



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS



Laboratorio de Biomedicina Molecular

**ANÁLISIS PROTEÓMICO EN TEJIDOS DE CÁNCER EPITELIAL
DE OVARIO DE PACIENTES RESISTENTES A LA
QUIMIOTERAPIA DE PRIMERA LÍNEA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A

QBP. GLORIA ANGELINA HERRERA QUITERIO

Director de tesis: Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez
Codirectora de tesis: Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres
Asesor externo: Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara

Chilpancingo de los Bravo, Gro., Diciembre del 2018.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE GUERRERO
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN ESPECIALIZADA EN MICROBIOLOGÍA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

APROBACIÓN DE TESIS

En la ciudad de Chilpancingo, Guerrero, siendo los 20 días del mes de junio de dos mil dieciocho se reunieron los miembros del Comité Tutorial designado por la Academia de Posgrado de la Maestría en Ciencias Biomédicas, para examinar la tesis titulada “Análisis proteómico en tejidos de cáncer epitelial de ovario de pacientes resistentes a la quimioterapia de primera línea”, presentada por la alumna Gloria Angelina Herrera Quiterio, para obtener el Grado de Maestría en Ciencias Biomédicas. Después del análisis correspondiente, los miembros del comité manifiestan su aprobación de la tesis, autorizan la impresión final de la misma y aceptan que, cuando se satisfagan los requisitos señalados en el Reglamento General de Estudios de Posgrado e Investigación Vigente, se proceda a la presentación del examen de grado.

El Comité Tutorial

 Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez
 Dirección de tesis

 Dra. Olga Lilia Garibay Cerdaneres
 Codirección de tesis

 Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

 Dr. Oscar del Moral Hernández

 Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara

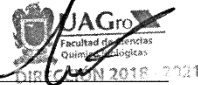
Vo. Bo

Vo. Bo

 Dra. Isela Parra Rojas
 Coordinadora del Posgrado de la Facultad de
 Ciencias Químico Biológicas
 Posgrado de la FCQB

 Dr. Oscar del Moral Hernández
 Director de la Facultad de Ciencias Químico
 Biológicas

Coordinación 2014-2018



Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Biomedicina Molecular de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas (FCQB) de la Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro) en Chilpancingo, Gro., y en el Laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, ubicado en Cuernavaca, Morelos.

Bajo la dirección de

Dr. Marco Antonio Leyva Vázquez

La Co-dirección de

Dra. Olga Lilia Garibay Cerdenares

La asesoría de

Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara

Dra. Luz del Carmen Alarcón Romero

Dr. Oscar del Moral Hernández

Esta investigación se desarrolló bajo un Convenio General entre el IECan “Dr. Arturo Beltrán Ortega” y el Laboratorio de Biomedicina Molecular.

Durante el periodo en que cursó la Maestría en Ciencias Biomédicas, la C. Gloria Angelina Herrera Quiterio recibió la beca (No. 602916) del 01 de septiembre de 2016 al 31 de agosto de 2018 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) a los programas del Padrón Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC).

Formando además parte del “Programa de Incorporación de Mujeres Indígenas para el Fortalecimiento Regional del Estado de Guerrero” perteneciente al CONACyT y coordinado por la UAGro, convocatoria 20016.

Dedicatoria

A Dios la fuente de todo, el Dios de mi vida, por mostrarme su amor cada día y mantenerme en este camino. Creo en ti y en ti, mi Fe se fortalece.

A mis padres Gloria e Hipólito porque su amor es el motor de mi vida, todos mis esfuerzos y logros son para ustedes. Gracias por su apoyo incondicional para seguir cumpliendo mis sueños y metas, por siempre creer y confiar en mí. Los amo. Dios los bendiga.

A mi mejor amigo, mi novio, mi prometido, Alan el amor de mi vida, este logro también es tuyo. Gracias por caminar a mi lado durante este proyecto y por ser el mejor compañero, tu amor, comprensión y apoyo han sido fundamentales en mi vida. Te amo.

A mis hermanas Xochitl, Magui y Yesenia por siempre estar de manera incondicional y por ser las mejores amigas, las amo.

A mis sobrinos Polito, Tomi y Jose Manuel porque con su alegría y cariño me han fortalecido y alentado durante este trayecto, soy la tía más feliz.

A toda mi familia por siempre manifestarme su cariño.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Marco Antonio Leyva, gracias por abrir las puertas de su laboratorio y permitirme formar parte de su grupo de trabajo, por la confianza y todo el apoyo proporcionado para la realización de este proyecto que ha sido fundamental, mi agradecimiento siempre. Dios lo bendiga.

A la Dra. Olga Garibay, mi agradecimiento infinito por elegirme para desarrollar este proyecto importante y especial para usted, que rápidamente se convirtió en un proyecto importante y especial para mí, gracias por confiar en mí desde el primer momento y cuidar cada detalle de este proyecto. Trabajar con usted ha sido una gran experiencia que me ha permitido crecer y aprender de usted. Pero sobre todo un agradecimiento especial por su calidez, por su trato sencillo y por ser siempre comprensible y apoyarme en cada etapa del proyecto. Mi cariño, respeto y admiración en gran medida. Que Dios la bendiga.

Al Dr. Sergio Manuel Encarnación, gracias por abrimme las puertas de su laboratorio y permitirme trabajar en el, por el tiempo invertido para hablar sobre el proyecto y porque a pesar de sus actividades siempre dedico tiempo para escucharme, hablar conmigo y resolver mis dudas. Un hombre sencillo y excelente profesional, mi admiración y respeto siempre.

A la Dra. Luz del Carmen Alarcón, gracias por ser mi tutora durante esta etapa de mi formación académica y parte de mi comité de sinodales, por el tiempo y esfuerzo invertido para la culminación de este proyecto, por sus aportaciones que han enriquecido el trabajo, y por supuesto, un agradecimiento muy especial por su apoyo constante y la confianza que me ha brindado para realizar mis proyectos académicos, porque a pesar de sus actividades siempre me dedico un espacio que me permitió crecer y trabajar en mis propuestas. La quiero y admiro mucho.

Al Dr. Oscar del Moral, gracias por sus aportaciones y comentarios siempre acertados que han enriquecido este trabajo. Gracias por sus enseñanzas en el salón de clases y el impacto positivo que ha tenido en mi formación profesional, mi respeto y admiración.

A la Dra. Eugenia Flores, mi maestra de seminario, sin duda trabajar con usted ha sido una grata experiencia y me ha permitido aprender y crecer, gracias por preocuparse y ocuparse de mi proyecto, su apoyo a sido fundamental para la culminación de este trabajo, pero sobre todo gracias por siempre ayudarme y brindarme su confianza, mi admiración y respeto siempre.

A la maestra Magda, gracias por su apoyo desde el primer día que llegué al Laboratorio de Proteómica, por sus aportaciones y esfuerzo para para sacar adelante el trabajo, por el tiempo y dedicación para instruirme en cada experimento. Gracias por su calidez, por permitirme conocer a la extraordinaria mujer que es, por hacerme sentir como en casa, mi cariño y agradecimiento por siempre.

Al Lic. En Biol. Gabriel Martínez, gracias por todo su apoyo durante mi estancia en el Laboratorio de Proteómica, por su paciencia y disponibilidad para ayudar siempre, por los días de trabajo extra, por sus acertadas aportaciones al proyecto. Por la confianza brindada y hacer mi estancia en el laboratorio más amena y agradable, mi agradecimiento por siempre.

Al Dr. Marco Antonio Jiménez por las facilidades otorgadas para la realización de este proyecto, por sus comentarios y sugerencias siempre acertados.

A la Maestra Mónica Saavedra, gracias por su valioso apoyo y colaboración, por proporcionarnos los medios para la realización de este proyecto.

A todo el equipo del IECAN, médicos cirujanos, patólogos, enfermeras y enfermeros, a los encargados de archivo clínico, a la **maestra Sacnité** y a la **química Monse**, por siempre estar dispuestos a ayudar y a transmitir sus conocimientos, por la paciencia y todo el apoyo brindado en cada toma de muestra, su colaboración fue fundamental para el desarrollo de este proyecto.

Al Lic. En Matemáticas Saúl Salinas, gracias por su colaboración en el análisis estadístico de este proyecto, por su paciencia y dedicación.

A mis profesores de la maestría: **La Dra. Berenice Illades, la Dra. Mónica Espinoza, el Dr. Daniel Hernández y el Dr. Eduardo Castañeda** por el impacto positivo en mi formación durante el posgrado, son excelentes profesores.

A la Química Naty, gracias por su compromiso y profesionalismo, gracias por el apoyo técnico, por siempre tener una forma de ayudar, por su paciencia y amistad.

Al Químico Josué, gracias, por su valioso apoyo para continuar o terminar los experimentos, por siempre estar dispuesto a ayudar, por su amistad.

A la Dra. Ana Zacapala y al Dr. Miguel Mendoza, gracias por su apoyo en este proyecto.

Al MC. Hugo, gracias por siempre estar dispuesto a ayudar y colaborar y por tu apoyo para resolver dudas técnicas durante la realización de este proyecto.

A mis compañeros del proyecto de cáncer de Ovario: **Blanca y Memo**, por todo lo que hemos compartido y aprendido juntos.

A mis amigos de la maestría: **Tans, Laura, Leylani y Oscar**, por los momentos compartidos, por todas las risas, los cumpleaños festejados y todo lo que hemos aprendido juntos, por hacer más ameno este trayecto. Les deseo éxito en todo lo que emprendan.

A la abuelita Trini, gracias por recibirme en su casa durante todos estos años, por hacerme sentir en familia, por siempre estar dispuesta a compartir, por su generosidad, por la bellas platicas y por sus sabios consejos, mi respeto y cariño hacia usted siempre. Dios la bendiga.

A Brenda (Chulo), gracias por ser como eres, una jovencita compartida, por tu solidaridad siempre, por ser mi compañera de desvelos y siempre animarme, por tu bella amistad, eres una niña increíble, sigue así y llegarás muy lejos. Dios bendiga tu camino, te quiero mucho.

