diferentes tipos celulares que se presentan en etapa embrionaria, tales como las células de la granulosa, de Sertoli, la teca o fibroblastos, los cuales podrían dar origen a ciertos tumores como los de células de la granulosa, tecomas, fibrotecales, de células estromales, de Sertoli-Leydig, etc, (fig. 5) (Al-Agha et al., 2011). Su incidencia es muy baja, llega a tener una frecuencia del 8% de los tumores de ovario, este tipo de tumores se ha visto relacionado con diversos tipos de mutaciones asociadas a cada estirpe celular (Gershenson, 2012).

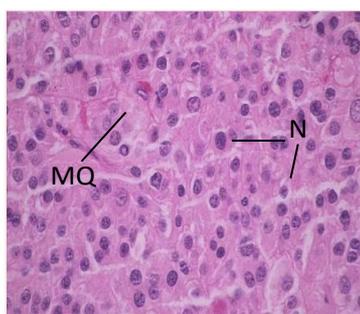


Figura 5. Micrografía óptica de corte transversal de un tumor de células de Leydig de cordones sexuales. En morado se observan los núcleos (N) y en rosa estructuras del mesénquima y tejido conectivo (MQ), tinción con Hematoxilina y Eosina (Al-Agha et al., 2011).

Cáncer de células germinales

El cáncer de células germinales (MOGTs por sus siglas en inglés, Malignant Ovarian Germ Cell Tumors), se desarrolla en células germinales, con un alto índice de crecimiento y malignidad, se presentan en tumores de tipo disgerminoma, en su mayoría se han visto asociados a teratomas y tumores de tipo mixto (Sigismondi et al., 2015). Pueden presentarse algunos otros carcinomas de tipo embrionario como, coriocarcinomas y poliembrioma, sin embargo, son poco frecuentes (Parkinson et al., 2011). Los MOGTs representan poco menos del 5% de los tumores ováricos, se desarrollan con mayor frecuencia en la adolescencia y en mujeres jóvenes (fig 6). Presentan un mejor tratamiento inclusive en etapas avanzadas a diferencia de los tumores ováricos de tipo epitelial (Gershenson, 2012).

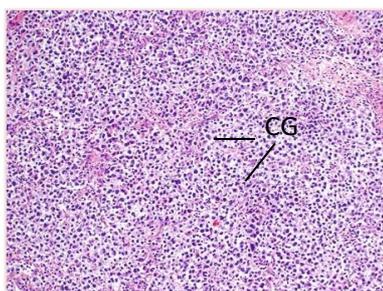


Figura 6. Micrografía óptica de corte transversal de tumor mixto de células germinales (CG), tinción con Hematoxilina y Eosina (Talerman y Vang, 2011).

Etiología del Cáncer epitelial de ovario

El cáncer epitelial de ovario (CEO) surge del epitelio superficial, es el más común de los tumores malignos de ovario y presenta una elevada letalidad atribuida a diversos factores tales como: detección tardía de la enfermedad, falta de biomarcadores de diagnóstico, alta recidiva (reaparición del cáncer) y resistencia a tratamientos (Schüler et al., 2013). Es una enfermedad con síntomas inespecíficos como inflamación, dolor en pelvis o abdomen, dificultad para ingerir alimentos, saciado rápido, sensación de orinar constantemente, acumulación de líquido de ascitis, en la mayoría de los casos los síntomas son muy similares a otro tipo de enfermedades, principalmente las que involucran a la cavidad abdominal, tales como indigestión, colitis y síndrome de colon irritable (Stack y Fishman, 2010; American Cancer Society, 2016; <http://www.cancer.org/cancer/ovariancancer/detailedguide/ovarian-cancer-what-is-ovarian-cancer>) por lo que no se sospecha el cáncer como primera opción y en la mayoría de los casos, se diagnostican en etapas avanzadas de la enfermedad con metástasis extendida (Malek y Tchernitsa, 2013).

Por otra parte, estudios realizados en tumores ováricos, reflejan que cada subtipo tumoral responde de manera diferente a los tratamientos, por lo que una caracterización más detallada de dicha neoplasia es crucial para determinar un tratamiento efectivo, oportuno y menos invasivo (Mungenast y Thalhammer, 2014).

Estadios de CEO

De acuerdo con la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, la FIGO, los tumores ováricos se agrupan con base a su origen, estadio y nivel de diseminación. En la actualidad la clasificación de los estadios de la enfermedad se basan en cuatro principales etapas, siendo la de tipo I en la que se presentan los menos agresivos debido a que la masa tumoral se encuentra localizada en uno o ambos ovarios, en el caso de la tipo II involucra ovarios y cavidad pélvica, la tipo III, ovarios, cavidad pélvica, formación de implantes en peritoneo y metástasis a nivel de nódulos linfáticos y la última etapa corresponde a la tipo IV que es determinada cuando existe una metástasis distal hacia diversos órganos (Zeppernick y Meinhold-Heerlein, 2014).

En la siguiente tabla se observa de manera detallada la etapificación del cáncer de ovario estipulada por la FIGO (Stack y Fishman, 2010).

Etapa	Características de la etapa
<u>I</u>	Limitado a los ovarios.
<u>IA</u>	Limitado a un ovario, presenta cápsula intacta sin tumoración en la superficie del ovario y sin células malignas en líquido de ascitis o en lavados peritoneales.
<u>IB</u>	Limitado a ambos ovarios, cápsula intacta sin tumor en la superficie del ovario y sin células malignas en líquido de ascitis o en lavados peritoneales.
<u>IC</u>	Limitado a uno o ambos ovarios, presentando ruptura en la cápsula, tumoraciones presentes en la superficie del ovario, presencia de células malignas en líquido de ascitis o en lavados peritoneales.
<u>II</u>	El tumor involucra uno o ambos ovarios con extensión pélvica.
<u>IIA</u>	Extensión e implantes en útero o tubas, sin presencia de células malignas en líquido de ascitis o en lavados peritoneales.
<u>IIB</u>	Extensión a órganos pélvicos vecinos, sin presencia de células malignas en líquido de ascitis o en lavados peritoneales.
<u>IIC</u>	Presencia de células malignas en líquido de ascitis o en lavados peritoneales.
<u>III</u>	Se involucra uno o ambos ovarios con metástasis confirmada en cavidad peritoneal fuera de la cavidad pélvica con diseminación a nódulos linfáticos.
<u>IIIA</u>	Metástasis microscópica en peritoneo fuera de la pelvis.
<u>IIIB</u>	Metástasis microscópica en peritoneo fuera de la pelvis <2 cm de dimensión .
<u>IIIC</u>	Metástasis microscópica en peritoneo fuera de la pelvis >2cm de dimensión, con metástasis hacia nódulos linfáticos (incluyendo nódulos inguinales) incluyendo la superficie de la cápsula del hígado.
<u>IV</u>	Metástasis distante más allá de la cavidad peritoneal, metástasis en hígado y efusión pleural.

Por otra parte se han clasificado a los tumores ováricos a partir de criterios moleculares en dos categorías: los de tipo I o de bajo grado, son aquellos que presentan una marcada diferenciación entre los compartimentos tisulares (epitelio-mesénquima; los tumores serosos bajo grado son característicos de este tipo de clasificación, los cuales, presentan mutaciones en KRAS, BRAF, PTEN y PI3K; los de tipo II o de alto grado, son tumores que presentan poco grado de diferenciación, ya que han perdido la arquitectura del tejido, por lo que es casi imposible distinguir entre compartimentos tisulares, en esta clasificación se incluyen a los tumores serosos de alto grado, mucinosos y de células claras, los cuales presentan mutaciones en p53, BRCA1 y BRCA1 (Auersperg et al., 2001a; Jayson et al., 2014; Schüler et al., 2013).

Clasificación de CEO por subtipos histológicos

Este tipo de carcinoma se clasifica de acuerdo a sus características histopatológicas, las cuales presentan diferentes índices de prevalencia en todo el mundo, los subtipos que se presentan en mayor frecuencia, son los tumores serosos de alto grado (HGSC, 70%), el tipo endometriode (EC, 10%) de células claras (CCC, 10%), el mucinoso (MC, 3%) y el carcinoma seroso de bajo grado (LGSC <5%) (Zeppernick y Meinhold-Heerlein, 2014). No obstante, en algunos casos los carcinomas de tipo mucinoso se presentan con mayor frecuencia con respecto a los de células claras.

A continuación se describen con mayor detalle cada uno de estos subtipos de CEO:

Seroso Limitrofe

Se caracterizan por presentar masas de tipo quísticas, de 2 a 25 cm, atipia nuclear, en algunos casos estratificación del epitelio y proyecciones micropapilares, polimorfismo celular y gran actividad mitótica. Este tipo de tumores no es considerado como un carcinoma, debido a que no hay invasión por parte de las células epiteliales al estroma como en otros tipos de tumores del mismo subtipo (serosos de bajo y alto grado); mientras que en ciertos casos pueden formar implantes en la cavidad peritoneal, pero no presentan propiedades metastásicas e invasivas (fig. 7), por lo que el pronóstico de supervivencia a este tipo de tumor es mayor (Fauser y Genazzani, 2015; Prat, 2012).

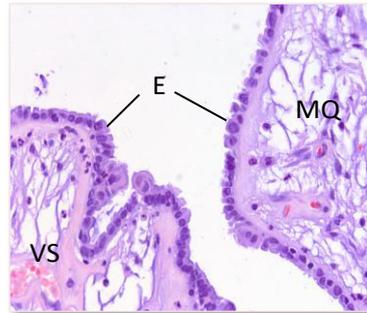


Figura 7. Micrografía óptica de corte transversal de tumor epitelial de tipo seroso límite, proveniente de mujer menopáusica, se observan cada uno de los compartimentos tisulares (epitelio-estroma). (E) El epitelio superficial se encuentra delimitando al tejido mesenquimatoso (MQ), en morado se observan los núcleos de las células epiteliales (N), se aprecia la ausencia de invasión de esta estirpe celular al tejido contiguo, (VS) en rojo se pueden visualizar pequeños vasos sanguíneos y glóbulos rojos; tinción con Hematoxilina y Eosina (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

Seroso de alto grado (HGSC)

La mayor parte de las pacientes presenta cáncer de ovario de alto grado, esta enfermedad es caracterizada por presentar mutaciones en p53 (proteína encargada en la regulación de ciclo celular). Aunque este tipo de tumor se ha asociado al epitelio superficial del ovario, evidencia reciente sugiere que la malignidad puede provenir de la fimbria de la tuba, lo cual refleja la semejanza histológica entre ambos tipos de tejido, de ahí su nombre de tipo seroso (fig. 7.1) (Jayson et al., 2014). Se ha propuesto que este tipo de carcinomas están asociados a lesiones provenientes del tejido tubárico lo que indicaría que posiblemente el origen de este subtipo provenga de dicho tejido (Nik et al., 2014). A menudo se encuentran ampliamente diseminados al momento del diagnóstico, a diferencia del tipo límite que no suele invadir otros compartimentos tisulares, presentan superficie lisa o con excrecencias papilares, de estroma edematoso, células neoplásicas dispersas y áreas necrosadas (Fernández y Núñez, 2004).

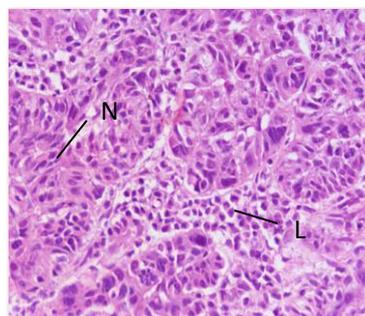


Figura 7.1 Micrografía óptica de corte transversal de tumor epitelial del subtipo seroso de alto grado, de mujer en etapa menopáusica, se muestra la pérdida completa de la arquitectura del tejido, se observan los núcleos de las células epiteliales en un tejido indiferenciado (N), así como la infiltración de linfocitos (L); tinción con Hematoxilina y Eosina (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

Cáncer de ovario Endometriode (EC)

Se han reportado mutaciones en p53 en este subtipo, a diferencia del subtipo seroso, los tumores del tipo endometriode se caracterizan por asemejarse histológicamente a tejido de endometrio. El 20% son bilaterales y hasta un 25% de los casos se asocia con cáncer de endometrio, presenta glándulas y macroscópicamente son tumoraciones sólido-quísticas (fig. 7.2). Aproximadamente el 10% se asocia con endometriosis (Fernández y Núñez, 2004).

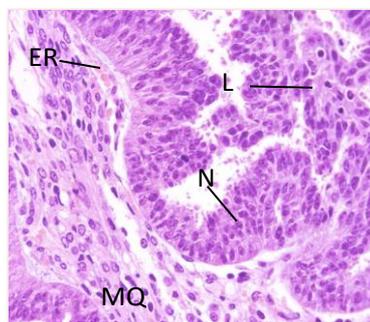


Figura 7.2. Micrografía óptica de corte transversal de tumor epitelial del subtipo endometriode, se observa la conformación de papilas con epitelio alto presentes en este subtipo, en morado (N) se muestran los núcleos de las células epiteliales, así como la presencia de pequeños linfocitos (L), en rojo (ER) se aprecia la infiltración de eritrocitos y estroma (MQ). Este tipo de tumores pueden llegar a formar estructuras glandulares que se asemejan al tejido endometrial. Tinción con Hematoxilina y Eosina (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

Cáncer de ovario Mucinoso (MC)

Este tipo de cáncer es el que se diagnostica comúnmente en etapas tempranas de la enfermedad, es extremadamente raro, ocurre de un 2-4% de los carcinomas epiteliales de ovario (Chao et al., 2013) se ha visto relacionado con cánceres de tipo gastrointestinal como colon y estómago, se ha propuesto que su origen proviene de estos tejidos y puede llegar a hacer metástasis en ovario (Jayson et al., 2014; Petrik, 2013). Son tumores sólidos o quísticos, con zonas necrosadas y hemorragias frecuentes. Una de sus características es que en el mismo tumor coexisten áreas benignas, limitrofes o *borderline* y zonas de malignidad. Se caracterizan por tener grandes acúmulos citoplasmáticos de mucina (fig.7.3) (Fernández y Núñez, 2004).

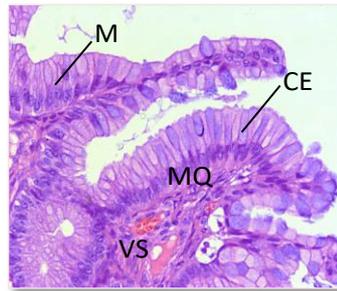


Figura 7.3. Micrografía óptica de corte transversal de tumor epitelial del subtipo mucinoso, de mujer en etapa menopáusica. Las células epiteliales de tipo cilíndrico con núcleos basales (CE), este tipo de tumores se caracteriza por la formación de vacuolas que contienen gran cantidad de mucina (M), en rosa se observa el tejido de mesénquima (MQ), y en rojo la presencia de vasos sanguíneos (VS); tinción con Hematoxilina y Eosina (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

Cáncer de ovario de células claras (CCC)

Este tipo de cáncer presenta una incidencia relativamente baja, se ha asociado a endometriosis al igual que el del subtipo endometriode (Petrik, 2013), este tipo de tumores se presentan como una gran masa localizada en la pelvis, comúnmente suelen ser unilaterales (fig. 7.4), se diagnostican en etapas tempranas sin embargo, las pacientes que padecen este tipo de tumor en particular presentan poca respuesta a tratamientos clínicos y quimioterapia por lo que al momento de su diagnóstico son clasificados como de alto grado (Jayson et al., 2014; Sugiyama et al., 2000).

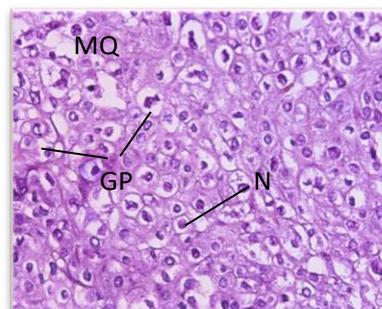


Figura 7.4. Micrografía óptica de corte transversal de tumor epitelial del subtipo de células claras, de mujer en etapa postmenopáusica. Las células presentan un núcleo claramente picnótico (N) y el citoplasma muestra una ausencia de coloración debido a la gran cantidad de glucoproteínas (GP) y en rosa se observa el tejido mesenquimal (MQ); tinción con Hematoxilina y Eosina (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

Hormonas Esteroides Sexuales del Ovario

Las hormonas esteroides presentan características liposolubles, comparten un esqueleto formado por el ciclopentanoperhidrofenantreno, que contiene 17 átomos de carbono (C). Se sintetizan a partir del colesterol, el cual contiene 27 átomos de carbono, dando lugar a la progesterona (21-C), los andrógenos (19-C) y los estrógenos (18-C) (Strauss y Barbieri, 2013).

Andrógenos

Los andrógenos son las hormonas sexuales masculinas por excelencia, ya que en el varón determinan los caracteres sexuales primarios y secundarios, así como el desarrollo y diferenciación de órganos reproductivos internos y externos. En la mujer, los andrógenos son sintetizados en las células de la teca interna del folículo ovárico a partir del colesterol. Las concentraciones circulantes de andrógenos cambian principalmente dependiendo de la etapa del ciclo menstrual y la edad de la mujer (Burger, 2002).

Estrógenos

Los estrógenos son las hormonas femeninas que intervienen en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios, durante el ciclo menstrual regulan la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, facilitan el crecimiento y maduración de los folículos ováricos, aumentan la motilidad de las trompas uterinas, participan en los cambios cíclicos del endometrio, el cuello uterino y la vagina, así como el desarrollo de la glándula mamaria (Strauss y Barbieri, 2013). Incluyen al 17β estradiol, el cual es resultado de la biotransformación de un anillo neutro (andrógenos) a un anillo fenólico, debido a un proceso de aromatización llevado a cabo por la enzima aromatasa. El estradiol, la estrona y el estriol que son secretados principalmente por las células de la granulosa de los folículos ováricos, el cuerpo lúteo y la placenta. Los estrógenos también participan en las funciones de otros tejidos y órganos como cerebro, piel, corazón, músculo esquelético, hueso, hígado, etc. (Boron y Boulpaep, 2012).

Progesterona

La progesterona es secretada por el cuerpo lúteo que resulta del folículo ovárico. Los principales órganos blanco de la progesterona son el útero, las glándulas mamarias y menor cantidad en el cerebro. La progesterona regula los cambios cíclicos en el endometrio, el cérvix y la vagina. Esta hormona es indispensable para el mantenimiento de la gestación (Strauss y Barbieri, 2013).

Receptores de hormonas esteroides sexuales

Las hormonas esteroides ejercen su acción por medio de su unión a receptores miembros de la súperfamilia de receptores nucleares que actúan como factores de transcripción, entre los que destacan receptores de andrógenos (AR), glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR), estrógenos (ER) y progesterona (PR) (Bottino y Lanari, 2010).

Los receptores de hormonas esteroides comparten una estructura similar, que consiste en un dominio carboxilo-terminal, el dominio de unión al ligando (LBD), una región central capaz de unir al ADN (DBD) y un dominio amino-terminal (NTD) imprescindible para lograr la actividad transcripcional propia de cada receptor, las regiones LBD y DBD presentan secuencias altamente conservadas, mientras que la región NTD es muy variable en su secuencia primaria y longitud, en la misma proteína pueden encontrarse dos secuencias que participan en el facilitar procesos de transcripción (AF) el primero AF-1 en el NTD y AF-2 en el dominio de unión al ligando (Bottino y Lanari, 2010).

