



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE AGUASCALIENTES

Maestría en Ciencias Área Toxicología

Centro de Ciencias Básicas

Departamento de Fisiología y Farmacología

Tesis

Efecto de los Antagonistas y Agonistas de Vasopresina sobre Factores Angiogénicos en la Línea Celular OV-90 de Cáncer Epitelial de Ovario Humano

Para obtener el grado de Maestro en Ciencias

Biol. Fernando Valdez Urias

Co-tutores:

Dr. Andrés Quintanar Stephano

Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano

Asesor:

Dr. José Luis Quintanar Stephano

Aguascalientes, Aguascalientes, Junio de 2021.

M. en C. Jorge Martín Alférez Chávez
 DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS BÁSICAS

PRESENTE

Por medio del presente como Miembros del Comité Tutorial designado del estudiante con ID 217980 quien realizó la tesis titulado: EFECTO DE LOS ANTAGONISTAS Y AGONISTAS DE VASOPRESINA SOBRE FACTORES ANGIOGÉNICOS EN LA LINEA CELULAR OV-90 DE CÁNCER EPITELIAL DE OVARIO HUMANO, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia damos nuestro consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que nos permitimos emitir el VOTO APROBATORIO, para que el pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Ponemos lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, le enviamos un cordial saludo.

ATENTAMENTE

"Se Lumen Proferre"

Aguascalientes, Ags., a 14 de junio de 2021.



Dr. Andrés Quintanar Stephano
 Tutor de tesis



Dr. Enrique Antonio Pedernera Astegiano
 Co-Tutor de tesis



Dr. José Luis Quintanar Stephano
 Asesor de tesis

C.C.B.- Interesado
C.C.B.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Fecha de dictaminación dd/mm/aa: 14/06/2021

NOMBRE: Fernando Valdez Urias ID: 217980

PROGRAMA: M. en C. área Biotecnología vegetal o Toxicología LGAC (del posgrado): Toxicología

TIPO DE TRABAJO: (x) Tesis () Trabajo práctico

TÍTULO: Uso de los antibióticos y agonistas de vasopresina sobre células endocrinas en la línea celular OV-20 de cáncer epitelial de ovario humano

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): Nuevo conocimiento de la relación AVP y cáncer de ovario, se abre una

INDICAR SI/NO SEGÚN CORRESPONDA:

Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:

- sí El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
- sí La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
- sí Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
- sí Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
- sí Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
- sí El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
- sí Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
- sí Generó transferencia del conocimiento o tecnológica

El egresado cumple con lo siguiente:

- sí Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
- sí Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc)
- sí Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial, en caso de los posgrados profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo el tutor
- sí Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
- sí Coincide con el título y objetivo registrado
- sí Tiene congruencia con cuerpos académicos
- sí Tiene el CVU del Conacyt actualizado
- no Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)

En caso de Tesis por artículos científicos publicados:

- Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
- El estudiante es el primer autor
- El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
- En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación.
- Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
- La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado

Sí X
No

FIRMAS

Elaboró:

* NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

Elsa Marcela Ramírez López
Dra. Elsa Marcela Ramírez López

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

Raquel
Dra. en C. Raquel Guerrero Alba

* En caso de conflicto de intereses, firmará un revisor miembro del NAB de la LGAC correspondiente distinto al tutor o miembro del comité tutorial, asignado por el Decano.

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

Jorge Martín Alfárez Chávez

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

M. en C. Jorge Martín Alfárez Chávez

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

En cumplimiento con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia que a la letra señala entre las funciones del Consejo Académico: ... Cuidar la eficiencia terminal del programa de posgrado y el Art. 105F las funciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los alumnos.

Elaborado por: D. Apoyo al Posg.
Revisado por: D. Control Escolar/D. Gestión de Calidad.
Aprobado por: D. Control Escolar/ D. Apoyo al Posg.

Código: DO-SEE-FO-15
Actualización: 01
Emisión: 20/06/19

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma de Aguascalientes por brindarme las herramientas necesarias para la realización de este proyecto.

Al programa de Maestría en Ciencias Área Biotecnología Vegetal y Toxicología por permitirme ser parte de esta generación de estudiantes y brindarme el apoyo necesario para la realización de estancias de investigación.

Agradezco al CONACyT por otorgarme la beca para la realización de la maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en particular el Laboratorio de Desarrollo Gonadal, por apoyarme en cumplir algunos objetivos de este trabajo.

A la Mtra. María José Gómora Herrera por compartir sus conocimientos, ayudarme en muchos experimentos y hacer que mi estancia en el laboratorio fuera muy productiva.

A la Dra. María del Carmen Méndez Herrera por impulsarme a trabajar con el cáncer de ovario y apoyarme con equipos y reactivos de su laboratorio.

Al Dr. Enrique Pedernera, por aceptarme como su alumno, abrirme las puertas del laboratorio y compartirme sus conocimientos.

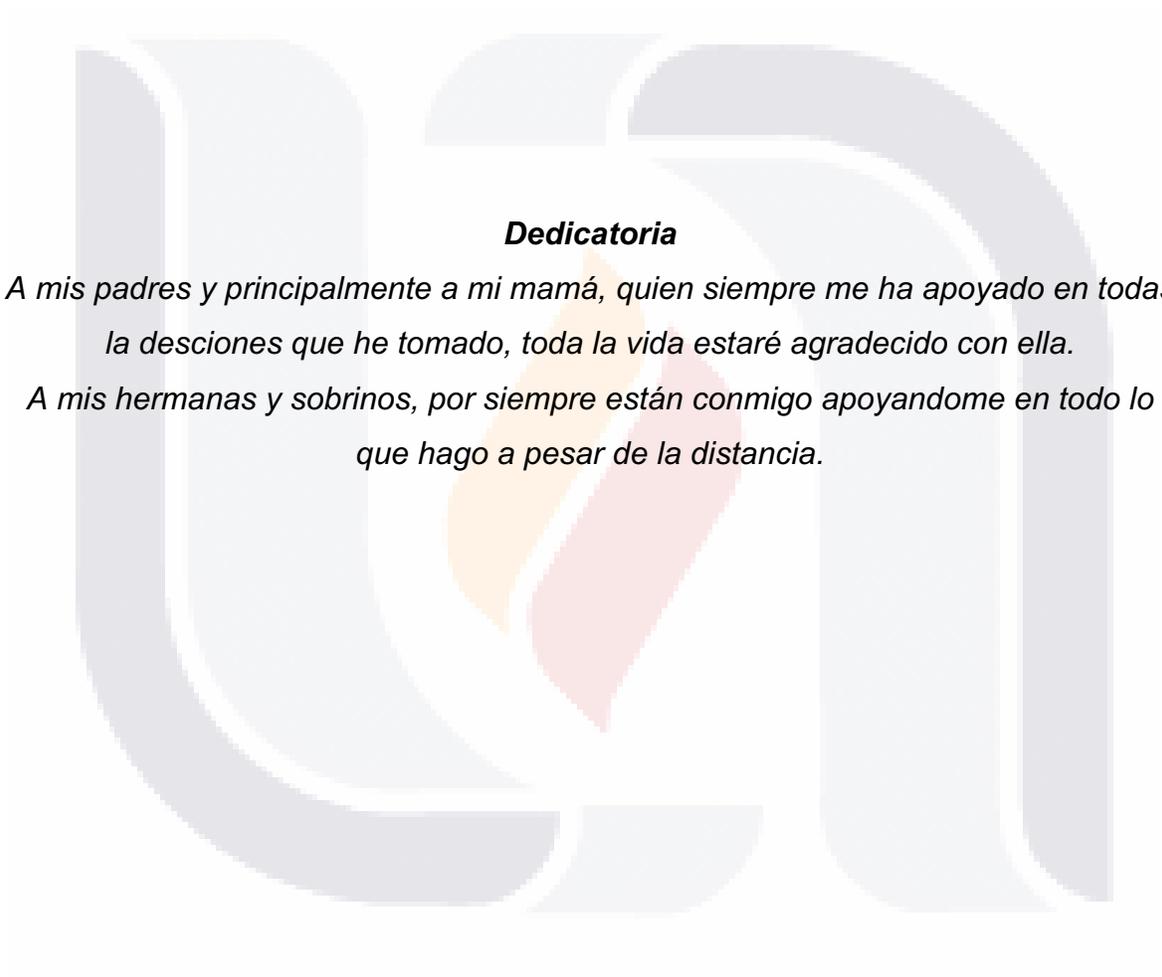
Al Dr. José Luis Quintanar, por apoyarme con reactivos y equipos de su laboratorio y poder avanzar en el trabajo.

A la Dra. Laura Córdova, por levantar mis ánimos y siempre estar cuando tenía dudas. Gracias por apoyarme como si fuera un integrante de tu laboratorio.

A Ángel Becerra Mejía por estar presente durante todo este tiempo y brindarme su apoyo siempre que lo necesité.

A mis compañeras del laboratorio: Vero, por ser mi amiga desde siempre y llevarme a todas partes. Yessy, por hacer que el laboratorio estuviera más alegre y dejarme siempre tu buena vibra. Argelia, por brindarme tus conocimientos del cultivo celular y por ser una gran amiga. Cynthia, por hacerme compañía en los tiempos de pandemia.

Al Dr. Andrés Quintanar, a quien agradezco infinitamente el permitirme estar en su laboratorio y brindarme la confianza para poder desarrollar el trabajo. Por inculcarme lo maravilloso de la ciencia y a trabajar siempre con el alma.



Dedicatoria

A mis padres y principalmente a mi mamá, quien siempre me ha apoyado en todas la desciones que he tomado, toda la vida estaré agradecido con ella.

A mis hermanas y sobrinos, por siempre están conmigo apoyandome en todo lo que hago a pesar de la distancia.

índice

Índice de Figuras..... 3

Abreviaturas utilizadas 4

1. Resumen 5

Palabras clave: 6

2. Abstract..... 7

Key words: 8

3. Introducción 9

4. Epidemiología del cáncer de ovario 9

5. Clasificación del cáncer de ovario y factores de riesgo 10

6. Subtipos histológicos de cáncer epitelial de ovario..... 12

 6.1 Seroso de alto grado..... 12

 6.2 Cáncer seroso de bajo grado 13

 6.3 Cáncer de ovario mucinoso (COM)..... 13

 6.4 Cáncer de ovario Endometriode (COE)..... 13

 6.4 Cáncer de ovario de células claras (CCC) 14

7. Angiogénesis y cáncer 15

 7.1 Tipos de angiogénesis..... 18

8. VEGF..... 19

 8.1 Receptores VEGF 20

 8.2 EL VEGF y cáncer..... 22

9. Arginina vasopresina (AVP) y sus receptores..... 25

 9.1 Agonistas y antagonistas de AVP..... 29

 9.2 Estudios de AVP en cáncer..... 30

10. Justificación 32

11. Pregunta de investigación..... 32

12. Hipótesis 32

13. Objetivo 33

14. Objetivos específicos..... 33

Estudiar en cultivos de células OV-90 lo siguiente:	33
15. Materiales y métodos	34
15.1 Cultivo celular	34
15.2 Ensayo de toxicidad	34
15.3 Inmunofluorescencia	35
15.4 Western Blot	36
15.4.1 Obtención de las muestras	36
15.4.2 SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)	37
y Western blot	37
15.4.3 Detección de Proteínas en Membranas de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF).....	38
15.5 Análisis estadístico	39
16. Resultados	40
16.1 Efecto tóxico de los antagonistas y agonistas de AVP sobre las células OV-90	40
16.2 Presencia de los receptores V1a, V2 y VEGFR2 en las células OV-90.	42
16.3 Expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 en las células OV-90	42
17. Discusión	44
18. Conclusiones	49
19. Bibliografía	50

Índice de Figuras

Figura 1.....	15
Figura 2.....	17
Figura 3.....	22
Figura 4.....	26
Figura 5.....	40
Figura 6.....	41
Figura 7.....	41
Figura 8.....	42
Figura 9.....	43
Figura 10.....	43



Abreviaturas utilizadas

AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AQP2	Acuaporina 2
AVP	Arginina Vasopresina
BRCA1	Cáncer de mama 1
BRCA2	Cáncer de mama 2
CCC	Cáncer de ovario de células claras
CE	Célula endotelial
CEO	Cáncer epitelial de ovario
CIST	Carcinoma intraepitelial seroso de la trompa
CO	Cáncer de ovario
COE	Cáncer de ovario endometriode
COM	Cáncer de ovario mucinoso
DAG	Diacilglicerol
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dp	Desmopresina
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
HIF	Factor inducible por hipoxia
LDH	Lactato deshidrogenasa
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógeno
PARP	Poli (ADN ribosa) plimerasa
PKA	Proteína quinasa A
PDGF	Factor de crecimiento derivado de plaquetas
RTKs	Receptores tirosina quinasa
S1P	Esfingosina-1-Fosfato
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular
VEGFR2	Receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio vascular

1. Resumen

El cáncer epitelial de ovario (CEO) es la neoplasia ginecológica más letal debido a que se detecta en etapas avanzadas y un porcentaje alto de las pacientes presenta resistencia a la quimioterapia. Uno de los mecanismos más importantes en el desarrollo del cáncer es la angiogénesis, que involucra la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de vasos ya existentes. En el proceso de angiogénesis participan principalmente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y su receptor VEGFR2. Trabajos previos han mostrado que las células mesangiales del riñón poseen receptores de AVP y responden a ella secretando varios factores, entre los cuales se encuentra el VEGFA. Por otro lado, investigaciones sobre cáncer y AVP, han mostrado que los agonistas de AVP disminuyen la angiogénesis. Una característica común de las células mesangiales y las células del CEO es su mismo origen epitelial, sin embargo, a la fecha no se han descrito receptores de AVP en las células del CEO ni en las células epiteliales de ovario sanos. Basados en la información conocida, podemos suponer que las células epiteliales del cáncer de ovario podrían poseer receptores de AVP y que de alguna manera podrían ser parte del mecanismo carcinogénico de este tipo de cáncer. Considerando lo anterior, este trabajo tiene como objetivos establecer si la línea celular OV-90 de cáncer epitelial de ovario expresan el factor VEGFA y su receptor VEGFR2 y si estas proteínas son reguladas por agonistas y antagonistas de los receptores de AVP. **Material y Métodos.** Se utilizó la línea celular OV-90 de cáncer epitelial de ovario. A las 24 y 48 horas de cultivo, se determinó por inmunofluorescencia, la presencia de los receptores V1a y V2 de AVP y VEGFR2 en las células OV-90. 2) Se evaluó la expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 por Western blot en células OV-90 sometidas a diferentes dosis de agonistas y antagonistas de AVP. Se consideraron las mejores dosis para los diferentes fármacos, aquellas que no mostraron efectos citotóxicos: a) desmopresina (Dp) 1 mM (agonista específico para los receptores V2 de AVP), b) Conivaptán (CON) (100 ng/ml), (antagonista no peptídico de los receptores V1a-V2 de AVP), y c) OPC-21268 (140 nM) (antagonista no peptídico

específico de los receptores V1a AVP). **Resultados.** 1) La inmunofluorescencia mostró la presencia de los receptores V1a y V2 de AVP y el receptor VEGFR2 en las células cancerosas OV-90. Los resultados del Western blot mostraron la presencia de las proteínas VEGF y VEGFR, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en la expresión proteica entre los grupos control y los tratados con agonistas y antagonistas de AVP. Los resultados mostraron además que ninguna de las dosis empleadas del agonista Dp ni de los antagonistas de AVP conivaptán OPC-21268 tuvieron efectos citotóxicos.

Se mostró por primera vez la presencia del VEGFA y su receptor VEGFR en las células del OV-90. 2) A las dosis utilizadas no se encontraron efectos citotóxicos de los compuestos agonista y antagonistas de los receptores de AVP. Es necesario hacer más experimentos utilizando curvas dosis-respuesta para cada uno de los compuestos a diferentes tiempos para realmente determinar si las células OV-90 experimentan cambios significativos en la expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2.