Mi agradecimiento con todas las personas que de una u otra forma aportaron conocimiento y apoyo para la realización de este proyecto.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	9
II.	ABSTRACT.....	10
III.	INTRODUCCIÓN.....	11
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
V.	RESULTADOS.....	20
VI.	DISCUSIÓN	46
VII.	CONCLUSIONES.....	51
VIII.	REFERENCIAS.....	52

I. RESUMEN

Los agentes de platino y taxanos son la quimioterapia estándar para tratar el cáncer epitelial de ovario desde hace más de 30 años, sin embargo, 70% de las pacientes presentan resistencia a estos medicamentos. En un esfuerzo por identificar las vías celulares y las proteínas específicas que favorecen la quimiorresistencia a carboplatino y paclitaxel en las neoplasias ováricas, a través de un enfoque proteómico basado en cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas se analizó la expresión de proteínas en tejidos de pacientes con cáncer epitelial de ovario quimiorresistentes a carboplatino y paclitaxel en comparación con tejidos de ovario libres de cáncer y con cáncer epitelial de ovario de pacientes que no fueron sometidas a tratamiento y la probable relación entre las proteínas diferencialmente expresadas con la quimiorresistencia. Se encontraron perfiles de expresión diferencial en proteínas con actividad de transporte entre las pacientes que no recibieron quimioterapia antes de la cirugía en comparación con las pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante que no mostraron sobreexpresión de proteínas con esta función. También se observaron diferencias en proteínas con actividad catalítica como oxidorreductasas: citocromo C1 y citocromo oxidasa, en la paciente con quimioterapia adyuvante. Mientras que en las pacientes con quimioterapia neoadyuvante predominaron las proteínas de unión a receptores, como galectina 1, S100A7, factor de crecimiento derivado de hepatoma y la proteína 2 relacionada con el factor de crecimiento derivado de hepatoma. En las pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante la quimiorresistencia podría ser consecuencia de la disminución en la expresión de proteínas transportadoras que permitan el ingreso del platino a las células tumorales o por la activación de vías de proliferación a través de las proteínas de unión a receptores. Por otro lado las proteínas citocromo C1 y citocromo oxidasa pueden estar favoreciendo la quimiorresistencia intrínseca en la paciente que recibió quimioterapia adyuvante. La expresión diferencial sugiere que los mecanismos moleculares de quimiorresistencia son distintos de acuerdo con la administración de quimioterapia neoadyuvante versus adyuvante, por lo que es necesario evaluar los patrones proteicos que se presentan antes y después de la administración sistémica de los quimioterapéuticos en una población mayor.

Palabras clave: cáncer epitelial de ovario, carboplatino, paclitaxel, quimiorresistencia, proteómica, LC-MS/MS.

II. ABSTRACT

The agents of platinum and taxanes are the standard chemotherapy to treat ovarian epithelial cancer for more than 30 years, however, 70% of patients have resistance to these medications. In an effort to identify the cellular pathways and specific proteins that favor the chemoresistance to carboplatin and paclitaxel in ovarian neoplasms in this investigation through a Proteomics approach based on liquid chromatography coupled to mass spectrometry, protein expression was analyzed in tissues of patients with epithelial ovarian cancer chemo-resistant to carboplatin and paclitaxel in comparison with ovarian tissues free of cancer and with ovarian carcinomas from patients who were not subjected to treatment and the probable relationship between differentially expressed proteins with chemoresistance. Differential expression profiles were found in proteins with transport activity among patients who did not receive chemotherapy before surgery compared to patients who received neoadjuvant chemotherapy who did not show overexpression of proteins with this function. Differences were also observed in proteins with catalytic activity such as oxidoreductases: cytochrome C1 and cytochrome oxidase, in the patient with adjuvant chemotherapy. While in patients with neoadjuvant chemotherapy, receptor binding proteins predominated, such as galectin 1, S100A7, growth factor derived from hepatoma and protein 2 related to hepatoma-derived growth factor. In the patients who received neoadjuvant chemotherapy, chemoresistance could be a consequence of the decrease in the expression of transport proteins that allow the entry of platinum to tumor cells or by the activation of proliferation pathways through receptor binding proteins. On the other hand, the cytochrome C1 and cytochrome oxidase proteins may be favoring the intrinsic chemoresistance in the patient who received adjuvant chemotherapy. The differential expression suggests that the molecular mechanisms of chemoresistance are different according to the administration of neoadjuvant versus adjuvant chemotherapy, so it is necessary to evaluate the protein patterns that occur before and after the systemic administration of chemotherapeutics in a larger population.

Key words: epithelial ovarian cancer, carboplatin, paclitaxel, chemoresistance, proteomics, LC-MS/MS.

III. INTRODUCCIÓN

El cáncer epitelial de ovario (CEO) es el más frecuente de las neoplasias ováricas con 90% de los casos y la principal causa de muerte por neoplasias ginecológicas a nivel mundial (IARC, 2012; Ferlay *et al.*; 2015). Esto se debe principalmente al diagnóstico en etapas avanzadas (Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia [FIGO] III y IV), es decir cuando el cáncer se ha diseminado más allá de los ovarios y ha alcanzado órganos abdominales adyacentes o fuera de la cavidad abdominal (Bast 2009). El diagnóstico tardío es consecuencia de la falta de pruebas de tamizaje que permitan la detección temprana, debido a que la mayoría de los biomarcadores propuestos carecen de una buena especificidad y valor predictivo positivo para la enfermedad en estadio temprano (Taylor *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2011).

El CEO en estadio I es curable en el 90% de los casos, mientras que la supervivencia a 5 años para los estadios avanzados, es inferior al 21% (Heintz *et al.*, 2006; Siegel *et al.*, 2016). El tratamiento estándar del CEO es la citorreducción completa seguida de la administración de quimioterapia adyuvante es decir que los medicamentos se administran posteriormente de haberse realizado la cirugía primaria, este régimen de quimioterapia se basa en la combinación de cisplatino o carboplatino y taxanos principalmente paclitaxel (Agarwal y Kaye 2003; Marth *et al.*, 2017). El platino es un agente alquilante que se une covalentemente a las purinas del DNA formando intracadenas que interfieren con los mecanismos de reparación de daño al DNA (Dasari y Tchounwou 2014; Johnstone 2015), mientras que el paclitaxel se une de forma no covalente a los microtúbulos afectando la estabilidad y la formación del uso mitótico provocando el arresto de las células en la fase G2 y evita su paso a la fase M, por lo cual inducen apoptosis (Parness y Horwitz 1981).

Una variación del tratamiento estándar es administrar agentes de platino y taxanos como quimioterapia neoadyuvante, es decir, antes de realizar cirugía primaria, seguido de una cirugía de intervalo. Este régimen es aplicado en pacientes con tumores que no pueden ser removidos debido a su gran tamaño, el objetivo de este esquema de quimioterapia es reducir el tamaño del tumor y posteriormente realizar una cirugía menos invasiva (Manher *et al.*, 2016).

Las pacientes tratadas con quimioterapia adyuvante tienen una respuesta inicial favorable durante su tratamiento primario, sin embargo, la mayoría de las pacientes en etapas III-IV presentan recaída dentro de los primeros 6 y 12 meses después del último ciclo de tratamiento, a esta respuesta se le conoce como quimiorresistencia (Davis *et al.*, 2014). La quimiorresistencia representa el principal obstáculo para mejorar la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia general en las pacientes con CEO, ya que la enfermedad recurrente no es curable (Galluzzi *et al.*, 2012).

Se desconoce la base molecular de la resistencia al platino, diversos estudios han reportado que es de naturaleza multifactorial y numerosos mecanismos parecen estar involucrados. Muchas células quimiorresistentes muestran un fenotipo pleomórfico, es decir, presentan alteración en diversas vías de señalización celular que implican disminución en la absorción de platino, aumento en el eflujo de los medicamentos, tolerancia o reparación del daño al DNA y resistencia a la apoptosis (Kelland, 2007; Zheng, 2017).

Se ha propuesto que la resistencia a los agentes de platino y taxanos puede ser propia de las células tumorales (resistencia intrínseca) o desarrollarse por exposición a los fármacos quimioterapéuticos (resistencia extrínseca o adquirida) (Stewart, 2007; Lippert, 2008).

La resistencia intrínseca se refiere a la capacidad de las células cancerosas para no responder al tratamiento desde el inicio de la quimioterapia (Stewart, 2007; Liu *et al.*, 2012) y se asocia con los mecanismos de supervivencia que desarrollan las células tumorales independiente de la quimioterapia, por ejemplo, el aumento en la expresión de proteínas antioxidantes necesarias para reducir el estrés oxidativo, estas proteínas tienen afinidad por el platino y al unirse al medicamento evitan que llegue a su sitio blanco (Liu *et al.*, 2012).

La resistencia adquirida se atribuye a alteraciones genéticas y epigenéticas que se producen como consecuencia de la exposición a los fármacos quimioterapéuticos, los cuales alteran la síntesis de DNA, inducen daño al DNA e impiden la despolimerización de microtúbulos, estos efectos pueden ser tolerados por la célula, evitando la activación de

las vías de apoptosis y adquiriendo un fenotipo más agresivo y quimiorresistente (Liu *et al.*, 2012).

Recientemente se han reportado biomoléculas y agentes potenciadores de citotoxicidad implicados en la quimiorresistencia intrínseca o adquirida a platino y paclitaxel y otros fármacos de segunda línea en cáncer de ovario y otros tipos de cáncer. Estos trabajos han sido desarrollados en líneas celulares tumorales, sin embargo, estos modelos no representan en su totalidad las complejas interacciones entre los tumores y su ambiente. Por lo antes expuesto, esta investigación tiene como propósito analizar la expresión diferencial de proteínas, a través del análisis masivo de proteínas mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS) en tejidos de pacientes con CEO quimiorresistentes en comparación con tejidos de CEO que no han sido sometidos a quimioterapia y tejidos de ovario libres de cáncer (OLC) y analizar la relación entre las proteínas diferencialmente expresadas con su función biológica y su probable participación en la quimiorresistencia.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Ética, consentimiento informado y captación de muestras

El estudio fue aprobado por la Subdirección de Enseñanza e Investigación del Instituto Estatal de Cancerología “Dr. Arturo Beltrán Ortega” (IECan) de Acapulco, Gro. (FO-INV-AUT-04/2017). Se incluyeron en el estudio nueve tejidos, cinco corresponden a pacientes diagnosticadas con cáncer epitelial de ovario (CEO) y cuatro a pacientes con ovarios libres de cáncer (OLC). Las características del tratamiento con quimioterapia administrado a las pacientes son las siguientes: dos pacientes con CEO recibieron quimioterapia neoadyuvante que se refiere a la administración de fármacos antineoplásicos antes de ser intervenidas quirúrgicamente con el objetivo de disminuir la carga tumoral y poder realizar la citorreducción, una paciente con CEO recibió quimioterapia adyuvante esta se administró por vez primera posterior a la cirugía citorreductora y dos pacientes con diagnóstico de CEO que al momento de la cirugía no habían recibido tratamiento con quimioterapia y posterior a la cirugía no recibieron tratamiento por fallecimiento.