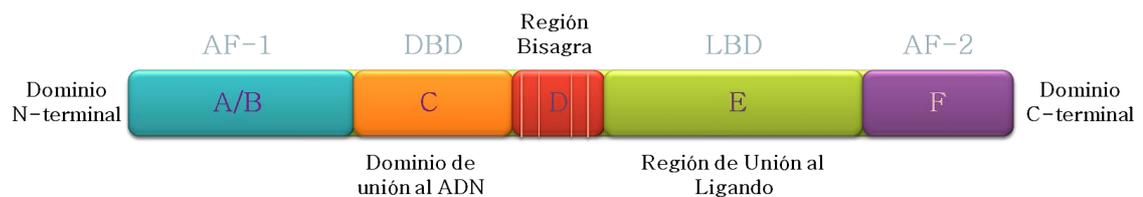


Figura 8. Estructura básica de los receptores de la súperfamilia de hormonas esteroides sexuales. Modif. de (Li y Al-Azzawi, 2009).

Estos receptores se encuentran tanto en el citosol como en el núcleo de las células blanco; al unirse con su ligando específico forman dímeros que se translocan al núcleo y actúan como factores de transcripción interaccionando con sus elementos de respuesta, secuencias palíndromas definidas en el DNA normalmente localizadas en regiones reguladoras de genes blancos.

Existen rutas alternativas para la activación de los receptores nucleares dependientes de la unión a su ligando. Por ejemplo, algunos de ellos pueden ser fosforilados a consecuencia de la interacción con receptores de ciertos factores de crecimiento como el TGF- β ; estas rutas de señalización pueden afectar también la transcripción mediante moléculas que actúan en la vía, como es el caso de las smad3 (proteínas que participan en la vía de señalización de TGF- β); debido a ello puede presentarse un entrecruzamiento de la señal entre receptores nucleares y receptores membranales (Aranda y Pascual, 2001).

Receptor de Andrógenos

La función biológica tanto de los andrógenos como de otras hormonas sexuales depende de la interacción de éstas con su receptor. El receptor de andrógenos (AR) se encuentra en el cromosoma X (q 11-12) está conformado por ocho exones, la proteína presenta una secuencia de 919 aminoácidos con una masa de 110 kDa (Bottino y Lanari, 2010; Lonergan y Tindall, 2011).

Este receptor está localizado en diversos tejidos con actividad androgénica, de tal manera que los andrógenos ingresan a las células por difusión pasiva, como es el caso de 5 α -dihidrotestosterona y la testosterona y se unen por uniones no covalentes a su receptor específico formándose un dímero que se transloca a núcleo y como resultado se presenta el reclutamiento de coactivadores o correpresores que permiten que se lleve a cabo la transcripción de genes específicos (Traish et al., 2002).

Receptor de Estrógenos

Al igual que en otras hormonas, la actividad estrogénica es mediada por su receptor (ER) de tal manera que los estrógenos como el estradiol actúan como ligando que al unirse a su receptor funcionan como factores de transcripción regulando ciertos genes blanco.

Existen dos principales receptores asociados a los estrógenos, el ER α y el ER β los cuales comparten un 96% de homología entre sus secuencia de aminoácidos en el sitio de unión al DNA, son transcritos por los genes ESR1 y ESR2 respectivamente (Gulliver y Hurst, 2011). El ER α y el ER β se encuentran codificados por los cromosomas 6 y 14, presentan cinco dominios A/B, C, D, E y F, cada uno con

diferentes funciones específicas en la proteína, el A/B se encuentra en el extremo N-terminal, presenta los dominios de activación (AF-1) éstos de suma importancia debido a que participan en la acción de diversos genes blanco. El dominio C es el responsable de la unión de la proteína al DNA y de la dimerización del receptor presentando una alta homología entre los receptores de estrógenos, el dominio D (región bisagra) brinda flexibilidad a la proteína, en el caso del E, participa en la unión al ligando, presenta un dominio de activación dependiente de la hormona (AF-2) y junto con la unión al DNA se facilita la homodimerización o heterodimerización, por otra parte el tipo F, presenta una acción y actividad que aún se desconoce (Mungenast y Thalhammer, 2014; Strauss y Barbieri, 2013).

La localización de estos receptores es muy diversa, en el caso del ER α se sitúa principalmente en el útero, glándula mamaria, testículo, hígado, riñón, músculo cardíaco y tejido de músculo esquelético. Los efectos que presenta cada uno de los receptores son muy diversos, en el caso del ER α induce una respuesta de diferenciación, sobrevivencia y proliferación celular, de tal manera que una alteración en la actividad normal de este receptor aumenta la probabilidad de desarrollar ciertos tipos de cáncer como el de mama y endometrio (Mungenast y Thalhammer, 2014).

Receptor de Progesterona

La progesterona es una hormona esteroide de 21 átomos de carbono, que se sintetiza en el ovario, principalmente por el cuerpo lúteo, en la segunda fase del ciclo sexual (Boron y Boulpaep, 2012). Esta hormona participa en múltiples funciones, tales como, ovulación, desarrollo alveolar, mantenimiento del endometrio durante la gestación, lactancia, conducta sexual; estas y otras acciones fisiológicas son mediadas por el receptor de progesterona (PR). El PR actúa como factor de transcripción, sin embargo se ha observado que esta proteína puede llevar a cabo una función transcripcional por la vía no genómica llevada a cabo principalmente por segundos mensajeros (Scarpin, 2009). Este receptor presenta dos isoformas (PR-A y PR-B), presentes de la transcripción de dos promotores alternativos de un mismo gen (11q 22–23). El PR-B presenta 164 amino ácidos más que el receptor PR-A en la región N-terminal (Bottino y Lanari, 2010). Ambas isoformas presentan funciones esenciales, el PR-B participa en el mantenimiento y desarrollo de la glándula mamaria, el PR-A actúa principalmente a nivel del útero y funcionamiento reproductivo; estos receptores pueden actuar en forma de homodímeros para PR-A y PR-B o heterodímeros de ambos (Scarpin, 2009).

Factores de crecimiento

Los factores de crecimiento corresponden a un conjunto de moléculas de naturaleza proteínica, tendiendo como función la regulación del ciclo celular y distintas etapas de este. Todos los factores de crecimiento comparten características específicas para realizar sus funciones estimulantes, interactuando con moléculas receptoras ubicadas en la membrana plasmática, de las células blanco generando señales transmitidas posteriormente hacia el interior del citoplasma mediante la activación de enzimas con actividad de cinasas que fosforilan ciertos sustratos proteínicos. De este modo una cascada de señales conocida como transducción de señales que finaliza activando la expresión específica de ciertos genes, que serán traducidos en los ribosomas, constituyéndose en la respuesta celular de un determinado factor de crecimiento (Cornejo Uribe, 2011; Massague, 2005; Sosa-Garrocho y Macías-Silva, 2004).

Entre los factores de crecimiento más conocidos, se encuentran, el factor de crecimiento fibroblástico α y β , el factor de crecimiento transformante beta, el factor derivado de plaquetas, el factor de crecimiento del endotelio vascular y los factores de crecimiento similares a la insulina I y II (FGFa, FGFB, TGF- β , PDGF, VEGF, IGF-I y IGF-II) (Boron y Boulpaep, 2012).

Factor de crecimiento transformante beta (TGF- β)

El factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) pertenece a la superfamilia de los TGF β , los cuales presentan más de 60 proteínas, el TGF- β es el más representativo debido a que fue el primero en ser descrito, sin embargo, las proteínas formadoras de hueso (BMPs), las activinas, las inhibinas, los factores de crecimiento y diferenciación (GDFs), la sustancia inhibidora Muleriana (MIS), entre otros, también forman parte de esta familia (Sosa-Garrocho y Macías-Silva, 2004).

Se han descrito cinco isoformas relacionadas este factor: TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 (descritas en mamíferos, codificadas en el genoma humano, 19q13, 1q41 y 14q24 respectivamente), TGF- β 4 (aves) y TGF- β 5 (anfibios) (Chou et al., 2010). Los TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3, forman dímeros estabilizados por interacciones hidrofóbicas unidas por puentes disulfuro, los monómeros a su vez presentan un anillo de cisteína que le brinda estabilidad a la proteína (Podar et al., 2007). Cada una de las tres isoformas es sintetizada como un homodímero de 75-kDa conocido como un pro-TGF- β procesado por proteólisis en el aparato de Golgi para obtener la forma madura. Estos homodímeros de 25-kDa interactúan con la proteína asociada a latencia (LAP) para formar un pequeño complejo latente. Durante su secreción el TGF- β es escindido de la LAP ya que ambas porciones están unidas por

uniones no covalentes. A este complejo de TGF- β unido a la LAP se les acopla una de las cuatro proteínas de unión al TGF- β (LTBP's) que tiene el papel de almacenar al TGF- β en la matriz extracelular (Principe et al., 2014). El TGF- β 1 participa en la producción de matriz extracelular, neovasacularización, función inmune, regulación de la proliferación celular, diferenciación y movilidad (Tas et al., 2014), sus efectos son principalmente locales mediante mecanismos reguladores, los cuales pueden ser autocrinos o paracrinos (Papadatos-Pastos et al., 2011). Una de las principales funciones de esta proteína es la de inhibir el crecimiento de células epiteliales (Cao et al., 2012); está compuesto de cinco isoformas y cada una de ellas es esencial para el desarrollo de los organismos (Principe et al., 2014).

Esta citocina está estructurada como un ligando dimérico-polipeptídico, caracterizado por presentar seis residuos de cisteína bien conservados en diferentes tipos de especies. Cada TGF- β presenta receptores asociados a éste, como el de tipo I y el de tipo II, la expresión de cada uno de ellos depende de su célula blanco específico (Podar et al., 2007). Los receptores de TGF- β tienen actividad enzimática del tipo cinasa de serinas/treoninas RI y RII ambos receptores son glucoproteínas de aproximadamente 500 aminoácidos, están organizados en un dominio N-terminal extracelular de unión al ligando, una región transmembranal y un dominio C-terminal con dominio de cinasa de serinas/treoninas. Además, en los receptores tipo I se presenta un motivo rico en glicina/serina (GS) (Shi y Massagué, 2003).

Los TGF- β 1 y TGF- β 2 son sintetizados por diversas estirpes celulares, mientras que el TGF- β 3 es expresado sólo por células mesenquimales (Peralta-Zaragoza et al., 2001; Podar et al., 2007).

Los TGF- β controlan múltiples procesos, incluyendo la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Actúan a través de receptores denominados TGF- β RI y TGF- β RII. El TGF- β se une primero al TGF- β RII y una vez formado este complejo fosforila al TGF- β RI y así iniciar su vía de señalización. El TGF- β RIII también conocido como betaglicano es un receptor accesorio que ancla el complejo ligando receptor a la membrana celular (Shi y Massagué, 2003).

Los receptores TGF- β R son los que inician la cascada de señalización, una vez que se une del TGF- β con el TGF- β RII, éste recluta y activa a TGF- β RI (Massague, 1998; Qiu et al., 2015; Shi y Massagué, 2003), de esta manera, se forma un complejo en el cual el receptor RI es fosforilado por RII en el dominio GS situado antes del dominio de cinasa cuya fosforilación se presenta en diversos residuos de serina treonina. En ausencia de su ligando cada TGF- β RI y TGF- β RII se encuentran en la membrana plasmática en forma de homodímero y cuando están unidos a TGF- β (dímero) se encuentran como un heterodímero (Sosa-Garrocho y Macías-Silva, 2004). Una vez fosforilado el TGF- β RI por acción de TGF- β RII aparecen dos efectos, se libera el receptor de las moléculas inhibitoras y permite la unión de moléculas efectoras (Smad) las cuales son fosforiladas en su porción C-terminal por el TGF- β RI lo que

estimula su actividad serina/treonina cinasa, con la subsiguiente fosforilación en distintos miembros de la familia de las proteínas Smad (Shi y Massagué, 2003) (R-Smads: Smad2 y Smad3 en el caso del TGF- β 1). Estas proteínas fosforiladas se unen a otro miembro de la familia Smad (Co-Smad o Smad 4) y, como resultado, se produce su translocación al núcleo, en donde sus dominios MH1 interactúan con secuencias de DNA de forma célula-específica (5' AGAC-3') conocidas como elementos de unión a Smad (Sosa-Garrocho y Macías-Silva, 2004), los cuales interactúan con otros factores de transcripción para finalmente regular la expresión génica. Una de las principales consecuencias de la unión de TGF- β a sus receptores es su capacidad de inhibir el crecimiento y regular la diferenciación y muerte celular (Vanegas y Vásquez, 2011).

Antecedentes

En México, en el 2003 se registraron más de 4,000 casos nuevos de cáncer de ovario los cuales representaron la cuarta causa de muerte por cáncer en las mujeres; estudios epidemiológicos comprendidos entre los años de 1980 al 2011 indican que la cantidad de fallecimientos reportados en mujeres de entre 35 y 64 años se ha elevado en un 1.4% (Torres-Sánchez et al., 2014) cerca del 85 al 90% corresponden a carcinomas ováricos epiteliales (De León, 2011).

El tumor maligno más frecuente de ovario es el tipo epitelial, se detecta en estadios avanzados de la enfermedad, ya que no presenta síntomas que determinen su rápida detección, en la mayoría de las ocasiones se confunde con síndrome de colon irritable y aunque cerca de 80% de los casos responde al tratamiento primario, entre el 60-70% de las mujeres presenta una recaída que se vuelve refractaria a la quimioterapia, aunado a que las pacientes se dirigen con médicos que carecen de la preparación requerida para el tratamiento aumentando el riesgo de tener una cirugía que conlleve a un mal pronóstico para las pacientes (De León, 2011; Gallardo-Rincón et al., 2016).

El riesgo de padecer CEO en la población femenina es de un 1.8%, sin embargo, éste aumenta en un 5% si existen antecedentes familiares de cáncer de mama u ovario; en el caso de presentarse mutaciones en BRCA 1 y BRCA2 el riesgo se eleva de hasta un 45% por arriba de la población en general (Gallardo-Rincón et al., 2016). Este tipo de cáncer se ha visto relacionado con la mutación en diversos genes los cuales llevan a su cargo el control de división celular, así mismo, se ha visto que cada uno de ellos se relaciona de manera particular con algún subtipo histológico de CEO (Jayson et al., 2014).

Receptores de Hormonas Esteroides en el Cáncer de Ovario

Receptor de andrógenos y su relación con procesos cancerígenos

Actualmente se han descrito diversos mecanismos por los cuales el receptor de andrógenos (AR) bajo condiciones alteradas puede originar procesos anormales que desencadenen eventos neoplásicos en diversos tipos de tejidos (Bottino y Lanari, 2010). En el caso particular de cáncer de mama, el AR, se encuentra expresado entre 60 y un 80% aproximadamente en tumores metastásicos; sin embargo, su presencia está determinada por diversos factores, los cuales se determinan principalmente por el subtipo clínico, edad y estadios de la enfermedad (Chia et al., 2015). En otros tipos de cáncer como el de próstata, este receptor juega un papel importante, debido a que se relaciona con factores de transcripción, de crecimiento y postranscripcionales que alteran y modifican los mecanismos en la funcionalidad normal del AR (Richter et al., 2007); tal es el caso de IGF, VGF y TGF β , los cuales pueden cruzar río abajo con la vía de AR induciendo angiogénesis, crecimiento y diferenciación celular; por otro lado el EGF también participa en la regulación de efectores que activan al AR promoviendo procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia celular en células cancerosas de próstata (Zhu y Kyprianou, 2008).

En condiciones normales en la mujer el AR se expresa en la superficie epitelial del ovario; su función radica en el mantenimiento y crecimiento del tejido ovárico (Zhu et al., 2016), se ha descrito en diversos tejidos del aparato reproductor femenino como trompas de Falopio y endometrio modulando diversas funciones locales y periféricas dependientes de andrógenos (Gibson et al., 2014). Sin embargo, en mujeres posmenopáusicas al aparecer cambios morfológicos y funcionales derivados de la pérdida en la reserva folicular, puede presentarse el desarrollo de quistes de inclusión que suelen observarse como pequeñas hendiduras derivadas del epitelio superficial del ovario, los cuales suelen originar una elevada vascularización; la importancia que reside en ellos, se debe a que pueden llegar a malignizarse y desarrollar carcinomas ováricos (Méndez et al., 2013; Schüller et al., 2013). Así mismo, estudios sugieren que el AR pudiese estar implicado en la transformación de quistes de este tipo en diversos subtipos de CEO en particular aquellos derivados de malignidades en tuba y endometrio. En endometrio el AR se ha relacionado con ciertos procesos de endometriosis, patología que se ha visto asociada con cáncer de ovario, en particular con el subtipo de células claras y endometrioides (Gibson et al., 2014). Así mismo, estudios epidemiológicos, reflejan que el aumento en los niveles de andrógenos incrementan la probabilidad de desarrollar CEO, debido a que presentan una influencia en la proliferación de células del epitelio superficial ovárico y disminución de procesos apoptóticos; esté

receptor se ha detectado por inmunohistoquímica hasta en el 90% de los casos de CEO estudiado (Papadatos-Pastos et al., 2011).

Por otro lado estudios realizados con dihidrotestosterona (DHT) en líneas celulares del subtipo seroso reflejan que ésta hormona estimula la división celular hasta en un 75%, además de que la ausencia o presencia del AR juega un papel crucial en procesos proliferativos, esto debido a que células carentes del AR muestran tasas de proliferación considerablemente menores en relación a las que lo expresaban, así mismo, se identificó que la cantidad androgénica administrada en líneas celulares modifica la respuesta del AR, debido a que en concentraciones elevadas aumentaba la presencia del receptor (Elattar et al., 2012). En el caso de mujeres que presentan síndrome de ovario poliquístico, hirsutismo, ciclos menstruales irregulares o anaovulación presentan mayor riesgo de desarrollar CEO debido a los altos niveles de andrógenos en circulación sistémica (Gibson et al., 2014), además de que el aumento de androstenediona y DHEA se han asociado al incremento del riesgo a desarrollar cáncer de ovario (Modugno et al., 2012).

Por otra parte, un estudio realizado con 46 muestras de mujeres diagnosticadas con CEO seroso con edades de entre 27 y 86 años, mostraron que la mayoría presentaba de moderada a fuerte inmunopositividad al AR, así mismo en células endometriales tratadas con DHT reflejan una marcada desregulación de genes importantes relacionados con proliferación celular, supervivencia celular y migración (Gibson et al., 2014). En cultivos celulares de las líneas SKOV-3 (células de cáncer de ovario) y la OVCAS-16 (derivadas de ascitis) mostraron que los tratamientos con DHT inhibían los efectos de TGF- β (citocina encargada en la regulación de proliferación celular en células epiteliales) al reducir las concentraciones de los receptores 1 y 2 provocando una desregulación de TGF- β (Modugno et al., 2012; Evanoglou et al., 2000), por lo tanto, las concentraciones de DHT presentes en cultivos celulares provocan una disminución considerable en el RNAm del TGF- β , lo cual induce la inhibición de los mecanismos de rescate para evitar procesos proliferativos en las células, lo que incrementa la probabilidad de inducir neoplasias, por lo tanto, el riesgo de desarrollar CEO es mayor cuando se presentan concentraciones elevadas de andrógenos (Leung y Adashi, 2003; Gibson et al., 2014).