Palabras clave: Vasopresina, Cáncer Epitelial de Ovario, Angiogénesis, VEGF

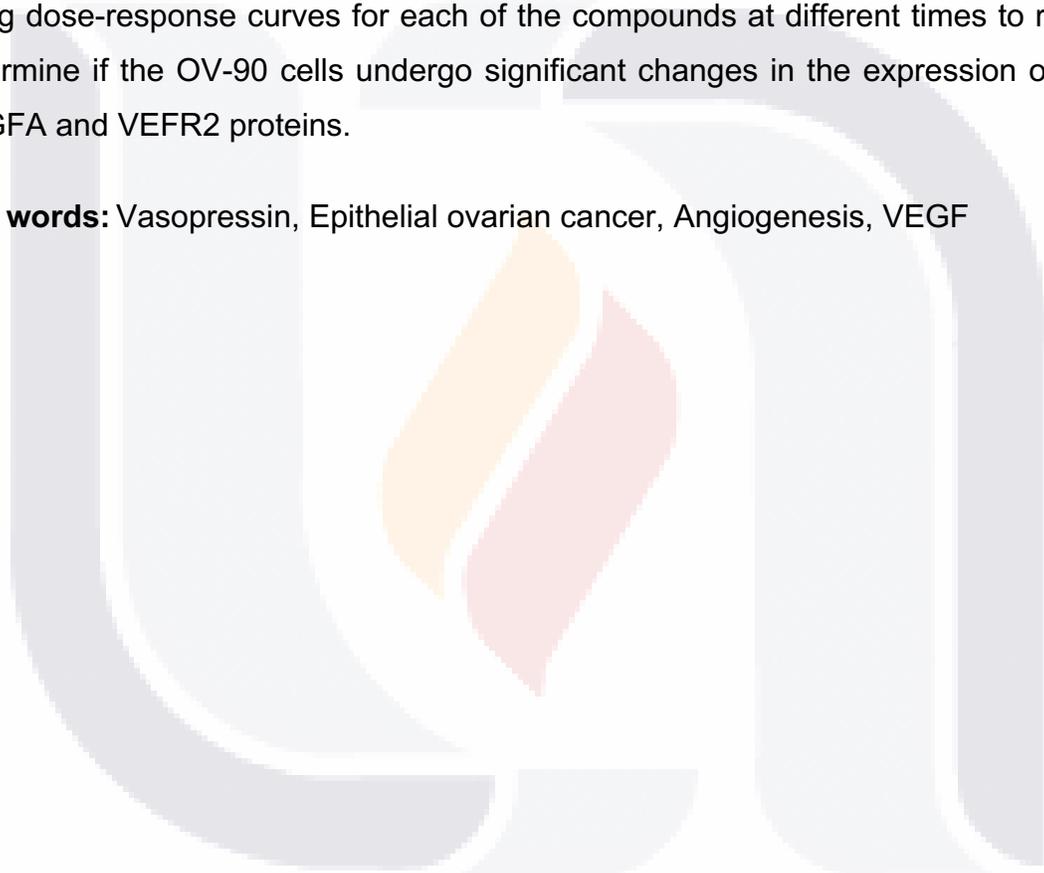
2. Abstract

Epithelial ovarian cancer (CEO) is the most lethal gynecological neoplasm because it is detected in advanced stages and a high percentage of patients are resistant to chemotherapy. One of the most important mechanisms in cancer development is angiogenesis, which involves the formation of new blood vessels from existing ones. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor, VEGFR2, both participate mainly in the angiogenesis process. Previous work has shown that the mesangial cells of the kidney have vasopressin (AVP) receptors and respond to it by secreting several factors, among which is VEGFA. On the other hand, research on cancer and AVP has shown that AVP agonists decrease angiogenesis. A common characteristic of mesangial cells and CEO cells is their epithelial origin, which is the same, however, to date no AVP receptors have been described in CEO cells or healthy ovarian epithelial cells. Based on the known information, we could assume that ovarian cancer epithelial cells have AVP receptors and that they could somehow be part of the carcinogenic mechanism of this type of cancer. Considering the above, this work aims to establish if the OV-90 epithelial ovarian cancer cell line expresses the VEGFA factor and its receptor VEGFR2, and if these proteins are regulated by agonists and antagonists of AVP receptors. **Material and methods.** The OV-90 epithelial ovarian cancer cell line was used. Past 24 and 48 hours of culture, the presence of AVP and VEGFR2 receptors V1a and V2 in OV-90 cells was determined by immunofluorescence. 2) The expression of VEGFA and VEGFR2 proteins was evaluated by Western blot in OV-90 cells subjected to different doses of AVP agonists and antagonists. The best doses considered for the different drugs, were those that did not produce cytotoxic effects: a) desmopressin (Dp) 1 mM (specific agonist for AVP V2 receptors), b) Conivaptan (CON) (100 ng / ml), (non-peptide antagonist of AVP V1a-V2 receptors), and c) OPC-21268 (140 nM) (specific non-peptide antagonist of V1a AVP receptors). **Results.** 1) Immunofluorescence showed the presence of AVP V1a and V2 receptors and VEGFR2 receptor on OV-90 cancer cells. The results of the Western blot showed the presence of VEGF and VEGFR proteins, however, no significant differences were found in protein

expression between control groups and those treated with AVP agonists and antagonists. The results also showed that none of the doses of the Dp agonist or the AVP antagonists withivaptan OPC-21268 had cytotoxic effects.

The presence of VEGFA and its receptor VEGFR was shown for the first time in OV-90 cells. 2) At the doses used, no cytotoxic effects of the AVP receptor agonist and antagonist compounds were found. It is necessary to carry out more experiments using dose-response curves for each of the compounds at different times to really determine if the OV-90 cells undergo significant changes in the expression of the VEGFA and VEFR2 proteins.

Key words: Vasopressin, Epithelial ovarian cancer, Angiogenesis, VEGF



3. Introducción

El cáncer es una enfermedad que consiste en el crecimiento anormal de células que se agrupan y crecen dañando los tejidos que se encuentran cerca, modificando la fisiología del organismo (Catherine Sánchez, 2013). En 2015 era considerado como la primera o segunda causa de muerte en personas menores de 70 años en más del 50% de todos los países, se estimó que para el año 2018 habría 18.1 millones de nuevos casos de cáncer y de estos, 9.6 millones morirían por esta enfermedad. El cáncer más común para ambos sexos es el de pulmón, que tiene la mayor tasa de mortalidad a nivel mundial. En hombres, después del cáncer de pulmón sigue el cáncer de próstata con la segunda tasa de incidencia más alta. En las mujeres, el cáncer de mama es el más común después del cáncer de pulmón (Bray et al., 2018). Dentro de los cánceres más relevantes en la mujer se encuentran los ginecológicos, siendo el más importante el cáncer cervicouterino con la mayor tasa de incidencia, seguido del de mama. El cáncer de ovario representa el séptimo cáncer más común y es la octava causa de muerte en las mujeres del mundo (Lheureux et al., 2019).

4. Epidemiología del cáncer de ovario

El cáncer de ovario (CO) es un problema de salud pública que ha aumentado en los últimos años, aproximadamente el 95% de estas neoplasias corresponden al cáncer epitelial del ovario (Lheureux et al., 2019). La mayor incidencia de este cáncer se registra en países desarrollados como, Estados Unidos de América, algunos países europeos, Australia y Nueva Zelanda. Un dato sobre esta enfermedad es que es más común en mujeres de raza blanca; en Estados Unidos 12.8 por cada 100,000, comparado con mujeres afroamericanas e hispanas con 9.8 por cada 100,000. La incidencia de este tipo de cáncer es mayor en mujeres mayores de 60 años de edad (Fernández, 2004).

El cáncer de ovario es considerado como la segunda neoplasia ginecológica más importante en todo el mundo y la más letal en países europeos y en Estados Unidos. Las estadísticas muestran que aproximadamente 200,000 mujeres a nivel mundial son diagnosticadas con CO, de las cuales 125,000 mueren a causa de esta enfermedad (Lheureux, Braunstein, & Oza, 2019). Alrededor del 70% de las mujeres con cáncer de ovario se diagnostican en etapas avanzadas (etapa 3 y 4) (Cho et al., 2009). La tasa de mortalidad del CO supera el 70% a los cinco años de ser diagnosticadas. El 95% de las neoplasias ováricas son de origen epitelial, mientras que el 5% restante corresponde al cáncer no epitelial, como el de células estromales y del cordón sexual (Sankaranarayanan & Ferlay, 2006). Según la Sociedad Americana Contra el Cáncer, en el 2021, se diagnosticarán 21,410 mujeres con CO en Estados Unidos y morirán cerca de 13,770 a causa de esta neoplasia (American Cancer Society; <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-ovario/acerca/estadisticas-clave.html>).

Estudios realizados en México, muestran que en el año 2003 se registraron más de 4000 nuevos casos de CO y que para el año 2011, hubo un incremento de en la cantidad de muertes en mujeres de 35 a 64 años de edad del 1.4% (Torres et al., 2014).

5. Clasificación del cáncer de ovario y factores de riesgo

El origen del CO aún no se conoce al igual que su patología, pero estudios previos muestran que la mayoría de los tumores de ovario se originan en otros tejidos ginecológicos y posteriormente invaden el ovario (Reid et al., 2017).

Los tumores del ovario pueden ser de origen epitelial o no epitelial. Dentro de los no epiteliales se encuentran las neoplasias ováricas estromales del cordón sexual que son poco frecuentes (1.2% de los casos de cáncer de ovario). Una de las ventajas que presenta este tipo de neoplasia es que se detectan en etapas y edades tempranas (Quirk & Natarajan, 2005). Se han asociado algunas mutaciones en

genes para el desarrollo de este tipo de cáncer, como la de *DICER1* (Heravi-Moussavi et al., 2012) y *FOXL2* (Nolan et al., 2017).

El *cáncer epitelial de ovario* representa el 85% de los cánceres de ovario, surge a partir de una formación quística compleja de células epiteliales que se encuentran en la corteza ovárica. Dentro de los factores de riesgo de este cáncer se encuentran los tradicionales (reproductivos u hormonales), se ha establecido que los procesos que disminuyen la ovulación son protectores. La multiparidad, la lactancia, la ligadura de las trompas de Falopio, la menarquia tardía y la menopausia temprana son considerados como factores que disminuyen la aparición del cáncer de ovario (Wentzensen et al., 2016). Los factores involucrados en la alta letalidad de este tipo de cáncer son: la detección tardía (etapas avanzadas), alta capacidad de recaídas, falta de biomarcadores que además de permitir hacer un diagnóstico temprano permitan establecer un tratamiento encaminado a prevenir la resistencia del cáncer a los tratamientos existentes (Wentzensen et al., 2016). Los síntomas del cáncer de ovario no son específicos por lo que se pueden confundir con otras patologías como: el síndrome de intestino irritable y algunas molestias pélvicas no específicas (Barbara A. Goff et al., 2004). Es muy común que los pacientes acudan al hospital y no se haga el diagnóstico correcto (B. A. Goff et al., 2000).

Este tipo de carcinoma se puede clasificar en base a diferentes características como: causas, origen de su desarrollo y mutaciones (Rosen et al., 2009) sin embargo, la clasificación más importante se basa en sus características histológicas, basada en las células que le dan origen y las mutaciones que presenta (National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine, 2016). El CEO se puede dividir en dos grandes categorías generales: de tipo I y tipo II. Los cánceres que se encuentran en el tipo I, son aquellos en los que se han descrito las lesiones precursoras, generalmente son de crecimiento lento (Koshiyama et al., 2017), dentro de este tipo se encuentran los carcinomas seroso de bajo grado, endometrioides, de células claras y mucinoso. Presentan mutaciones en *KRAS*, *ARID1A*, *PIK3CA*, *PTEN* y *BRFA* (Fortner et al., 2015). Los tumores de tipo II, son

aquellos en los que no se ha descrito claramente las lesiones que dan origen al desarrollo de la neoplasia y pueden desarrollarse de novo en el epitelio del ovario o en el epitelio de las trompas de Falopio (Koshiyama et al., 2017). Los carcinomas que pertenecen a este tipo son: seroso de alto grado, carcinosarcomas y carcinomas no diferenciados, presentan mutaciones en *TP53*. Se cree que estos cánceres se originan en el extremo distal de las trompas de Falopio (Fortner et al., 2015).

6. Subtipos histológicos de cáncer epitelial de ovario

6.1 Seroso de alto grado

Es el tipo de cáncer de ovario más común, representa el 70% de los cánceres de ovario (Prat, 2012), se acepta que proviene de lesiones precursoras denominadas carcinoma intraepitelial seroso de la tuba (CIST), de la región distal de las trompas de Falopio (Nik et al., 2014), debido a que las células de cáncer seroso de alto grado son muy similares a las del CIST. En ambos tipos celulares se encuentra la mutación del gen *TP53* y un alto índice de expresión de ki67. Se han encontrado “firmas de p53” en la porción distal de las trompas de Falopio y estas firmas de p53 podrían ser las responsables de iniciar el CIST y de ahí pasar al cáncer seroso de alto grado.

Las mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2* son relacionadas con el desarrollo de este cáncer (M. R. Jones et al., 2017). Se ha demostrado que las firmas de p53 están presentes en pacientes que presentan o no mutaciones en estos genes, por lo que se ha propuesto que esta neoplasia surge primeramente por daños en p53 seguida por mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, que llevan a una inestabilidad en la reparación de ADN por recombinación homóloga que favorecen al desarrollo y crecimiento del tumor (Bowtell, 2010). Microscópicamente las células tumorales presentan un tamaño intermedio, pero se pueden encontrar células gigantes que tienen nucléolos prominentes, presentan una alta actividad mitótica y un núcleo tres veces mayor al de otras células (Fig. 1A) (Prat, 2012); Jayson et al.,

2014). Este tipo de cáncer se asocia a antecedentes familiares de cáncer de mama y ovario de primer grado (Wentzensen et al., 2016).

6.2 Cáncer seroso de bajo grado

Es un cáncer poco frecuente, representa el 10% de los tumores de CEO. Se considera que estos tumores se originan a partir de tumores limítrofes o que pueden tener sus origen a partir de inclusiones epiteliales de ovario que han sufrido metaplasia de Müller (Koshiyama et al., 2017). Las características microscópicas de este subtipo de cáncer es que muestran células con núcleos uniformes y estroma hialinizado, es común que presenten cuerpos de psammoma (Fig. 1B). Las mutaciones en el gen p53 no son tan comunes, lo contrario es para los genes *BRAF* y *KRAS* que presentan mutaciones en el 38% y 19% de los tumores (S. Jones et al., 2012).

6.3 Cáncer de ovario mucinoso (COM)

Es el subtipo menos frecuente, solo del 2-4% del cáncer epitelial de ovario diagnosticado pertenece a este subtipo (Chao et al., 2013). Se cree que este tipo de cáncer tiene su origen en tejidos gastrointestinales, como el colon y el estómago y que genera metástasis al ovario (Jayson et al., 2014), aunque también pueden originarse de manera primaria en el ovario. Microscópicamente el COM presenta quistes multiloculares con una sustancia mucoide y regiones sólidas muy grandes (Fig. 1C). Este tumor puede contener áreas benignas, áreas limítrofes y áreas de malignidad, con zonas necrosadas y hemorragias frecuentes (Fernández et al., 2004). Se han identificado mutaciones de *KRAS* (en el 50% de los tumores), en los codones 12 y 13 (Koshiyama et al., 2017) y en el gen *HER2* (en el 18% de los tumores) (Lheureux et al., 2019).

6.4 Cáncer de ovario Endometrioide (COE)

A diferencia del subtipo seroso de alto grado, cuyo posible origen sea en las fimbrias de las trompas de Falopio, este subtipo tiene semejanza histológica al del tejido

endometrial. Microscópicamente los tumores de COE pueden ser quísticos o sólidos (Fig.1D). Un porcentaje elevado se asocia al cáncer endometrial, en el que aproximadamente el 10% de este subtipo de cáncer está asociado a endometriosis, y sus células presentan características del cáncer endometrial (Fernández et al., 2004). Además, se ha demostrado que las mujeres con síndrome de Lynch tienen mayor riesgo de desarrollar el COE (Lheureux et al., 2019). Las mutaciones más frecuentes en este tipo de cáncer están relacionadas a los genes *PTEN*, *PIK3CA*, *ARID1A*, *PPP2R1A* y *CTNNB1* (McConechy et al., 2014). Wentzensen et al., 2016 demostró que el uso de pastillas anticonceptivas durante 10 años disminuye el riesgo de presentar este tipo de cáncer, mientras que una menopausia tardía aumenta el riesgo de desarrollar el carcinoma.

6.4 Cáncer de ovario de células claras (CCC)

Este subtipo (Fig. 1E) es muy poco frecuente y a pesar de que se detecta en etapas muy tempranas de su desarrollo, presenta una alta resistencia a los tratamientos clínicos y de quimioterapia. Al igual que el cáncer endometriode, se cree que se origina de tejido endometrial de pacientes con endometriosis (Petrik, 2013). Dentro de las características microscópicas del CCC se presentan áreas sólidas y papilas complejas, las células contienen núcleos grandes con citoplasma de apariencia clara lleno de glucógeno (Fig. 1E) (Lheureux et al., 2019). En este tipo de cáncer se encuentra altamente expresado el gen *HNF1B* encargado de la reparación del ADN. Además, se han identificado mutaciones en genes de las vías PI3K/Akt y Ras (Kar et al., 2018). El uso de pastillas anticonceptivas se ha asociado a un riesgo menor de desarrollar este tipo de carcinomas (Wentzensen et al., 2016).

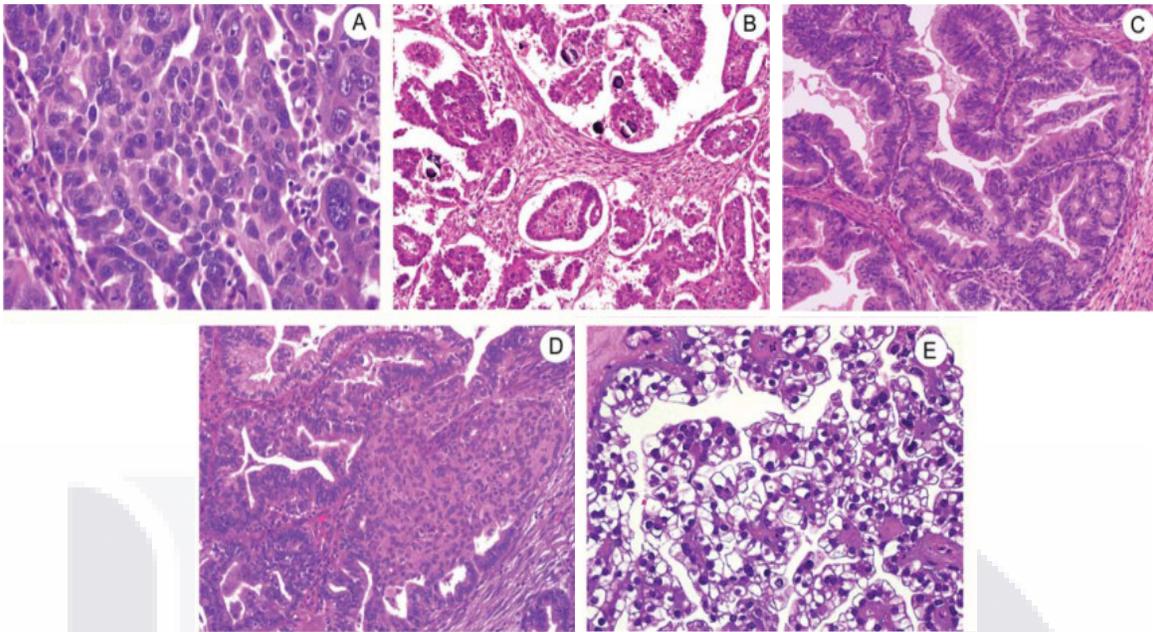


Fig 1. Histología de los cinco subtipos de carcinoma de ovario. A) Carcinoma seroso de alto grado; B) Carcinoma seroso de bajo grado; C) Carcinoma mucinoso; D) Carcinoma endometriode; E) Carcinoma de células claras. (Prat, 2012).