Las muestras que se incluyeron en el estudio permitieron comparar tres perfiles de expresión de proteínas de acuerdo con el momento de la administración de quimioterapia:

- 1) Perfil de expresión de proteínas en células tumorales sin exposición a fármacos, se refiere a las pacientes que al momento de la toma de muestra no habían recibido tratamiento con quimioterapia: muestras CEO2-SinQT, CEO4-SinQT y CEO11-QTad, esta última muestra corresponde a una paciente que posterior a la cirugía recibió quimioterapia con carboplatino y paclitaxel.
- 2) Perfil de expresión de proteínas en células tumorales posterior a la exposición a fármaco, se refiere a las pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante: muestras CEO6-QTneo y CEO7-QTneo, que se analizaron como un pool que se identifica con el folio CEO67-QTneo.
- 3) Perfil de expresión basal de ovario libre de cáncer: OLC1, OLC2, OLC3 y OLC4.

Se excluyeron las pacientes que habían sido tratadas con cirugía preventiva: como histerectomía simple o salpingo-oferectomía unilateral. Los tejidos de OLC fueron obtenidos de pacientes que recibieron histerectomía radical debido a la presencia de

cáncer cervical, pero que los ovarios no presentaron alteraciones aparentes corroboradas por diagnóstico histopatológico. Las pacientes que aceptaron participar en el estudio lo hicieron con base en el Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud, basado en la declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial y firmaron consentimiento informado. Los nombres de las pacientes y números de expediente se mantuvieron confidenciales y se asignaron folios exclusivos del Laboratorio de Biomedicina Molecular (LBM) de la Facultad de Ciencias Químico Biológicas.

Se obtuvieron muestras de tejidos de 2g aproximadamente y se preservaron en amortiguador de fosfato salino (PBS) 1X estéril y fueron almacenados a -70°C hasta su procesamiento. Una biopsia adicional de la misma zona fue enviada al Departamento de Patología del IECAN para el diagnóstico histopatológico del tumor.

Procesamiento de las muestras

Lisis celular

Los tejidos fueron descongelados y lavados 3 veces con PBS 1X estéril, se retiró el PBS y los tejidos fueron macerados en morteros de porcelana con 1 mL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 5 mM, EDTA 2 mM y Nonidet P-40 al 1%, 200 μL de coctel de inhibidores de proteasas (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) que incluye AEBSF 2 mM, aprotinina 0.3 μM , bestatina 116 μM , E-64 14 μM , leupeptina 1 μM y EDTA 1 mM. El lisado se incubó 30 minutos en hielo. Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos a 4°C , se colectó el sobrenadante y se etiquetó como extracto total (ET).

Cuantificación de proteínas

Las muestras se cuantificaron mediante el método de Bradford modificado (Bradford 1976). El reactivo de Bradford concentrado se diluyó en una proporción 1:4 con agua destilada. Se preparó una solución ácida con 10 μL de HCl 0.12 N más 1 mL de agua. En un tubo eppendorf se colocaron 36 μL de la solución ácida más 4 μL de la muestra de proteínas previamente solubilizada en el amortiguador tributilfosfina (TBP) y se adicionó 1.4 mL del reactivo de Bradford previamente diluido, se homogenizó y se realizó lectura de la absorbancia a 595 nm.

Electroforesis unidimensional

Los extractos de proteínas fueron sometidos a SDS-PAGE al 12 % de acuerdo al protocolo descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). El corrimiento se realizó a 30 mA durante 1 hora aproximadamente.

Eliminación de albúmina e IgG

Los extractos de proteínas totales de los tejidos de CEO y OLC fueron sometidos a eliminación de albúmina e IgG (1.5 mg de proteína de cada muestra), usando el Pierce Albumin/IgG Removal Kit (Thermo Fisher No. Cat. 89875) como indican las instrucciones del fabricante. Después de la eliminación se recuperó de 53.55 μg – 108 μg de proteína total.

Preparación de muestras para el análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

El análisis por espectrometría de masas se realizó en el Laboratorio del Dr. Sergio Manuel Encarnación Guevara, Jefe del Departamento de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM, con el apoyo técnico de la M en C. Magdalena Hernández Ortiz y el Lic. En Biología Ángel Gabriel Batallar.

Posterior a la eliminación de proteínas abundantes se tomó del extracto proteico el equivalente a 16.5 μg de proteína para el análisis por LC-MS/MS. Se precipitaron las proteínas adicionando nueve volúmenes de etanol frío e incubando a -20 °C toda la noche. El precipitado se lavó tres veces con etanol al 90%. El precipitado resultante se resuspendió en 50 μL de Tris pH 8.8, una vez disueltas las proteínas se llevó a cabo la reducción con ditioneitol (DTT) a una concentración final de 100 mM, se incubó a 40°C durante 30 minutos, seguido de la alquilación con iodoacetamida a una concentración final de 200 mM, se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. El exceso de DTT y iodoacetamida se eliminaron con un paso de precipitación con etanol descrito anteriormente. Las proteínas modificadas se solubilizaron en una solución que bicarbonato de amonio 50 mM y deoxicolato 0.5% y se agregó 1 μg de tripsina porcina modificada

grado pureza secuenciación, la digestión se llevó a cabo a 37°C durante 16 horas. Se realizó la extracción del detergente con acetato de etilo y ácido trifluoro-acético (TFA por sus siglas en inglés) a una concentración final de 0.5 % y se agitó vigorosamente. Se centrifugó y eliminó la fase orgánica, se repitió el mismo procedimiento una vez más (sin añadir TFA), finalmente los péptidos fueron secados en *speed vac* y se almacenaron a -80 °C hasta el momento de su análisis por LC-MS/MS.

Análisis por LC-MS/MS

El análisis por LC-MS/MS se realizó en un sistema nano UPLC Dionex Ultimate 3000 RSLC acoplado en línea con un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer de Thermo Fisher Scientific. Las muestras fueron atrapadas en una precolumna (Magic AQ C18; 3 μm -200 Å; 2 cm x 100 μm ID) y posteriormente fueron separadas en un gradiente de elución de 250 minutos empleando una columna capilar (Easy spray column 15 cm x 75 μm de diámetro interno, pepmap RSLC C18, 3 μm). El flujo de trabajo fue de 250 nL/min y la fase móvil estuvo formado por las soluciones: A) 0.1 % ácido fórmico en agua y B) 0.1% ácido fórmico en una mezcla 80:20 (v:v) acetonitrilo:agua. Los péptidos a medida que van saliendo de la cromatografía son analizados en el espectrómetro de masas que opera en modo positivo y con adquisición dependiente de datos (ADD) en un rango de masas completo de 300 - 2,000 Th. Las 10 señales más intensas con estados de carga dos o superiores fueron seleccionadas en el cuadrupolo y fragmentadas con el método HCD a una energía de colisión normalizada (ECN) del 27%. Los iones precursores se analizaron a una resolución de 70,000 (a 200 m/z) y los iones fragmentados se detectaron con 17 500 de resolución. La ventana de selección de los precursores es de dos Th.

Identificación/cuantificación de péptidos/proteínas y análisis bioinformático

El análisis de identificación y cuantificación relativa de péptidos y proteínas a partir de los espectros de masas generados fueron analizados en el Software MaxQuant V 1.6.0.16. Para la búsqueda se fijó la enzima de corte como Arg-C y todos los residuos de cisteína como carbamidometil-cisteína. Como modificaciones variables se incluyó fosforilación de

residuos de serina, treonina y tirosina y oxidación en metionina. Las proteínas se identificaron con una tasa de descubrimiento falso del 0.1% empleando la estrategia “targeted decoy”, que se incluye en el programa MaxQuant. La base de datos de secuencia de proteínas que se usó como referencia es la reportada en el repositorio UniProt (www.uniprot.org/) para el proteoma humano como identificador UP000005640, liberada el 30 de abril de 2016. El análisis cuantitativo se realizó mediante la estrategia libre de marcaje (label-free), son consideradas aquellas proteínas con al menos dos péptidos en la categoría de “razor-unique”, que hayan sido identificados por MS/MS.

Análisis de la calidad de las secuencias

El análisis manual consistió de los siguientes de criterios:

- Se cotejó que el código Uniprot coincidiera con el nombre de la proteína.
- Se eliminaron los códigos Uniprot que correspondían a proteínas identificadas con un péptido.
- Se eliminaron los códigos que correspondían a proteínas abundantes del plasma como albúmina sérica humana (ASH) e inmunoglobulinas.
- Se eliminaron códigos obsoletos, códigos no caracterizados y códigos que ya han sido eliminados por Uniprot debido a que pertenecían a marcos de lectura abiertos o pseudogenes.
- Se identificaron los códigos de isoformas, estos se caracterizan por tener un guión (-) seguido de un número que indica el número de isoforma, sin embargo, los códigos con estas características no son reconocidos en otras bases de datos en las que se realizan análisis bioinformáticos.
- Se revisó la entrada de cada código en Uniprot para conocer si correspondían a proteínas revisadas (registros anotados manualmente con información extraída de la literatura y análisis computacional especializado) o proteínas no revisadas (registros analizados computacionalmente que esperan la anotación manual completa).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de conglomerados jerárquico con el objetivo agrupar las proteínas de acuerdo a patrones similares de expresión. Para realizar dicho análisis primero fueron estandarizados los valores de la cuantificación libre de marcaje (LFQ) obtenidos para cada proteína en MaxQuant, estos valores estandarizados son llamados valores Z (*Z score*) y se obtuvieron aplicando la siguiente fórmula:

$$Z = \frac{x - \mu}{\sigma}$$

z: Valor estandarizado o *Z score*
x: media de la LFQ para cada proteína
 μ : Valor x o valor de interés
 σ : desviación estándar de las proteínas

El valor Z es igual a la media de la LFQ de cada proteína menos el valor X, dividido entre la desviación estándar.

Los valores Z obtenidos van de +4 a -4. Los resultados del conglomerado jerárquico se representan con un mapa de calor en el cual la intensidad de la expresión se mide con los valores Z comparados con la media obtenida de las cinco muestras analizadas para cada una de las proteínas, por lo que los matices de rojo indican alto nivel de expresión (+1 a +4) y las variaciones en los matices de verde indican bajo nivel de expresión (-1 a -4). El análisis estadístico se llevó a cabo con el Software RStudio V.1.1.383.

Análisis de enriquecimiento de vías

Las proteínas identificadas por LC-MS/MS y que de acuerdo al análisis estadístico fueron diferencialmente expresadas, se analizaron a partir de su código de identificación en UNIPROT (www.uniprot.org) en bases de datos como: Reactome (<http://www.reactome.org/>), Gene Ontology (<http://geneontology.org/>), Panther (<http://pantherdb.org/>), The human Protein Atlas (<http://www.proteinatlas.org/>) para detallar su función, la posible interacción con otras proteínas y su papel en la quimiorresistencia.