Receptor de estrógenos y su relación con procesos cancerígenos

Los estrógenos presentan una gran actividad biológica en el organismo, participan regulando diversas funciones en el cuerpo, sin embargo el incremento de estrógenos endógenos se han visto relacionados con varios tipos de cáncer como el de mama; el riesgo aumenta cuanto existe menarquia temprana, menopausia tardía, nuliparidad, obesidad y el uso de terapia de reemplazo hormonal, debido a que incrementan los niveles de estradiol en plasma sanguíneo, además la expresión de diversas enzimas como aromatasa y sulfotransferasa se han relacionado con mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Diversos estudios han reportado que la enzima sulfotransferasa está relacionada con un incremento en los niveles de estradiol, los cuales elevan el riesgo de desarrollar cáncer de ovario además de que aumentan la movilidad celular al perder las uniones de adhesión celular promoviendo procesos metastásicos, además, su receptor (ER), se ha visto asociado con diversas funciones que podría inducir la acumulación de mutaciones que desencadenen una transformación maligna (Mungenast y Thalhammer, 2014). En el caso del ER α se relaciona con una mayor proliferación de células tumorales (Sieh et al., 2013), y ha sido reportado con una expresión alta en tumores malignos de alto grado y baja expresión en tumores metastásicos (Leung y Adashi, 2003), en el caso del ER β su expresión es mayor en tumores menos malignos como el caso de los de tipo limítrofe y en estadios tempranos (I y II), disminuyendo en tumores con mayor grado de malignidad, a diferencia del ER α el cual se ha visto su expresión especialmente en tumores de ovario del subtipo endometriode, seroso y células claras (Chan et al., 2008), mientras que presenta una baja asociación con el subtipo mucinoso (Arias-Pulido et al., 2009; Sieh et al., 2013).

Receptor de progesterona y su relación con procesos cancerígenos

Las hormonas esteroides sexuales juegan un papel importante en el desarrollo y mantenimiento de órganos y tejidos, en el ovario, estas hormonas participan en mecanismos que disminuyen el crecimiento anormal del epitelio superficial (OSE) e inducen apoptosis en células anormales, así mismo, la presencia de su receptor PR incrementa de un 40 a 70% en carcinomas de ovario se relaciona con la inducción de apoptosis, promoción de arresto celular y senescencia en líneas celulares de ovario y se ha asociado a un mejor pronóstico de sobrevida total y periodo libre de enfermedad cuando las pacientes son positivas para el PR y AR (Jeon et al., 2016; Jönsson et al., 2015; Modugno et al., 2012; Takahashi et al., 2009), no obstante, en el caso de ser negativo para PR y ER las pacientes presentan un pronóstico desalentador, debido a que el periodo de sobrevida es menor, sin

embargo, otros estudios sugieren que el PR podría estar actuando sobre el efecto proliferativo e inflamatorio que induce el ER, empero, aún se desconocen los mecanismos celulares que están participando en la acción ambos receptores (Arias-Pulido et al., 2009; Mungenast y Thalhammer, 2014).

La mayoría de los casos diagnosticados con CEO son positivos para el PR (principalmente para el subtipo seroso y endometriode) (Arias-Pulido et al., 2009; Modugno et al., 2012), lo que ha sido reportado como favorable, ya que su expresión se relaciona más en etapas tempranas de la tumorigénesis, dado que al disminuir la presencia de este receptor aumenta el grado de malignidad tumoral (Modugno et al., 2012). Para el caso del subtipo endometriode, las pacientes presentan una mayor sobrevida con la presencia del PR, independientemente de factores como la edad, estadio, grado, etc., mientras que en el caso de los tumores serosos de alto grado la expresión de este receptor ha sido propuesto como posible marcador de sobrevida, utilizando terapias hormonales como coadyuvante y que a su vez pueda presentar menos implicaciones tóxicas e invasivas para las pacientes (Sieh et al., 2013).

TGF- β en Cáncer epitelial de ovario

En la mayoría de las células TGF- β es un potente inhibidor del crecimiento celular y participa en el control y progresión del ciclo celular en la fase G1 tardía. Esta supresión del crecimiento ésta asociada con el incremento de la actividad en la expresión de varios inhibidores de cinasas dependiente de ciclinas (CKI) incluyendo p15, p21 y p27, las cuales participan en la inactivación de las CDK 4/6 (en ciclina D1) y en las CDK2 (en ciclina E), por lo que se impide la hiperfosforilación de PRB1 y por ende el E2F no puede ser disociado, lo cual frena la síntesis de genes que regulan el ciclo celular como *c-myc* y *c-myb* (Gálvez-Gastélum et al., 2004; Johnson, 2005). Debido a ello mutaciones en la vía de TGF- β puede también dirigir la pérdida en la habilidad de la célula para entrar en apoptosis. Es considerado como un freno paulatino en el desarrollo tumoral, sin embargo al verse alterado, promueve fallas en los controles celulares, por lo tanto se ha llegado a asociar a TGF- β con diversos cánceres epiteliales.

En el ovario TGF- β es un factor importante para el desarrollo del epitelio superficial del ovario durante la ovulación, la inhibición de los efectos de TGF- β induce la proliferación del epitelio superficial en el ovario (Chou et al., 2010), a su vez, la señalización regula importantes procesos en la reproducción femenina y es indispensable para el desarrollo y funcionamiento del ovario (Chen et al., 2001; Li, 2015). Sin embargo, estudios sugieren que cambios en las vías de señalización pueden ser cruciales para el desarrollo de cáncer epitelial de ovario, en estadios avanzados de este carcinoma, esta citosina puede

participar en vías de señalización no canónicas, lo cual propicia la activación de rutas de proliferación, migración, diferenciación, etc. (Chou et al., 2010).

Por otra parte, estudios han mostrado que TGF- β 1 es frecuentemente inactivado por mutaciones en cáncer metastásico en mama, cabeza y cuello, además se ha visto explorada la posibilidad de que mutaciones en TGF- β induzcan cáncer de ovario, dichos hallazgos demuestran que el 23% del cáncer de ovario es provocado por una delección de 9 pares de bases en el exón 1, dichos datos sugieren que las alteraciones en TGF- β 1 son frecuentes en cáncer de ovario y pueden estar íntimamente relacionados con la pérdida de respuesta a TGF- β (Chen et al., 2001). Por otra parte, estudios realizados en líneas celulares de cáncer de ovario el TGF- β se ve inhibido por andrógenos naturales y andrógenos sintéticos como la mibolerona, la cual simula la síntesis de ADN en un 55% de los cultivos primarios de epitelio superficial de ovario. Estos hallazgos muestran que el tratamiento con andrógenos 5alfa-dihydrotestosterona (DHT) causa una disminución de los receptores de TGF- β , de esta manera los andrógenos pueden promover la progresión del cáncer de ovario por inducir la disminución de este factor de crecimiento, provocando que las células tumorales de ovario escapen de los controles anti proliferativos del TGF- β (Leung y Adashi, 2003).

En estadios iniciales en la tumorigénesis, un gran número de células pierde su respuesta al TGF- β por la inhibición del crecimiento celular, activación de apoptosis o ambas, por consiguiente, TGF- β , sus receptores y las moléculas transductoras (Smads) son supresores de tumores; sin embargo, se ha sugerido que la mayoría de los tumores humanos se vuelven refractarios a los efectos inhibidores del crecimiento inducidos por TGF- β (Vanegas y Vásquez, 2011); tal como se observa con la enzima transglutaminasa tisular, es inducida por TGF- β y se encuentra implicada en proliferación celular, diferenciación y apoptosis, la cual se encuentra sobre-expresada en carcinomas de ovario, donde modula la transición epitelio-mesénquima (EMT, por sus siglas en inglés) e induce metástasis; sin embargo, su regulación en el cáncer epitelial de ovario está poco explorada (Cao et al., 2012; Francis-Thickpenny et al., 2001). Por lo tanto está citosina presenta un rol dual, como un supresor de tumores a través de la inhibición en el crecimiento celular y como un promotor de tumores debido a la capacidad de proliferación, invasión celular y actividad metastásica (Cao et al., 2012).

Receptor de TGF- β y su relación con procesos cancerígenos

Otros receptores asociados a CEO son TGF- β RI y RII ya que actúan como una unidad funcional en la vía de inhibición de la proliferación mediada por TGF- β , la pérdida en cualquiera de los genes que regulan dichos receptores podrían conducir a un descontrol del ciclo celular, esto sugiere que puede existir una asociación mutagénica entre TGF- β RII y varios tipos de cáncer y entre ellos algunos subtipos histológicos de CEO; sin embargo aún no se conoce su expresión definida en cada subtipo de cáncer epitelial de ovario (Francis-Thickpenny et al., 2001). Aunque la presencia de TGF- β se observa normalmente en el epitelio de ovario, en células cancerosas, aumenta su expresión considerablemente, este cambio está asociado a sus receptores TGF- β RI y TGF β RII (Antony et al., 2010).

A su vez las mutaciones en TGF- β RII han sido reportadas en cáncer de ovario, sugiriendo que en carcinogénesis de este órgano y las alteraciones en otros componentes de la vía de señalización de sus receptores podrían jugar un rol importante en la pérdida de la respuesta a TGF- β (Antony et al., 2010).

Planteamiento del problema

El cáncer epitelial de ovario es una enfermedad asintomática que se detecta generalmente en etapas avanzadas cuando ya se ha diseminado. El 80% de las pacientes que lo padecen presenta recurrencia durante los primeros dos años posteriores a su diagnóstico aún con la extirpación del tumor primario.

A pesar de que se conocen los eventos hormonales que intervienen como factores de protección o inductores de este tipo de cáncer, no existe una asociación que permita determinar un perfil de sus receptores con los diferentes subtipos histológicos y la influencia que presenta el TGF- β RII asociado a cada uno de los receptores de hormonas y los distintos grados de malignidad.

Justificación

El cáncer epitelial de ovario es la neoplasia ginecológica más letal, debido a que se detecta de manera tardía con un alto índice de recaída y resistencia a quimioterapia. En México representa la cuarta causa de muerte por cáncer en la mujer; en los últimos años la cantidad de fallecimientos atribuidos a esta neoplasia se han incrementado, lo que indica la baja efectividad de detección, seguimiento y tratamiento en las pacientes.

Hasta la fecha se desconocen marcadores moleculares específicos para la detección o seguimiento de esta enfermedad; por lo que en el presente estudio se propone determinar la expresión de los receptores ER α , AR, PR y TGF- β RII en tres subtipos histológicos con mayor incidencia en cáncer epitelial de ovario (seroso, endometriode y mucinoso) con la finalidad de establecer posibles asociaciones con la expresión de estos receptores con el grado de malignidad y proliferación celular.

En caso de que se determine algún tipo de relación entre la expresión de los receptores estudiados y los subtipos histológicos del cáncer de ovario, permitirá proponer terapias más específicas, con menor resistencia a la quimioterapia y menos efectos colaterales que brinden un panorama alentador a las mujeres que padecen este tipo de cáncer.

Pregunta de investigación

¿Cómo se asocian los perfiles de expresión de los receptores AR, ER α , PR y TGF β RII con los subtipos histológicos de tumores de cáncer epitelial de ovario y su grado de malignidad?

Hipótesis

Los tumores epiteliales del ovario (seroso, endometriode y mucinoso) presentan diferentes perfiles de expresión a los receptores hormonas esteroides sexuales, AR, ER α , PR y TGF- β RII, los cuales podrían estar relacionados al grado de malignidad.

Objetivos

General

Determinar los perfiles de expresión de los receptores de AR, ER α , PR y TGF- β RII en los tumores de ovario, de los subtipos histológicos seroso, endometriode y mucinoso, relacionados con el grado de malignidad del tumor.

Particulares

- 1) Obtener muestras de tejido tumoral de ovario y clasificarlas por subtipo histológico en seroso, endometriode y mucinoso.
- 2) Detectar la presencia de los receptores AR, ER α , PR y TGF- β RII en los subtipos histológicos de tumores de ovario con diferentes grados de malignidad.
- 3) Determinar el índice de proliferación celular en los tumores de ovario utilizando el marcador de proliferación celular Ki-67.
- 4) Correlacionar el índice de proliferación celular con la expresión de los receptores AR, ER α , PR y TGF- β RII en cada subtipo histológico discriminando por grado de malignidad.

Material y Método

Este es un estudio prospectivo, longitudinal y observacional; el cual fue realizado con muestras obtenidas a partir de pacientes del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), entre los años de 2008 – 2017. Se logró la obtención de 130 muestras de las cuales 105 cuentan con diagnóstico anatómo-patológico confirmado de cáncer epitelial de ovario primario de los subtipos serosos, endometrioides, mucinosos y células claras, los 25 tumores restantes son del subtipo seroso limítrofe confirmado por patólogo. Para el presente estudio se eligieron 78 muestras debido a que presentaban zonas epiteliales adecuadas para su estudio. El manejo de los tejidos fue de acuerdo con los protocolos establecidos para los bancos de tumores internacionales (Montes et al., 2011) y fue aprobado por la Comité de ética de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México y la Comité de ética del Instituto Nacional de Cancerología.

La obtención de la muestra biológica fue por conveniencia, tomando los siguientes criterios de selección:

Criterios de Inclusión: Pacientes con cáncer epitelial de ovario primario y tumores de tipo seroso limítrofe, vírgenes a tratamiento de quimioterapia que firmaron el consentimiento informado.

Criterios de Exclusión: Pacientes con carcinomas epiteliales de tipo mixto, de células claras o con metástasis de otros órganos.

Criterios de Eliminación: Muestras que presentaron un análisis anatómo-patológico distinto a cáncer epitelial de ovario de los subtipos serosos, endometrioides, mucinosos y tumores serosos limítrofes.

Procesamiento de la Muestra

Una vez obtenida la muestra del estudio transoperatorio se fijó un fragmento mediante inmersión en paraformaldehído al 4% en buffer de fosfatos durante 24 hrs y se realizaron lavados con solución amortiguadora de fosfatos (PBS) para su posterior deshidratación con concentraciones graduales de alcohol durante 1hr cada uno. A continuación se procedió a la aclaración del tejido por medio de dos cambios de xilol y en seguida se embebió el tejido en parafina para finalmente incluirlo y poder verificar la conservación de las estructuras epiteliales mediante una tinción de Hematoxilina y Eosina.

Se realizaron cortes de 3 μ m en el micrótopo los cuales fueron colocados en laminillas cargadas; cada muestra se sometió a la inmunodetección de los receptores AR, ER α , PR, pTGF- β RII y el marcador Ki-67, usando la técnica de inmunohistoquímica.

Desparafinación y recuperación antigénica

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

Para la recuperación de epítomos inducida por calor se utilizó el buffer de citratos pH 6 dentro de una olla de presión (Decloaking Chamber Biocare Medical™) durante 15 minutos, una vez concluido este periodo se dejó enfriar y se lavó con tres veces con PBS durante 5 minutos cada vez y se prosiguió con la realización de la inmunohistoquímica.

Inmunohistoquímica

Se incubaron las laminillas en H₂O₂ al 0.9% durante 10 minutos a temperatura ambiente, y para permeabilizar la membrana se ocupó PBS tritón al 1% durante 25 minutos y se bloquearon las uniones inespecíficas con suero de caballo al 5% durante 30 minutos. Se prosiguió a la colocación de los anticuerpos de interés durante toda la noche a temperatura ambiente.

Los anticuerpos primarios utilizados fueron: AR (sc816 Santa Cruz Biotechnology), ER α (sc543 Santa Cruz Biotechnology) y PR (8757SCellSignaling), Ki-67 (Gtx82777 Genetex), con inmunodetección nuclear; para pTGF- β RII (phospho S225 + S250) (PA5-37755 ThermoFisher Scientific), de localización membranal.

El anticuerpo secundario utilizado fue el Mach 2 anti-conejo HRP (RHRP520 Biocare Medical™) o Mach 2 anti-ratón HRP (MHRP520 Biocare Medical™), durante 1h a temperatura ambiente, el cromógeno utilizado para revelar fue: 3,3' tetrahidrocloruro de diaminobencidina™ (DAB) y se procedió a la contratinción de los núcleos con Hematoxilina de Gill para finalmente ser montadas con resina sintética y ser observadas en el microscopio óptico de luz, por tres observadores independientes.

Inmunofluorescencia

Se utilizaron anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos dirigidos contra los anticuerpos primarios: Alexa 488 (goat anti-rabbit) y Alexa 647 (donkey anti-mouse) los cuales se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, para la realización de los lavados se utilizó PBS-Tween 0.1%; la tinción de los núcleos se hizo mediante la incubación con DAPI (4',6-Diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride Sigma D9542) por 3 minutos, posteriormente se cubrieron los cortes con medio de montaje especial para fluorescencia Vectashield H-1000 (Vector Laboratories), para finalmente almacenarse a 4°C protegidas de la luz hasta su observación en el microscopio confocal (Leica TSC SP5 ©).

Evaluación de Inmunopositividad

La evaluación de la positividad de las muestras para cada receptor se hizo mediante la técnica Inmunoreactive Score (IRS), realizada por tres observadores diferentes, determinando la intensidad de la tinción y porcentaje de células positivas donde valores iguales o superiores a 20 se consideraron positivos.

La cuantificación de la proliferación celular se determinó mediante la inmunodetección de Ki-67 y se contaron los núcleos tumorales teñidos en la zona evaluada, la cuantificación se realizó en tres zonas distintas de 200 células cada una, se realizó sobre los núcleos marcados únicamente de las células epiteliales por tres observadores independientes, utilizando el programa ImageJ (Versión 10.2); el conteo fue cegado para cada uno de ellos. (600 núcleos por cada muestra excluyendo los núcleos de células estromales y células inflamatorias).

El índice de proliferación se estableció del promedio obtenido de tres zonas distintas del tejido como se establece en la técnica de H-Score (Kim et al., 2012; Nishimura et al., 2014).

Análisis Estadístico

La frecuencia de expresión de los receptores estudiados fue analizada mediante una prueba de Chi-cuadrado para la determinación de diferencias estadísticas con respecto a cada subtipo histológico y grado de malignidad tumoral, para la realización de este análisis se utilizó el paquete estadístico SPSS (Versión 21). Así mismo, al analizar la expresión de los receptores de hormonas esteroideas sexuales en presencia de pTGF- β RII se utilizó una prueba de comparación de dos proporciones; mientras que para la evaluación del índice de proliferación tumoral en los diversos grados de malignidad se aplicó una prueba de comparaciones múltiples Tukey Kramer, con ayuda del estadístico NCSS 2007 (Versión 1). El valor de P menor a 0.05 fue considerado como significativo.

Resultados

Selección de las Muestras y Distribución

En el presente estudio se obtuvieron un total de 130 muestras, de las cuales 25 correspondieron a tumores ováricos de tipo limítrofe y 105 con diagnóstico anatómo-patológico confirmado de cáncer epitelial de ovario. De las muestras recolectadas se eligieron 78 que presentaban zonas epiteliales suficientes para el análisis del panel completo de inmunodetección de los receptores propuestos: AR, PR, ER α , pTGF- β RII y del marcador de Ki-67 como indicador de proliferación celular.

Las 78 muestras seleccionadas se distribuyeron de acuerdo a los siguientes subtipos histológicos: 48 tumores serosos, 20 limítrofes y 28 carcinomas, 23 endometrioides y 7 del subtipo mucinoso (fig. 1).