7. Angiogénesis y cáncer

Desde su formación en el embrión, para satisfacer sus necesidades metabólicas, de crecimiento, diferenciación y desarrollo, los tejidos deben asegurarse de un aporte adecuado de nutrientes, factores de crecimiento, O_2 , eliminación de productos de deshecho y CO_2 . Para que lo anterior ocurra, se requiere la formación de vasos sanguíneos que nutran a todos los tejidos y órganos. Al fenómeno que da lugar a la formación de vasos sanguíneos se llama *vasculogénesis* y ocurre en el embrión a partir de células progenitoras llamadas *angioblastos*, estas células sufren diferenciación y migración para formar una red vascular primordial, a partir de aquí, células endoteliales (CE) empiezan a diferenciarse en arterias y venas mediante estímulos hemodinámicos y factores genéticos (Herbert & Stainier, 2011). La *angiogénesis*, es otro proceso por el cual también se forman vasos sanguíneos. Este fenómeno, involucra la formación de nuevos vasos sanguíneos (neoangiogénesis) a partir de vasos pre-existentes. Este proceso también es vital para las funciones de los tejidos y órganos del cuerpo, ya que también asegura la

cantidad de vasos sanguíneos requeridos para transportar nutrientes a todos los tejidos y órganos además de eliminar los productos de desecho. La angiogénesis involucra la migración y proliferación de células endoteliales, la organización de estas células en estructuras tubulares que se diferenciarán en nuevos vasos sanguíneos (Zhu & Witte, 1999) (Fig. 2).

Los eventos que ocurren en la angiogénesis incluyen los siguientes pasos:

1) células endoteliales (CE) forman nuevos vasos sanguíneos por el estímulo de varios factores pro-angiogénicos. Sin estos estímulos las células permanecen en estado inactivo, manteniendo sus uniones intercelulares mediante proteínas de unión como la VE-cadherina. Cuando un vaso sanguíneo detecta una señal angiogénica, que puede provenir de células hipóxicas, células inflamatorias o células tumorales vecinas, dan lugar a la alteración de y separación de las uniones celulares, luego, los pericitos se desprenden, dando lugar a la degradación de la matriz extracelular y al inicio de la formación de un nuevo vaso sanguíneo. Las CE que inician el brote angiogénico, son *células endoteliales de punta* son muy dinámicas que desarrollan extensiones filopodiales que se extienden mientras se mantienen unidas a las *CE de tallo* que mantienen la unión del nuevo vaso sanguíneo con el existente (Herbert & Stainier, 2011). La principal vía de señalización que participa en este proceso es la vía Notch. Esta vía determina el destino de las CE ya sea en células de tallo o células de punta. Las CE que expresan mayormente a la proteína angiogénica, factor de crecimiento endotelial vascular A (VEGFA) son las células endoteliales de punta. La producción del VEGFA y la activación de su respectivo receptor, VEGFR2, promueve la expresión de un ligando de Notch (Delta-like 4) en las CE de punta favoreciendo el proceso angiogénico (Hellström et al., 2007).

2) las CE se agrupan para formar un tubo vascular formado por capilares de pequeño tamaño los cuales se alargan y organizan para formar una red vascular de vasos más grandes que se ramifican en vasos pequeños. Las CE de punta que

regulan los vasos en formación, al entrar en contacto con otros vasos sanguíneos pierden sus propiedades de movilidad y se anastomosan para permitir el flujo sanguíneo. Finalmente, los vasos formados a partir de las células endoteliales son cubiertos por otros tipos celulares como los pericitos (asociados a arterias y venas), y células del músculo liso (principalmente en arteriolas, capilares y vénulas) (Adams & Alitalo, 2007). Las células del músculo liso, son las responsables de la contracción y/o dilatación de los vasos sanguíneos. El reclutamiento de las células musculares lisas, es favorecido por el factor de crecimiento derivado de plaquetas B (PDGFB) y el factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- β) (Martínez y Herrera, 2006). El PDGFB es liberado de las células endoteliales y es quimiotáctico para los pericitos que se unen a las paredes de los vasos inmaduros y crean contactos con las CE. La unión entre las células endoteliales y las células murales es mantenido por la esfingosina-1-fosfato (S1P), que favorece el tránsito de la cadherina neural (N-cadherina) para el ensamblaje de las uniones adherentes (Paik et al., 2004).

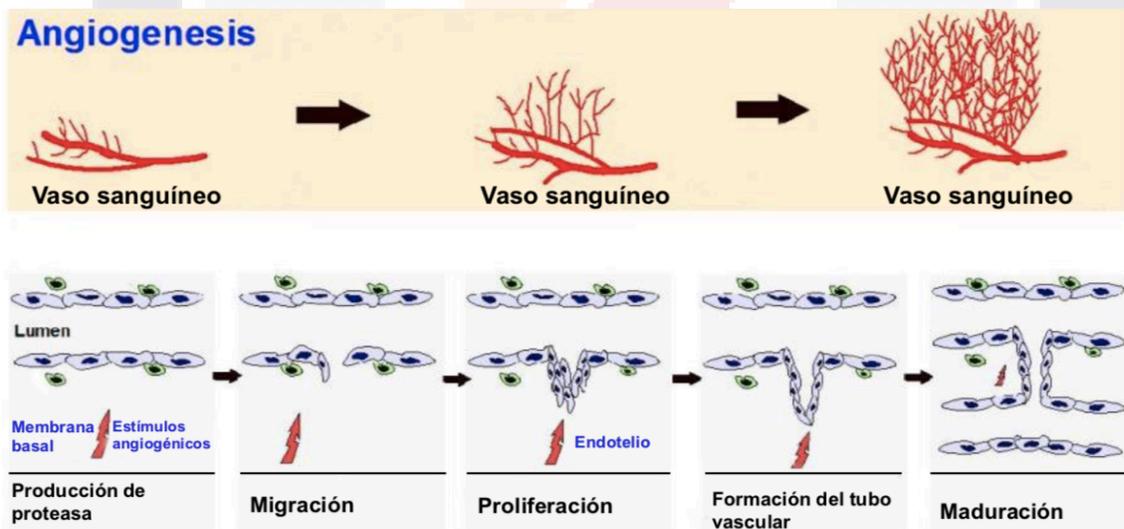


Fig 2. Procesos angiogénico que involucra la formación de vasos sanguíneos a partir de

7.1 Tipos de angiogénesis

Existen dos tipos de angiogénesis:

Angiogénesis fisiológica también conocida como *angiogénesis normal* y la *angiogénesis patológica* o *anormal*. La angiogénesis fisiológica, se realiza en mayor medida durante el desarrollo embrionario y continua hasta el desarrollo postnatal temprano, debido a la necesidad creciente de oxígeno y nutrientes necesarios para el desarrollo y crecimiento de los diferentes órganos (Adams & Alitalo, 2007). En la etapa adulta, la angiogénesis fisiológica ocurre únicamente en el ovario durante la etapa reproductiva, pues el crecimiento folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo necesitan de la proliferación de nuevos vasos sanguíneos. Este tipo de angiogénesis también está presente en los vasos sanguíneos durante el proceso cicatricial.

La angiogénesis patológica se lleva a cabo cuando falla la expresión de los factores pro y anti angiogénicos (Martínez y Herrera, 2006). La angiogénesis puede ser insuficiente, provocando que los tejidos no se recuperen de manera adecuada, o puede ser sobre-estimada lo que favorece el crecimiento tumoral y desarrollo de metástasis (Herbert & Stainier, 2011).

Hay factores moleculares encargados de regular la angiogénesis, entre estos se encuentran el VEGF, que es el factor más importantes en el desarrollo de la angiogénesis, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), TGF- α , TGF- β , factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), interleucina 18 (IL-18), angiopoyetinas (Ang-1 y 2), PDGF, entre otras (Martínez y Herrera, 2006).

El comportamiento de las CE en la angiogénesis es controlado por diferentes vías de señalización, entre las que se encuentran las vías de TIE2 y Notch, sin embargo, como se mencionó anteriormente, el proceso de angiogénesis es regulado principalmente por el VEGF (Martínez, 2006).

8. VEGF

El VEGF es un mitógeno identificado y aislado de las células endoteliales que tiene la capacidad para generar angiogénesis de manera fisiológica y patológica. Con un peso molecular aproximado de 45 kDa, también es conocido como VEGFA y pertenece a una amplia familia de factores de crecimiento incluyendo los siguientes: VEGFB, VEGFC, VEGFD, VEGFE y el factor de crecimiento placentario (PLGF). Estos factores difieren entre sí por sus patrones de expresión, especificidad de los receptores y funciones biológicas (Martínez, 2006) El VEGFA presenta varias isoformas, incluyendo la VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆, siendo la isoforma 165 la que tiene el papel fisiológico más relevante (Apte et al., 2019).

Además de las células endoteliales, el VEGFA también es producido de manera importante por las células del músculo liso vascular y se ha demostrado que diferentes factores de crecimiento favorecen su síntesis y secreción. Entre los factores moleculares promotores de la síntesis y secreción del VEGFA están: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), TGF- β , angiotensina II, endotelina I, entre otras (Tahara et al., 1999).

La función mejor conocida del VEGFA es sobre el proceso de angiogénesis y la permeabilidad vascular, sin embargo, se le han descrito otras funciones. Se sabe que también afecta la función de las células inmunes presentes en el microambiente tumoral, afectando la respuesta del organismo a los tumores (Hansen et al., 2012). Dentro de los descubrimientos más importantes del VEGF son sus efectos autocrinos y paracrinos sobre las mismas células tumorales que lo producen y la tumorigénesis. La señalización del VEGF en las células tumorales es mediada por receptores tirosina-cinasa (RTKs) y neurofilinas (NRPs) (Goel & Mercurio, 2013).

El VEGFA participa además, en muchos procesos independientes de la angiogénesis como: la migración e invasión de las células cancerosas al activar a los receptores VEGFR, de las células del sistema inmune (células dendríticas, macrófagos, células T y células T reguladoras) provocando su inmunosupresión, favoreciendo así el crecimiento tumoral (García et al., 2020).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Uno de los principales mediadores de la expresión de VEGFA es la hipoxia, mediante el factor inducible por hipoxia (HIF) (Apte et al., 2019).

8.1 Receptores VEGF

Como se mencionó anteriormente, la señalización de VEGFA está dada por receptores RTKs y NRPs, funcionando estos últimos como co-receptores (Goel & Mercurio, 2013)(Simons et al., 2016). Existen tres receptores más conocidos tipo RTKs para el VEGF: VEGFR1 también llamado FLT1, VEGFR2 (FLK1 o KDR) y el VEGFR3 o FLT4. Estos receptores son muy parecidos a los receptores del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), aunque tienen diferencias claras, así, el PDGFR tiene 5 dominios transmembranales de tipo IgG, mientras que VEGFR presenta 7 dominios (Shibuya, 2011). Las células endoteliales expresan principalmente a estos receptores, aunque, estudios recientes indican que también se expresan en otros muchos tipos celulares, incluyendo células tumorales. expresan estos receptores (Kowanetz & Ferrara, 2006).

El principal receptor para el VEGFA es el VEGFR2 responsable de la angiogénesis y se expresa principalmente en las células endoteliales (Kowanetz & Ferrara, 2006). El VEGFA también se une a receptores NRPs-1, favoreciendo la afinidad de esta proteína por el receptor VEGFR2. El VEGFR2, activa la señalización en las células tumorales desencadenando la mitogénesis y la permeabilidad de las células endoteliales (Sakurai et al., 2005).

El VEGFA tiene una afinidad muy alta por VEGFR1, pero la señalización mediada por este receptor es débil para el desarrollo de la angiogénesis, sin embargo, cuando se une a VEGFR2 se promueve la formación de los vasos sanguíneos, indicando el VEGFR1 inhibe el proceso de angiogénesis (Goel & Mercurio, 2013).

El VEGFE se une a FLT1, mientras que el VEGFC y D se unen al VEGFR3, participando en el proceso de linfangiogénesis (Pajusola et al., 1992).

Para que el receptor RTK se active, es necesario que el VEGFA se una a su receptor, iniciando su homodimerización o heterodimerización, seguido de la activación y autofosforilación de los residuos de tirosina en los dominios

intracelulares, que a su vez, activa varias vías de señalización intracelular relacionadas con la permeabilidad vascular, migración y proliferación celular, principalmente de las células endoteliales (Fig. 3) (Simons et al., 2016). Existen dos vías principales para la activación de VEGFR2: la canónica, activada por el ligando VEGFA, y la no canónica, activada por otros estímulos diferentes al VEGFA).

La activación canónica del receptor por su ligando, incluye la unión de las diferentes variantes de VEGFA, pero también mediante la unión de VEGFC y VEGFD al receptor. Varios estudios demuestran que el VEGFA tiene alta afinidad por los receptores VEGFR1 y VEGFR2. En las células endoteliales hay diez veces más receptores VEGFR2 que VEGFR1, pero la afinidad del VEGFA es mayor para el receptor VEGFR1, sin embargo, cuando el VEGFA se une a este receptor no hay activación de las vías de señalización responsables de la proliferación celular, migración, etc. (Nilsson et al., 2010).

Durante la angiogénesis se activa el receptor VEGFR2 al acoplarse al VEGFA, lo que a su vez activa diferentes vías de señalización como; fosfoinositol-3-quinasa (PI3Ks), proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs), fosfolipasa C γ y pequeñas GTPasas (Martínez, 2006).

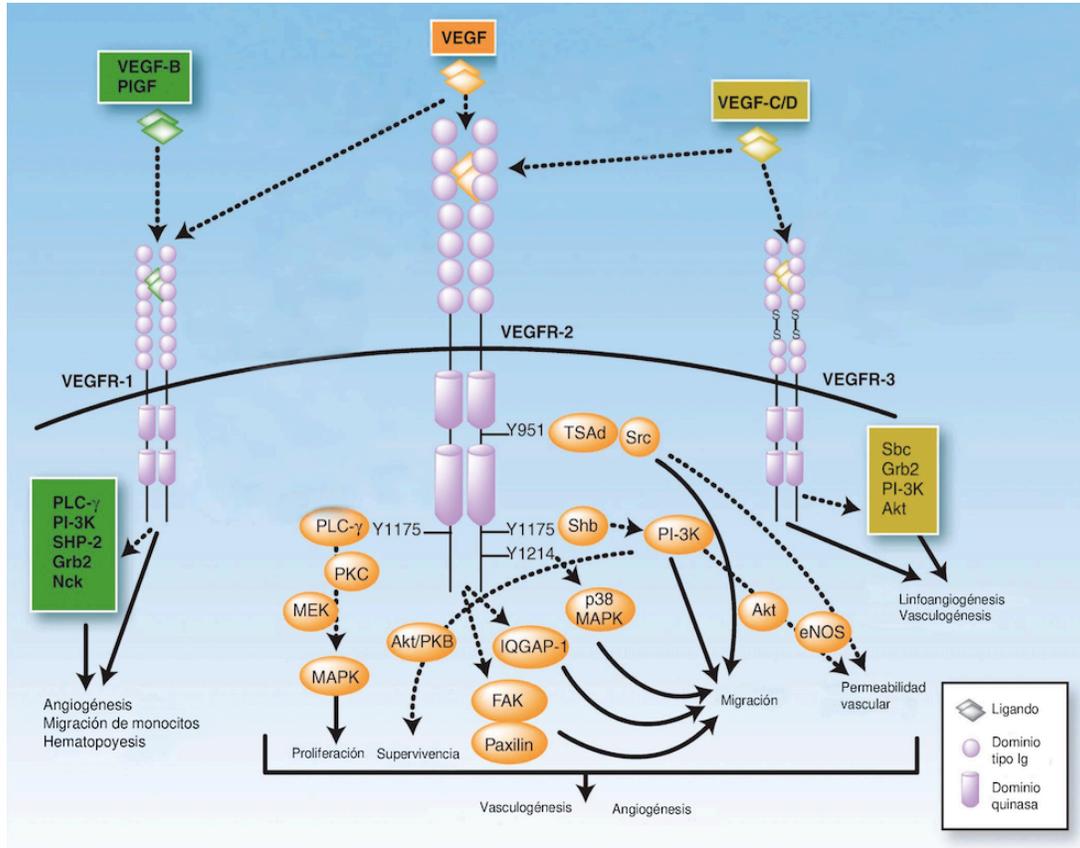


Fig 3. Vía de señalización mediada por VEGFRs. Lo números indican los sitios de autofosforilación que se activan por VEGFR2. Se muestra la señalización de VEGFR1 y VEGFR3. FAK (quinasa de adhesión focal) Grb2 (proteína unida al factor de crecimiento 2) MAPK (proteína quinasa activada por mitógeno) MEK (proteína quinasa activada por mitógeno/ señal extracelular- quinansa quinansa) PI-3K)

8.2 EL VEGF y cáncer

Aunque el VEGF es muy importante para el desarrollo de la vascularización de los diferentes órganos y tejidos normales, se acepta que las células tumorales lo secretan y de manera autocrina se estimula el desarrollo tumoral (Cao et al., 2012). Además, esta forma de autoactivar a las células tumorales, se sustenta en la capacidad del proliferativa del VEGF, que lo convierte en un factor importante que

en la patogénesis molecular del tumor, favoreciendo así, su crecimiento y metástasis (Apte et al., 2019). Se ha descrito que la capacidad de sintetizar y secretar el VEGF se presenta principalmente en los cánceres más agresivos y poco diferenciados (Goel & Mercurio, 2013). Un estímulo importante de la expresión del VEGF en las células tumorales es el factor inducible por hipoxia (HIF), que coadyuva a activar las vías de señalización que aumentan la síntesis y secreción del VEGF por las células tumorales. HIF se mantiene activado en las células del tumor, aumentando la expresión de VEGF (Mimeault & Batra, 2013). También se ha descrito, que la señalización autocrina del VEGF aumenta la expresión del VEGFR2 en las células tumorales.