V. RESULTADOS

Tejidos biológicos

Los tejidos de CEO y OLC fueron obtenidos durante el periodo de agosto a diciembre de 2017. Se incluyeron en el estudio cinco tejidos de CEO que se clasificaron en tres grupos de acuerdo con la administración de quimioterapia: CEO con quimioterapia neoadyuvante, que se refiere a la administración de fármacos antineoplásicos antes de intervenir quirúrgicamente a las pacientes, estas pacientes se identifican con la etiqueta QT-neo (2/5), CEO con quimioterapia adyuvante la cual se administra posterior a la cirugía primaria y se identifican con la etiqueta QTad (1/5) y CEO sin tratamiento con quimioterapia y su etiqueta es SinQT (2/5).

Se incluyeron cuatro tejidos de OLC que fueron utilizados como controles de expresión basal para realizar la comparación del perfil de proteínas de cada condición. Los datos clínicos de las pacientes que se asocian al desarrollo del cáncer de ovario se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características clínicas que se asocian con el desarrollo de cáncer epitelial de ovario.

Grupo de pacientes	Folio	Edad (años)	Edad de la menarca (años)	Edad de la menopausia (años)	No. de gestas	Diagnóstico histológico
Pacientes con quimioterapia neoadyuvante (QT + cirugía + QT)	CEO6-QTneo *	32	11	NA	4	Adenocarcinoma seroso papilar
	CEO7-QTneo *	64	11	49	14	Adenocarcinoma seroso papilar
Paciente con quimioterapia adyuvante (Cirugía + QT)	CEO11-QTad	47	12	49	3	Adenocarcinoma endometriode
Pacientes con CEO sin recibir QT	CEO2- SinQT	54	14	47	2	Adenocarcinoma seroso papilar
	CEO4- SinQT	63	15	38	12	Adenocarcinoma seroso papilar
Pacientes libres de cáncer de ovario	OLC1	40	12	NA	7	Ovario libre de cáncer
	OLC2	56	13	45	8	
	OLC3	45	14	44	3	
	OLC4	72	14	54	14	

QT: quimioterapia, QTneo: quimioterapia neoadyuvante, QTad: quimioterapia adyuvante, SinQT: sin quimioterapia, *: Tejidos analizados como un pool que se identifica con el código CEO67-QTneo, NA: No aplica.

El tipo histológico de los carcinomas ováricos se determinó en el Departamento de Patología del IECan. Los tejidos captados fueron incluidos en parafina, se obtuvieron cortes de 10 micras y se realizó tinción con hematoxilina-eosina (H&E), para observar la estructura, composición y características de los tejidos. En la Figura 1A se observa la estructura normal del epitelio cúbico simple que recubre la superficie de los ovarios, su crecimiento en monocapa y se observa polaridad celular, en la Figura 1B se observan las células foliculares en crecimiento en un ovario libre de cáncer. Los tejidos de CEO corresponden a los tipos histológicos: seroso papilar (4/5) (Figura 1C) y endometriode (1/5) (Figura 1 D).

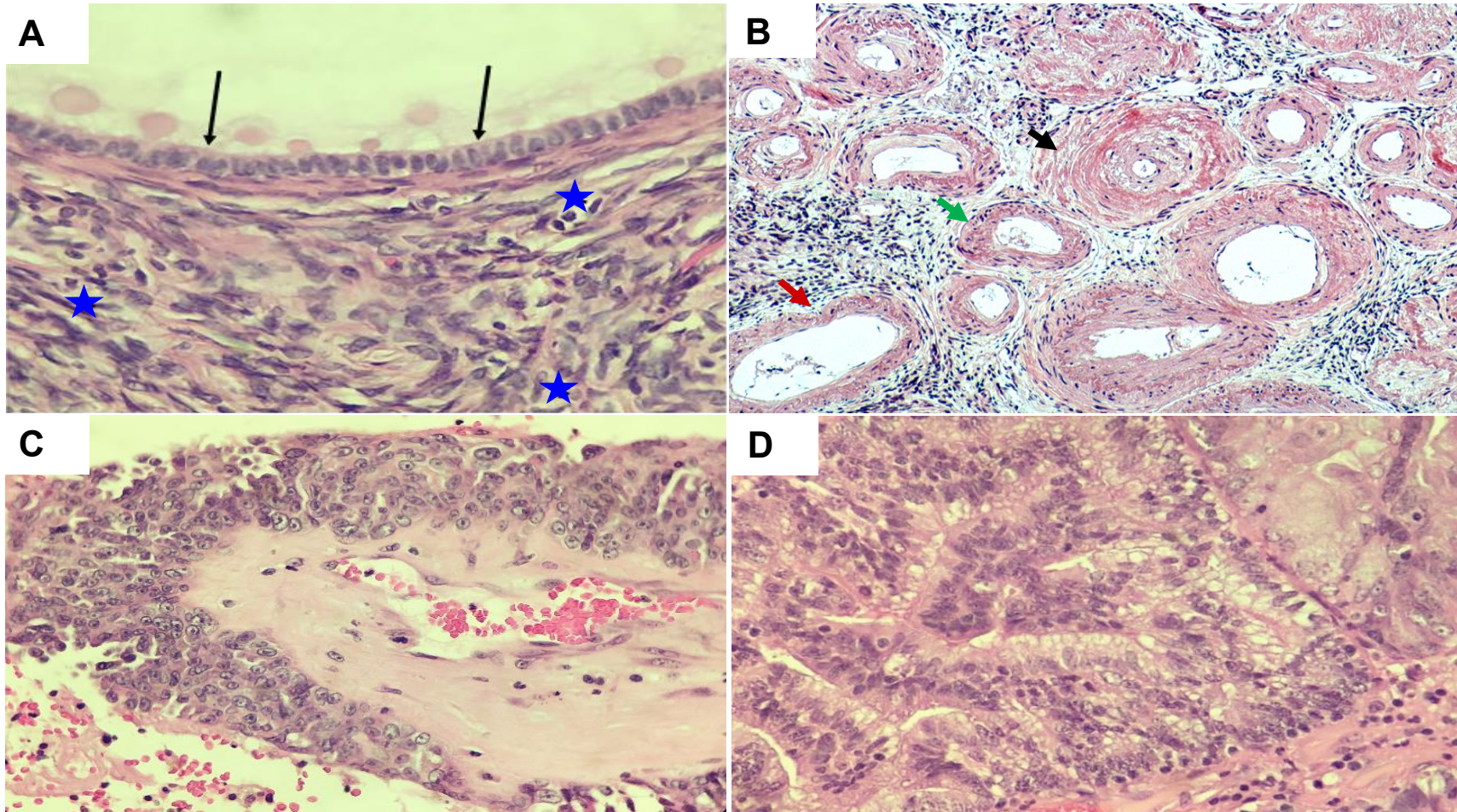


Figura 1. Diagnóstico histopatológico diferencial de CEO y OLC. A) Tejido de ovario libre de cáncer, las flechas señalan la capa de epitelio cúbico simple que recubre la superficie de los ovarios, las estrellas señalan el estroma ovárico, 100X, **B)** Células foliculares de un ovario libre de cáncer, la flecha roja señala un folículo primordial, la flecha verde señala un folículo secundario y la flecha negra indica un folículo antral, 40X, **C)** Carcinoma seroso papilar de alto grado, se observa papila con identificable infiltración al estroma, pérdida de la polaridad celular, crecimiento celular descontrolado, aumento en el tamaño y número de núcleos, 100X. **D)** CEO de tipo endometriode, se observan glándulas adosadas y bordes luminales lisos, 40X. Técnica de tinción: hematoxilina-eosina.

Respuesta a la quimioterapia con carboplatino y paclitaxel

La respuesta a los antineoplásicos en las pacientes con diagnóstico de CEO que recibieron quimioterapia con carboplatino y paclitaxel fue evaluada de acuerdo con la disminución de los niveles séricos de la glicoproteína CA125 y la disminución o ausencia de enfermedad residual mediante tomografía axial computarizada (TAC) en pelvis o resonancia magnética nuclear (RMN).

Las pacientes se clasificaron en tres categorías; en la primera categoría se encuentran las pacientes identificadas con el folio CEO6-QTneo y CEO7-QTneo ambas con diagnóstico de CEO de tipo histológico seroso papilar y etapa clínica IIIC, las pacientes recibieron nueve ciclos de quimioterapia neoadyuvante con carboplatino en una dosis de 450 mg/m² y paclitaxel de 210 mg/m². La respuesta al tratamiento no fue favorable, al finalizar el noveno ciclo de quimioterapia la paciente CEO6-QTneo mantenía niveles séricos de la glicoproteína CA125 de 739.0 U/L y 107.0 U/L en la paciente CEO7-QTneo, ambas fueron catalogadas como resistentes a la quimioterapia, posteriormente fueron tratadas con cirugía citorreductora y se observó que la paciente CEO7-QTneo presentaba implantes en otros órganos de la cavidad abdominal. Debido a que las pacientes compartían las características clínico-patológicas y el esquema de tratamiento, estos tejidos fueron analizados como un pool con la finalidad de obtener la concentración de proteínas requerida para el análisis por LC-MS/MS y se identifican con el folio CEO67-QTneo.

En la segunda categoría se encuentra una paciente con el código de identificación CEO11-QTad y diagnóstico de CEO de histotipo endometriode, etapa clínica IIIC, que al momento de tomar la biopsia no había recibido ningún tipo de fármacos quimioterapéuticos. Fue sometida a cirugía citorreductora, se tomó la biopsia, se observó metástasis en ganglios linfáticos y recto, posterior a la cirugía le fue administrada quimioterapia adyuvante: un ciclo de carboplatino en una dosis de 450 mg/m² y paclitaxel en una dosis de 250 mg/m², seguido de ocho ciclos de carboplatino en una dosis de 450 mg/m² más ciclofosfamida (CFA) en una dosis de 1g, en el último ciclo de este régimen de quimioterapia se emitió el diagnóstico de resistencia a carboplatino, la paciente no mostró disminución de los niveles séricos de CA125 por el

contrario, hubo un aumento de 785.6 U/L al iniciar al quimioterapia a 850.0 U/L en el último ciclo de tratamiento y se diagnosticó metástasis en epiplón.

La tercera categoría corresponde a pacientes que fueron diagnosticadas histológicamente de primera vez con CEO, pero que no recibieron ningún tipo de tratamiento debido a fallecimiento y se identifican con el código CEO2-SinQT y CEO4-SinQT (Tabla 2).

Tabla 2. Perfil clínico de pacientes con CEO y su respuesta a la quimioterapia.