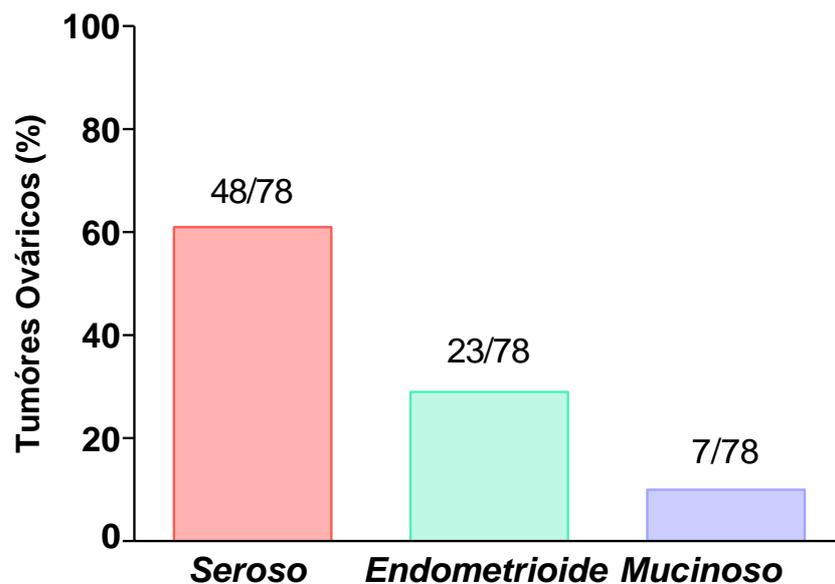


Figura 1. Distribución de muestras de tumores de ovario por subtipo histológico. Los tumores del subtipo seroso son los que se presentan en mayor frecuencia dentro de los tumores ováricos de la población estudiada, seguidos por los endometrioides y por último los carcinomas mucinosos.

Inmunodetección de los receptores de hormonas esteroides sexuales y pTGF- β RII

El análisis de la frecuencia de expresión de los receptores se realizó en muestras procesadas por inmunohistoquímica (figs. 2 - 4). La localización nuclear y membranal para los receptores a esteroides sexuales y del receptor pTGF- β RII respectivamente se corroboró con inmunofluorescencia (fig. 5).

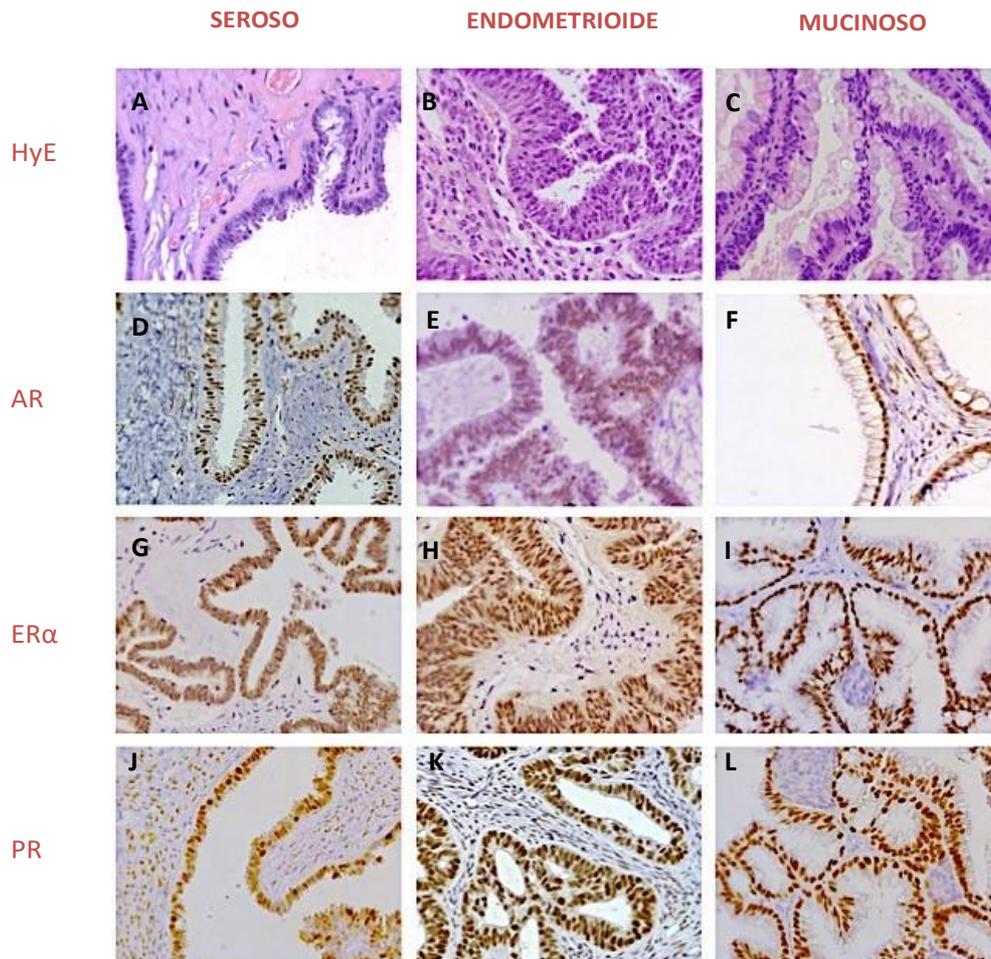


Figura 2. Inmunodetección de receptores de hormonas esteroides sexuales en los diferentes subtipos histológicos de carcinomas de ovario. (A-C) Fotomicrografías de tumores ováricos, seroso, endometriode y mucinoso teñidos con Hematoxilina y Eosina, en los tres tipos de tumores se visualizan las papilas epiteliales contiguas al tejido estromal característicos a este tipo de tumores. **(D-L)** La expresión de los receptores AR, ER α y PR se visualiza en el núcleo de las células epiteliales. Micrografías obtenidas con el objetivo de 40x (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

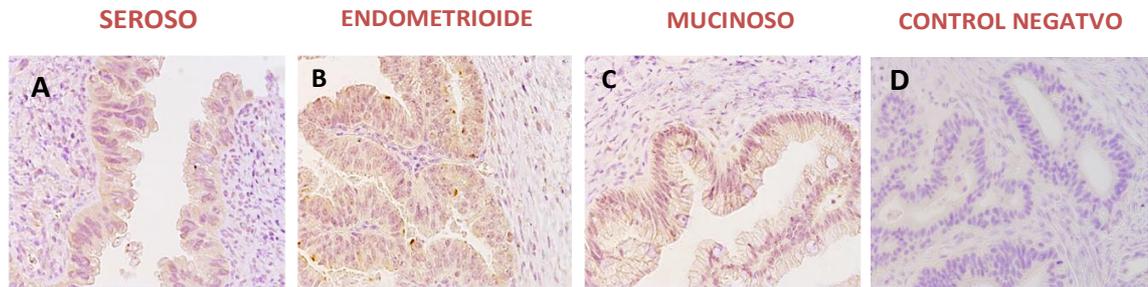


Figura 3. Expresión de pTGF-βRII en carcinomas de ovario. (A-C) Evaluación de expresión de pTGF-βRII en carcinomas de ovario del subtipo seroso, endometrioides y mucinoso. La marca para este receptor se restringe en la membrana de las células epiteliales. (D) Control negativo de la técnica, realizado en carcinoma del subtipo endometrioides. Micrografías obtenidas con el objetivo de 40x (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

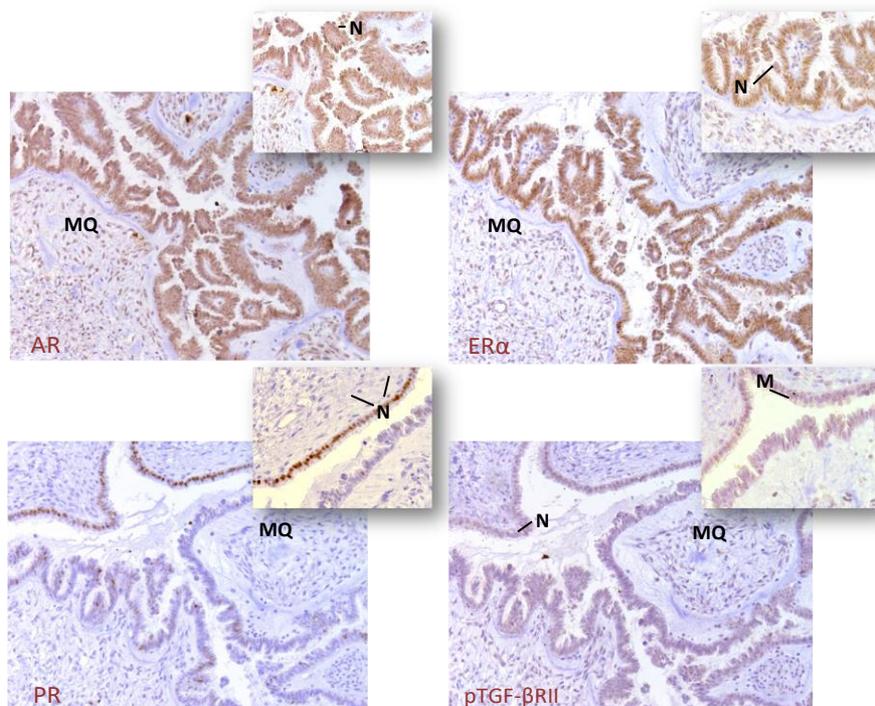


Figura 4. Expresión de los receptores de hormonas esteroides sexuales y de pTGF-βRII en carcinoma de ovario del subtipo seroso. En la micrografía óptica superior se observa la inmunopositividad de AR, ERα, PR y pTGF-βRII en un corte seriado de un tumor seroso. Se distingue la estructura tisular de cada compartimento, en morado se observa el mesénquima (MQ), en marrón se puede visualizar la marca localizada en el núcleo de las células epiteliales y algunas estromales para los receptores de hormonas esteroides sexuales (N). Para pTGF-βRII la tinción se localiza en la membrana plasmática de las células epiteliales (M). Fotomicrografías obtenidas con el objetivo de 20x (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

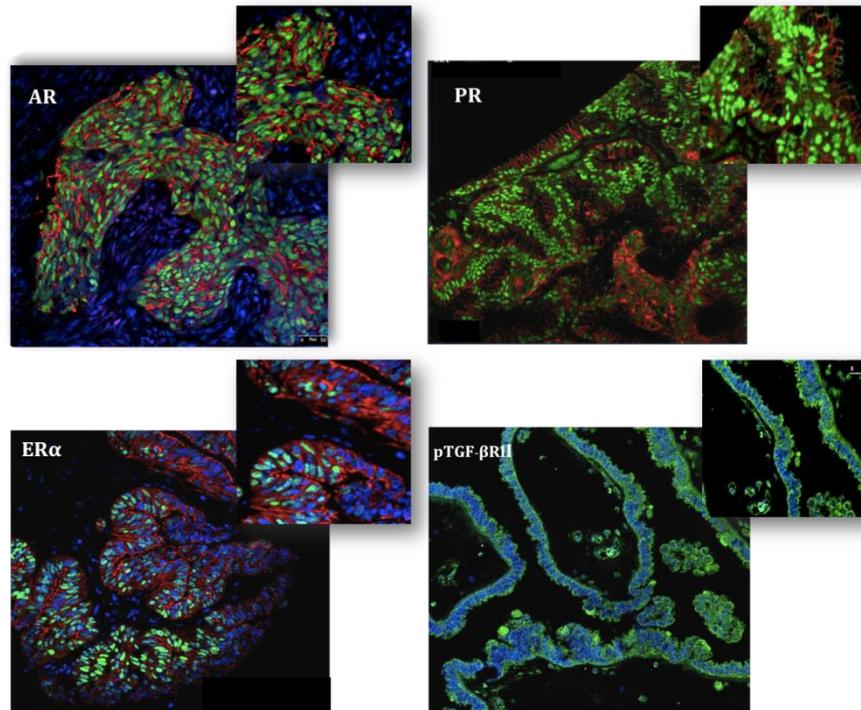


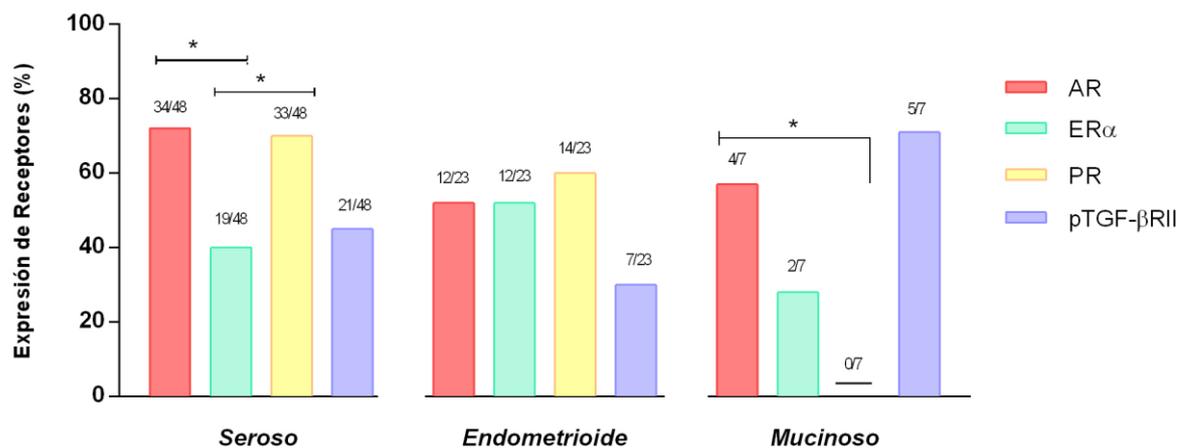
Figura 5. Expresión de receptores hormonas esteroides sexuales y pTGF- β RII en cáncer epitelial de ovario. Se muestra citoqueratina como marcador de células epiteliales (rojo), DAPI como marcador de núcleos (azul) y la expresión de los receptores (verde). La inmunoposividad de los tres receptores de hormonas esteroides sexuales se encuentra focalizada en el núcleo; mientras que en el caso del receptor de pTGF- β RII se encuentra en la región membranal de las células epiteliales. La visualización de los receptores de AR, PR y TGF- β RII en las fotomicrografías pertenecen al subtipo seroso y en ER α es carcinoma del subtipo endometriode. Micrografías obtenidas con el objetivo de 40x (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

Frecuencia de Expresión

Las muestras obtenidas fueron evaluadas para determinar la presencia de la proteína de interés en los tres subtipos histológicos estudiados (tabla 1 y fig. 6). Los resultados demuestran que existen diferencias en la expresión de ER α con respecto a AR y PR en tumores del subtipo seroso con una frecuencia de expresión del 70% y 68% respectivamente contra 40% del ER α , mientras que en los carcinomas endometrioides no se observan diferencias significativas en la expresión de los receptores estudiados. Al analizar a los tumores del subtipo mucinoso se perciben diferencias en la expresión de AR con una expresión de 57% versus 0% de PR, por otra parte, en el caso de pTGF- β RII se denota una tendencia a incrementar su presencia en este subtipo. El análisis de los resultados fue realizado con una prueba de Chi-cuadrado mostrando una $*p < 0.05$.

Tabla 1. Frecuencia de expresión y porcentaje de los receptores de esteroides sexuales y de pTGF- β RII en los subtipos seroso, endometriode y mucinoso de CEO.

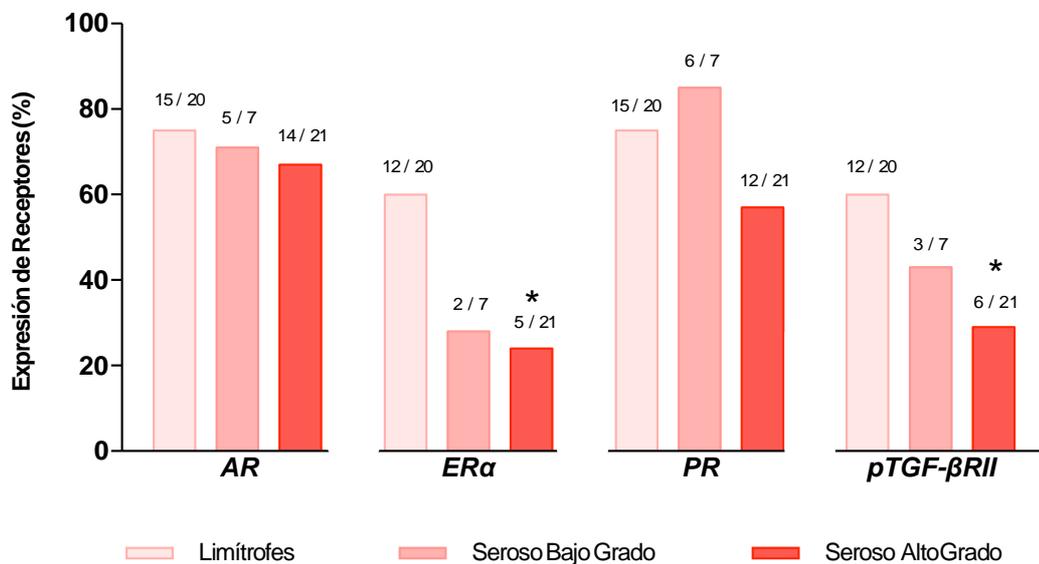
Subtipo Histológico				
Tipo de Receptor	Seroso	Endometriode	Mucinoso	Total
AR	34/48 (70%)	12/23 (52%)	4/7 (57%)	50/78 (68%)
ER α	19/48 *	12/23 (52%)	2/7 (28%)	33/78 (45%)
PR	33/48 (68%)	14/23 (60%)	0/7 *	47/78 (64%)
pTGF- β RII	21/48 (43%)	7/23 (30%)	5/7 (71%)	33/78 (45%)

**Figura 6.** Frecuencia de expresión de los receptores de hormonas esteroides sexuales y pTGF- β RII en tumores de ovario. Los tumores del subtipo seroso presentan diferencias en la expresión de AR y ER α así mismo, se observan cambios en la expresión del AR con respecto a ER α en estos tumores, en los tumores mucinosos se muestran diferencias en la expresión de AR y PR. * $p < 0.05$.

Frecuencia de Expresión por Grado de Malignidad Tumoral

Al evaluar la expresión de cada receptor en los diversos grados de malignidad tumoral, se observó que la expresión de ER α y de pTGF- β RII disminuye en los tumores de mayor grado de malignidad del subtipo seroso (serosos alto grado). En el caso del AR y PR no se encontraron diferencias significativas en su expresión para este subtipo; mientras que en los carcinomas endometrioides la expresión de los receptores AR, ER α y PR no muestran cambios evidentes entre los diversos grados analizados, sin embargo, se observa que la expresión de pTGF- β RII disminuye al aumentar el grado de malignidad en estos tumores. Por otra parte, al analizar a los tumores mucinosos se observó que presentan un perfil de expresión distinto a los tumores serosos y endometrioides y la forma activa de pTGF- β RII, debido a que tiende a incrementar en los tumores mucinosos de mayor grado de malignidad, contrario al comportamiento observado en las muestras analizadas de los subtipos serosos y endometrioides, no obstante, debido al número de muestras analizadas no es posible corroborar y determinar una significancia estadística (fig. 7) * $p < 0.05$ realizando una prueba de Chi-cuadrado.