Diferentes estudios han mostrado, que la expresión del VEGF estimula el crecimiento del cáncer mamario del tipo triple negativo, en el que se encuentra elevada la expresión de VEGF en etapas avanzadas de la enfermedad (etapa III). El VEGF también se ha asociado a cánceres con elevada capacidad de invasión y metástasis. Las evidencias sugieren que esto es debido principalmente a la activación de los receptores VEGFR1 y VEGFR2 (Malekian et al., 2020).

En la búsqueda de tratamientos anticancerígenos, actualmente se emplean fármacos que tengan la capacidad de inhibir las vías de señalización del binomio VEGF-VEGFR responsable del crecimiento tumoral. Una de las estrategias más importantes ha sido el desarrollo de anticuerpos contra el VEGFA. El primero de estos fue el llamado anticuerpo A.4.6.1, que reconoce todas las isoformas de VEGFA. El anticuerpo fue probado en modelos murinos. Posteriormente, se obtuvo el anticuerpo para humanos llamado bevacizumab, que presenta las mismas características que el anticuerpo murino. El bevacizumab ha sido utilizado en pacientes con cáncer colorrectal no tratado, con resultados positivos. El bevacuzimab también se ha utilizado en el tratamiento de otros tipos de cáncer: carcinoma pulmonar de células no escamosas, glioblastoma multiforme, cáncer de ovario y cáncer de cuello uterino, entro otros, también con resultados alentadores (Ferrara & Adamis, 2016).

8.3 Tratamientos contra Cáncer de ovario

El Cáncer de ovario es una enfermedad heterogénea, presenta varios subtipos histológicos de diferente origen y manifestaciones clínicas diversas, aunque todos ellos se desarrollan en el mismo sitio anatómico (ovario). Por lo tanto, el CO se considera como un conjunto de distintas enfermedades que tienen que ser tratadas de manera específica. Esta diversidad de subtipos del cáncer de ovario, es una de las razones por la que los tratamientos existentes no han sido tan efectivos (Schmid & Oehler, 2014). Actualmente, los objetivos para el tratamiento del cáncer de ovario se basan en el desarrollo de terapias dirigidas molecularmente para cada subtipo de cáncer y las condiciones particulares de cada paciente.

Un aspecto muy importante para la eficacia del tratamiento del CO es la detección temprana, en donde la citorreducción combinada con quimioterapia a base de platino (carboplatino y cisplatino) y taxanos (paclitaxel y docetaxel) tendría una alta eficacia, sin embargo, se observó que las pacientes tienden a recaer (Lheureux et al., 2019). El carboplatino se administra primero que el cisplatino porque se ha demostrado la misma eficacia en combinación con el paclitaxel. En estas condiciones, el paclitaxel presenta menos efectos secundarios y su administración es más sencilla (Ozols et al., 2003). Algunas ocasiones la cirugía no se puede llevar a cabo al momento de detectar el tumor, debido a la extensión que presenta o al estado clínico de la paciente, por lo que el tratamiento farmacológico debe posponerse. Así, la paciente es sometida primero a un procedimiento llamado cirugía citorreductora de intervalos en el que la paciente recibe al menos tres ciclos de quimioterapia. Los estudios sobre esta combinación de tratamiento (cirugía primaria y cirugía de intervalos) han mostrado ser de utilidad (Kehoe et al., 2015). Actualmente está adquiriendo relevancia en el tratamiento de los cánceres ováricos el uso de terapias dirigidas, que consisten en el uso de factores antiangiogénicos e inhibidores de la poli (ADN ribosa) polimerasa (PARP). Dentro de los inhibidores de la angiogénesis se encuentra el Bevacizumab, anticuerpo monoclonal que impide que VEGF se una al receptor induciendo una menor formación de vasos

sanguíneos. Diferentes estudios han mostrado que el tratamiento con bevacizumab combinado con carboplatino y paclitaxel mejora la supervivencia libre de enfermedad de pacientes con CEO (Kristensen et al., 2011).

Las PARP son proteínas que se encargan de la reparación por escisión de base cuando hay daño en el ADN. Los inhibidores de estas proteínas promueven la acumulación de roturas de doble hebra del ADN, lo que lleva al colapso de la célula y posteriormente a la muerte. La célula es capaz de reparar el daño por roturas de doble hebra por recombinación homóloga y sobrevivir a la inhibición de PARP. Sin embargo, en células de cáncer de mama y ovario hay mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, por lo que hay defectos en la reparación homóloga y sensibilidad a la inhibición de PARP, que lleva a la muerte celular por un fenómeno denominado “letalidad sintética” que ocurre cuando hay mutaciones o fallas en dos o más genes (Schmid & Oehler, 2014). Se han utilizado inhibidores de la PARP en el cáncer de ovario, con mutaciones en los genes *BRCA1* y *BRCA2*, con buenos resultados (Tan et al., 2008).

Otras terapias para el cáncer de ovario que se encuentran actualmente en la etapa de ensayos preclínicos y están dirigidos a los receptores de la tirosina quinasa, receptor de folato, inmunoterapia y a la red PI3K / Akt / mTOR (Schmid & Oehler, 2014; Lheureux et al., 2019).

Existe evidencia de que la hormona Arginina Vasopresina (AVP) participa en la secreción de VEGF y en el desarrollo del cáncer. Algunos estudios han indicado que la inhibición de los receptores V1a de AVP disminuye la liberación del VEGF en las células del músculo liso vascular, en pacientes con el síndrome de hiperestimulación ovárica (Cenksoy et al., 2014).

9. Arginina vasopresina (AVP) y sus receptores

La AVP es un péptido de nueve aminoácidos que se produce en los cuerpos celulares de las neuronas en los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo. Así mismo, pequeñas cantidades de la hormona también son

sintetizadas por otros tejidos fuera del hipotálamo. En el hipotálamo, la síntesis de AVP inicia como pre-pro-vasopresina, compuesta de 164 aminoácidos y es codificada junto con dos proteínas: la neurofisiina 2 (NPII) y la copeptina, que mediante una signalasa es convertida en pro-presofisiina en el retículo endoplásmico, posteriormente la copeptina es glicosilada y separada por una endopeptidasa que también elimina la neurofisiina del péptido. La Pro-AVP es encerrada en vesículas, donde la arginina del carbono terminal y la lisina son cortadas por la carboxipeptidasa E, mientras que la glicina del carbono terminal es oxidada por la glicina-monooxigenasa en hidroxil-glicina, finalmente una liasa convierte la hidroxil-glicina en un grupo amida para que reaccione con el ácido glioxílico y forme la AVP (Fig. 4) (Sparapani et al., 2021). La AVP se almacena en gránulos de secreción en la hipófisis posterior (neurohipófisis), para ser liberada a la circulación mediante diferentes estímulos (Ferrara, 2005)(Laycock, 2010).

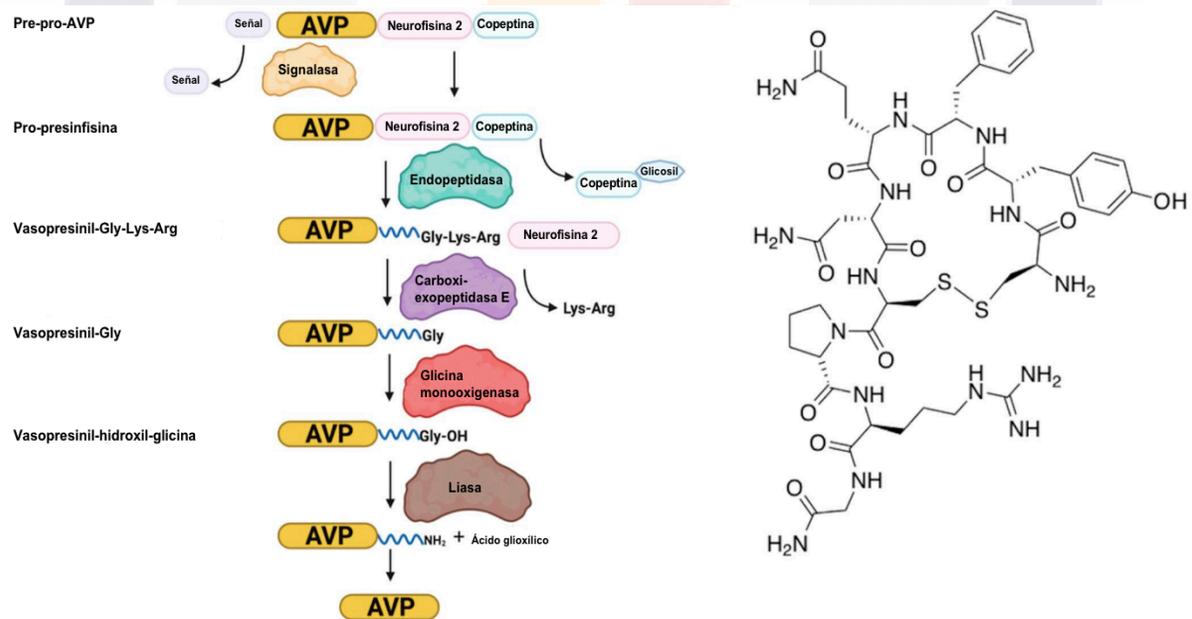


Fig 4. Síntesis y estructura de AVP. (Sparapani et al., 2021)

Las principales funciones de la AVP en el organismo son: vasoconstricción, antidiurésis y secreción de ACTH. Los efectos de la AVP sobre sus células y tejidos

blanco es mediada por al menos tres tipos de receptores: los V1a, V1b and V2 (Rotondo et al., 2016).

Los receptores de AVP son proteínas de membrana con un tamaño que va de 371 a 424 aminoácidos y comprenden 7 dominios transmembrana unidos por tres sitios extracelulares.

Los receptores de AVP pertenecen a la familia 1b de receptores ligados a proteínas G. El sitio de unión de la hormona implica la parte superior de la hélice transmembrana, los bucles extracelulares (incluyendo el puente disulfuro) y el sitio N-terminal (Laycock, 2010).

Una de las divisiones de los receptores de AVP se basa en los segundos mensajeros a los que están acoplados, en esta clasificación se encuentran los receptores V1 y V2.

Los V1 se encuentran acoplados a una proteína Gq/11, activando la fosfolipasa C (PLC), que a su vez induce la generación de 1,4,5-inositol trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG), lo que causa un aumento del calcio intracelular (Sparapani et al., 2021).

Por otro lado, los receptores V2 están acoplados a una proteína Gs, por lo que hay una estimulación de adenilatociclase y un incremento intracelular de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) (Lycock, 2010).

Los receptores V1a están altamente expresados en células del músculo liso vascular y miometrio, participando en fenómenos de vasoconstricción y mioconstricción, en los hepatocitos participa en procesos de gluconeogénesis y glucogenólisis y agregación plaquetaria (Rotondo et al., 2016). Este receptor también se encuentra en el sistema nervios central y participa en la regulación del ritmo cardiaco (Li et al., 2009).

El receptor V1b se acoplan a Gq y Gi , aunque también se ha reportado que se une a Gs para activar diferentes vías de señalización (Thibonnier et al., 2001). Este receptor, también se encuentra altamente expresado en las células corticotropas de la adenohipófisis regulando la liberación de ACTH (Antoni, 1984).

El receptor V2 de vasopresina se encuentra principalmente en el riñón, específicamente en la membrana basolateral del túbulo contorneado distal y el túbulo colector, en donde la AVP ejerce su función antidiurética. La AVP aumenta la permeabilidad al agua y su reabsorción a través de la activación de los receptores V2, desencadenando una cascada de señalización que favorece al aumento de AMPc y Ca^{+2} que a su vez, fosforila a la acuaporina 2 (AQP2), dependiente de la proteína quinasa A (PKA), lo que moviliza a las vesículas que contienen a las moléculas de AQP2 hacia la membrana apical de las células, a la que se integra, generando un incremento en el número de canales de agua favoreciendo la reabsorción y retención de agua por el organismo de agua (Sparapani et al., 2021). Otra función importante de los receptores V2 es en el riñón es su papel estimulante en la reabsorción de Na^{+} a nivel del asa de Henle (Rotondo et al., 2016).

Además de estar presente en el riñón, el receptor V2 se ha encontrado en las células endoteliales, a las que activa induciendo la liberación del factor de von Willebrand (vWF) y del factor VII (FVIII) (Kaufmann et al., 2000). Por otro lado, existe evidencia de aislada de que la AVP podría estar jugando algún papel en la activación de los receptores V2 de las células cancerosas participando en la progresión del cáncer. La evidencia consiste en que una disminución de los receptores de AVP favorece el desarrollo de algunos tipos de cáncer como: el cáncer pulmonar, de mama y colorrectal (North, 2000).

En el sistema nervioso central y el sistema inmune, la mayoría de las vías de señalización son mediadas por los receptores V1a de AVP, mientras que los receptores V2 y los receptores V1b se expresan en menor medida o no se expresan (Laycock, 2009; (Rotondo et al., 2016). Estudios recientes han mostrado la expresión del ARNm de V2R en el hipocampo y otras regiones del cerebro de la rata, y que en el hipocampo, esta expresión disminuye en función de la edad, sin embargo, el papel del receptor V2 en este sitio no ha sido bien establecido (Dumais & Veenema, 2016).

9.1 Agonistas y antagonistas de AVP

El conocimiento de la AVP en la participación de otras funciones corporales previamente desapercibidas, proviene del desarrollo de fármacos con propiedades agonistas y antagonistas específicos para estimular o bloquear de manera específica los diferentes tipos de receptores de AVP.

Dentro de los agonistas de AVP, el más antiguo y mejor estudiado ha sido la desmopresina (Dp), un derivado sintético de AVP que se une específicamente a los receptores V2. La diferencia de Dp con el péptido original radica en la desaminación de la cisteína en la posición 1, además de una sustitución de L-arginina por D-arginina en la posición 8, lo que da selectividad por los receptores V2 y sin ningún efecto presor (Garona et al., 2015). En las células endoteliales la Dp promueve la liberación del factor VIII de coagulación, el factor de von Willebrand y los activador del plasminógeno. El receptor V2 se expresa en diferentes tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de mama. Se sabe que en este cáncer, una sobre estimulación del receptor V2 tiene efectos antiproliferativos en las células tumorales, así como una disminución en la cantidad de vasos sanguíneos formados en tumores de cáncer de mama y colorrectal (Petit et al., 2001).

Dentro de los antagonistas de los receptores de AVP se encuentra el OPC-21268, un antagonista no peptídico específico de los receptores V1a de AVP, este receptor se encuentra mayormente expresado en las células del músculo liso vascular. Se ha demostrado que el empleo de este antagonista y otros de la misma naturaleza específicos para los receptor disminuyen la secreción del VEGF de las células del músculo liso vascular (Shinoura et al., 2000).

El conivaptan es un antagonista no peptídico de AVP, pertenece al grupo de los vaptanes, fármacos que tienen la capacidad de bloquear los receptores V1a y V2 de AVP. Este fármaco es un antagonista competitivo y reversible. Por sus propiedades acuaréticas, en el humano se utilizan para el tratamiento de la hiponatremia hipervolémica en condiciones de insuficiencia cardíaca congestiva crónica, así como en pacientes con ascitis en la cirrosis hepática (Can et al., 2019).

Algo importante que hay que resaltar, es que aunque este antagonista se une a los receptores V1a y V2, tiene una afinidad 10 veces mayor por los receptores V2 (Rajan et al., 2018).

9.2 Estudios de AVP en cáncer

La información publicada sobre el papel de la AVP en el desarrollo del cáncer se ha basado en el uso de agonistas y/o antagonistas de los receptores de AVP, teniendo como blanco terapéutico los diferentes tipos de receptores de AVP; V1a, V1b y V2. En 1999 Alonso y colaboradores encontraron que la administración intravenosa de desmopresina (Dp) redujo en un 70% la metástasis pulmonar en ratones Balb/c inoculados con la línea celular F3II de cáncer de mama. También se determinó la presencia de agregados celulares en plasma, obteniendo que el plasma tratado con Dp evita la agregación celular (Alonso et al., 1999).

De igual forma (Giron et al., 2002), trabajando en un modelo de cáncer de mama en ratones Balb/c, encontraron que la administración de Dp redujo la metástasis pulmonar.

En otro experimento, Shinoura et al., 2000, estudiaron los efectos de bloquear los receptores V1a en un modelo de cáncer pulmonar en un modelo de ratón. En este estudio, describieron una menor proliferación de las células cancerosa.