Respuesta a la quimioterapia	Folio	Tipo histológico	Etapa clínica	Ciclos de QT con CBP	Ciclos de QT con PT	CA125 (U/L)	
						Pre-QT	Post-QT
Resistentes a QT neoadyuvante (QT+ cirugía + QT)	CEO6-QT neo*	Cistadenocarcinoma endometrioide	IIIC	9 ciclos/450 mg/m ²	9 ciclos/210 mg/m ²	830.0	739.0
	CEO7-QT neo*	Seroso papilar	IIIC	9 ciclos/450 mg/m ²	9 ciclos/210 mg/m ²	1641.0	107.0
Resistentes a QT adyuvante (Cirugía + QT)	CEO11-QT ad	Endometrioide	IIIC	9 ciclos/450 mg/m ²	2 ciclos/210 mg/m ² + 7ciclos de CFA 1g	785.6	850.0
	CEO2-SinQT	Seroso papilar	IIIC	NA	NA	527.1	527.0
Pacientes con CEO sin recibir QT	CEO4- SinQT	Seroso papilar	IIIC	NA	NA	345.2	345.2

CEO: cáncer epitelial de ovario, QT: quimioterapia, QTneo: quimioterapia neoadyuvante, QTad: quimioterapia adyuvante, SinQT: sin quimioterapia, CBP: carboplatino, PT: paclitaxel, Pre-QT: previo a la quimioterapia, Post-QT: posterior a la quimioterapia NA: No aplica, *: Tejidos analizados como un pool que se identifica con el código CEO67-QTneo.

Identificación y cuantificación de proteínas por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

Para analizar el perfil de expresión de proteínas en los nueve tejidos se realizó LC-MS/MS. Los espectros de masas generados por el Q-Exactive Plus Orbitrap Mass Spectrometer de Thermo Fisher Scientific fueron analizados en el Software MaxQuant V.1.6.0.16 y arrojó una lista de 3071 códigos Uniprot, estos datos fueron exportados a Excel para generar una base de datos que contiene los códigos Uniprot de cada proteína, número de péptidos con el cual fueron identificadas, el porcentaje de cobertura de los péptidos, la cuantificación libre de marcaje (LFQ por sus siglas en inglés) expresada como intensidad, nombre del gen que codifica para esa proteína, entre otros datos como se observa en la siguiente figura representativa (Figura 2).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
	Protein IDs	Protein names	Gene names	Number of proteins	Peptides	Peptides CEO11A	Peptides CEO11b	Peptides CEO11c	Razor + unique peptides CEO11A	Razor + unique peptides CEO11b	Razor + unique peptides CEO11c	Sequence coverage [%]	Unique + razor sequence coverage [%]	Mol. weight [kDa]	LFQ intensity CEO11A	LFQ intensity CEO11b	LFQ intensity CEO11c
1																	
2	AOA024QZX5	Serpin B6	SERPINB6	4	15	1	1	0	1	1	0	55	55	43.024	0	0	0
3	AOA024ROT9	Apolipoprotein C-II;Pro APOC2;APOC4-		5	2	0	0	0	0	0	0	29.7	29.7	11.284	0	0	0
4	AOA024R216	Hepatoma-derived grov HDGFRP3		2	3	1	2	2	0	0	0	19.7	7.4	22.619	0	0	0
5	AOA024R4E5	Vigilin	HDLBP	23	14	9	10	8	9	10	8	18.7	18.7	141.44	325660000	161250000	171120000
6	AOA024R4M1	40S ribosomal protein	RPS9	6	7	4	6	3	4	6	3	33	33	22.591	0	0	66099000
7	AOA024R571	EH domain-containing	EHD1	7	7	1	1	0	1	1	0	21.4	19.7	61.927	0	0	0
8	AOA024R7W	YTH domain-containing	YTHDF3;YTHDF1	8	2	0	1	2	0	1	2	4.3	4.3	58.311	0	6106300	0
9	AOA024RA52	Proteasome subunit alj	PSMA2	5	6	4	5	4	4	5	4	41	41	25.898	931050000	112540000	108490000
10	F5H796;AOA024R4E5	Diablo homolog, mitocl	DIABLO	11	4	2	1	0	2	1	0	56.1	56.1	17.785	0	0	0
11	AOA024RCR6	Large proline-rich prote	BAT3;BAG6	22	4	2	2	0	2	2	0	7.8	7.8	118.7	152750000	0	0
12	AOA087WV9	Dystrophin	DMD	17	13	0	0	0	0	0	0	4.2	3.7	426.09	0	0	0
13	K7ERP4;K7EK	Glutathione peroxidase	GPX4	11	3	0	0	0	0	0	0	28.4	28.4	17.629	0	0	0
14	AOA087WT2	Protein VAC14 homolog	VAC14	2	1	0	1	1	0	1	1	12.4	12.4	20.497	0	0	4184500
15	AOA087XOU3	Amino acid transporter	SLC1A3	4	1	1	0	0	1	0	0	4.7	4.7	47.099	0	0	0
16	AOA087WT9	Ester hydrolase C11orf	C11orf54	13	6	4	4	4	4	4	4	39.5	39.5	28.683	65697000	125400000	62890000
17	AOA087WTA	Collagen alpha-2(I) cha	COL1A2	2	5	2	3	1	2	3	1	5.2	5.2	129.15	200350000	0	0
18	AOA0G2JN83	Keratin-associated pro	KRTAP9-8;KRTA	13	1	0	0	0	0	0	0	9.1	9.1	16.253	0	0	0
19	AOA087WTB	Ubiquitin carboxyl-term	UCHL3	3	3	1	1	1	1	1	1	24.2	24.2	21.945	0	0	0
20	AOA087WTE	Inter-alpha-trypsin inh	ITIH2	4	20	7	5	4	7	5	4	36.2	36.2	106.66	967490000	140150000	116700000
21	AOA087WUY	Ankyrin-3	ANK3	14	2	2	1	0	2	1	0	4.2	4.2	90.258	0	5542000	0
22	AOA087WTH	Enolase-phosphatase E	ENOPH1	5	4	2	2	2	2	2	2	31.9	31.9	23.364	174010000	0	0

Figura 2. Base de datos en excel generada a partir de las salidas de MaxQuant. Se muestran algunas columnas con los datos crudos obtenidos en este software que identificó 3071 proteínas para las cuales indica su código de identificación en Uniprot, nombre de la proteína, número de péptidos con los que ha sido identificada cada proteína, porcentaje de cobertura de la secuencia, la cuantificación libre de etiqueta (LFQ por sus siglas en inglés), entre otros datos.

Análisis de la calidad de las secuencias

Los estudios de proteómica a gran escala generan grandes cantidades de datos que necesitan ser procesados de acuerdo a flujos o secuencias automatizadas y manual durante el análisis de la información obtenida, por ello a partir de las 3071 proteínas identificadas en el experimento, se realizó un análisis de calidad, con el objetivo de incluir en el estudio solo aquellas proteínas identificadas con al menos dos péptidos, verificar la vigencia de los códigos Uniprot (Figura 3), debido a que la base de datos de secuencia de proteínas que MaxQuant usó como referencia es la reportada en el repositorio UniProt (www.uniprot.org/) para el proteoma humano como identificador UP000005640, liberada el 30 de abril de 2016 y Uniprot es un repositorio que se encuentra en constante actualización de la información.

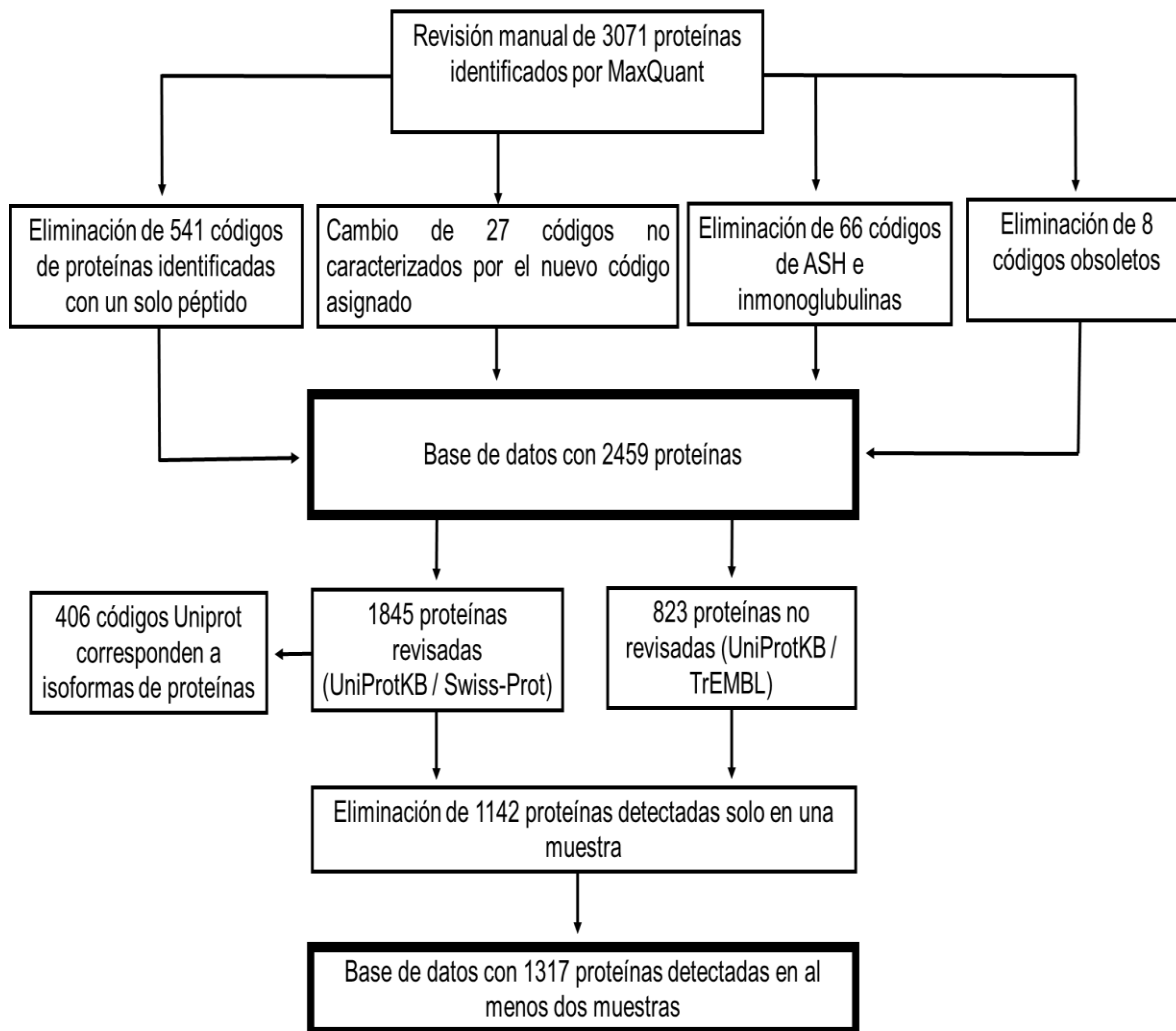


Figura 3. Estrategia de revisión manual de la calidad de las secuencias identificadas en MaxQuant.