A



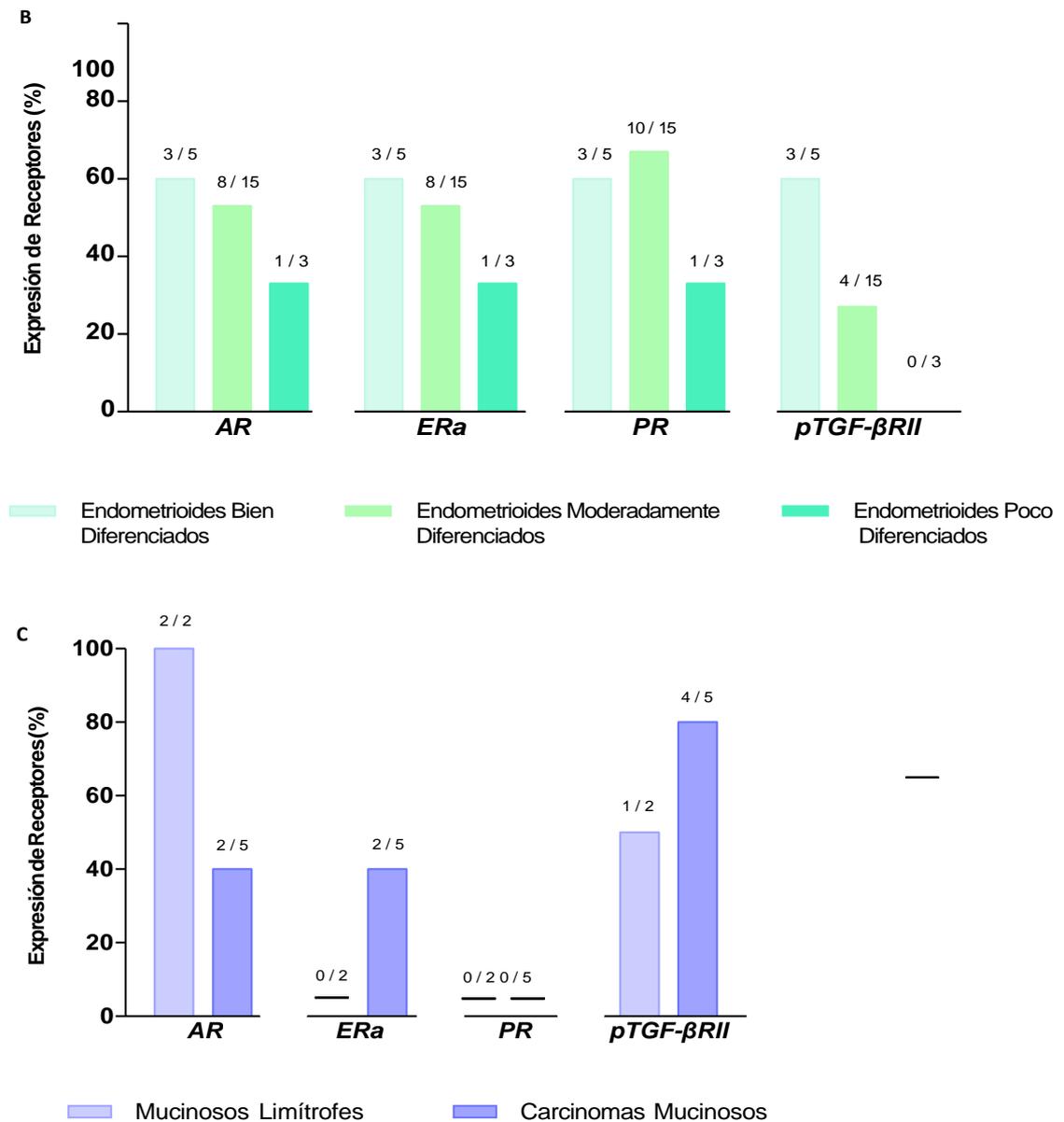


Figura 7. Expresión de AR, ERα, PR y pTGF-βRII en los diferentes grados de malignidad de tumores ováricos. (A) Perfil de expresión de receptores de hormonas esteroides sexuales y pTGF-βRII en tumores con diferente grado de malignidad del subtipo seroso, se observan diferencias significativas en la expresión de ERα y pTGF-βRII en los tumores SAG **(B)** Perfil de expresión de receptores de hormonas esteroides sexuales y pTGF-βRII en tumores con diferente grado de malignidad del subtipo endometriode. **(C)** Perfil de expresión de receptores de hormonas esteroides sexuales y pTGF-βRII en tumores con diferente grado de malignidad del subtipo mucinoso. *p< 0.05.

Índice de Proliferación Celular

El índice de proliferación celular fue evaluado en cada una de las 78 muestras analizadas, por medio de su inmunoreactividad a Ki-67 (figs. 8 y 9), el cual fue comparado con el grado de malignidad tumoral de cada subtipo histológico estudiado. En la fig. 10, se observa el incremento de la proliferación celular en los tumores que presentan mayor grado de malignidad, del subtipo seroso; los SAG reflejan diferencias significativas en la proliferación celular con respecto a los Limitrofe y SBG, en el caso de los endometrioides se observa una tendencia en la cual hay un incremento en el índice de proliferación conforme aumenta el grado de malignidad tumoral, mientras que, en los tumores del subtipo mucinoso el índice de proliferación celular parece ser mayor en los ML que en los CM, no obstante, para determinar estas diferencias es importante incrementar el número de casos analizados para poder concluir sobre los resultados obtenidos. Comparaciones múltiples con Tukey Kramer con un valor de significancia de $*p < 0.05$.

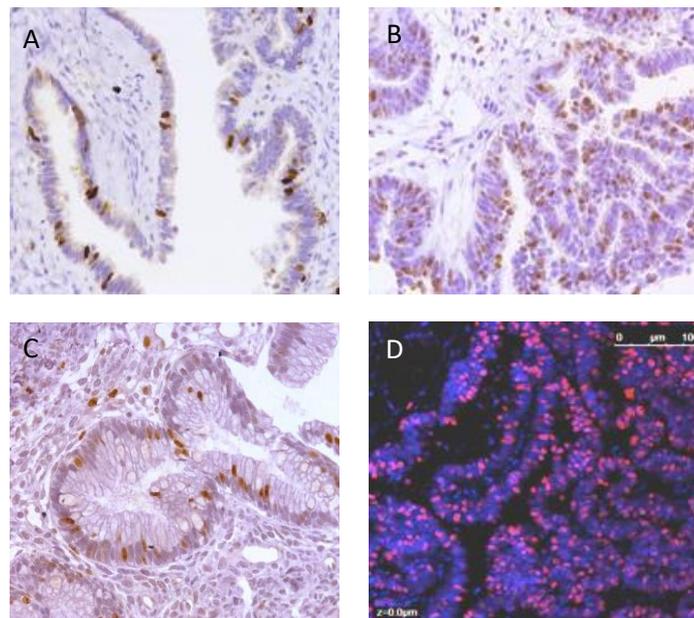


Figura 8. Inmunopositividad del marcador de proliferación celular Ki-67 en cada subtipo histológico de CEO. (A) Carcinoma seroso bajo grado. (B) Carcinoma del subtipo endometriode. (C) Carcinoma mucinoso. La tinción del marcador muestra que la célula se encuentra en proceso de duplicación del material genético, por consiguiente la tinción se encuentra localizada en el núcleo de las células epiteliales. (D) Fotomicrografía de marcaje positivo de la proteína de Ki-67 (rojo) y núcleos con DAPI (azul). Fotomicrografías vistas a un aumento de 40x (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

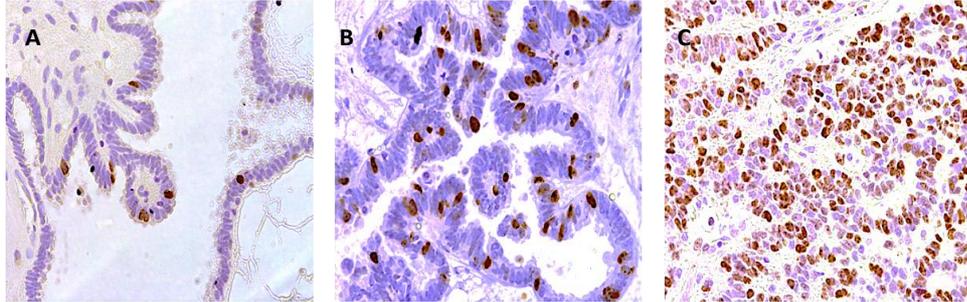


Figura 9. Expresión del marcador Ki-67 en los diversos grados de malignidad del subtipo seroso.

(A) tumor Limítrofe y (B) tumor seroso bajo grado, se muestra que el marcaje en el núcleo de las células epiteliales se encuentra de bajo a moderado, sin embargo en la fotomicrografía (C) que corresponde a un tumor seroso de alto grado la proliferación celular es visiblemente mayor. Fotomicrografías vistas a un aumento de 40x (Laboratorio Desarrollo Gonadal, Fac. Medicina).

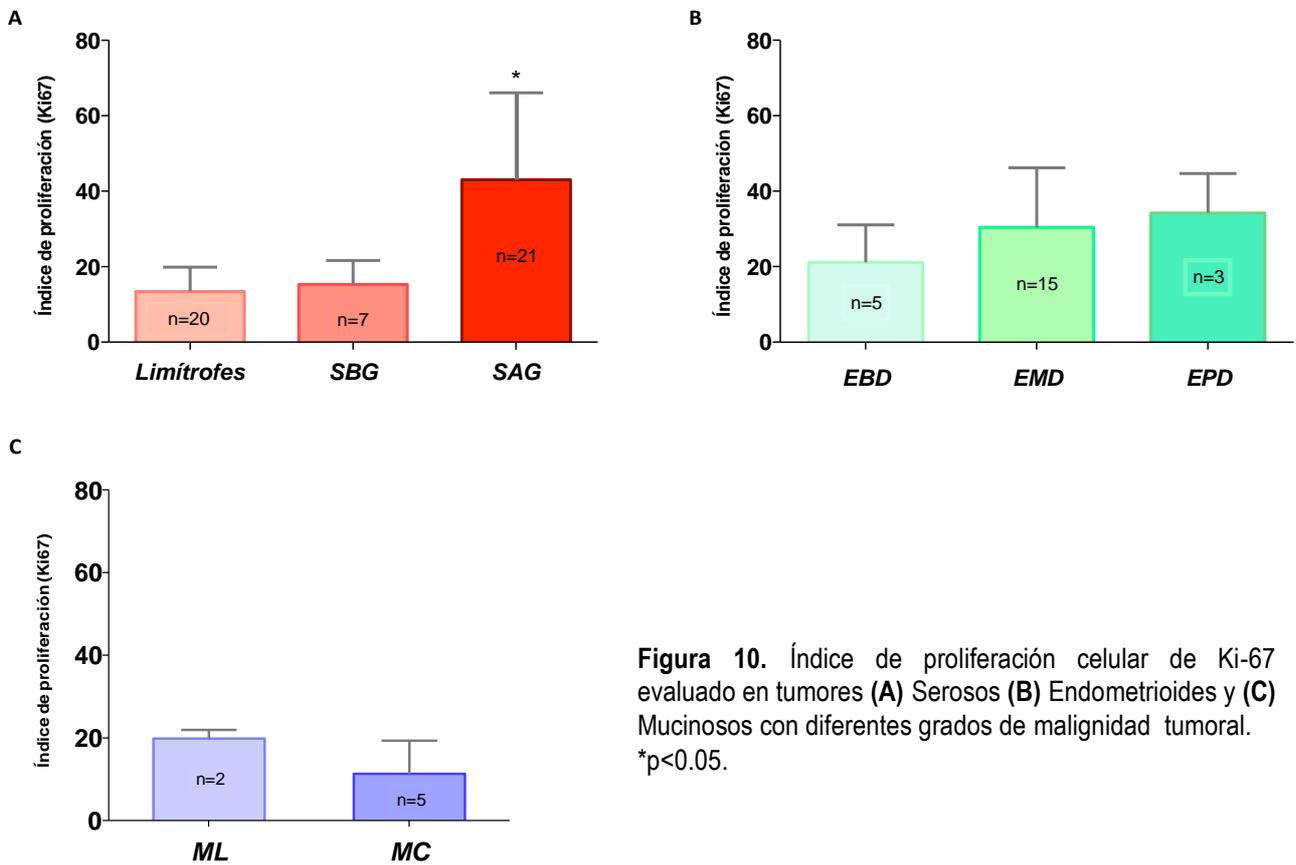
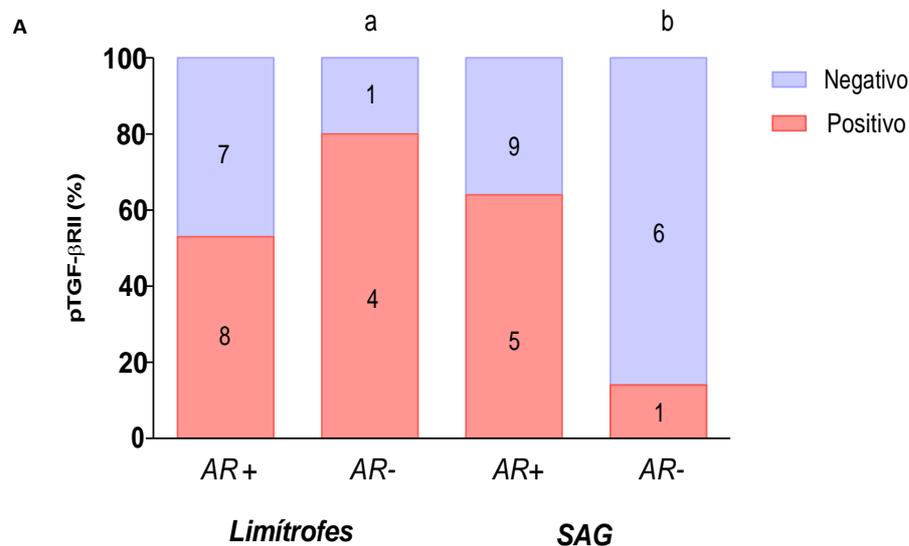


Figura 10. Índice de proliferación celular de Ki-67 evaluado en tumores (A) Serosos (B) Endometrioides y (C) Mucinosos con diferentes grados de malignidad tumoral. *p<0.05.

Expresión de pTGF- β RII y su correlación con receptores de hormonas esteroides sexuales en tumores serosos limítrofes y de alto grado

Debido al número de muestras obtenidas para los tumores serosos Limítrofes y de alto grado, se realizó un perfil de expresión de pTGF- β RII con respecto a los receptores hormonas esteroides sexuales, con la finalidad de determinar una posible relación entre la coexpresión de estas proteínas y el pTGF- β RII. Los resultados obtenidos muestran que en ausencia del AR la expresión del receptor de pTGF- β RII es mayor en los tumores Limítrofes, sin embargo, disminuye significativamente en los SAG, no obstante, al observar al PR, se muestra un comportamiento inverso, debido a que el cambio en la expresión de pTGF- β RII se presenta cuando el PR es positivo tanto para los serosos Limítrofes como para los SAG, en la fig. 11, se visualiza que en el caso de los primeros la expresión de pTGF- β RII es mayor con respecto a los tumores de alto grado, no obstante, este cambio no es evidente cuando el PR es negativo para ambos tipos tumorales; lo cual indica, que la presencia de PR y la ausencia de AR podrían estar actuando sobre la expresión de pTGF- β RII en dos grados de malignidad del subtipo seroso, en ambos casos se indica que el receptor de TGF- β disminuye en aquellos carcinomas de mayor grado de malignidad. En el caso de ER α , no se observaron diferencias estadísticamente significativas al ser comparado con la frecuencia de expresión de pTGF- β RII. * $p < 0.05$ utilizando una prueba de comparación de dos proporciones.



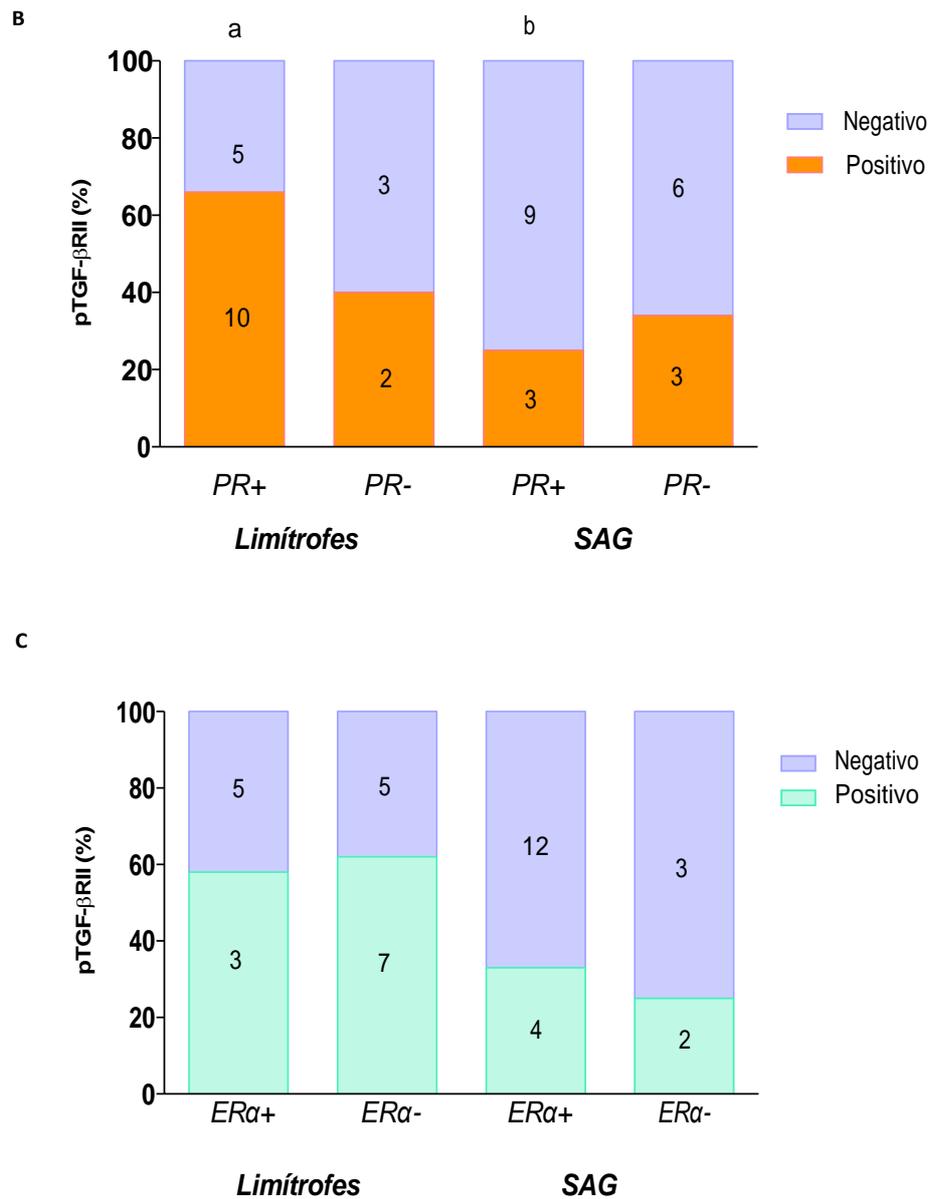


Figura 11. Correlación de pTGF-βRII y receptores hormonas esteroides sexuales en tumores serosos Limítrofes y de alto grado. Se observan diferencias significativas en la expresión de AR y PR asociados a la forma activa de pTGF-βRII, en el caso de ERα no se notó ningún cambio en la expresión del pTGF-βRII. Letras desiguales reflejan diferencias estadísticas, * $p < 0.05$.