Hermo y colaboradores en el 2008, probaron los efectos de la aplicación de DDAVP sobre el desarrollo de metástasis en perras con tumores malignos de mama extirpados por cirugía. La DDAVP fue aplicada 30 minutos antes y 24 horas después de la cirugía. Los resultados mostraron una disminución significativa en el número de metástasis 3 meses y 1 año después de la extirpación del tumor en el grupo tratado con desmopresina.

Ripoll et al. (2013), realizaron un estudio de los efectos de la Dp, sobre la formación de vasos sanguíneos y el tamaño de tumores mamarios en ratonas Balb/c

inoculadas con la línea de células cancerosas F3II, encontrando que la Dp tuvo un efecto inhibitor tanto sobre el tamaño de los tumores como de la angiogénesis tumoral. Además, describieron en cultivos de células endoteliales vasculares de la glándula mamaria (HMVEC) (que poseen receptores V2 de AVP), que la Dp, a dosis de 1 μ M, disminuye la angiogénesis.

Garona et al. (2019), realizaron un estudio para evaluar el efecto terapéutico del análogo de los receptores V2 de vasopresina (V4Q5) dDAVP, encontrando que el uso de este agonista disminuyó la metástasis de cáncer colorrectal a hígado y pulmones en un modelo murino. También disminuyó la formación de vasos sanguíneos y la migración en cultivo de células HMVEC a las que se administró (V4Q5) dDAVP a una concentración de 1 μ M. En la línea celular CT-26 de cáncer colorrectal murino, la administración de desmopresina disminuyó la proliferación celular de manera significativa respecto al control.

De igual forma, se han realizado estudios en líneas celulares de cáncer de pulmón (Pifano et al, 2018). Estos investigadores observaron que el uso de la desmopresina tiene un efecto antiproliferativo de las células tumorales.

10. Justificación

El cáncer epitelial de ovario es una de las neoplasias ginecológicas más comunes. A nivel mundial se considera la octava causa de muerte por cáncer en mujeres. Debido a que este tipo de cáncer se detecta de manera tardía, presenta un alto índice de recaídas y resistencia al tratamiento.

Actualmente, una alternativa prometedora es el desarrollo de nuevos tratamientos contra el cáncer de ovario a través de la inhibición de la angiogénesis, evento central en el crecimiento tumoral regulado por el VEGF.

Trabajos previos han demostrado que el uso de agonistas y antagonistas de los receptores de AVP pueden jugar un papel importante en la angiogénesis en diferentes tipos de cáncer.

Por lo tanto, consideramos que podría ser importante profundizar en el uso de antagonistas de los receptores V1a y V2 de AVP, así como de agonistas de los receptores V2 de AVP como posibles alternativas farmacológicas a través de determinar si estos compuestos afectan la expresión del VEGFA y la activación del receptor VEGFR2 en el cáncer epitelial de ovario.

11. Pregunta de investigación

¿Los antagonistas y agonistas de vasopresina podrán ser utilizados para modificar la expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 en la línea celular OV-90 de cáncer epitelial de ovario?

12. Hipótesis

El uso de antagonistas y agonista de los receptores V1a y V2 de AVP modificará la expresión de VEGFA y del receptor VEGFR2 en las células cancerosas OV-90 de cáncer epitelial de ovario.

13. Objetivo

Evaluar el efecto de los antagonistas y un agonista de AVP sobre la expresión del VEGFA y el receptor VEGFR2 en la línea celular OV-90 del cáncer epitelial de ovario,

14. Objetivos específicos

Estudiar en cultivos de células OV-90 lo siguiente:

- 1) La toxicidad del agonista y antagonistas de los receptores de AVP en cultivo celular.
- 2) Mediante inmunofluorescencia determinar la presencia de los receptores V2, V1a de AVP y VEGFR2.
- 3) Mediante Western blot, evaluar el efecto de la desmopresina sobre la expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2.
- 4) Evaluar mediante Western blot el efecto del conivaptán (antagonista de los receptores V1a y V2 de AVP) sobre la expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2.
- 5) Evaluar mediante western blot el efecto del OPC21268 (antagonista de los receptores V1a de AVP) sobre la expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2.

15. Materiales y métodos

15.1 Cultivo celular

Se utilizó la línea celular OV-90 de CEO obtenidas de un adenocarcinoma papilar seroso de ovario humano, cultivadas en medio 105 (Sigma Cat. M5395-1L) y medio 199 (Gibco Cat. 11043-023) suplementado con suero fetal de bovino (FBS) al 10% (Gibco Cat. 16000-044) y una mezcla de penicilina-estreptomicina-glutamina (Gibco Cat. 10378). Las células se incubaron a 37 °C con 5% CO₂ y 95% de aire.

15.2 Ensayo de toxicidad

El ensayo de toxicidad se realizó utilizando el kit Cytotox 96 (Cat. G1780 Promega) para medir el porcentaje de lactato deshidrogenasa (LDH). Esta técnica se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

Se utilizaron placas de 96 pozos, divididos de la siguiente manera: control negativo (medio de cultivo sin células), control + vehículo (SS y DMSO al 20%), Desmopresina (0.5 µM, 1 µM, 2 µM), Conivaptan (50, 100, 200 ng/ml) y OPC-21268 (70 µM, 140 µM, 280 µM). Todos los tratamientos se hicieron por triplicado. En cada pozo se colocaron 10,000 células (OV-90) en medio completo al 10% de SFB.

Una vez administradas las diferentes sustancias (tratamientos), la placa se incubó a 37 °C durante 24 horas. Al finalizar el tiempo de incubación, de cada pozo se tomaron 50 µl del sobrenadante y se vertió en otro pozo. A los pozos originales (con células) se añadieron 5 µl del buffer de lisis y se incubaron 45 min a 37 °C.

Al terminar el periodo de incubación, se agregaron 50 µl del reactivo Citotox 96 en cada pozo, se incubaron por 5 minutos a 37 °C. Posteriormente se agregaron 50 µl de la solución de paro y se leyeron en un lector de placas (iMark™ Microplate Absorbance Reader) a 490 nm.

15.3 Inmunofluorescencia

Se utilizaron cultivos celulares de la línea OV-90, en las condiciones descritas en el apartado *cultivo celular* y se utilizaron para teñir el VEGFR2 y los receptores de AVP con el método de doble inmunofluorescencia. Las células se colocaron en 3 cajas de cultivo de 30 mm de diámetro con un cubreobjetos previamente esterilizado en el fondo y se sembraron 200,000 células aprox. Cuando las células se adaptaron a la placa (24-48 horas), se desechó el medio de cultivo y las células se fijaron con paraformaldehído (PFA) al 4% durante 30 minutos. Posteriormente se hicieron 3 lavados de 5 min con PBS 1X. Luego se incubaron con PBS-Tritón al 0.25% durante 30 min. Al finalizar el periodo de incubación, se realizaron 3 lavados de 5 min con PBS 1X. Para bloquear los sitios inespecíficos se utilizó suero de caballo al 5% durante 30 min y luego se hizo un lavado con PBS 1X. En seguida, las células se incubaron con los respectivos anticuerpos primarios; en una caja se colocó el anticuerpo contra el receptor V2 de AVP (Anti-V2, Cat. MBS8242744 BioSource) a una dilución 1:100 en PBS 1X. En la segunda caja se vertió el anticuerpo para el receptor V1a (Anti-V1a, Cat. AVR-010 de Almone Labs) diluido 1:200 en PBS 1X. La tercera caja se utilizó como control negativo (sin anticuerpo). Luego se dejaron incubar durante toda la noche a temperatura ambiente.

Doble inmunofluorescencia. Al día siguiente las placas se lavaron 3 veces con PBS 1x por 5 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a fluorocromos (Alexa 488 goat anti-rabbit Cat. A11008 invitrogen) diluido 1:1000 en PBS 1x y se incubaron por 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Luego, se hicieron 3 lavados con PBS-Tween al 0.05% durante 5 minutos. Posteriormente, excepto la placa control negativo las otras dos se incubaron con anticuerpo primario para VEGFR2 (Anti-VEGFR2, Cat. ab9530 Abcam), diluido 1:100 en PBS 1X. y se incubaron toda la noche a temperatura ambiente y en oscuridad. Al día siguiente, se hicieron tres lavados con PBS 1X durante 5 minutos y se incubaron en el anticuerpo secundario acoplado a fluorocromo (Alexa 594 goat anti-mouse Cat. A32744 invitrogen) diluido 1:500 en PBS 1x incluyendo al control negativo. Después

se realizaron tres lavados con PBS-Tween al 0.05% durante 5 minutos. Seguido de los lavados las células se incubaron con 100µl de DAPI (4',6-Diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride) (Cat. D9542 Sigma) durante 10 minutos para teñir los núcleos. Se lavaron 3 veces con PBS 1X. Una vez realizado los lavados se procedió a montar los cubreobjetos (sobre los que encuentran adheridas las células), con medio de montaje para fluorescencia Vectashield H-1000 (Vector Laboratories), se sellaron con barniz y se analizaron en el microscopio confocal.

15.4 Western Blot

15.4.1. Obtención de las muestras

Se utilizaron 6 placas de 50mm de diámetro (Thermo Fisher Scientific, Roskilde, Dinamarca) con 200,000 células c/u de la línea celular OV-90, en las condiciones de cultivo descritas anteriormente. Una vez obtenida una confluencia celular del 80%, se administraron los siguientes tratamientos: 1) control basal, 2) control + diluyente (SS), 3) control + DMSO al 20%, 4) Desmopresina (1 mM), 5) Conivaptan (100 ng/ml) y 6) OPC-21268 (140 nM). Después de 24 horas de incubación, se procedió a extraer las proteínas de la siguiente manera: Preparación del buffer de RIPA: 20 ml de Tris-base (50 mM) pH 8.0 + 0.2 ml de tritón x-100 + 0.1 gr de ácido desoxicólico + 0.02 gr de dodecilsulfato sódico (SDS) + 174 gr de NaCl + inhibidor de proteasas (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail, Cat. 4693124001 Merck). Se desechó el medio de cultivo de las placas y se agregaron 250 µl del buffer RIPA procediendo a lisar las células desprendiéndolas mecánicamente del fondo con ayuda de un gendarme. Después de despegar el lisado de células, se procedió a completar la lisis utilizando una micropipeta de 1 ml repipeteando vigorosamente para asegurar la lisis completa. Al terminar, el lisado se colocó en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se incubó a 4 °C en agitación constante durante 30 minutos. Al terminar, los lisados se centrifugaron a 4 °C por 15 minutos a 14,000 rpm. Se recuperó el sobrenadante y se congeló a -20 °C hasta la cuantificación de las proteínas. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el kit BCA Protein Assay

for cells or Tissue Protein Samples (Cat. 23225 Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante.

15.4.2. SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis) y Western blot

Para evaluar la expresión de las proteínas de interés, se realizó la técnica SDS-PAGE y western blot de la siguiente manera: En cada carril se cargaron 40 μ g de proteína en buffer de carga a un volumen final de 30 μ l, luego, para evaluar a la proteína VEGFA se corrió en un gel de poliacrilamida al 15%, mientras que para el receptor VEGFR2 se corrió en un gel de poliacrilamida al 8%. Como marcador de peso molecular se utilizaron 5 μ l de la Precisión Plus Kaleidoscope Prestained Protein Standards (Cat. 1610375 BIO-RAD), la cual fue colocada en el carril del centro. Las muestras se corrieron a 80 volts hasta que las bandas del marcador de peso molecular estuvieron separadas lo necesario para poder observar las proteínas de interés (3 hrs. aproximadamente). Una vez que las muestras terminaron de correr se procedió a realizar la transferencia, de la siguiente manera: Se utilizaron membranas de fluoruro de polivinilideno (PVDF) (Immun-Blot PVDF Membranes for Protein Blotting Cat. 1620177. BIO-RAD), previamente activadas en metanol al 100% durante 1 minuto, 5 minutos en agua destilada y 15 minutos en el buffer de transferencia. Posteriormente se hizo el sándwich en el siguiente orden: base negra, fibra, papel filtro, gel, membrana PDVF, papel filtro, fibra y base blanca. Se colocó el sándwich en la cámara de electroforesis con el buffer de transferencia y hielo, y se dejó transfiriendo toda la noche a 12 mA a temperatura ambiente por 18 horas.

15.4.3. Detección de Proteínas en Membranas de Fluoruro de Polivinilideno (PVDF)

Terminada la transferencia, las membranas desecaron a temperatura ambiente, luego se bañaron con metanol al 100% para su permeabilización, enseguida, se bloquearon los sitios inespecíficos con leche "Svelty" sin grasa al 5% en TBS (Tris Buffer Salino: 500 mM de NaCl, 20 mM de Tris-HCl), durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se realizaron dos lavados de 10 minutos con TBS-Tween (0.2% de Tween-20 en TBS). Luego de los lavados, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C en agitación orbital constante; para una membrana se utilizó el anticuerpo anti-VEGFR2 (Cat GTX 30654 genetex) diluido 1:750 en TBS-Tween, mientras que la otra membrana se incubó con el anti-VEGFA (Cat. GTX102643 Genetex) a una dilución de 1:400 en leche al 5% en TBS. Como proteína constitutiva se determinó a la Tubulina mediante el anticuerpo anti- α -tubulina (Cat. T5168 Sigma) diluido 1:4000 en leche Svelty al 5%.

Una vez finalizado el periodo de incubación con los anticuerpos primarios, las membranas se lavaron por 5 minutos con agua destilada, dos lavados de 10 minutos con TBS-Tween y un lavado de 10 minutos con TBS.

Después de los lavados las membranas se incubaron con el respectivo anticuerpo secundario: para el anti-VEGFR2 y el anti-VEGFA se utilizó el anticuerpo anti-rabbit (Cat. A0545 Sigma) a una dilución 1:1000 en leche al 5% y como anticuerpo anti- α -tubulina se empleó el anti-mouse (Cat. 816120 Zymed) en una dilución 1:2000 en leche al 5%. Luego las muestras se dejaron en incubación por dos horas a temperatura ambiente.

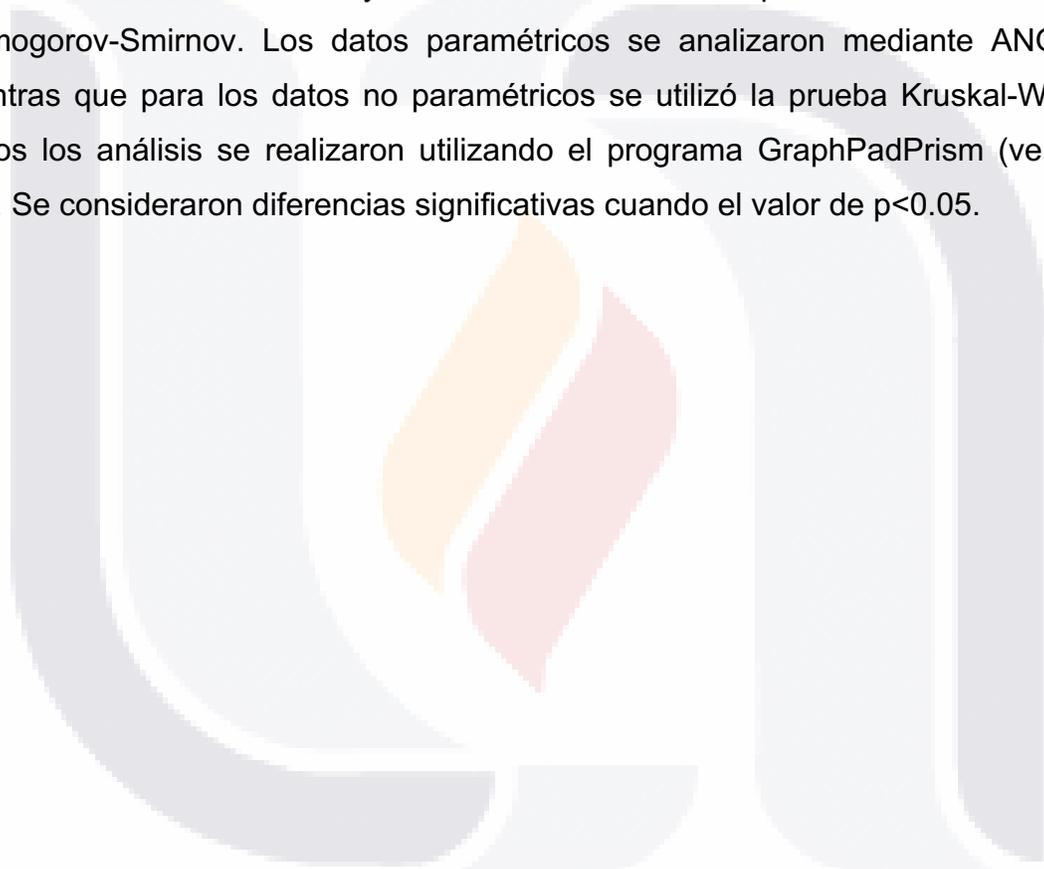
Al terminar las incubaciones, se realizaron dos lavados de 15 minutos con TBS-Tween, luego cinco lavados de 5 minutos con TBS-Tween, seguido de un lavado con TBS por 5 minutos.

Finalmente, las membranas se revelaron utilizando el kit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Cat. WBKLS0500 Millipore) usando el equipo

MicroChemi 4.2. Después de la obtención de las membranas, se escanearon en formato TIFF en una escala de grises. Posteriormente las imágenes fueron analizadas por densitometría utilizando el software Quantity One (Bio-Rad).