Del análisis de la calidad de las secuencias se generaron dos listas de proteínas:

La primera lista de proteínas cuenta con 2459 códigos Uniprot y se obtuvo como resultado de la eliminación de 541 códigos correspondientes a proteínas identificadas con un péptido, 66 códigos que correspondieron a proteínas abundantes del plasma y 8 códigos obsoletos. De estos 2459 códigos se revisó la entrada en Uniprot; 1845 códigos se identificaron como proteínas revisadas y 614 códigos correspondieron a proteínas no revisadas. 406 códigos pertenecían a una isoforma de proteína, a estos códigos les fue eliminado el número que indica la isoforma para ser usados en análisis *in silico*.

La segunda lista cuenta con 1317 proteínas detectadas en al menos dos de las ocho muestras analizadas que incluyen pacientes con CEO y sin CEO, se generó a partir de la lista de 2459 códigos de la cual fueron eliminados 1142 códigos que correspondieron a proteínas detectadas solo en una muestra.

Con la finalidad de obtener una descripción global de la expresión de las proteínas en las ocho muestras de CEO y OLC se realizó un análisis de conglomerados jerárquico también conocido como análisis *Cluster*, que tiene como objetivo agrupar las proteínas de acuerdo a patrones similares de expresión. El primer análisis se realizó con las 2459 proteínas, este análisis mostró patrones de expresión distinguibles entre las muestras, destacando grupos de proteínas con sobre y subexpresión (Figura 4).

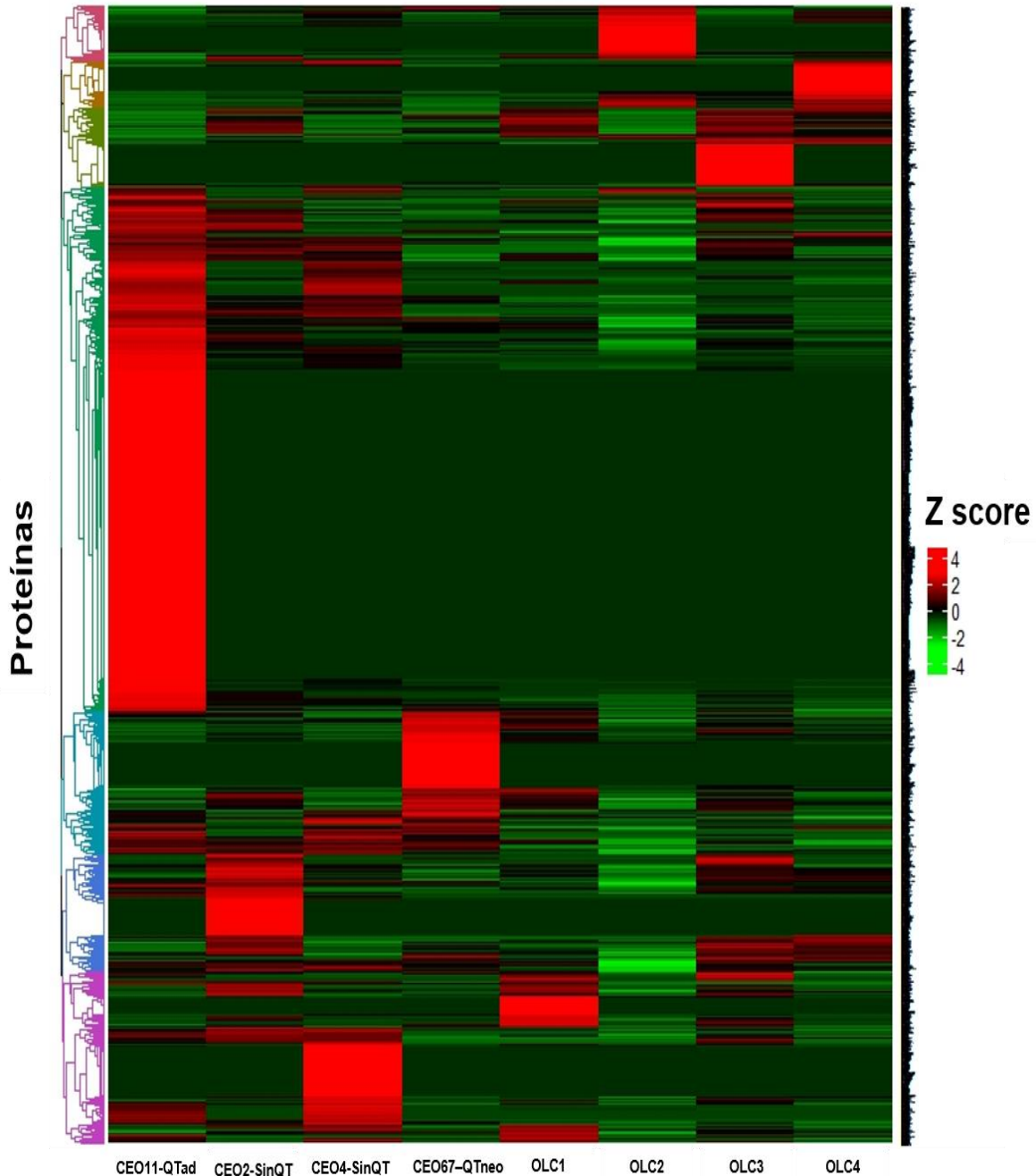


Figura 4. Análisis de conglomerados jerárquico del perfil de expresión de 2459 proteínas identificadas en tejidos de CEO y OLC. Cada columna representa una muestra clínica que se indica con un folio y cada fila una proteína. Se observan diferencias notables entre los perfiles de expresión de cada muestra, resaltan grupos definidos de proteínas sobreexpresadas y grupos con expresión disminuida. La muestra OLC2 se utilizó como control, presenta el perfil con menor número de proteínas con aumento en la expresión en comparación con las muestras de CEO y el resto de muestras de OLC. Las variaciones en los matices de rojo indican alto nivel de expresión (+1 a +4), y las variaciones en los matices de verde indican bajo nivel de expresión (-1 a -4).

También se realizó un análisis de conglomerados jerárquico con la lista de 1317 proteínas que corresponden a las proteínas presentes en al menos dos de las ocho muestras analizadas de CEO y OLC. Se consideró únicamente la muestra OLC2 como control de expresión basal debido a que en el análisis de conglomerado jerárquico de 2459 proteínas mostró el perfil de expresión con mayor diferencia en comparación con los perfiles de expresión de CEO. Este análisis mostró un perfil de expresión heterogéneo entre tejidos, con aumentos notables en la expresión y que no comparten con ninguna otra muestra (Figura 5). Bajo este criterio, se consideraron sólo los grupos de proteínas sobreexpresadas para realizar el análisis de vías y redes biológicas, con la finalidad de conocer los procesos celulares en los que participan estas proteínas y su probable relación con el proceso de quimiorresistencia.

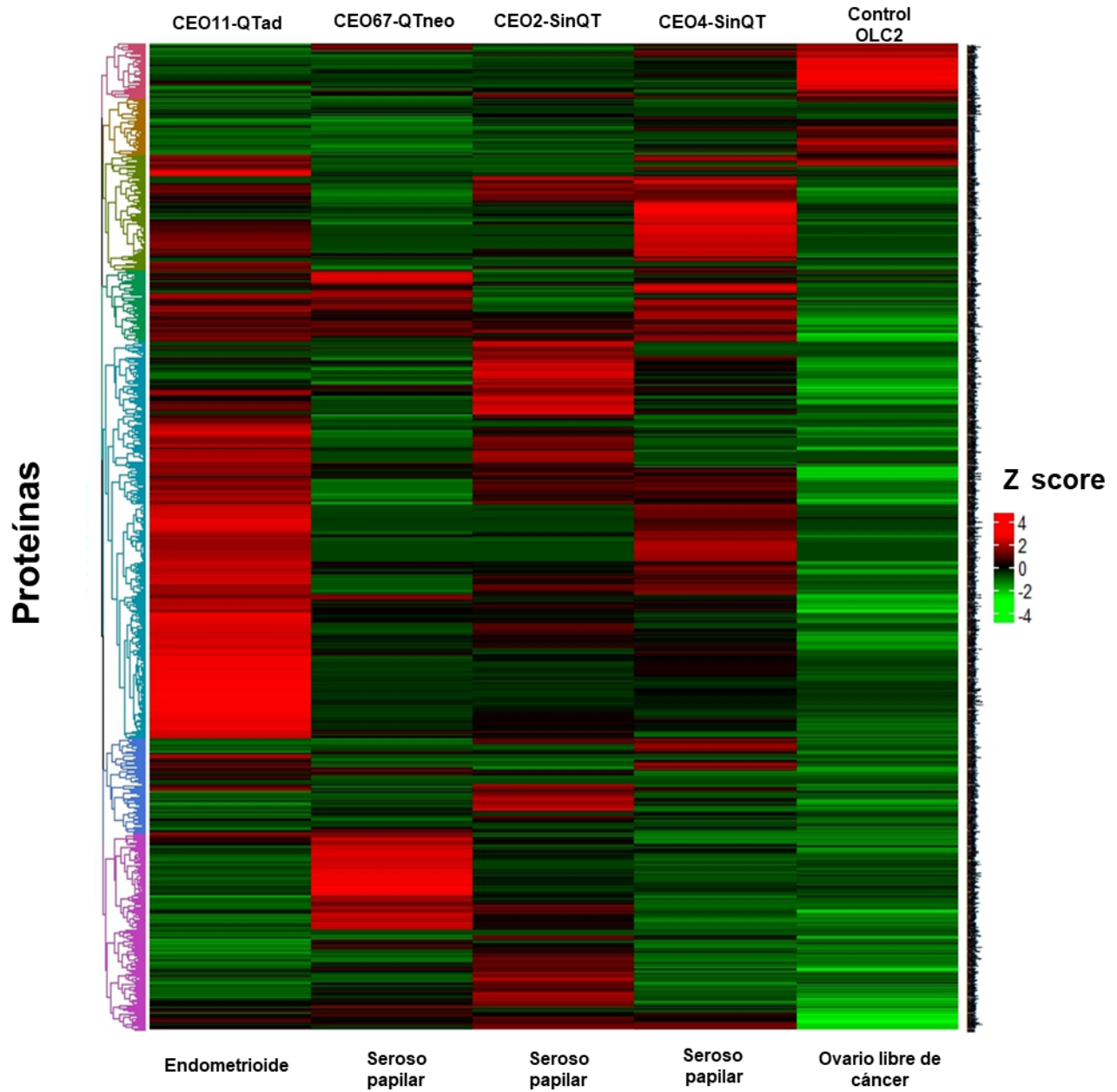


Figura 5. Análisis de conglomerados jerárquico con 1317 proteínas presentes en al menos dos de las ocho muestras analizadas de CEO y OLC. Cada muestra presenta un grupo de proteínas con aumentos notables en la expresión de manera exclusiva. El color rojo indica aumento en la expresión y el color verde indica bajos niveles de expresión.