Discusión

Este es un estudio prospectivo centrado en los carcinomas ováricos serosos, endometrioides y mucinosos. Las muestras analizadas en el presente trabajo fueron obtenidas de pacientes mexicanas con una media de 48 años, las cuales presentaron de los 21 a los 79 años de edad. Estos datos son relevantes ya que pueden ser extrapolables con otros trabajos que reflejan cifras similares en cuanto a la distribución de las edades de las pacientes, en el 2016 Morales-Vasquez y colaboradores, determinaron que las mujeres se encontraban entre 41- 60 años con edades que iban desde los 18 hasta los 90 años. El procesamiento y manejo de las mismas se hizo de acuerdo a los protocolos establecidos para bancos de tumores internacionales (Montes et al., 2011), los cuales cumplieron con los requerimientos del objetivo de estudio al presentar zonas representativas del compartimiento epitelial y fueron fijadas de manera inmediata para evitar la sobre-fijación y daño del mismo, con ello se aseguró la inmunodetección tanto de proteínas nucleares como de la membrana.

La distribución histológica de los carcinomas ováricos obtenidos fue del 62% para el subtipo seroso, 29% para tumores endometrioides y 9% para mucinosos. Estas frecuencias coinciden con lo reportado por Morales y colaboradores (2016), para mujeres mexicanas, además de tener similitudes con la literatura internacional reportada (Jayson et al., 2014; Prat, 2012; Zeppernick and Meinhold-Heerlein, 2014) sin embargo, la incidencia de CEO, presenta peculiaridades ya que, en países como Italia, Australia y Brasil se reporta que la estirpe mucinosa es más abundante que la de tipo endometrioide (Paes et al., 2011; Sung et al., 2014). Por otra parte, en Japón reportan mayor probabilidad de desarrollar cáncer de ovario de células claras en comparación con mujeres caucásicas (Itamochi et al., 2008), lo cual indica que en este tipo de cáncer participan diversos factores que evidencian la heterogeneidad de esta enfermedad, debido a las variaciones en cada etnia y la región geográfica que pudieran influir en el desarrollo de un subtipo de carcinoma determinado (Sung et al., 2014). Esto a su vez dificulta las posibilidades de generar terapias específicas que sean más eficientes y con menos efectos secundarios, por ello, es muy importante buscar marcadores moleculares que aumenten las posibilidades de éxito en la lucha contra esta enfermedad.

Al analizar la distribución histológica de cada clase tumoral, se realizó la inmunodetección de los receptores hormonas esteroides sexuales a cada subtipo, se observó que la frecuencia de expresión de los receptores AR y PR es mayor (70 y 68% respectivamente), en los tumores del subtipo seroso, mientras que la del ER alfa es baja (40%), lo que indica que la presencia de este receptor se relaciona más con otros tipos de carcinomas como lo es el endometriode, mientras que en el caso de los de tipo seroso su expresión es baja en aquellos de mayor grado de malignidad (Sieh et al., 2013).

Por otro lado, en los tumores mucinosos se observan, diferencias en la presencia de los receptores AR y PR, debido que el AR se expresó en el 57% de los casos, mientras que el PR no fue expresado en este subtipo; así mismo, se percibe que la presencia del receptor de estrógenos es menor en estos carcinomas. Estos resultados son congruentes con lo reportado por (Arias-Pulido et al., 2009; Sieh et al., 2013) donde observan la disminución de expresión de estos receptores en tumores mucinosos, sin embargo, la baja incidencia que presentan estos carcinomas dificulta emitir una conclusión de los resultados obtenidos para estos tumores, por lo que sería importante contar con más casos que permitan observar este comportamiento de manera más clara.

Cuando se evaluó la expresión de los receptores de hormonas esteroides en los tumores serosos, endometrioides y mucinosos, en los diferentes grados de malignidad, se observó que la expresión de ER alfa disminuye en los tumores con mayor grado de malignidad del subtipo seroso, este comportamiento se ha observado en trabajos de Escobar y colaboradores (2013), en donde se muestra una notable disminución de expresión de éste en carcinomas serosos de alto grado en comparación a los de bajo grado y limítrofes. Lo cual implica que posiblemente este receptor y su ligando no participan en procesos de malignización tumoral, como lo es la proliferación. Esto es congruente con otros resultados obtenidos, donde no se observó ninguna asociación directa entre el índice de proliferación celular, medido a través de la presencia de Ki-67. Por tal motivo, los efectos proliferativos de estos tumores pudieran estar controlados por la activación de MAP cinasas, PI3K, activación por receptores GPER o metaloproteinasas (Mungenast y Thalhammer, 2014; Yager, 2015; Chuffa, 2017). A diferencia de los tumores de origen seroso y mucinosos, en los endometrioides se observó que los receptores de hormonas esteroides sexuales evaluados (AR, ER y PR) se expresaron en altas cantidades, pero no se visualizó ninguna asociación con el grado de malignidad tumoral en los tres subtipos, a diferencia de lo reportado por otros autores (Sieh et al., 2013), mientras que en otros autores reportan que el ER alfa y PR se han relacionado más con este subtipo que con los otros dos, donde la presencia de ambos receptores se asocian con un pronóstico desfavorable y baja

supervivencia por parte de las pacientes (Arias-Pulido et al., 2009), mientras que la alta expresión del PR se asocia con una sobrevida total y un periodo libre de enfermedad más prolongado (Arias-Pulido et al., 2009; Jönsson et al., 2015), debido a que se le ha relacionado con la promoción de apoptosis e incluso se ha llegado a relacionar a este receptor como actor contra los efectos proliferativos del ER alfa (Lee et al., 2005; Mungenast y Thalhammer, 2014).

Con respecto al AR, se ha asociado especialmente al subtipo seroso y mucinoso, debido al alto grado de expresión que tiene este receptor en ambos carcinomas, teniendo más del 70% de positividad en tumores serosos (Chuffa et al., 2017; Schock et al., 2014; Papadatos-Pastos et al., 2011), por lo que se sugiere como promotor del desarrollo de la carcinogénesis en el ovario, sin embargo, no hay evidencia suficiente para corroborarlo. Estudios realizados por Elattar y colaboradores, reflejaron que la estimulación con DHT, en líneas celulares que presentan características semejantes a los tumores del subtipo seroso, aumenta la división celular hasta en un 75%, además de observar que la presencia o ausencia del AR juega un papel crucial en procesos proliferativos, ya que células de ovario carentes de este receptor muestran tasas de proliferación considerablemente menores a los que lo expresaban (Gibson et al., 2014; Elattar, 2011). Contradictoriamente, otros estudios, refieren que la presencia de este receptor mejora la sobrevida de las pacientes y que éstas presentan un periodo libre de enfermedad más prolongado (Jönsson et al., 2015; Nodin et al., 2010), debido a esta controversia, es importante realizar más estudios que aporten nueva información sobre el papel del receptor de andrógenos en CEO.

Por otro lado, se ha reportado que los tumores serosos, específicamente los de tipo limítrofe, son los más frecuentes en mujeres jóvenes, tienen bajo potencial maligno y alta sobrevivencia a 5 años (95%) (Fauvet et al., 2004). En nuestro estudio, estos resultados mostraron que la frecuencia de expresión fue similar para los tres receptores estudiados (AR, ER alfa y PR) y su perfil de expresión fue parecido al observado en carcinomas endometrioides que tienen una sobrevivencia de 5 años. Por lo que consideramos establecer si la expresión de los receptores esteroides sexuales pudiesen estar asociados al mejor pronóstico de estas pacientes, para ello será necesario analizar las historias clínicas y determinar la respuesta de tratamiento lo que será motivo de otro estudio.

A diferencia de los tumores serosos limítrofes donde se presentan mayormente en mujeres jóvenes, los carcinomas serosos son en general, los más frecuentes y de peor pronóstico (Fauvet et al., 2004). Este estudio muestra que en estos tumores se mantiene la misma frecuencia de expresión de los receptores AR y PR, pero disminuye significativamente la expresión del ER alfa, lo cual es contradictorio ya que se señala que la expresión elevada del PR mejora el pronóstico de las pacientes (Sieh et al., 2013). Este papel de los estrógenos en los diferentes tipos de cáncer hormono dependientes no ha sido esclarecido, ya que es considerando el efecto que tiene el estradiol a través del receptor alfa sobre el crecimiento celular y la proliferación de las células malignas (Key et al., 2002; Petrie et al., 2013; Zhang et al., 2016; Zhou et al., 2017), y como se ha demostrado que el ER alfa está asociado a supervivencia y proliferación en líneas celulares de ovario y mama, al ser estimuladas con estradiol (Liu et al., 2017), sin embargo, resulta inversa la disminución de expresión de este receptor y en el aumento en el índice de proliferación ya que, una de las funciones del ER alfa es la transactivación del gen que codifica para el PR (Schultz et al., 2003), no obstante, la disminución en la frecuencia de expresión del ER no se acompaña con la expresión de PR.

Por otra parte, al evaluar la presencia del TGF- β RII, se seleccionó a la proteína fosforilada en su residuo Ser225-250 que denota activación, además de ser una cinasa constitutivamente activa, lo que facilita observar de manera funcional a dicha proteína (Massague, 1998; Shi y Massagué, 2003). En este estudio el pTGF- β RII se expresó en los tres subtipos histológicos analizados, donde el 44% de los tumores serosos fueron inmunopositivos, 30% para endometrioides y el 71% para el subtipo mucinoso. Esta última cifra es un dato interesante, debido a que estudios de Francis-Thickpenny et al., 2001; Zeppernick and Meinhold-Heerlein, 2014, reflejan un comportamiento similar para este receptor, en donde se observa su alta expresión en tumores mucinosos, en relación a los otros dos subtipos evaluados, en los cuales la expresión es menor, inclusive si se compara con la presencia de los receptores AR, ER alfa y PR, por lo que el comportamiento del pTGF- β RII en los carcinomas mucinosos es distinto a lo esperado; una posible explicación, sugiere que este tipo de tumores deriva de órganos de localización peritoneal del tracto gastrointestinal, debido a que presenta diferencias histológicas, moleculares y de respuesta atípica a tratamiento para carcinomas de ovario, debido a esto, se propone que posiblemente sean tumores secundarios para este órgano y no originarios de él como se proponía (Kurman y Shih, 2008; Prat, 2012), así mismo, bajo esta hipótesis se ha observado que TGF- β RII frecuentemente se encuentra mutado y sobre-expresado en carcinomas de colon (Geng et al., 2013; Goggins et al., 1998; Grady et al., 1999), a diferencia de ovario en donde se observa que la expresión del TGF- β RII llega a ser baja en carcinomas serosos (Karlan y Li, 2008).

De tal manera que al evaluar la frecuencia de expresión de la proteína TGF- β RII en los diferentes grados de malignidad, se observa que disminuye significativamente y de forma inversamente proporcional con el grado de malignidad del subtipo seroso, ya que se determinó que en los tumores limítrofes su frecuencia de expresión fue mayor. Estas observaciones, concuerdan con un estudio de Karlan y Li, (2008) en el cual mencionan que en etapas avanzadas de la enfermedad esta proteína se presenta en menor frecuencia, por lo que el tumor se vuelve refractario a los estímulos antiproliferativos y pro-apoptóticos del TGF- β , e inclusive en etapas tardías este factor de crecimiento puede promover la progresión tumoral (Podar et al., 2007; Principe et al., 2014; Siegel et al., 2016).

En el presente estudio no se pudo establecer alguna relación entre el índice de proliferación celular y la presencia de pTGF- β RII en los subtipos histológicos analizados. Así mismo, es importante reconocer que además de la proliferación que se presenta en cada tumor existen otros marcadores que determinan la progresión tumoral, de los cuales muchas ocasiones la proliferación se detiene para dar lugar a procesos de migración, pérdida de polaridad celular y diferenciación, lo cual condiciona la malignidad del tumor. Estos procesos, pueden estar mediados por TGF- β y sus receptores, ya sea activando la vía canónica por las SMAD (Principe et al., 2014; Yan et al., 2009) o la vía no canónica, la cual implica cambios en múltiples vías de señalización, que pueden incluir PI3K, AKT, RAS, RAF, MEK y ERK, para inducir procesos de proliferación o migración con la activación de NF κ B, MMP2, MMP9, además de factores como Snail actuando como factor de transcripción y E-cadherina como molécula de adhesión, las cuales se han relacionado con la TEM (Podar et al., 2007; Principe et al., 2014). Dada la complejidad de los procesos que se ven activados a través del factor TGF- β se requieren más estudios *in vitro* para determinar los mecanismos moleculares que están participando en los diversos subtipos de CEO.

Otro aspecto importante que se consideró en el presente estudio, fue la evaluación de la proliferación celular y con respecto al grado de malignidad tumoral, para lo cual se tomó como parámetro el índice de proliferación celular medido a través de la presencia de la proteína Ki-67 y se relacionó con el diagnóstico anatómo-patológico; siguiendo este parámetro, se observó que los tumores serosos de alto grado presentan un índice de proliferación significativamente mayor con respecto a los tumores de bajo grado y limítrofes, de manera semejante a lo reportado en estudios de Köbel y Huntsman (2011). Para el caso de los tumores endometrioides se observa una tendencia en el aumento de proliferación celular en aquellos carcinomas con menor grado de diferenciación celular, sin embargo, no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas al igual que en el subtipo mucinoso.

Estos datos sugieren la importancia de la utilización de posibles marcadores moleculares como indicadores de progresión de la enfermedad, ya que en varios trabajos reportados de Aune et al., 2011; Heeran et al., 2013; Kim et al., 2012, se observa que el marcaje de Ki-67 en etapas tardías de la enfermedad refleja un peor pronóstico para las pacientes que desarrollan cáncer de ovario, además de presentar un periodo libre de enfermedad y sobrevida total más corta, por otro lado aquellas con menor porcentaje de positividad presentan periodos de sobrevida más prolongados (Kritpracha et al., 2005), así mismo, aquellas mujeres diagnosticadas en etapas avanzadas tienen un porcentaje de proliferación mayor y la enfermedad es más agresiva en comparación a aquellas que se encontraban en etapas tempranas de esta, por lo tanto, los resultados del presente estudio reflejan que para el caso de los tumores serosos de alto grado el índice de proliferación celular obtenido por Ki-67 permite ser un indicativo de que la enfermedad está en etapas tardías, sin embargo es importante asociar estos resultados con las historias clínicas de pacientes de nuestra población, para determinar el papel que presenta este marcador de proliferación en los diversos grados de malignidad de los subtipos histológicos de CEO en la sobrevida de las mujeres mexicanas.

Por otra parte, al comparar la presencia de los receptores de hormonas esteroides sexuales con la del pTGF- β RII se observó que no se presentaron diferencias significativas, en el caso del ER alfa (Evangelou et al., 2003), sin embargo, en PR se observa que al estar presente cambia la expresión del pTGF- β RII, estudios reportados por (Ho, 2003) sugieren que el PR podría estar actuando de manera sinérgica con el TGF- β y de esta manera promover procesos apoptóticos en cáncer de ovario, no obstante en este estudio se observó que en tumores limítrofes la forma activa de TGF- β RII se presenta con mayor frecuencia comparada con los tumores serosos de alto grado, en los cuales la expresión de este receptor se ve significativamente disminuida, sin embargo, se requieren realizar más estudios moleculares para determinar su posible asociación.

En el caso de AR y pTGF- β RII se visualizaron diferencias significativas cuando el AR está ausente en tumores serosos limítrofes y de alto grado, por lo que la presencia de pTGF- β RII cambia cuando AR no es expresado; estos resultados son interesantes debido a que en trabajos anteriores se ha reportado la acción que tienen los andrógenos y su receptor sobre la función y señalización de TGF- β , en donde se observa una acción a nivel transcripcional que podría estar causando una disminución en los TGF- β RI y TGF- β RII, por lo tanto, se inhibe la acción de la proteína y sus receptores, induciendo mecanismos celulares que conducen a una mayor proliferación celular, disminución de la apoptosis y activación de vías de señalización que promueven la migración y metástasis (Evangelou et al., 2003; Ho, 2003; Karlan y Li, 2008; Kohan-Ivani et al., 2016).

El origen celular de los carcinomas ováricos se ha atribuido principalmente al epitelio superficial del ovario (Auersperg et al., 2001b; Kurman y Shih, 2008; Prat, 2012), no obstante, algunos autores proponen que podrían ser carcinomas de diferentes orígenes compartiendo un mismo sitio anatómico y que generan cada uno de los subtipos de CEO (Kurman y Shih, 2010). En el caso de los carcinomas serosos de alto grado, su evolución podría estar dada desde la tuba uterina debido a que varios estudios sugieren que mutaciones en p53, BRCA1/BRCA2 los cuales podrían estar relacionadas con el desarrollo de carcinomas intraepiteliales de la serosa de la tuba uterina (STICs), estos podrían ser precursores de la formación de neoplasias que den como resultado un tumor secundario a ovario; por otra parte, los carcinomas del subtipo endometriode podrían tener un origen en endometrio, los cuales han sido relacionados con endometriosis, debido a que se ha reportado que alteraciones en el gen ARIDA1A expresadas en endometriosis han sido asociadas al subtipo endometriode y células claras, ausentes en los otros subtipos histológicos (Wiegand et al., 2010). En los tumores mucinosos probablemente su desarrollo sea a partir del sistema gastrointestinal, debido a sus semejanzas histológicas y fisiopatológicas (Kurman y Shih, 2011), además de observarse un patrón de expresión de los receptores de hormonas esteroideas sexuales, en los que se denota una baja presencia de PR y ER alfa (Arias-Pulido et al., 2009). Por lo que las diferencias moleculares e histológicas en cada subtipo histológico serían un punto interesante a dilucidar, dado a que a partir de la determinación del origen del desarrollo del CEO y el perfil de expresión de cada uno de los receptores estudiados, podrían tener un impacto favorable para la toma de decisiones clínicas para el tratamiento de las pacientes.

Conclusiones

En este estudio, los tumores del subtipo seroso son los que se presentan en mayor frecuencia, mientras que los mucinosos fueron los menos abundantes, a pesar del bajo número de muestras obtenidas para este tipo de tumor, fue inesperado que en ninguno de los carcinomas de este subtipo se detectó la presencia del PR, mientras que la proporción de tumores donde estuvieron presentes los receptores AR y pTGF- β RII es alta con respecto a la del ER alfa. De igual manera, al evaluar el índice de proliferación celular (Ki-67) se observó, que los tumores mucinosos de tipo limítrofe parecen presentar tasas de proliferación mayores con respecto a los de mayor grado de malignidad, sin embargo, es necesario obtener más casos que confirmen estos resultados. En conjunto, estas evidencias, refuerzan la idea de que este subtipo histológico se originó en un tejido extraovárico, posiblemente de órganos de localización peritoneal del tracto gastrointestinal, pero con los resultados aquí mostrados no es posible plantear que alguno de los receptores estudiados, o cualquier combinación de estos, pueda servir como marcador molecular de diagnóstico o como blanco molecular en el tratamiento de estos carcinomas.

Los tumores del subtipo endometriode muestran un perfil de expresión similar en todos los receptores evaluados, sin embargo, al ser analizados por grado de malignidad, se observa que estos tienden a disminuir en los carcinomas más agresivos, aunque no hay diferencias estadísticas significativas; no obstante, en el caso del pTGF- β RII se observó que no es expresado en los tumores endometrioides poco diferenciados, de la misma manera, se aprecia una clara asociación entre el incremento del índice de proliferación celular con el grado de malignidad diagnosticado, por lo que una propuesta derivada de este estudio es que en el subtipo endometriode el cociente de la presencia de TGF- β RII / Ki-67 puede ser utilizada para determinar el grado de malignidad de los tumores del subtipo endometriode, aunque se requiere incrementar los casos a evaluar para confirmar de manera estadística estos resultados.