15.5 Análisis estadístico

Los datos obtenidos se expresan como la media \pm DE. Para el análisis estadístico de todos los datos en los ensayos de toxicidad se utilizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. Los datos paramétricos se analizaron mediante ANOVA, mientras que para los datos no paramétricos se utilizó la prueba Kruskal-Wallis. Todos los análisis se realizaron utilizando el programa GraphPadPrism (versión 7.0). Se consideraron diferencias significativas cuando el valor de $p < 0.05$.



16. Resultados

16.1 Efecto tóxico de los antagonistas y agonistas de AVP sobre las células OV-90

La toxicidad de los diferentes tratamientos sobre las células OV-90 se expresa como el porcentaje de liberación de la enzima lactato deshidrogenasa después de 20 horas de incubación. Desmopresina (Dp). La figura 5 muestra que, en comparación con el control, las dosis de 0.5 μM , 1 μM y 2 μM de desmopresina no indujeron diferencias significativas en el porcentaje de la LDH liberada.

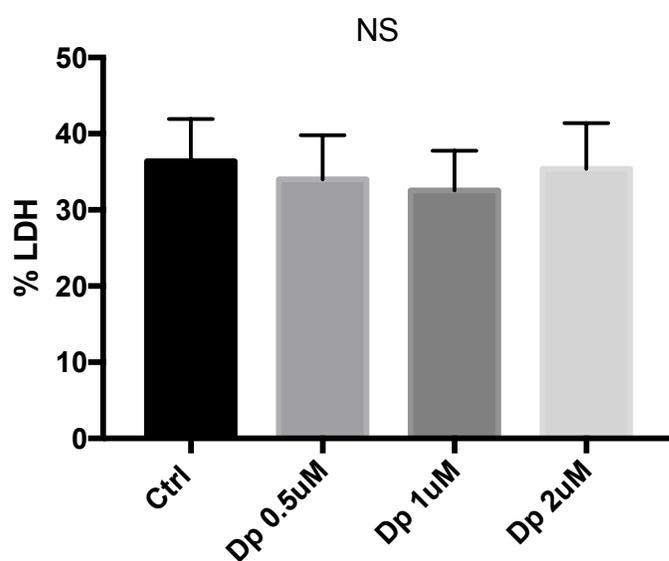


Fig 5. Efectos de la desmopresina (0.5, 1 y 2 μM) sobre la liberación de la lactato deshidrogenasa en cultivos de células de la línea OV-90. La exposición a la Dp fue de 24 horas. Se muestra la media \pm DE de 4 experimentos independientes. Diferencias no significativas = NS.

La evaluación del efecto tóxico del conivaptán, mostró que, en comparación con el control, ninguna de las concentraciones estudiadas (50, 100 y 200 ng/ml) mostraron efecto tóxico sobre las células OV-90 (Fig. 6).

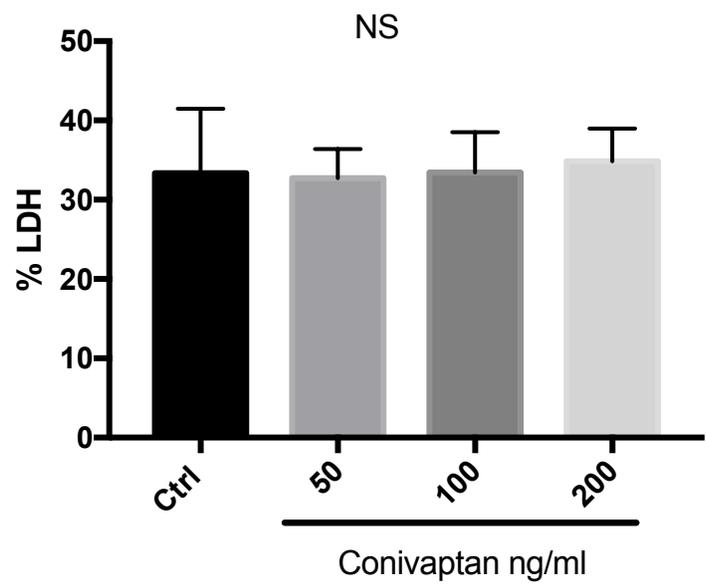


Fig 6. Efectos del conivaptán (50, 100 y 200 ng/ml) sobre la liberación de la lactato deshidrogenasa en cultivos de células de la línea OV-90. La exposición al conivaptán fue de 24 horas. Se muestra la media \pm DE de 4 experimentos independientes. Diferencias no significativas = NS.

La figura 7, muestra que a las dosis administradas (70, 140 y 280 μ M) del OPC-21268, no poseen efecto tóxico sobre las células de la línea OV-90 .

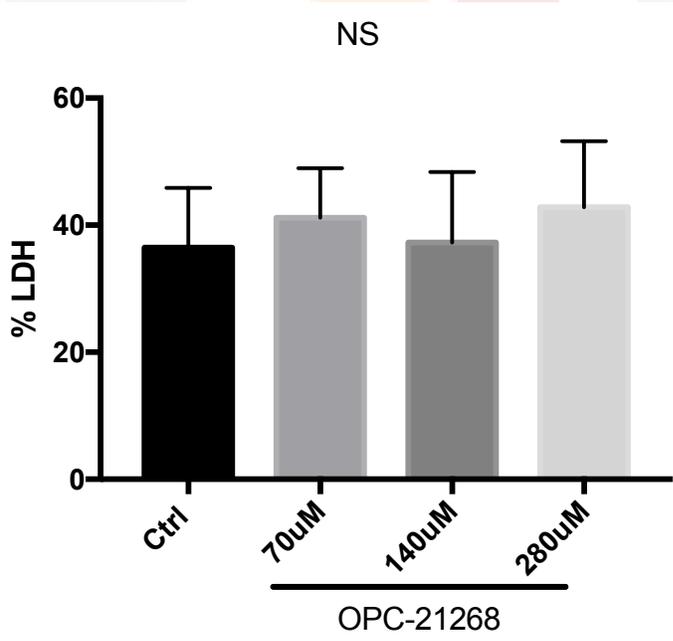


Fig 7. Efectos del OPC-21268 (70, 140 y 280 μ M) sobre la liberación de la lactato deshidrogenasa en cultivos de células de la línea OV-90. La exposición al OPC-21268 fue de 24 horas. Se muestra la media \pm DE de 4 experimentos independientes. Diferencias no significativas = NS.

16.2 Presencia de los receptores V1a, V2 y VEGFR2 en las células OV-90.

La presencia de los receptores V1a y V2 de AVP, así como del VEGFR2 fue evaluada en la línea celular OV-90 mediante inmunofluorescencia. En la figura 8 se muestra la presencia de los receptores V1a, V2 y VEGFR2 en las células OV-90. Fig. 8A corresponde al control negativo teñido con DAPI. Este control no se incubó con ningún anticuerpo específico para los receptores. La Fig. 8B muestra la distribución de los receptores V1a en la membrana de las células teñidos con Alexa 488, mientras que en la Fig. 8C se observa la presencia de los receptores V2 teñidos con Alexa 488 localizados principalmente en la membrana de las células. Finalmente, la Fig. 8D muestra a los receptores VEGFR2 teñidos con Alexa 594 localizados principalmente en los núcleos celulares.

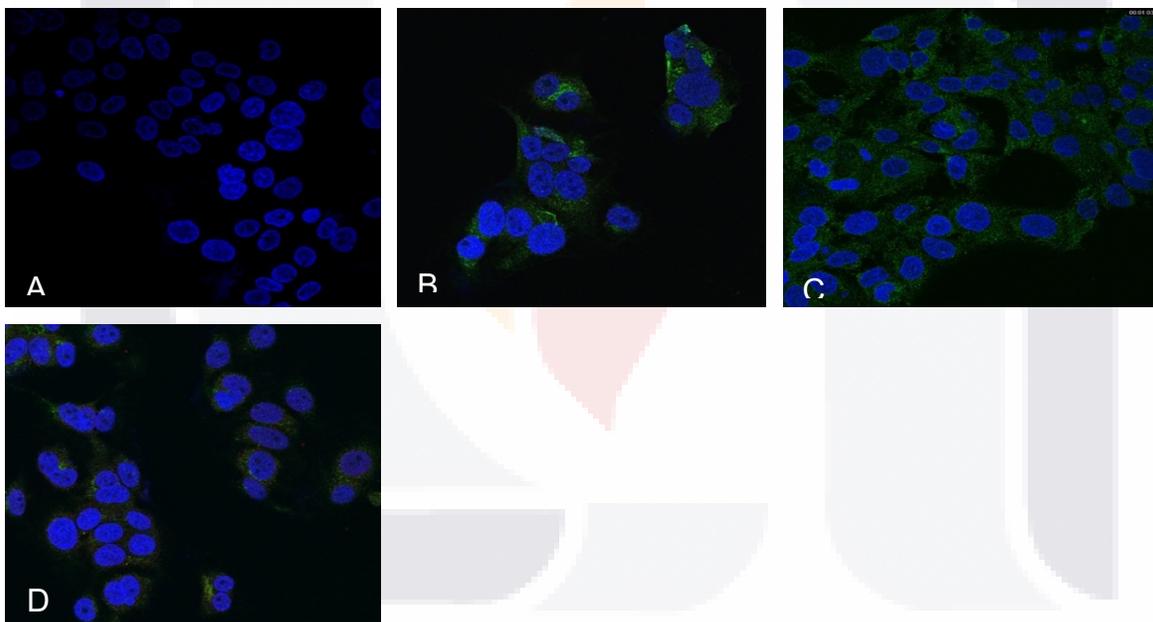


Fig 8. Inmunofluorescencia para los receptores V1a, V2 y VEGFR2 en las células OV-90. (A) Control negativo. (B) Receptor V1a (verde). (C) Receptor V2 (verde). (D) Receptor VEGFR2 (Rojo).

16.3 Expresión de las proteínas VEGFA y VEGFR2 en las células OV-90

Expresión de las proteínas VEGFA y la proteína receptora VEGFR en 40 μ g de lisado de las células OV-90 mediante la técnica de Western blot.

En la figura 9 se muestran los efectos de los diversos tratamientos sobre la expresión de la proteína VEGFA de células OV-90 obtenida en condiciones basales (sin ningún tratamiento) y expuestas a: SS (vehículo), DMSO, Dp 1 μ M, Conivaptan 100 ng/ml y OPC-21268 140 μ M por 24 horas. En el panel 9A se muestra el Western blot representativo, y en el panel 9B el porcentaje de los valores relativos agrupados de la densitometría en relación con la α -tubulina, obtenidos de 3 experimentos independientes. Los resultados muestran que ninguno de los tratamientos indujo cambios significativos en la expresión de la proteína VEGFA. En la figura 10, panel A, se muestra la expresión de VEGFR2 en 40 μ g de proteína obtenidas del lisado de las muestras: basal (sin tratamiento), S (vehículo), DMSO, Dp 1 μ M, Conivaptan 100 ng/ml y OPC-21268 140 μ M. En un carril aparte se corrió un marcador de peso molecular 250 kDa. El análisis de los porcentajes de densidad óptica de tres experimentos independientes, no mostró diferencias significativas en la expresión del VEGFR2 (Fig. 10 panel B).

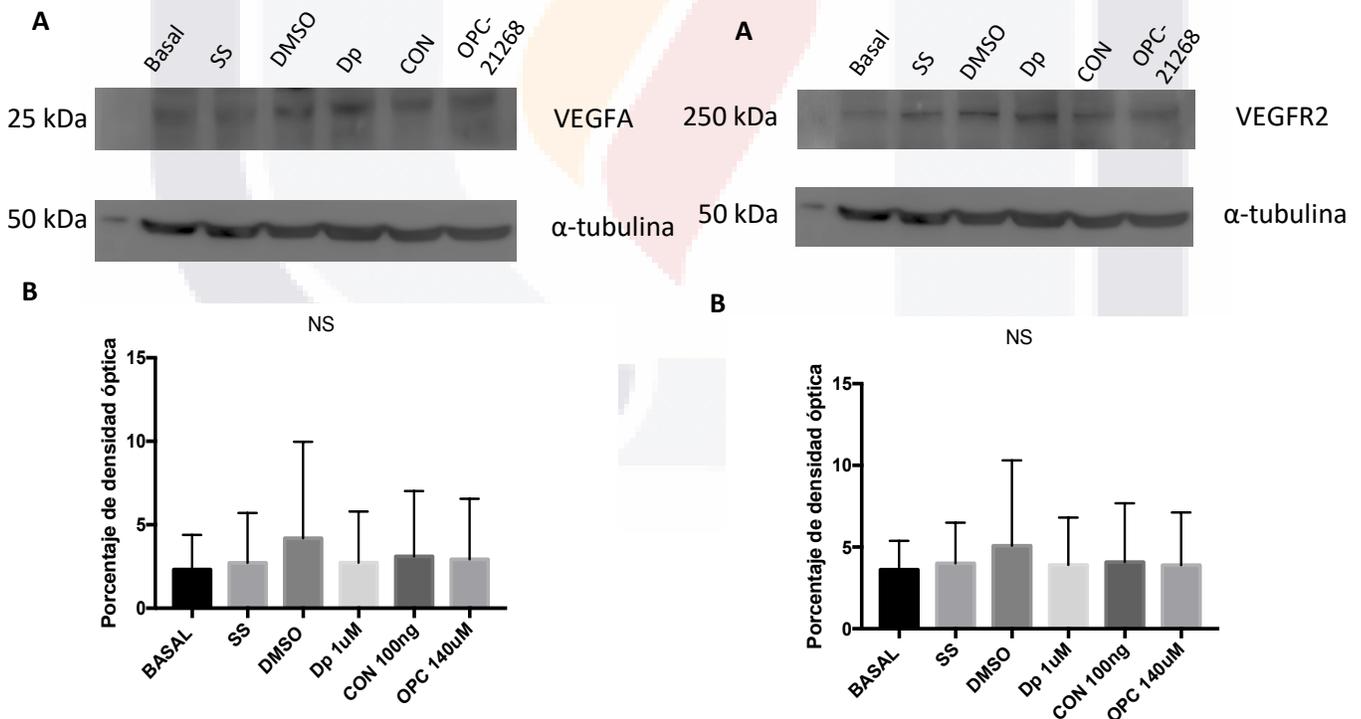


Fig 9. Western Blot y análisis de densitometría para VEGFR2. (A) Las bandas representan a VEGFA y α -tubulina. (B) Análisis de densitometría. Se muestra la expresión de VEGFA en los diferentes tratamientos utilizados. Los valores se expresan como porcentaje de densidad óptica en relación con la α -tubulina por cada 40 μ M de proteína. Se muestra la media \pm DE de 3 experimentos independientes. Diferencia no significativa = NS.

Fig 10. Western Blot y análisis de densitometría para VEGFR2. (A) Las bandas representan a VEGFR2 y α -tubulina. (B) Análisis de densitometría. Se muestra la expresión de VEGFR2 en los diferentes tratamientos utilizados. Los valores se expresan como porcentaje de densidad óptica en relación con la α -tubulina por cada 40 μ M de proteína. Se muestra la media \pm DE de 3 experimentos independientes. Diferencia no significativa = NS.

17. Discusión

En base a la literatura revisada, este trabajo muestra por primera vez la presencia de los receptores V1A y V2 de vasopresina, así como del receptor VEGFR2 en las células cancerosas de la línea OV-90 de ovario.

Al igual que en las células tumorales del cáncer OV-90, los receptores V1a y V2 de AVP están presentes en las membranas celulares de diferentes tumores como: pulmón, ovario, mama, próstata, gastrointestinal y colorrectal (North, 2000; Monstein et al., 2008; Pifano et al., 2018). Es posible que los receptores formen parte de las vías de señalización que activan los segundos mensajeros celulares, es decir que estén acoplados a las proteínas G con 7 dominios transmembranales, que median la hidrólisis del fosfatidilinositol y aumento del Ca^{+} en el citosol que promueven la vía de la adenilato ciclasa y AMPc (V2) (Robert & Clauser, 2005). Por otro lado Kimura et al. (1986), describieron la expresión del gen de AVP y los genes de los receptores V1a y V2 en las células cancerosas de pulmón.

Algunos tumores además de expresar a los receptores V1a y V2, tienen la capacidad de sintetizar y secretar a la AVP, y de manera autocrina regular a las células tumorales. Este fenómeno ha sido descrito por Péqueux et al. (2004), quienes, además, describieron un importante efecto mitogénico en el cáncer de pulmón. Estos autores también demostraron que el efecto mitogénico de la AVP sobre las células cancerosas del pulmón, es mediado por la activación de los receptores V2, a través de la vía de señalización ERK1, mediante la fosforilación de la PKA. Estas observaciones sugieren que este mismo mecanismo podría estar mediando los efectos de la AVP sobre las células cancerosas de la línea OV-90. Trabajos recientes en nuestro laboratorio con células cancerosas de la línea OV-90 apoyan este concepto. En estos trabajos, utilizando las técnicas de rayadura para evaluar la capacidad migratoria de las células cancerosas y el ensayo con Ki67, un marcador de proliferación celular son afectados por la administración de desmopresina (Dp) (análogo sintético de AVP específico para receptores V2) y el

conivaptán (antagonista específico de los receptores V1a-V2 de AVP) (González-Sánchez, 2019). Así, se demostró que la Dp es un factor inhibidor de la migración y proliferación de las células de la línea OV-90, mientras que el conivaptán posee un efecto estimulante sobre estos mismos parámetros (González-Sánchez, 2019). Así, estos resultados confirman la presencia de los receptores V1a y V2 en las células de cáncer de ovario OV-90.