En la muestra CEO11-QTad se identificaron 141 proteínas sobreexpresadas aglomeradas en grupos estrechamente relacionados (Figura 6A). En la muestra CEO67-QTneo se identificaron 110 proteínas sobreexpresadas (Figura 7A). En las muestras de pacientes con CEO que no recibieron tratamiento con quimioterapia se identificaron 77 en la muestra CEO2-SinQT y 42 proteínas en la muestra CEO4-SinQT con aumento en la expresión (Figura 8A y Figura 9A) en comparación con el perfil de expresión de la muestra OLC2 que mostró un grupo de sobreexpresión de 64 proteínas (Figura 10A).

Con la finalidad de conocer de manera general los procesos biológicos en los que participan las proteínas sobreexpresadas, se realizó un análisis bioinformático utilizando la base de datos Reactome (<http://www.reactome.org/>) que es una base de datos de acceso abierto, actualizada y revisada por pares en donde se encuentran integrados los procesos biológicos y vías de señalización en los que participan proteínas reportadas por diferentes grupos de investigación científica.

Las 141 proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO11-QTad mostraron que los principales procesos biológicos en los que participan son sistema inmune y metabolismo de proteínas (Figura 6B). En la muestra CEO67-QTneo las proteínas seleccionadas sobresalen con la participación en el proceso de transducción de señales (Figura 7B). En la muestra CEO2-SinQT las proteínas sobreexpresadas participan en transducción de señales, sistema inmune y metabolismo (Figura 8B), en CEO4-SinQT las proteínas con aumento en la expresión mostraron participación en metabolismo y sistema inmune (Figura 9B) y finalmente, en el tejido OLC2 las 64 proteínas sobreexpresadas participan en sistema inmune y organización de la matriz extracelular (Figura 10B).

Con el objetivo de conocer la función molecular de las proteínas sobreexpresadas se realizó un análisis *in silico* en la base de datos *Panther* (<http://pantherdb.org/>), una base de datos biológicos de genes y proteínas, curada, de acceso abierto y actualizada, que permite clasificar e identificar los procesos biológicos en los que participan las proteínas, funciones moleculares y componentes celulares.

En un primer análisis *Panther* describe los procesos y funciones moleculares de forma general y posteriormente permite ir desglosando estos procesos hasta llegar a funciones específicas, de acuerdo con esto, en la muestra CEO11-QTad, el 47.8% de las proteínas cumplen una función catalítica, el 32.6% tienen actividad de unión, el 19.6% de las proteínas cumplen funciones moleculares como; transporte, regulación de la traducción, transducción de señales y estructural (Figura 6C).

De las 110 proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO67-QTneo, el 62.5% cumplen una función de unión, el 22.9% cumplen función catalítica y el 14.6% se encuentra dividido en funciones moleculares como transducción de señales y moléculas estructurales (Figura 7C).

En la muestra CEO2-SinQT se sobreexpresan de manera diferencial 77 proteínas, de las cuales el 52.6% tiene función catalítica, el 31.6% cumplen funciones de unión y el 15.0% de las proteínas cumplen una función estructural, de receptor y de transporte (Figura 8C).

En la muestra CEO4-SinQT se identificaron 42 proteínas con aumento en la expresión, el 43.3% cumplen una función catalítica, el 30.0% funcionan como proteínas de unión y el 26.7% de las proteínas cumplen función estructural, de transporte y actividad antioxidante (Figura 9C).

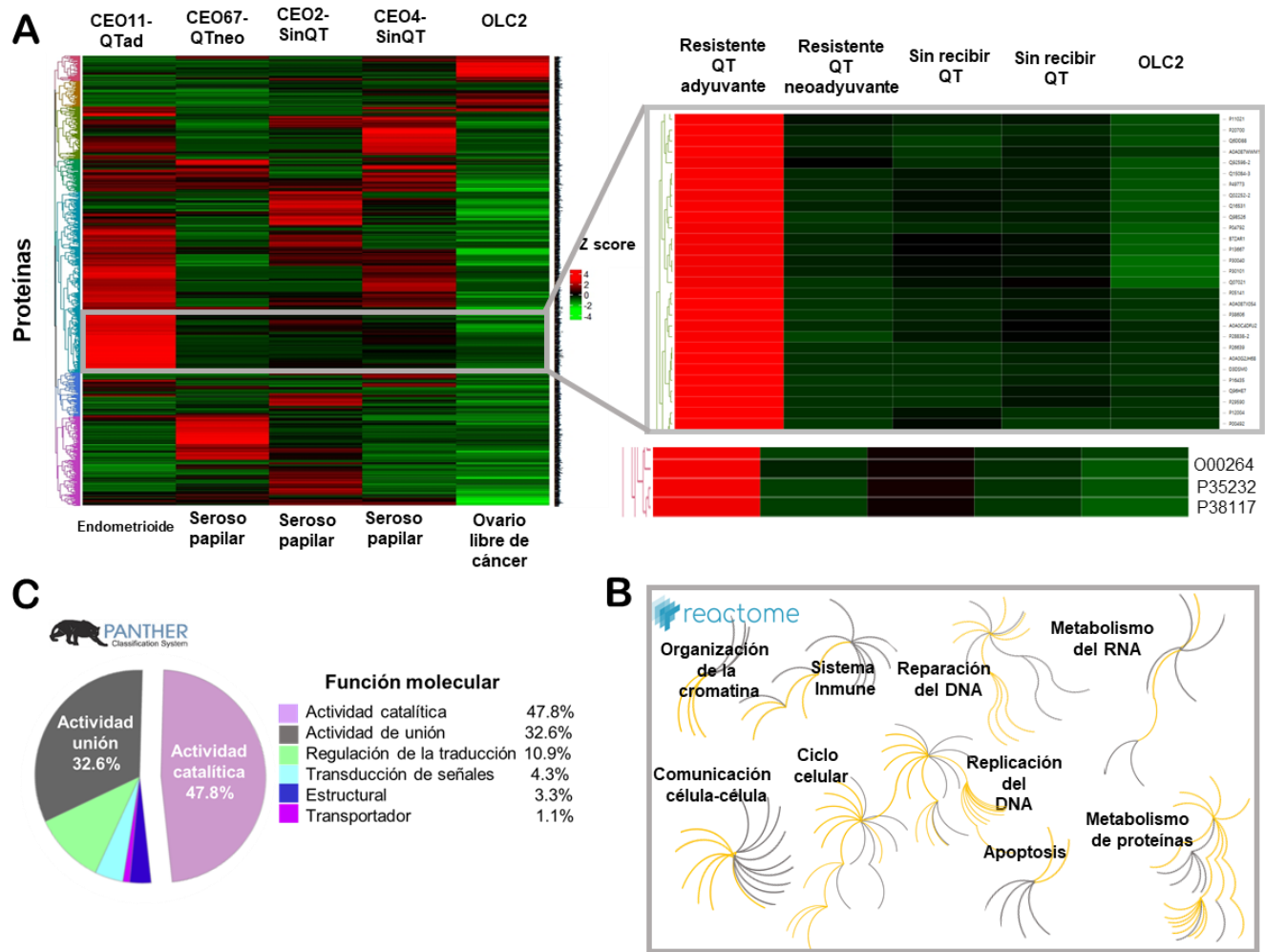


Figura 6. Análisis *in silico* de las proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO11-QTad. A) Acercamiento de la zona que corresponde a las 141 proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO11-QTad, se observa que en el resto de las muestras la expresión de estas proteínas está disminuida o ausente. **B)** Análisis de Reactome permitió obtener una visión general de los procesos celulares en los que participan las 141 proteínas, entre los cuales se encuentra metabolismo de proteínas y sistema inmune a través de proteínas como las citocinas (adaptado de Reactome). **C)** Análisis en *Panther* para identificar la función molecular de las proteínas que mostraron aumento en la expresión, destacan la actividad catalítica y la actividad de unión.