En el caso de los tumores del subtipo seroso, al igual que los del subtipo endometriode, los cuatro receptores analizados disminuyen a medida que aumenta el grado de malignidad. En particular, la presencia del ER α y de la forma activa de pTGF- β RII son estadísticamente menores en los subtipos serosos de alto grado, en comparación con los de bajo grado y limítrofes principalmente. Es importante señalar que en los tumores serosos limítrofes se observó la asociación entre la presencia del PR y la forma activa del pTGF- β RII; mientras que en los tumores serosos de alto grado, la ausencia de tumores positivos al AR se asoció con menor presencia del pTGF- β RII, lo cual indica que sea probable que se

estén llevando a cabo procesos que determinen una acción estimulante o inhibitoria con la ausencia o presencia de estos receptores y del pTGF- β RII en los diversos grados de malignidad estudiados, de manera que, si bien, estos resultados son estadísticamente significativos, faltan hacer estudios *in vitro* para determinar los mecanismos moleculares que pudieran estar involucrados en el comportamiento de estas proteínas.

Finalmente, dado que el índice de proliferación celular es tres veces más alto en los tumores serosos de alto grado que los limítrofes y los de bajo grado, en este subtipo de CEO si es posible proponer que la baja presencia del ER α y de la forma activa de pTGF- β RII pueden ser tomados en cuenta como marcadores moleculares del grado de malignidad, información que es valiosa para diseñar tratamientos más específicos y con mayor efectividad en la lucha contra esta terrible enfermedad.

Perspectivas

Se requieren realizar más estudios que determinen la asociación de los receptores hormonas esteroides sexuales y su participación en los diversos grados subtipos histológicos de tumores de cáncer de ovario, así mismo establecer la correlación de estos receptores y el TGF- β RII en los diferentes grados de malignidad tumoral, y de esta manera determinar su efecto sobre el periodo libre de enfermedad, sobrevida total y respuesta a tratamiento de las pacientes.

Bibliografía

1. Al-Agha, O.M., Huwait, H.F., Chow, C., Yang, W., Senz, J., Kalloger, S.E., Huntsman, D.G., Young, R.H., Gilks, C.B., 2011. FOXL2 Is a Sensitive and Specific Marker for Sex Cord-Stromal Tumors of the Ovary: *Am. J. Surg. Pathol.* 35, 484–494. doi:10.1097/PAS.0b013e31820a406c
2. Antony, M.L., Nair, R., Sebastian, P., Karunakaran, D., 2010. Changes in expression, and/or mutations in TGF- β receptors (TGF- β RI and TGF- β RII) and Smad 4 in human ovarian tumors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 136, 351–361. doi:10.1007/s00432-009-0703-4
3. Aranda, A., Pascual, A., 2001. Nuclear Hormone Receptors and Gene Expression. *Physiol. Rev.* 81, 1269–1304.
4. Arias-Pulido, H., Smith, H.O., Joste, N.E., Bocklage, T., Qualls, C.R., Chavez, A., Prossnitz, E.R., Verschraegen, C.F., 2009. Estrogen and progesterone receptor status and outcome in epithelial ovarian cancers and low malignant potential tumors. *Gynecol. Oncol.* 114, 480–485. doi:10.1016/j.ygyno.2009.05.045
5. Auersperg, N., Wong, A.S.T., Choi, K.-C., Kang, S.K., Leung, P.C.K., 2001a. Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology ¹. *Endocr. Rev.* 22, 255–288. doi:10.1210/edrv.22.2.0422
6. Auersperg, N., Wong, A.S.T., Choi, K.-C., Kang, S.K., Leung, P.C.K., 2001b. Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology ¹. *Endocr. Rev.* 22, 255–288. doi:10.1210/edrv.22.2.0422
7. Boron, W.F., Boulpaep, E.L. (Eds.), 2012. *Medical physiology: a cellular and molecular approach*, Updated second edition. ed. Saunders/Elsevier, Philadelphia, PA.
8. Bottino, M.C., Lanari, C., 2010. Localización extra nuclear de receptores esteroides y activación de mecanismos no genómicos. *Med. B. Aires* 70, 173–184.
9. Burger, H.G., 2002. Androgen production in women. *Fertil. Steril.* 77, 3–5.
10. Cao, L., Shao, M., Schilder, J., Guise, T., Mohammad, K.S., Matei, D., 2012. Tissue transglutaminase links TGF- β , epithelial to mesenchymal transition and a stem cell phenotype in ovarian cancer. *Oncogene* 31, 2521–2534. doi:10.1038/onc.2011.429
11. 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. *Obstet. Gynecol.* 111, 144–151. doi:10.1097/01.AOG.0000296715.07705.e9
12. Chao, T.-K., Yo, Y.-T., Liao, Y.-P., Wang, Y.-C., Su, P.-H., Huang, T.-S., Lai, H.-C., 2013. LIM-homeobox transcription factor 1, alpha (LMX1A) inhibits tumorigenesis, epithelial–mesenchymal transition and stem-like properties of epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 128, 475–482. doi:10.1016/j.ygyno.2012.12.018
13. Chen, T., Triplett, J., Dehner, B., Hurst, B., Colligan, B., Pemberton, J., Graff, J.R., Carter, J.H., 2001. Transforming growth factor-beta receptor type I gene is frequently mutated in ovarian carcinomas. *Cancer Res.* 61, 4679–4682.
14. Chia, K., O'Brien, M., Brown, M., Lim, E., 2015. Targeting the Androgen Receptor in Breast Cancer. *Curr. Oncol. Rep.* 17. doi:10.1007/s11912-014-0427-8
15. Chou, J.-L., Chen, L.-Y., Lai, H.-C., Chan, M.W., 2010. TGF- β : friend or foe? The role of TGF- β /SMAD signaling in epigenetic silencing of ovarian cancer and its implication in epigenetic therapy. *Expert Opin. Ther. Targets* 14, 1213–1223. doi:10.1517/14728222.2010.525353

16. Chuffa, L.G. de A., Lupi-Junior, L.A., Costa, A.B., Amorim, J.P. de A., Seiva, F.R.F., 2017. The role of sex hormones and steroid receptors on female reproductive cancers. *Steroids* 118, 93–108. doi:10.1016/j.steroids.2016.12.011
17. Cornejo Uribe, R., 2011. El Factor de Crecimiento Epidérmico y la Diferenciación Celular del Epitelio Mamario. *Int. J. Morphol.* 29, 821–824. doi:10.4067/S0717-95022011000300025
18. De León, D.F.C., 2011. Cáncer Epitelial de Ovario. *Cancerología* 6, 53–60.
19. Elattar, A., Warburton, K.G., Mukhopadhyay, A., Freer, R.M., Shaheen, F., Cross, P., Plummer, E.R., Robson, C.N., Edmondson, R.J., 2012. Androgen receptor expression is a biological marker for androgen sensitivity in high grade serous epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 124, 142–147. doi:10.1016/j.ygyno.2011.09.004
20. Evangelou, A., Letarte, M., Jurisica, I., Sultan, M., Murphy, K.J., Rosen, B., Brown, T.J., 2003. Loss of coordinated androgen regulation in nonmalignant ovarian epithelial cells with BRCA1/2 mutations and ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 63, 2416–2424.
21. Fauser, B.C.J.M., Genazzani, A.R. (Eds.), 2015. *Frontiers in Gynecological Endocrinology*, ISGE Series. Springer International Publishing, Cham.
22. Fauvet, R., Boccara, J., Dufournet, C., David-Montefiore, E., Poncelet, C., Daraï, E., 2004. Restaging surgery for women with borderline ovarian tumors: Results of a French multicenter study. *Cancer* 100, 1145–1151. doi:10.1002/cncr.20098
23. Fernández, Núñez, 2004. Cáncer de Ovario Factores Pronóstico y Expectativas de Futuro. *Real Academia Nac. Medicina*.
24. Francis-Thickpenny, K.M., Richardson, D.M., van Ee, C.C., Love, D.R., Winship, I.M., Baguley, B.C., Chenevix-Trench, G., Shelling, A.N., 2001. Analysis of the TGF beta functional pathway in epithelial ovarian carcinoma. *Br. J. Cancer* 85, 687–691.
25. Gallardo-Rincón, D., Espinosa-Romero, R., Muñoz, W.R., Mendoza-Martínez, R., del Villar-Álvarez, S., Oñate-Ocaña, L., Isla-Ortiz, D., Márquez-Manríquez, J.P., Apodaca-Cruz, Á., Meneses-García, A., 2016. Panorama epidemiológico, avances diagnósticos, prevención, tratamiento y manejo de cáncer ovárico epitelial en México. *Salud Pública México* 58, 302–309.
26. Gálvez-Gastélum, F.J., Sandoval-Rodríguez, A.S., Armendáriz-Borunda, J., 2004. El factor de crecimiento transformante beta como blanco terapéutico. *Salud Pública México* 46, 341–350.
27. Geng, L., Chaudhuri, A., Talmon, G., Wisecarver, J.L., Wang, J., 2013. TGF-Beta Suppresses VEGFA-Mediated Angiogenesis in Colon Cancer Metastasis. *PLoS ONE* 8, e59918. doi:10.1371/journal.pone.0059918
28. Gershenson, D.M., 2012. Current advances in the management of malignant germ cell and sex cord-stromal tumors of the ovary. *Gynecol. Oncol.* 125, 515–517. doi:10.1016/j.ygyno.2012.03.019
29. Gibson, D.A., Simitsidellis, I., Collins, F., Saunders, P.T.K., 2014. Evidence of androgen action in endometrial and ovarian cancers. *Endocr. Relat. Cancer* 21, T203–T218. doi:10.1530/ERC-13-0551
30. Goggins, M., Shekher, M., Turnacioglu, K., Yeo, C.J., Hruban, R.H., Kern, S.E., 1998. Genetic alterations of the transforming growth factor beta receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* 58, 5329–5332.
31. Grady, W.M., Myeroff, L.L., Swinler, S.E., Rajput, A., Thiagalingam, S., Lutterbaugh, J.D., Neumann, A., Brattain, M.G., Chang, J., Kim, S.J., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Willson, J.K., Markowitz, S., 1999. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* 59, 320–324.
32. Gulliver, L.S.M., Hurst, P.R., 2011. Novel Approaches to Quantify Estradiol-Induced Loss of ERβ1 Protein in Older Mouse Ovarian Surface Epithelium: New Tools to

- Assess the Role of ER Protein Subtypes in Predisposing to Ovarian Epithelial Cancer? *Horm. Cancer* 2, 204–213. doi:10.1007/s12672-011-0077-3
33. Hennessy, B.T., Coleman, R.L., Markman, M., 2009. Ovarian cancer. *The Lancet* 374, 1371–1382. doi:10.1016/S0140-6736(09)61338-6
 34. Ho, S.-M., 2003. Estrogen, progesterone and epithelial ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 1, 73.
 35. Itamochi, H., Kigawa, J., Terakawa, N., 2008. Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci.* 99, 653–658. doi:10.1111/j.1349-7006.2008.00747.x
 36. Jayson, G.C., Kohn, E.C., Kitchener, H.C., Ledermann, J.A., 2014. Ovarian cancer. *The Lancet* 384, 1376–1388.
 37. Jelovac, D., Armstrong, D.K., 2011. Recent progress in the diagnosis and treatment of ovarian cancer. *CA. Cancer J. Clin.* 61, 183–203. doi:10.3322/caac.20113
 38. Jeon, S.-Y., Hwang, K.-A., Choi, K.-C., 2016. Effect of steroid hormones, estrogen and progesterone, on epithelial mesenchymal transition in ovarian cancer development. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 158, 1–8. doi:10.1016/j.jsbmb.2016.02.005
 39. Johnson, P.F., 2005. Molecular stop signs: regulation of cell-cycle arrest by C/EBP transcription factors. *J. Cell Sci.* 118, 2545–2555. doi:10.1242/jcs.02459
 40. Jönsson, J.-M., Skovbjerg Arildsen, N., Malander, S., Måsbäck, A., Hartman, L., Nilbert, M., Hedenfalk, I., 2015. Sex Steroid Hormone Receptor Expression Affects Ovarian Cancer Survival. *Transl. Oncol.* 8, 424–433. doi:10.1016/j.tranon.2015.09.002
 41. Karlan, B.Y., Li, A.J., 2008. Androgens and epithelial ovarian cancer: What's the connection? *Cancer Biol. Ther.* 7, 1712–1716. doi:10.4161/cbt.7.11.7054
 42. Köbel, M., Huntsman, D., 2011. Molecular Pathology of Ovarian Carcinomas. *Surg. Pathol. Clin.* 4, 275–296. doi:10.1016/j.path.2010.12.009
 43. Key, T., Appleby, P., Barnes, I., Reeves, G., Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, 2002. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J. Natl. Cancer Inst.* 94, 606–616.
 44. Kim, H., Kim, K., No, J.H., Jeon, Y.-T., Jeon, H.W., Kim, Y.-B., 2012. Prognostic value of biomarkers related to drug resistance in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Anticancer Res.* 32, 589–594.
 45. Kohan-Ivani, K., Gabler, F., Selman, A., Vega, M., Romero, C., 2016. Role of dihydrotestosterone (DHT) on TGF- β 1 signaling pathway in epithelial ovarian cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 142, 47–58. doi:10.1007/s00432-015-1998-y
 46. Kritpracha, K., Hanprasertpong, J., Chandeying, V., Dechsukhum, C., Geater, A., 2005. Survival analysis in advanced epithelial ovarian carcinoma in relation to proliferative index of MIB-1 immunostaining. *J. Obstet. Gynaecol. Res.* 31, 268–276. doi:10.1111/j.1447-0756.2005.00270.x
 47. Kurman, R.J., Shih, I.-M., 2011. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer? Shifting the paradigm. *Hum. Pathol.* 42, 918–931. doi:10.1016/j.humpath.2011.03.003
 48. Kurman, R.J., Shih, I.-M., 2010. The Origin and Pathogenesis of Epithelial Ovarian Cancer- a Proposed Unifying Theory. *Am. J. Surg. Pathol.* 34, 433–443. doi:10.1097/PAS.0b013e3181cf3d79
 49. Kurman, R.J., Shih, I.-M., 2008. Pathogenesis of Ovarian Cancer: Lessons From Morphology and Molecular Biology and Their Clinical Implications. *Int. J. Gynecol. Pathol. PAP.* doi:10.1097/PGP.0b013e318161e4f5

50. Lee, P., Rosen, D.G., Zhu, C., Silva, E.G., Liu, J., 2005. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 96, 671–677. doi:10.1016/j.ygyno.2004.11.010
51. Leung, P.C.K., Adashi, E.Y., 2003. *The Ovary*. Academic Press.
52. Li, J., Al-Azzawi, F., 2009. Mechanism of androgen receptor action. *Maturitas* 63, 142–148. doi:10.1016/j.maturitas.2009.03.008
53. Li, Q., 2015. Inhibitory SMADs: Potential Regulators of Ovarian Function1. *Biol. Reprod.* 92. doi:10.1095/biolreprod.114.125203
54. Liu, Y., Hou, Y., Ma, L., Sun, C., Pan, J., Yang, Y., Zhou, H., Zhang, J., 2017. Regulation of semaphorin 4D expression and cell proliferation of ovarian cancer by ERalpha and ERbeta. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 50. doi:10.1590/1414-431x20166057
55. Lonergan, P.E., Tindall, D.J., 2011. Androgen receptor signaling in prostate cancer development and progression. *J. Carcinog.* 10. doi:10.4103/1477-3163.83937
56. Malek, A., Tchernitsa, O., 2013. *Ovarian Cancer: Methods and Protocols*. Humana Press.
57. Massague, J., 2005. Smad transcription factors. *Genes Dev.* 19, 2783–2810. doi:10.1101/gad.1350705
58. Massague, J., 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* Palo Alto 67, 753–91.
59. Mendez, C., Morales-Vasquez, F., Perez-Montiel, D., Gomora, M.J., Espinola-Zetina, C., Hernandez-Martinez, A., Lopez-Basave, H., Pedernera, E., 2013. Estrogen and androgen receptor expression in surface epithelium and inclusion cyst in the ovary of premenopausal and postmenopausal women. *J. Ovarian Res.* 6, 85. doi:10.1186/1757-2215-6-85
60. Modugno, F., Laskey, R., Smith, A.L., Andersen, C.L., Haluska, P., Oesterreich, S., 2012. Hormone response in ovarian cancer: time to reconsider as a clinical target? *Endocr. Relat. Cancer* 19, R255–R279. doi:10.1530/ERC-12-0175
61. Montes, M., Pedernera, E., Morales-Vasquez, F., Méndez, M. del C., 2011. Bancos de tumores. *Patología* 49, 251–256.
62. Morales-Vásquez, F., Pedernera, E., Reynaga-Obregón, J., López-Basave, H.N., Gómora, M.J., Carlón, E., Cárdenas, S., Silva-Ayala, R., Almaraz, M., Méndez, C., 2016. High levels of pretreatment CA125 are associated to improved survival in high grade serous ovarian carcinoma. *J. Ovarian Res.* 9. doi:10.1186/s13048-016-0247-6
63. Mungenast, F., Thalhammer, T., 2014. Estrogen Biosynthesis and Action in Ovarian Cancer. *Front. Endocrinol.* 5. doi:10.3389/fendo.2014.00192
64. Nik, N.N., Vang, R., Shih, I.-M., Kurman, R.J., 2014. Origin and Pathogenesis of Pelvic (Ovarian, Tubal, and Primary Peritoneal) Serous Carcinoma. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* 9, 27–45. doi:10.1146/annurev-pathol-020712-163949
65. Nishimura, R., Osako, T., Nishiyama, Y., Tashima, R., Nakano, M., Fujisue, M., Toyozumi, Y., Arima, N., 2014. Prognostic significance of Ki-67 index value at the primary breast tumor in recurrent breast cancer. *Mol. Clin. Oncol.* doi:10.3892/mco.2014.400
66. Nodin, B., Zendeirokh, N., Brondstedt, J., Nilsson, E., Manjer, J., Brennan, D.J., Jirstrom, K., 2010. Increased androgen receptor expression in serous carcinoma of the ovary is associated with an improved survival. *J. Ovarian Res.* 3, 14. doi:10.1186/1757-2215-3-14
67. Paes, M.F., Daltoé, R.D., Madeira, K.P., Rezende, L.C., Sirtoli, G.M., Herlinger, A.L., Souza, L.S., Coitinho, L.B., Silva, D., Cerri, M.F., Chiaradia, A.C.N., Carvalho, A.A., Silva, I.V., Rangel, L.B., 2011. A retrospective analysis of clinicopathological and prognostic characteristics of ovarian tumors in the State of Espírito Santo, Brazil. *J. Ovarian Res.* 4, 14. doi:10.1186/1757-2215-4-14