La realización de este proyecto, también permitió demostrar por primera vez la presencia de los receptores VEGFR2 en las células cancerosas de la línea OV-90. Se sabe que este receptor está involucrado de manera importante en los procesos de migración y proliferación en muchos tipos celulares (Simons et al., 2016). Se ha demostrado que el VEGFR2 es un receptor de tipo tirosina quinasa que se localiza principalmente en las membranas celulares, y que al ser activado por el VEGFA, desencadena una cascada de fosforilaciones que activan diferentes vías de señalización (Koch et al., 2011). Además de estar presente en las células endoteliales, este receptor ha sido encontrado en células cancerosas de diversos tipos, como en el cáncer de mama, colorrectal, pulmón, urotelial y ovario (Goel & Mercurio, 2013; Modi & Kulkarni, 2019). La presencia del VEGFR2 también ha sido descrito en otras líneas celulares de cáncer de ovario como en las líneas HeyA8 y SKOV3ip1 (Spannuth et al., 2009). Además, se ha identificado en diversos tipos de cáncer de ovario que este receptor estuvo presente en el 85% de las muestras (Spannuth et al., 2009).

Aunque la evidencia sugiere que VEGFR2 es un receptor de membrana, en nuestro trabajo la ubicación del receptor fue más notoria en el núcleo celular, lo que concuerda con otros estudios en los que se ha mostrado la translocación del receptor al núcleo, en donde activa diferentes factores de transcripción, como el sp1, que se sabe está involucrado en la transcripción de genes como el VEGFA y VEGFR2 (Domingues et al., 2011). Además, en las células endoteliales el VEGFR2 se une a su propio promotor dando lugar a un mecanismo de retroalimentación positiva en el que el resultado es un incremento de su expresión. Aunque el

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

mecanismo exacto por el cual los receptores del VEGFR2 se translocan al núcleo, la evidencia actual sugiere que esta es mediada por la caveolina-1, a la cual se unen, y de esta manera llegan al núcleo, en donde realizan su actividad transcripcional (Domingues et al., 2011).

La evidencia acumulada indica que la AVP juega un papel importante en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer (Ripoll et al., 2013; Pifano et al., 2018), este efecto se ha puesto en evidencia con el uso de agonistas y antagonistas de los receptores de AVP. En el presente trabajo, evaluamos el efecto tóxico del conivaptán, un antagonista de los receptores V1a y V2 de AVP, y el OCP-21268, un antagonista específico para bloquear los receptores V1a. También utilizamos a la Dp, un agonista específico para los receptores V2 de AVP. Nuestros resultados mostraron que, a las dosis utilizadas, ninguno de ellos tuvo un efecto tóxico sobre las células cancerosas de la línea OV-90. Estos resultados muestran que la poca toxicidad de los compuestos y al efecto biológico demostrado sobre la migración y proliferación de las células cancerosas de la línea OV-90 (González-Sánchez, 2019), se puede jugar con un mayor rango de libertad en el uso de diferentes dosis de los agonistas y antagonistas de AVP para estudios sobre el cáncer.

Las concentraciones de Dp, conivaptan y OPC-21268 que se utilizaron fueron establecidas con base en estudios realizados en diferentes líneas celulares. Se ha reportado que la Dp a una dosis de 1 μ M induce una disminución en la proliferación y migración celular en el cáncer de pulmón, mama y colorrectal (Giron et al., 2002; Ripoll et al., 2013; Garona et al., 2019). El conivaptan se utilizó en un modelo "in vitro" de daño cerebrovascular en una dosis de 100 ng/ml mostrando una disminución de la muerte neuronal (Yang et al., 2016). No se encontraron en la literatura trabajos sobre los efectos tóxicos del OPC-21268 sobre cultivos celulares, sin embargo, se sabe que a una concentración de 140 μ M se incrementa la afinidad del compuesto por los receptores V1a en la línea celular COS-7 (Shinoura et al., 2000).

En este trabajo, a la dosis utilizada, el conivaptán no indujo daño a las células OV-90. Un resultado semejante al nuestro realizado por Yang et al., 2016 en cultivos primarios de neuronas y miocitos de rata, donde también evaluaron la muerte celular mediante la liberación de LDH, mostró que los grupos tratados con conivaptán no causaron daño celular. Se tiene poca información sobre los efectos tóxicos del conivaptán. En un trabajo de Martínez Reséndiz (2016), sobre los efectos de diferentes dosis de conivaptán en la regulación de la presión arterial a largo plazo, observó que las pruebas de funcionamiento renal y hepático mostraron niveles normales de las proteínas séricas, sugiriendo que las dosis de 4 mg/kg de peso corporal no generan daño hepático y renal.

En relación con el OPC-21268, antagonista específico para los receptores V1a de AVP, tampoco se encontraron trabajos sobre sus efectos tóxicos a nivel celular. En este trabajo se demostró que el OPC-21268 a las dosis utilizadas (70, 140 y 280 μ M) no tuvieron un efecto tóxico sobre las células OV-90. En el trabajo de Martínez-Reséndiz (2016), en el que utilizó el OPC-21268 (4 mg/Kg de peso/24 hs/15 días) no indujeron cambios significativos en las pruebas de daño hepático y renal (Martínez Reséndiz, 2016).

El diluyente utilizado para disolver a los antagonistas de AVP fue el DMSO. Se ha demostrado que este compuesto presenta un efecto citotóxico *per se*. Uno de los mecanismos por los que se genera daño celular es a través de la inhibición de la respiración celular a nivel de las mitocondrias en las que se genera un aumento de las proteínas Poli ADN ribosa polimerasa (PARP) que favorece la liberación del factor inductor de apoptosis, ocasionando la muerte de las células (Galvao et al., 2014). Muchos trabajos sobre los efectos tóxicos del DMSO han utilizado diferentes concentraciones del compuesto, que van del 1% al 20%, en función de los tipos celulares bajo estudio. En el presente trabajo, los resultados obtenidos no mostraron daño tóxico en respuesta al conivaptan y OPC-21268 diluidos en DMSO al 1%, por lo que este porcentaje de DMSO no significó un peligro tóxico para las células OV-90.

En relación con el estudio de los efectos tóxicos de la Dp, los resultados mostraron que a las dosis utilizadas (0.5, 1 y 2 μM), este agonista no indujo ningún daño sobre las células OV-90. La búsqueda bibliográfica sobre los efectos tóxicos de la Dp en células de cultivo, no arrojó resultado positivo. En un estudio en pacientes con insuficiencia renal crónica, tratados con Dp, a las dosis de 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal, no mostraron efectos secundarios que sugirieran mayor daño sobre las funciones renales que las inherentes a la enfermedad (Ruzicka et al., 2003).

Nuestros estudios con Western blot para evaluar la capacidad del agonista Dp, y los antagonistas de AVP (conivaptán y OPC-21268), para inducir la síntesis del VEGFA y VEGFR2 mostraron que a las dosis utilizadas, ningún de los compuesto fue capaz de modificar su expresión en las células OV-90. Sin embargo, algunos estudios realizados por Tahara et al., (1999; 2011) quienes trabajando con cultivos celulares de músculo liso vascular y células mesangiales de rata, mostraron que la AVP juega un papel importante en la secreción de VEGFA mediado por la activación de los receptores V1a y dependiente de la dosis de AVP. Además, demostraron que la AVP estimula directamente a las células mesangiales estimulando la secreción de TGF β . Tahara et al., 2008, Wang et al., 2004 confirmaron que el TGF β estimula a su vez la síntesis y secreción de VEGF de las células mesangiales. Por lo tanto, es posible que la secreción de VEGF inducida por AVP pueda estar mediada al menos en parte, por la liberación de TGF β inducida por la AVP. En nuestro experimento, es posible que no se haya visto un efecto significativo del OPC-21268 en la disminución de la expresión de VEGFA debido a que la concentración utilizada y el tiempo de exposición al compuesto. Otra posibilidad es que en las células OV-90, no poseen la maquinaria celular para activar otras vías de señalización que actuando de manera autocrina participen en la autorregulación de la secreción del VEGFA. Mas experimentos son necesarios para demostrar esta hipótesis.

En relación con el efecto del DMSO sobre la secreción del VEGFA, en la literatura revisada, solo se encontró un trabajo en células HeLa (Şimşek et al., 2015). En este, los autores describieron que el DMSO a una concentración de 1.4 μM , indujo

inhibición de la expresión del VEGFA, Sin embargo, los autores solo mencionaron que el mecanismo que media este efecto no se conoce. En nuestro trabajo, a las dosis utilizadas de DMSO, no encontramos efecto alguno sobre la expresión del VEGFA y VEGFR2.

18. Conclusiones

1. Este trabajo muestra por primera vez, que las células OV-90 expresan los receptores de vasopresina V1A y V2 y el VEGFR2.
2. Los receptores V1a y V2 se localizan en la membrana celular, mientras que los receptores VEGFR2 se localizan en el núcleo de las células OV-90.
3. Los ensayos de toxicidad mostraron que las células OV-90, son resistentes a las dosis empleadas de los diferentes compuestos (DMSO, desmopresina, conivaptan y OPC-21268).
4. La falta de respuesta a los diferentes compuestos sobre la secreción del VEGFA y la expresión del VEGFR2 sugiere que los mecanismos celulares y moleculares de las células OV-90 no poseen mecanismos de integración que favorezcan el desarrollo de retroalimentación para la síntesis y secreción del VEGF y del VEGFR2.
5. Se requiere de más trabajo experimental para evaluar otras concentraciones de los compuestos y mayores tiempos de exposición, así como explorar las vías de señalización que regulan la expresión de las proteínas angiogénicas en las células OV-90.

19. Bibliografía

Adams, R. H., & Alitalo, K. (2007). Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(6), 464-478. <https://doi.org/10.1038/nrm2183>

Alonso, D. F., Skilton, G., Farías, E. F., Bal de Kier Joffé, E., & Gomez, D. E. (1999). Antimetastatic effect of desmopressin in a mouse mammary tumor model. *Breast Cancer Research and Treatment*, 57(3), 271-275. <https://doi.org/10.1023/a:1006291607871>

Antoni, F. A. (1984). Novel ligand specificity of pituitary vasopressin receptors in the rat. *Neuroendocrinology*, 39(2), 186-188. <https://doi.org/10.1159/000123976>

Apte, R. S., Chen, D. S., & Ferrara, N. (2019). VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*, 176(6), 1248-1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>

Bowtell, D. D. L. (2010). The genesis and evolution of high-grade serous ovarian cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 10(11), 803-808. <https://doi.org/10.1038/nrc2946>

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>

Can, B., Oz, S., Sahinturk, V., Musmul, A., & Alatas, İ. O. (2019). Effects of Conivaptan versus Mannitol on Post-Ischemic Brain Injury and Edema. *The Eurasian Journal of Medicine*, 51(1), 42-48. <https://doi.org/10.5152/eurasianjmed.2019.18368>

Cao, Y., E, G., Wang, E., Pal, K., Dutta, S. K., Bar-Sagi, D., & Mukhopadhyay, D. (2012). VEGF exerts an angiogenesis-independent function in cancer cells to promote their malignant progression. *Cancer Research*, 72(16), 3912-3918. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-4058>

Catherine Sánchez, N. (2013). Conociendo y comprendiendo la célula cancerosa: Fisiopatología del cáncer. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 24(4), 553-562. [https://doi.org/10.1016/S0716-8640\(13\)70659-X](https://doi.org/10.1016/S0716-8640(13)70659-X)

Cenksoy, C., Cenksoy, P. O., Erdem, O., Sancak, B., & Gursoy, R. (2014). A potential novel strategy, inhibition of vasopressin-induced VEGF secretion by relcovaptan, for decreasing the incidence of ovarian hyperstimulation syndrome in the hyperstimulated rat model. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 174, 86-90. <https://doi.org/10.1016/j.ejogrb.2013.12.001>

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 tumourigenesis, epithelial-mesenchymal transition and stem-like properties of epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 128(3), 475-482. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2012.12.018>

Domingues, I., Rino, J., Demmers, J. A. A., de Lanerolle, P., & Santos, S. C. R. (2011). VEGFR2 translocates to the nucleus to regulate its own transcription. *PLoS One*, 6(9), e25668. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025668>

Dumais, K. M., & Veenema, A. H. (2016). Vasopressin and oxytocin receptor systems in the brain: Sex differences and sex-specific regulation of social behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 40, 1-23. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2015.04.003>

Ferrara, N. (2005). VEGF as a therapeutic target in cancer. *Oncology*, 69 Suppl 3, 11-16. <https://doi.org/10.1159/000088479>

Ferrara, N., & Adamis, A. P. (2016). Ten years of anti-vascular endothelial growth factor therapy. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 15(6), 385-403. <https://doi.org/10.1038/nrd.2015.17>

Ferrara, N., Gerber, H.-P., & LeCouter, J. (2003). The biology of VEGF and its receptors. *Nature Medicine*, 9(6), 669-676. <https://doi.org/10.1038/nm0603-669>

Fortner, R. T., Ose, J., Merritt, M. A., Schock, H., Tjønneland, A., Hansen, L., Overvad, K., Dossus, L., Clavel-Chapelon, F., Baglietto, L., Boeing, H., Trichopoulou, A., Benetou, V., Laggiou, P., Agnoli, C., Mattiello, A., Masala, G., Tumino, R., Sacerdote, C., ... Kaaks, R. (2015). Reproductive and hormone-related risk factors for epithelial ovarian cancer by histologic pathways, invasiveness and histologic subtypes: Results from the EPIC cohort. *International Journal of Cancer*, 137(5), 1196-1208. <https://doi.org/10.1002/ijc.29471>

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Garcia, J., Hurwitz, H. I., Sandler, A. B., Miles, D., Coleman, R. L., Deurloo, R., & Chinot, O. L. (2020). Bevacizumab (Avastin®) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook. *Cancer Treatment Reviews*, 86, 102017. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102017>

Garona, J., Pifano, M., Orlando, U. D., Pastrian, M. B., Iannucci, N. B., Ortega, H. H., Podesta, E. J., Gomez, D. E., Ripoll, G. V., & Alonso, D. F. (2015). The novel desmopressin analogue [V4Q5]dDAVP inhibits angiogenesis, tumour growth and metastases in vasopressin type 2 receptor-expressing breast cancer models. *International Journal of Oncology*, 46(6), 2335-2345. <https://doi.org/10.3892/ijo.2015.2952>

Garona, J., Sobol, N. T., Pifano, M., Segatori, V. I., Gomez, D. E., Ripoll, G. V., & Alonso, D. F. (2019). Preclinical Efficacy of [V4 Q5]dDAVP, a Second Generation Vasopressin Analog, on Metastatic Spread and Tumor-Associated Angiogenesis in Colorectal Cancer. *Cancer Research and Treatment: Official Journal of Korean Cancer Association*, 51(2), 438-450. <https://doi.org/10.4143/crt.2018.040>

Giron, S., Tejera, A. M., Ripoll, G. V., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. (2002). Desmopressin inhibits lung and lymph node metastasis in a mouse mammary carcinoma model of surgical manipulation. *Journal of Surgical Oncology*, 81(1), 38-44. <https://doi.org/10.1002/jso.10141>

Goel, H. L., & Mercurio, A. M. (2013). VEGF targets the tumour cell. *Nature Reviews. Cancer*, 13(12), 871-882. <https://doi.org/10.1038/nrc3627>

Goff, B. A., Mandel, L., Muntz, H. G., & Melancon, C. H. (2000). Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer*, 89(10), 2068-2075. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(20001115\)89:10<2068::aid-cnrc6>3.0.co;2-z](https://doi.org/10.1002/1097-0142(20001115)89:10<2068::aid-cnrc6>3.0.co;2-z)

Goff, B. A., Mandel, L. S., Melancon, C. H., & Muntz, H. G. (2004). Frequency of symptoms of ovarian cancer in women presenting to primary care clinics. *JAMA*, 291(22), 2705-2712. <https://doi.org/10.1001/jama.291.22.2705>

González Sánchez, Z. S. (2019). *Efecto de la desmopresina en cultivos celulares de la línea celular OV-90 de cáncer epitelial de ovario*. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

Hansen, W., Hutzler, M., Abel, S., Alter, C., Stockmann, C., Kliche, S., Albert, J.,

Sparwasser, T., Sakaguchi, S., Westendorf, A. M., Schadendorf, D., Buer, J., & Helfrich, I. (2012). Neuropilin 1 deficiency on CD4+Foxp3+ regulatory T cells impairs mouse melanoma growth. *The Journal of Experimental Medicine*, 209(11), 2001-2016. <https://doi.org/10.1084/jem.20111497>

Hellström, M., Phng, L.-K., Hofmann, J. J., Wallgard, E., Coultas, L., Lindblom, P., Alva, J., Nilsson, A.-K., Karlsson, L., Gaiano, N., Yoon, K., Rossant, J., Iruela-Arispe, M. L., Kalén, M., Gerhardt, H., & Betsholtz, C. (2007). Dll4 signalling through Notch1 regulates formation of tip cells during angiogenesis. *Nature*, 445(7129), 776-780. <https://doi.org/10.1038/nature05571>

Heravi-Moussavi, A., Anglesio, M. S., Cheng, S.-W. G., Senz, J., Yang, W., Prentice, L., Fejes, A. P., Chow, C., Tone, A., Kalloger, S. E., Hamel, N., Roth, A., Ha, G., Wan, A. N. C., Maines-Bandiera, S., Salamanca, C., Pasini, B., Clarke, B. A., Lee, A. F., ... Huntsman, D. G. (2012). Recurrent somatic DICER1 mutations in nonepithelial ovarian cancers. *The New England Journal of Medicine*, 366(3), 234-242. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1102903>

Herbert, S. P., & Stainier, D. Y. R. (2011). Molecular control of endothelial cell behaviour during blood vessel morphogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12(9), 551-564. <https://doi.org/10.1038/nrm3176>

Hermo, G. A., Torres, P., Ripoll, G. V., Scursoni, A. M., Gomez, D. E., Alonso, D. F., & Gobello, C. (2008). Perioperative desmopressin prolongs survival in surgically treated bitches with mammary gland tumours: A pilot study. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 178(1), 103-108. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.06.015>

Jones, M. R., Kamara, D., Karlan, B. Y., Pharoah, P. D. P., & Gayther, S. A. (2017). Genetic epidemiology of ovarian cancer and prospects for polygenic risk prediction. *Gynecologic Oncology*, 147(3), 705-713. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2017.10.001>

Jones, S., Wang, T.-L., Kurman, R. J., Nakayama, K., Velculescu, V. E., Vogelstein, B., Kinzler, K. W., Papadopoulos, N., & Shih, I.-M. (2012). Low-grade serous carcinomas of the ovary contain very few point mutations. *The Journal of Pathology*, 226(3), 413-420. <https://doi.org/10.1002/path.3967>

Kar, S. P., Berchuck, A., Gayther, S. A., Goode, E. L., Moysich, K. B., Pearce, C. L., Ramus, S. J., Schildkraut, J. M., Sellers, T. A., & Pharoah, P. D. P. (2018). Common Genetic Variation and Susceptibility to Ovarian Cancer: Current Insights and Future

Directions. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 27(4), 395-404. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-17-0315>

Kaufmann, J. E., Oksche, A., Wollheim, C. B., Günther, G., Rosenthal, W., & Vischer, U. M. (2000). Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP. *The Journal of Clinical Investigation*, 106(1), 107-116. <https://doi.org/10.1172/JCI9516>

Kehoe, S., Hook, J., Nankivell, M., Jayson, G. C., Kitchener, H., Lopes, T., Luesley, D., Perren, T., Bannoo, S., Mascarenhas, M., Dobbs, S., Essapen, S., Twigg, J., Herod, J., McCluggage, G., Parmar, M., & Swart, A.-M. (2015). Primary chemotherapy versus primary surgery for newly diagnosed advanced ovarian cancer (CHORUS): An open-label, randomised, controlled, non-inferiority trial. *Lancet (London, England)*, 386(9990), 249-257. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)62223-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(14)62223-6)

Kimura, N., Andoh, N., Sasano, N., Sasaki, A., & Mouri, T. (1986). Presence of neurophysins in the human pituitary corticotrophs, Cushing's adenomas, and growth hormone-producing adenomas detected by immunohistochemical study. *The American Journal of Pathology*, 125(2), 269-275.