68. Papadatos-Pastos, D., Dedes, K.J., de Bono, J.S., Kaye, S.B., 2011. Revisiting the Role of Antiandrogen Strategies in Ovarian Cancer. *The Oncologist* 16, 1413–1421. doi:10.1634/theoncologist.2011-0164
69. Parkinson, C.A., Hatcher, H.M., Ajithkumar, T.V., 2011. Management of Malignant Ovarian Germ Cell Tumors: *Obstet. Gynecol. Surv.* 66, 507–514. doi:10.1097/OGX.0b013e318234ede9
70. Peralta-Zaragoza, O., Lagunas-Martínez, A., Madrid-Marina, V., 2001. Factor de crecimiento transformante beta-1: estructura, función y mecanismos de regulación en cáncer. *Salud Pública México* 43, 340–351.
71. Petrie, W.K., Dennis, M.K., Chelin Hu, Donghai Dai, Arterburn, J.B., Smith, H.O., Hathaway, H.J., Prossnitz, E.R., 2013. G Protein-Coupled Estrogen Receptor-Selective Ligands Modulate Endometrial Tumor Growth. *Obstet. Gynecol. Int.* 1–17. doi:10.1155/2013/472720
72. Petrik, J.J., 2013. Challenges in Experimental Modeling of Ovarian Cancerogenesis, in: Malek, A., Tchernitsa, O. (Eds.), *Ovarian Cancer*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 371–376.
73. Podar, K., Raje, N., Anderson, K.C., 2007. Inhibition of the TGF-beta signaling pathway in tumor cells. *Recent Results Cancer Res. Fortschritte Krebsforsch. Progres Dans Rech. Sur Cancer* 172, 77–97.
74. Prat, J., 2012. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch.* 460, 237–249. doi:10.1007/s00428-012-1203-5
75. Principe, D.R., Doll, J.A., Bauer, J., Jung, B., Munshi, H.G., Bartholin, L., Pasche, B., Lee, C., Grippo, P.J., 2014. TGF- β : Duality of Function Between Tumor Prevention and Carcinogenesis. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* 106, djt369-djt369. doi:10.1093/jnci/djt369
76. Qiu, X., Cheng, J.-C., Zhao, J., Chang, H.-M., Leung, P.C.K., 2015. Transforming growth factor- β stimulates human ovarian cancer cell migration by up-regulating connexin43 expression via Smad2/3 signaling. *Cell. Signal.* 27, 1956–1962. doi:10.1016/j.cellsig.2015.07.010
77. Richter, E., Srivastava, S., Dobi, A., 2007. Androgen receptor and prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis.* 10, 114–118.
78. Ross, M.H., Pawlina, W.H., 2007. *Texto y atlas color con biología celular y molecular*. China Editor. Médica Panam.
79. Scarpin, K., 2009. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nucl. Recept. Signal.* doi:10.1621/nrs.07009
80. Schock, H., Surcel, H.-M., Zeleniuch-Jacquotte, A., Grankvist, K., Lakso, H.-A., Fortner, R.T., Kaaks, R., Pukkala, E., Lehtinen, M., Toniolo, P., Lundin, E., 2014. Early pregnancy sex steroids and maternal risk of epithelial ovarian cancer. *Endocr. Relat. Cancer* 21, 831–844. doi:10.1530/ERC-14-0282
81. Schüler, S., Ponnath, M., Engel, J., Ortmann, O., 2013. Ovarian epithelial tumors and reproductive factors: A systematic review. *Arch. Gynecol. Obstet.* 287, 1187–1204. doi:10.1007/s00404-013-2784-1
82. Schultz, J.R., Petz, L.N., Nardulli, A.M., 2003. Estrogen receptor α and Sp1 regulate progesterone receptor gene expression. *Mol. Cell. Endocrinol.* 201, 165–175. doi:10.1016/S0303-7207(02)00415-X
83. Shi, Y., Massagué, 2003. Mechanisms of TGF- β Signaling from Cell Membrane to the Nucleus. *Cell* 113, 685–700. doi:10.1016/S0092-8674(03)00432-X
84. Siegel, R.L., Miller, K.D., Jemal, A., 2016. Cancer statistics, 2016: Cancer Statistics, 2016. *CA. Cancer J. Clin.* 66, 7–30. doi:10.3322/caac.21332

85. Sieh, W., Köbel, M., Longacre, T.A., Bowtell, D.D., deFazio, A., Goodman, M.T., Högdall, 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., Lurie, G., Wilkens, L.R., Carney, M.E., Thompson, P.J., Matsuno, R.K., Kjør, S.K., Jensen, A., Högdall, C., Kalli, K.R., Fridley, B.L., Keeney, G.L., Vierkant, R.A., Cunningham, J.M., Brinton, L.A., Yang, H.P., Sherman, M.E., García-Closas, M., Lissowska, J., Odunsi, K., Morrison, C., Lele, S., Bshara, W., Sucheston, L., Jimenez-Linan, M., Driver, K., Alsop, J., Mack, M., McGuire, V., Rothstein, J.H., Rosen, B.P., Bernardini, M.Q., Mackay, H., Oza, A., Wozniak, E.L., Benjamin, E., Gentry-Maharaj, A., Gayther, S.A., Tinker, A.V., Prentice, L.M., Chow, C., Anglesio, M.S., Johnatty, S.E., Chenevix-Trench, G., Whittemore, A.S., Pharoah, P.D., Goode, E.L., Huntsman, D.G., Ramus, S.J., 2013. Hormone-receptor expression and ovarian cancer survival: an Ovarian Tumor Tissue Analysis consortium study. *Lancet Oncol.* 14, 853–862. doi:10.1016/S1470-2045(13)70253-5
86. Sigismondi, C., Scollo, P., Ferrandina, G., Candiani, M., Angioli, R., Viganò, R., Scarfone, G., Mangili, G., 2015. Management of Bilateral Malignant Ovarian Germ Cell Tumors: A MITO-9 Retrospective Study. *Int. J. Gynecol. Cancer* 25, 203–207. doi:10.1097/IGC.0000000000000358
87. Song, Y.S., Kim, H.S., Aoki, D., Dhanasekaran, D.N., Tsang, B.K., 2014. Ovarian Cancer. *BioMed Res. Int.* 2014, 1–2. doi:10.1155/2014/764323
88. Sosa-Garrocho, M., Macías-Silva, M., 2004. EL FACTOR DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE BETA.
89. Stack, M.S., Fishman, D.A. (Eds.), 2010. *Ovarian Cancer, Cancer Treatment and Research.* Springer US, Boston, MA.
90. Strauss, J.F., Barbieri, R.L., 2013. *Yen and Jaffe's Reproductive Endocrinology.* Elsevier Health Sciences.
91. Sugiyama, T., Kamura, T., Kigawa, J., Terakawa, N., Kikuchi, Y., Kita, T., Suzuki, M., Sato, I., Taguchi, K., 2000. Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: A distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* 88, 2584–2589. doi:10.1002/1097-0142(20000601)88:11<2584::AID-CNCR22>3.0.CO;2-5
92. Sung, P.-L., Chang, Y.-H., Chao, K.-C., Chuang, C.-M., 2014. Global distribution pattern of histological subtypes of epithelial ovarian cancer: A database analysis and systematic review. *Gynecol. Oncol.* 133, 147–154. doi:10.1016/j.ygyno.2014.02.016
93. Takahashi, A., Kato, K., Kuboyama, A., Inoue, T., Tanaka, Y., Kuhara, A., Kinoshita, K., Takeda, S., Wake, N., 2009. Induction of senescence by progesterone receptor-B activation in response to cAMP in ovarian cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 113, 270–276. doi:10.1016/j.ygyno.2008.12.032
94. Talerman, A., Vang, R., 2011. Germ Cell Tumors of the Ovary, in: Kurman, R.J., Ellenson, L.H., Ronnett, B.M. (Eds.), *Blaustein's Pathology of the Female Genital Tract.* Springer US, Boston, MA, pp. 847–907. doi:10.1007/978-1-4419-0489-8_16
95. Tas, F., Karabulut, S., Serilmez, M., Ciftci, R., Duranyildiz, D., 2014. Clinical significance of serum transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) levels in patients with epithelial ovarian cancer. *Tumor Biol.* 35, 3611–3616. doi:10.1007/s13277-013-1476-6
96. Torres-Sánchez, L.E., Rojas-Martínez, R., Escamilla-Núñez, C., Vara-Salazar, E. de la, Lazcano-Ponce, E., 2014. Tendencias en la mortalidad por cáncer en México de 1980 a 2011. *Salud Pública México* 56, 473–491.
97. Traish, A.M., Kim, N., Min, K., Munarriz, R., Goldstein, I., 2002. Role of androgens in female genital sexual arousal: receptor expression, structure, and function. *Fertil. Steril.* 77, 11–18.

98. Vanegas, A.L., Vásquez, G.M., 2011. Smad y otros blancos terapéuticos en esclerodermia. *Rev. Colomb. Reumatol.* 18, 285–294.
99. Wiegand, K.C., Shah, S.P., Al-Agha, O.M., Zhao, Y., Tse, K., Zeng, T., Senz, J., McConechy, M.K., Anglesio, M.S., Kalloger, S.E., Yang, W., Heravi-Moussavi, A., Giuliany, R., Chow, C., Fee, J., Zayed, A., Prentice, L., Melnyk, N., Turashvili, G., Delaney, A.D., Madore, J., Yip, S., McPherson, A.W., Ha, G., Bell, L., Fereday, S., Tam, A., Galletta, L., Tonin, P.N., Provencher, D., Miller, D., Jones, S.J.M., Moore, R.A., Morin, G.B., Oloumi, A., Boyd, N., Aparicio, S.A., Shih, I.-M., Mes-Masson, A.-M., Bowtell, D.D., Hirst, M., Gilks, B., Marra, M.A., Huntsman, D.G., 2010. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N. Engl. J. Med.* 363, 1532–1543. doi:10.1056/NEJMoa1008433
100. Yager, J.D., 2015. Mechanisms of estrogen carcinogenesis: The role of E2/E1?quinone metabolites suggests new approaches to preventive intervention ? A review. *Steroids* 99, 56–60. doi:10.1016/j.steroids.2014.08.006
101. Yan, X., Liu, Z., Chen, Y., 2009. Regulation of TGF- β signaling by Smad7. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 41, 263–272. doi:10.1093/abbs/gmp018
102. Zeppernick, F., Meinhold-Heerlein, I., 2014. The new FIGO staging system for ovarian, fallopian tube, and primary peritoneal cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* 290, 839–842. doi:10.1007/s00404-014-3364-8
103. Zhang, J., Song, H., Lu, Y., Chen, H., Jiang, S., Li, L., 2016. Effects of estradiol on VEGF and bFGF by Akt in endometrial cancer cells are mediated through the NF- κ B pathway. *Oncol. Rep.* doi:10.3892/or.2016.4888
104. Zhou, X., Zheng, Z., Xu, C., Wang, J., Min, M., Zhao, Y., Wang, X., Gong, Y., Yin, J., Guo, M., Guo, D., Zheng, J., Zhang, B., Yin, X., 2017. Disturbance of Mammary UDP-Glucuronosyltransferase Represses Estrogen Metabolism and Exacerbates Experimental Breast Cancer. *J. Pharm. Sci.* doi:10.1016/j.xphs.2017.04.073
105. Zhu, M.-L., Kyprianou, N., 2008. Androgen receptor and growth factor signaling cross-talk in prostate cancer cells. *Endocr. Relat. Cancer* 15, 841–849. doi:10.1677/ERC-08-0084
106. Zhu, T., Yuan, J., Xie, Y., Li, H., Wang, Y., 2016. Association of androgen receptor CAG repeat polymorphism and risk of epithelial ovarian cancer. *Gene* 575, 743–746. doi:10.1016/j.gene.2015.09.054
107. <http://www.cancerdeovario.org.mx/info/image-styles.html>
108. <http://www.gicom.org.mx/en/cancerdeovario/cancerdeovario-2.html>
109. https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Mixed_germ_cell_tumour_-_intermed_mag.jpg
110. <http://www.wcrf.org/int/cancer-facts-figures/data-specific-cancers/ovarian-cancer-statistics>

ANEXOS

Protocolo de Procesamiento de muestras de tejidos para histología Inclusión en parafina

- 1.- El tejido se fija con Paraformaldehído al 4% durante toda la noche a 4°C (la fijación del tejido no debe de pasar de 48h).
 - El volumen del fijador debe de ser de 10 a 15 veces mayor al tejido (de 10-15 mL por cada gramo de tejido).
 - Lo recomendable para el grosor del tejido debe de ser de 2.5 mm hasta 8 mm.
- 2.- Se lava la muestra con PBS 5 veces durante 20 min.
- 3.- Se inicia la Deshidratación del tejido con alcoholes graduales de la siguiente manera:
 - ETOH 30% durante 1h
 - ETOH 40% durante 1h
 - ETOH 50% durante 1h
 - ETOH 60% durante 1h
 - ETOH 70% durante 1h
 - ETOH 80% durante 1h
 - ETOH 90% durante 1h
 - ETOH absoluto 1h
 - ETOH absoluto durante 1h
 - Xilol 1h
 - Xilol 1h
- 4.- Para la inclusión de la muestra se utiliza Parafina 1 durante 1h. La parafina debe de estar a 56 °C.
- 5.- Se continúa la inclusión con Parafina 2 durante 1h.
- 6.- Para la Inclusión final se coloca la muestra en casetes de plástico y moldes de metal.
- 7.- Se identifican los bloques con el número de muestra y expediente.
- 8.- Se enfrían los moldes 30 min en una base fría para posteriormente poder separar los moldes del bloque de parafina.
- 9.- Se almacenan los bloques a 4°C en la caja asignada

Preparación de Soluciones

PBS	1L
NaCl 137 mM	8g
KCl 2.7mM	0.2g
Na ₂ HPO ₄ 10mM	1.44g
KH ₂ PO ₄ 2mM	0.24g

Paraformaldehido 4% se disuelve en PBS pH 7.4

Pesar 4g de PFA y disolver en 100ml de PBS a 60 °C.

Alcoholes Graduales

Los alcoholes graduales se preparan a partir de ETOH 96%.

Reactivos

Reactivo	Marca	Num. de Catalogo
NaCl	Merck	K34684504
KCl	Merck	k34074636 510
Na ₂ HPO ₄	Merck	F1170586 341
KH ₂ PO ₄	Merck	A476973 328
PFA	Fluka	76240
ETOH 96%	Reasol	64-17-5
ETOH 100%	J.T.Baker	9014-03
Parafina	Sigma	P3808

Material y Equipo

Casetes para inclusión en parafina Marca Simport M490-2

Moldes base Marca SakuraCat 4163

Horno para parafina

Imunohistoquímica para AR, ER α , PR y pTGF- β RII

Desparafinar 1hra a 56°C (previamente desparafinados)

- Xilol 30min
 - Etanol :
 - 100% (1) -3min
 - 100% (2) -3min
 - 96% -3min
 - 70% -3min
 - 50% -3min
 - 30% -3min
 - Agua Destilada -3min
 - PBS -3min
1. Desenmarcar/desenmascarar antígenos en olla convencional BIOCARE con buffer de citratos con pH de 6 (Diva Decloakevcat) durante 12min hasta que alcance 25 mmHg (ponerlo en agua milliQ).
 2. *Dejar enfriar en hielo*
 3. Lavar con PBS 3 veces durante 5 min cada vez.
 4. Incubar con peróxido de hidrógeno durante 10min al 0.9%
 5. Lavar con PBS 3 veces durante 5min cada vez.
 6. Incubar con PBS Tritón al 2% durante 25min.
 7. Incubar con BackgroundPunisher durante 3min, se blanquea con albumina al 1%
 8. Lavar con PBS durante 5 min cada vez.
 9. Incubar con anticuerpo primario durante toda la noche a TA o durante 1h a 37°C
 10. AR dilución relación 1:50 → Santa Cruz sc816
 11. ER α dilución relación 1:75 → Santa Cruz sc 543
 12. PR dilución relación 1:75 → PR CellSignaling 8757SCellSignaling
 13. Ki-67 dilución 1: 600 → Ki-67 GenetexGtx82777
 14. TGF- β RII dilución en relación 1: 50 → ThermoFisher Scientific PA5-37755
 15. Lavar 3 veces con PBS durante 5 min cada uno.
 16. Incubar con anticuerpo secundario (polímero de BIOCARE) durante 1hora y media (Mach 2, Rabbit RHRP52OL)
 17. Lavar con PBS 3 veces durante 5min cada uno.
 18. Revelar con DAB 0B801L de BIOCARE
 19. Contrateñir con Hemtaoxilina de Gill, virar con agua amoniaca al 2%
 20. Montar con resina, dejar secar y observar al microscopio óptico.

Inmunofluorescencia para AR, ER α , PR Y pTGF- β RII

Desparafinar 1hra a 56°C (previamente desparafinados)

- Xilol 30min
 - Etanol :
 - 100% (1) -3min
 - 100% (2) -3min
 - 96% -3min
 - 70% -3min
 - 50% -3min
 - 30% -3min
 - Agua Destilada -3min
 - PBS -3min
21. Desenmarcar/desenmascarar antígenos en olla convencional BIOCARE con buffer de citratos con pH de 6 (Diva Decloakevcat) durante 12min hasta que alcance 25 mmHg (ponerlo en agua milliQ).
 22. Lavar con PBS 3 veces durante 5 min cada vez.
 23. Fijar con PFA (paraformaldehído) 2% por 15 minutos
 24. Lavar con PBS 3 veces durante 5min cada vez.
 25. Incubar con PBS Tritón al 1% durante 25min.
 26. Lavar con PBS 3 veces durante 5 min cada vez.
 27. Incubar con suero de caballo al 5% durante 30 minutos.
 28. Lavar con PBS sólo una vez por 5 minutos.
 29. Incubar con anticuerpo primario durante toda la noche a TA o durante 1h a 37°C
 30. AR dilución relación 1:50 → Santa Cruz sc816
 31. ER α dilución relación 1:75 → Santa Cruz sc543
 32. PR dilución relación 1:75 → PR (c19) sc538
 33. Ki-67 dilución 1: 200 → Ki-67 GenetexGtx82777
 34. pTGF- β RII dilución en relación 1:50 → ThermoFisher Scientific PA5-37755
 35. Lavar 3 veces con PBS durante 5 min cada uno.
 36. Incubar con anticuerpo secundario Anti-Rabbit Cy3 y Anti-Mouse Alexa 647
 37. Lavar con PBS 3 veces durante 5min cada uno.
 38. Incubar con Dapi por 3 minutos.
 39. Lavar con PBS 3 veces durante 5min cada uno.
 40. Montar con resina VECTSHIELD H-1000.



Casa abierta al tiempo
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 0044
Metodología 213-200264

Perfil de Expresión de los
Receptores de Hormonas
Esteroides Sexuales y de TGFβ
Ril en Cáncer Epitelial de
Ovario.

18/09/17
[Signature]

En la Ciudad de México se presentaron a las 11:00 horas del día 14 del mes de septiembre del año 2017 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana los suscritos miembros del jurado:

DR. JAVIER ESCOBAN JIMENEZ SALAZAR
DRA. MARIA GUADALUPE SANCHEZ ERINGAS
DRA. ROCIO CASTILLO SANCHEZ
DRA. MARIA DEL CARMEN MENDEZ HERRERA

Bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretaria la última, 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: ARGELIA CALVILLO ROBLEDO

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



REVISÓ

LIC. JLLIO CESAR DE LARA SASSI
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

[Signature]
DRA. JESSICA PRADO BLOQUICIA

PRESIDENTE

[Signature]
DR. JAVIER ESCOBAN JIMENEZ SALAZAR

VOCAL

[Signature]
DRA. MARIA GUADALUPE SANCHEZ ERINGAS

VOCAL

[Signature]
DRA. ROCIO CASTILLO SANCHEZ

SECRETARIA

[Signature]
DRA. MARIA DEL CARMEN MENDEZ HERRERA