Koch, S., Tugues, S., Li, X., Gualandi, L., & Claesson-Welsh, L. (2011). Signal transduction by vascular endothelial growth factor receptors. *The Biochemical Journal*, 437(2), 169-183. <https://doi.org/10.1042/BJ20110301>

Koshiyama, M., Matsumura, N., & Konishi, I. (2017). Subtypes of Ovarian Cancer and Ovarian Cancer Screening. *Diagnostics*, 7(1), 12. <https://doi.org/10.3390/diagnostics7010012>

Kowanetz, M., & Ferrara, N. (2006). Vascular endothelial growth factor signaling pathways: Therapeutic perspective. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 12(17), 5018-5022. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1520>

Kristensen, G., Perren, T., Qian, W., Pfisterer, J., Ledermann, J. A., Joly, F., Carey, M. S., Beale, P. J., Cervantes, A., & Oza, A. M. (2011). Result of interim analysis of overall survival in the GCIg ICON7 phase III randomized trial of bevacizumab in

women with newly diagnosed ovarian cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 29(18_suppl), LBA5006-LBA5006.
https://doi.org/10.1200/jco.2011.29.18_suppl.lba5006

Lheureux, S., Braunstein, M., & Oza, A. M. (2019). Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 69(4), 280-304. <https://doi.org/10.3322/caac.21559>

Li, J.-D., Burton, K. J., Zhang, C., Hu, S.-B., & Zhou, Q.-Y. (2009). Vasopressin receptor V1a regulates circadian rhythms of locomotor activity and expression of clock-controlled genes in the suprachiasmatic nuclei. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 296(3), R824-830. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.90463.2008>

M, S. (2006, septiembre 30). *Differential Roles of Vascular Endothelial Growth Factor receptor-1 and receptor-2 in Angiogenesis*. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology; J Biochem Mol Biol*.
<https://doi.org/10.5483/bmbrep.2006.39.5.469>

Malekian, S., Rahmati, M., Sari, S., Kazemimanesh, M., Kheirbakhsh, R., Muhammadnejad, A., & Amanpour, S. (2020). Expression of Diverse Angiogenesis Factor in Different Stages of the 4T1 Tumor as a Mouse Model of Triple-Negative Breast Cancer. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 10(2), 323-328. <https://doi.org/10.34172/apb.2020.039>

Martínez Reséndiz, H. A. (2016). *Papel de los antagonistas de los receptores V1a y V2 de Arginina vasopresina en la regulación de la presión arterila a largo plazo*. Universidad Autónoma de Aguascalientes.

McConechy, M. K., Ding, J., Senz, J., Yang, W., Melnyk, N., Tone, A. A., Prentice, L. M., Wiegand, K., McAlpine, J. N., Shah, S. P., Lee, C.-H., Goodfellow, P. J., Gilks, C. B., & Huntsman, D. G. (2014). Ovarian and endometrial endometrioid carcinomas have distinct CTNNB1 and PTEN mutation profiles. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 27(1), 128-134. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2013.107>

Mimeault, M., & Batra, S. K. (2013). Hypoxia-inducing factors as master regulators of stemness properties and altered metabolism of cancer- and metastasis-initiating cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(1), 30-54.

<https://doi.org/10.1111/jcmm.12004>

Modi, S. J., & Kulkarni, V. M. (2019). Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR-2)/KDR Inhibitors: Medicinal Chemistry Perspective. *Medicine in Drug Discovery*, 2, 100009. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2019.100009>

Nik, N. N., Vang, R., Shih, I.-M., & Kurman, R. J. (2014). Origin and pathogenesis of pelvic (ovarian, tubal, and primary peritoneal) serous carcinoma. *Annual Review of Pathology*, 9, 27-45. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-163949>

Nilsson, I., Bahram, F., Li, X., Gualandi, L., Koch, S., Jarvius, M., Söderberg, O., Anisimov, A., Kholová, I., Pytowski, B., Baldwin, M., Ylä-Herttuala, S., Alitalo, K., Kreuger, J., & Claesson-Welsh, L. (2010). VEGF receptor 2/3 heterodimers detected in situ by proximity ligation on angiogenic sprouts. *The EMBO Journal*, 29(8), 1377-1388. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.30>

Nolan, A., Joseph, N. M., Sangoi, A. R., Rabban, J., Zaloudek, C., & Garg, K. (2017). FOXL2 Mutation Status in Granulosa Theca Cell Tumors of the Ovary. *International Journal of Gynecological Pathology: Official Journal of the International Society of Gynecological Pathologists*, 36(6), 568-574. <https://doi.org/10.1097/PGP.0000000000000377>

North, W. G. (2000). Gene regulation of vasopressin and vasopressin receptors in cancer. *Experimental Physiology*, 85(s1), 27s-40s. <https://doi.org/10.1111/j.1469-445X.2000.tb00005.x>

Ozols, R. F., Bundy, B. N., Greer, B. E., Fowler, J. M., Clarke-Pearson, D., Burger, R. A., Mannel, R. S., DeGeest, K., Hartenbach, E. M., Baergen, R., & Gynecologic Oncology Group. (2003). Phase III trial of carboplatin and paclitaxel compared with cisplatin and paclitaxel in patients with optimally resected stage III ovarian cancer: A Gynecologic Oncology Group study. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(17), 3194-3200. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.02.153>

Paik, J.-H., Skoura, A., Chae, S.-S., Cowan, A. E., Han, D. K., Proia, R. L., & Hla, T. (2004). Sphingosine 1-phosphate receptor regulation of N-cadherin mediates vascular stabilization. *Genes & Development*, 18(19), 2392-2403. <https://doi.org/10.1101/gad.1227804>

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Pajusola, K., Aprelikova, O., Korhonen, J., Kaipainen, A., Pertovaara, L., Alitalo, R., & Alitalo, K. (1992). FLT4 receptor tyrosine kinase contains seven immunoglobulin-like loops and is expressed in multiple human tissues and cell lines. *Cancer Research*, 52(20), 5738-5743.

Petit, T., Davidson, K. K., Lawrence, R. A., von Hoff, D. D., & Izbicka, E. (2001). Neuropeptide receptor status in human tumor cell lines. *Anti-Cancer Drugs*, 12(2), 133-136. <https://doi.org/10.1097/00001813-200102000-00006>

Petrik, J. J. (2013). Challenges in experimental modeling of ovarian cancerogenesis. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1049, 371-376. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-547-7_28

Pifano, M., Garona, J., Sobol, N. T., Albertó, M., Alonso, D. F., & Ripoll, G. V. (2018). Search of vasopressin analogs with antiproliferative activity on small-cell lung cancer: Drug design based on two different approaches. *Future Medicinal Chemistry*, 10(8), 879-894. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0178>

Prat, J. (2012). New insights into ovarian cancer pathology. *Annals of Oncology*, 23, x111-x117. <https://doi.org/10.1093/annonc/mds300>

Quirk, J. T., & Natarajan, N. (2005). Ovarian cancer incidence in the United States, 1992-1999. *Gynecologic Oncology*, 97(2), 519-523. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.02.007>

Rajan, S., Tosh, P., Kadapamannil, D., Srikumar, S., Paul, J., & Kumar, L. (2018). Efficacy of vaptans for correction of postoperative hyponatremia: A comparison between single intravenous bolus conivaptan vs oral tolvaptan. *Journal of Anaesthesiology, Clinical Pharmacology*, 34(2), 193-197. https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_263_17

Reid, B. M., Permuth, J. B., & Sellers, T. A. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: A review. *Cancer Biology & Medicine*, 14(1), 9-32.

Ripoll, G. V., Garona, J., Pifano, M., Farina, H. G., Gomez, D. E., & Alonso, D. F. (2013). Reduction of tumor angiogenesis induced by desmopressin in a breast cancer model. *Breast Cancer Research and Treatment*, 142(1), 9-18. <https://doi.org/10.1007/s10549-013-2724-6>

Robert, J., & Clauser, E. R. (2005). [Vasopressin receptors: Structure/function

relationships and signal transduction in target cells]. *Journal De La Societe De Biologie*, 199(4), 351-359. <https://doi.org/10.1051/jbio:2005037>

Rosen, D. G., Yang, G., Liu, G., Mercado-Urbe, I., Chang, B., Xiao, X. S., Zheng, J., Xue, F.-X., & Liu, J. (2009). Ovarian cancer: Pathology, biology, and disease models. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14, 2089-2102. <https://doi.org/10.2741/3364>

Rotondo, F., Butz, H., Syro, L. V., Yousef, G. M., Di Ieva, A., Restrepo, L. M., Quintanar-Stephano, A., Berczi, I., & Kovacs, K. (2016). Arginine vasopressin (AVP): A review of its historical perspectives, current research and multifunctional role in the hypothalamo-hypophysial system. *Pituitary*, 19(4), 345-355. <https://doi.org/10.1007/s11102-015-0703-0>

Ruzicka, H., Björkman, S., Lethagen, S., & Sterner, G. (2003). Pharmacokinetics and Antidiuretic Effect of High-Dose Desmopressin in Patients with Chronic Renal Failure. *Pharmacology & Toxicology*, 92(3), 137-142. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0773.2003.920306.x>

Sakurai, Y., Ohgimoto, K., Kataoka, Y., Yoshida, N., & Shibuya, M. (2005). Essential role of Flk-1 (VEGF receptor 2) tyrosine residue 1173 in vasculogenesis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(4), 1076-1081. <https://doi.org/10.1073/pnas.0404984102>

Sankaranarayanan, R., & Ferlay, J. (2006). Worldwide burden of gynaecological cancer: The size of the problem. *Best Practice & Research. Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 20(2), 207-225. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2005.10.007>

Schmid, B. C., & Oehler, M. K. (2014). New perspectives in ovarian cancer treatment. *Maturitas*, 77(2), 128-136. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2013.11.009>

Schüler, S., Ponnath, M., Engel, J., & Ortmann, O. (2013). Ovarian epithelial tumors and reproductive factors: A systematic review. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 287(6), 1187-1204. <https://doi.org/10.1007/s00404-013-2784-1>

Shibuya, M. (2011). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) and Its Receptor (VEGFR) Signaling in Angiogenesis: A Crucial Target for Anti- and Pro-Angiogenic Therapies. *Genes & Cancer*, 2(12), 1097-1105. <https://doi.org/10.1177/1947601911423031>

Shih, K. K., & Chi, D. S. (2010). Maximal cyto-reductive effort in epithelial ovarian cancer surgery. *Journal of Gynecologic Oncology*, 21(2), 75-80. <https://doi.org/10.3802/jgo.2010.21.2.75>

Shinoura, H., Take, H., Itoh, S., Hirasawa, A., Inoue, K., Ohno, Y., Hashimoto, K., & Tsujimoto, G. (2000). Key amino acids of vasopressin V1a receptor responsible for the species difference in the affinity of OPC-21268. *FEBS Letters*, 466(2-3), 255-258. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)01079-6](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)01079-6)

Simons, M., Gordon, E., & Claesson-Welsh, L. (2016). Mechanisms and regulation of endothelial VEGF receptor signalling. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 17(10), 611-625. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.87>

Şimşek, E., Aydemir, E. A., İmir, N., Koçak, O., Kuruoğlu, A., & Fışkın, K. (2015). Dimethyl sulfoxide-caused changes in pro- and anti-angiogenic factor levels could contribute to an anti-angiogenic response in HeLa cells. *Neuropeptides*, 53, 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.npep.2015.07.002>

Spannuth, W. A., Nick, A. M., Jennings, N. B., Armaiz-Pena, G. N., Mangala, L. S., Danes, C. G., Lin, Y. G., Merritt, W. M., Thaker, P. H., Kamat, A. A., Han, L. Y., Tonra, J. R., Coleman, R. L., Ellis, L. M., & Sood, A. K. (2009). Functional significance of VEGFR-2 on ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer*, 124(5), 1045-1053. <https://doi.org/10.1002/ijc.24028>

Sparapani, S., Millet-Boureima, C., Oliver, J., Mu, K., Hadavi, P., Kalostian, T., Ali, N., Avelar, C. M., Bardies, M., Barrow, B., Benedikt, M., Biancardi, G., Bindra, R., Bui, L., Chihab, Z., Cossitt, A., Costa, J., Daigneault, T., Dault, J., ... Gamberi, C. (2021). The Biology of Vasopressin. *Biomedicines*, 9(1), 89. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9010089>

Tahara, A., Saito, M., Tsukada, J., Ishii, N., Tomura, Y., Wada, K., Kusayama, T., Yatsu, T., Uchida, W., & Tanaka, A. (1999). Vasopressin increases vascular endothelial growth factor secretion from human vascular smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology*, 368(1), 89-94. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(99\)00004-7](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(99)00004-7)

Tahara, A., Tsukada, J., Tomura, Y., Suzuki, T., Yatsu, T., & Shibasaki, M. (2008). Effect of vasopressin on type IV collagen production in human mesangial cells.

Regulatory Peptides, 147(1-3), 60-66. <https://doi.org/10.1016/j.regpep.2008.01.002>

Tan, D. S. P., Rothermundt, C., Thomas, K., Bancroft, E., Eeles, R., Shanley, S., Ardern-Jones, A., Norman, A., Kaye, S. B., & Gore, M. E. (2008). «BRCAness» syndrome in ovarian cancer: A case-control study describing the clinical features and outcome of patients with epithelial ovarian cancer associated with BRCA1 and BRCA2 mutations. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(34), 5530-5536. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.1703>

Thibonnier, M., Coles, P., Thibonnier, A., & Shoham, M. (2001). The basic and clinical pharmacology of nonpeptide vasopressin receptor antagonists. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 41, 175-202. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.41.1.175>

Wang, L., Kwak, J. H., Kim, S. I., He, Y., & Choi, M. E. (2004). Transforming growth factor-beta1 stimulates vascular endothelial growth factor 164 via mitogen-activated protein kinase kinase 3-p38alpha and p38delta mitogen-activated protein kinase-dependent pathway in murine mesangial cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(32), 33213-33219. <https://doi.org/10.1074/jbc.M403758200>

Wentzensen, N., Poole, E. M., Trabert, B., White, E., Arslan, A. A., Patel, A. V., Setiawan, V. W., Visvanathan, K., Weiderpass, E., Adami, H.-O., Black, A., Bernstein, L., Brinton, L. A., Buring, J., Butler, L. M., Chamosa, S., Clendenen, T. V., Dossus, L., Fortner, R., ... Tworoger, S. S. (2016). Ovarian Cancer Risk Factors by Histologic Subtype: An Analysis From the Ovarian Cancer Cohort Consortium. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 34(24), 2888-2898. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.66.8178>

Yang, M., Orgah, J., Zhu, J., Fan, G., Han, J., Wang, X., Zhang, B., & Zhu, Y. (2016). Danhong injection attenuates cardiac injury induced by ischemic and reperfused neuronal cells through regulating arginine vasopressin expression and secretion. *Brain Research*, 1642, 516-523. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2016.04.046>

Zhu, Z., & Witte, L. (1999). Inhibition of tumor growth and metastasis by targeting tumor-associated angiogenesis with antagonists to the receptors of vascular endothelial growth factor. *Investigational New Drugs*, 17(3), 195-212.