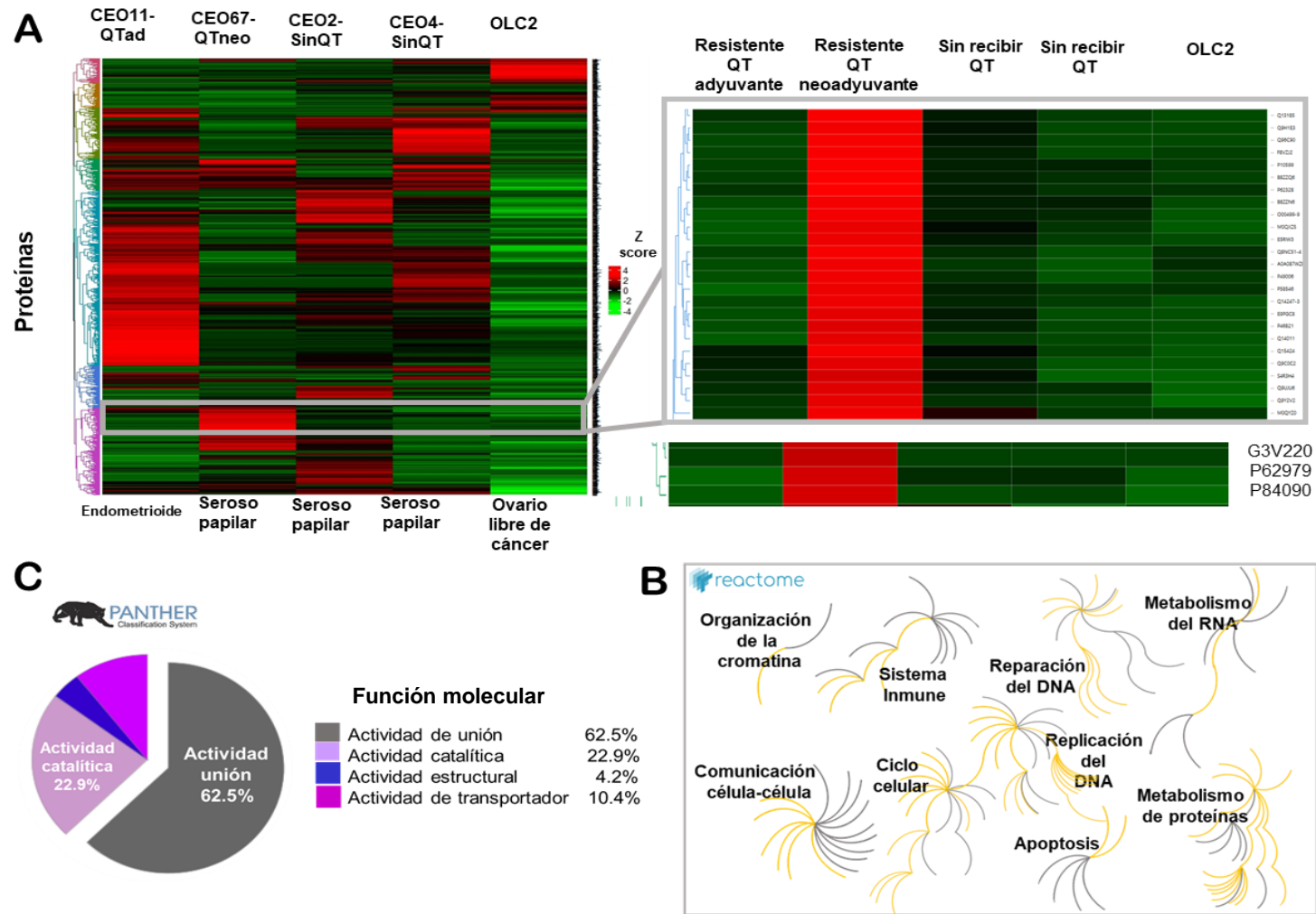


Figura 7. Análisis *in silico* de las proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO67-QTneo. A) Acercamiento de la zona que corresponde a las 110 proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO67-QTneo, se observa que en el resto de las muestras la expresión de estas proteínas está disminuida o ausente. B) Análisis de Reactome permitió obtener una visión general de los procesos celulares en los que participan las 110 proteínas, entre los cuales se encuentra ciclo celular y metabolismo de proteínas (adaptado de Reactome). C) Análisis en *Panther* para identificar la función molecular de las proteínas que mostraron aumento en la expresión, destacan la actividad catalítica y la actividad de unión.

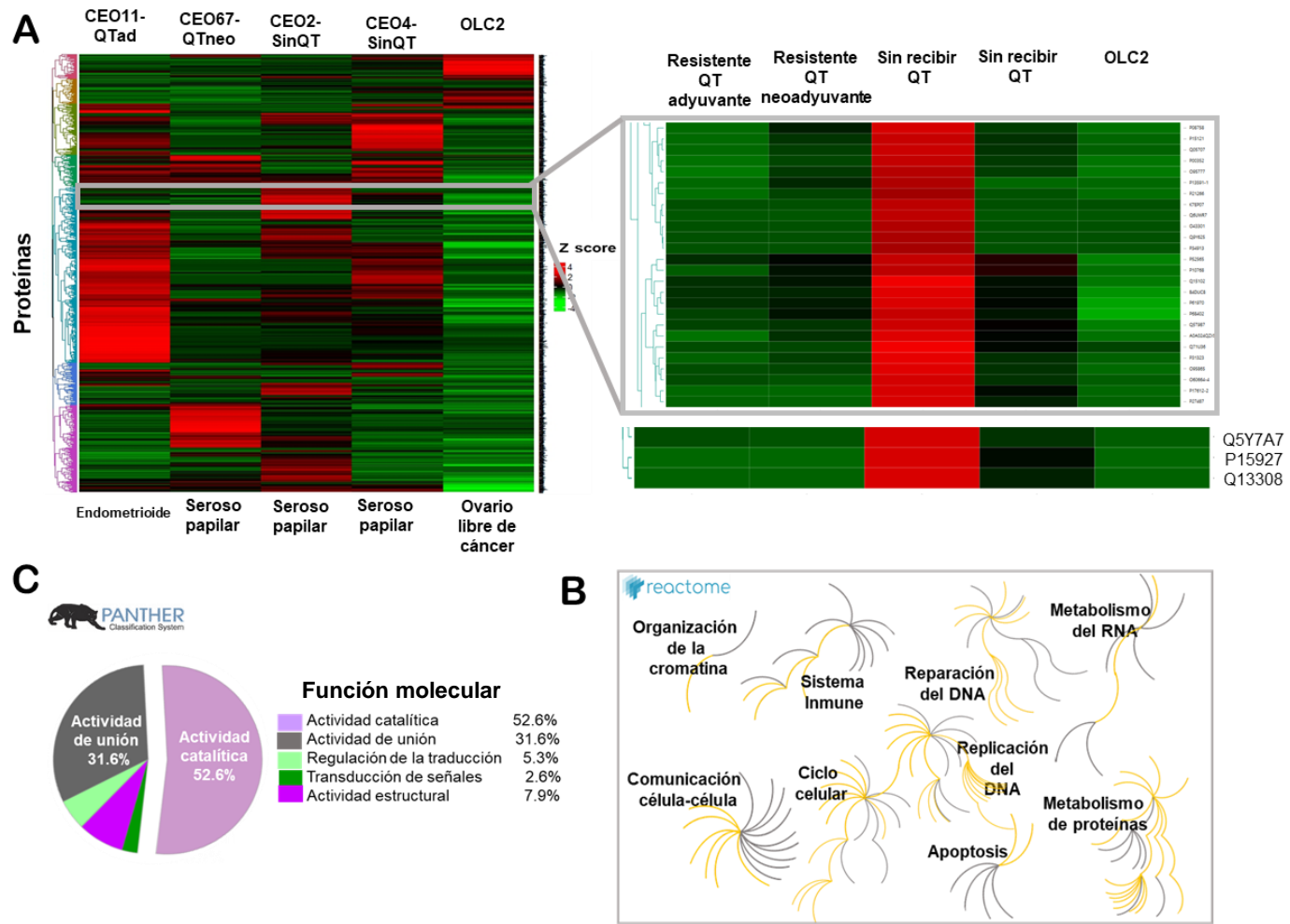


Figura 8. Análisis *in silico* de las proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO2-SinQT. A) Acercamiento de la zona que corresponde a las 77 proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO2-sinQT, se observa que en el resto de las muestras la expresión de estas proteínas está disminuida o ausente. **B)** Análisis de Reactome permitió obtener una visión general de los procesos celulares en los que participan las 77 proteínas, entre los cuales se encuentra metabolismo de proteínas y sistema inmune principalmente (adaptado de Reactome). **C)** Análisis en Panther para identificar la función molecular de las proteínas que mostraron aumento en la expresión, destacan la actividad catalítica y la actividad de unión.

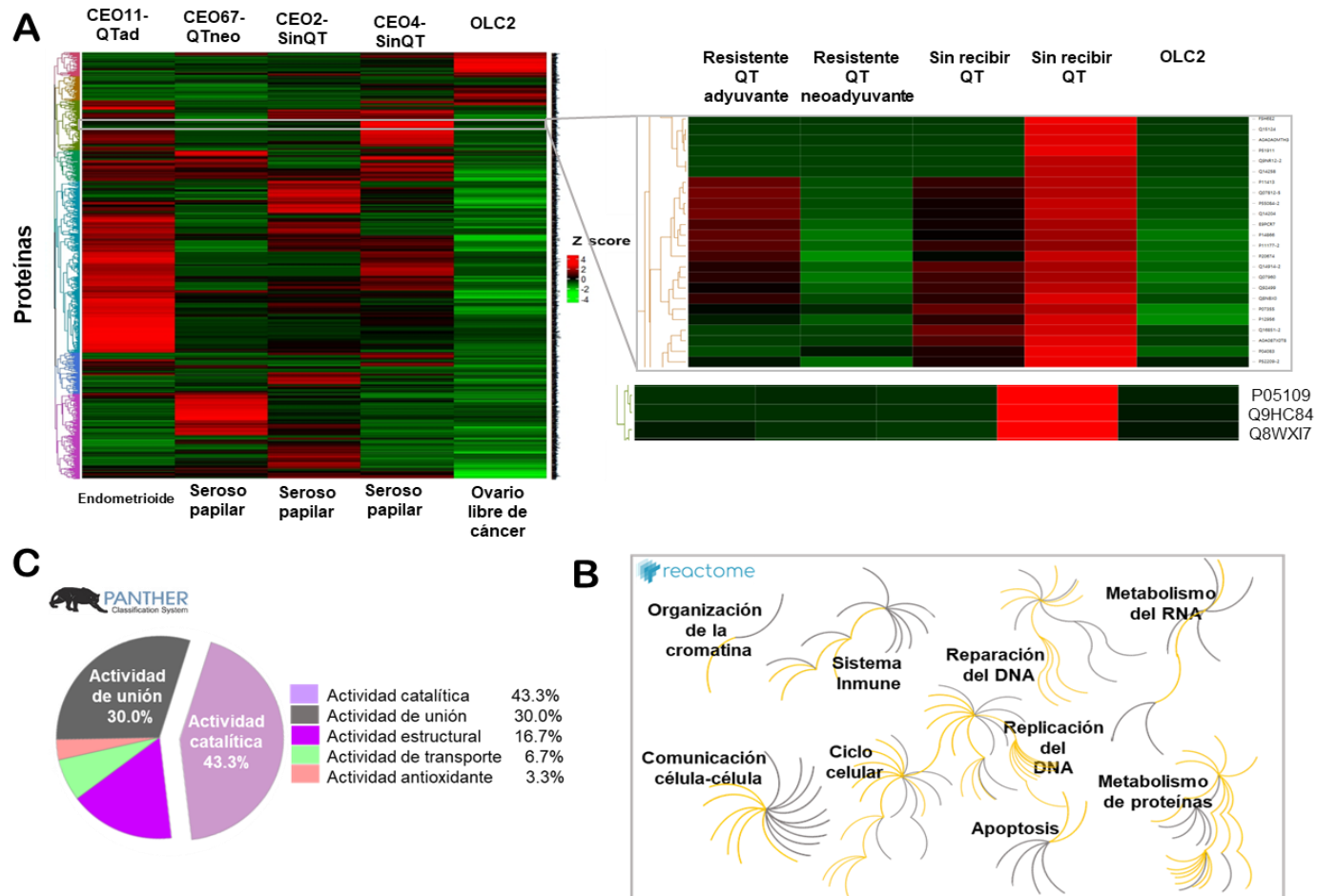


Figura 9. Análisis *in silico* de las proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO4-SinQT. A) Acercamiento de la zona que corresponde a las 42 proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO4-SinQT, se observa que en el resto de las muestras la expresión de estas proteínas está disminuida o ausente. **B)** Análisis de Reactome permitió obtener una visión general de los procesos celulares en los que participan las 42 proteínas, entre los cuales se encuentra ciclo celular, metabolismo de proteínas (adaptado de Reactome). **C)** Análisis en *Panther* para identificar la función molecular de las proteínas que mostraron aumento en la expresión, destacan la actividad catalítica y la actividad de unión

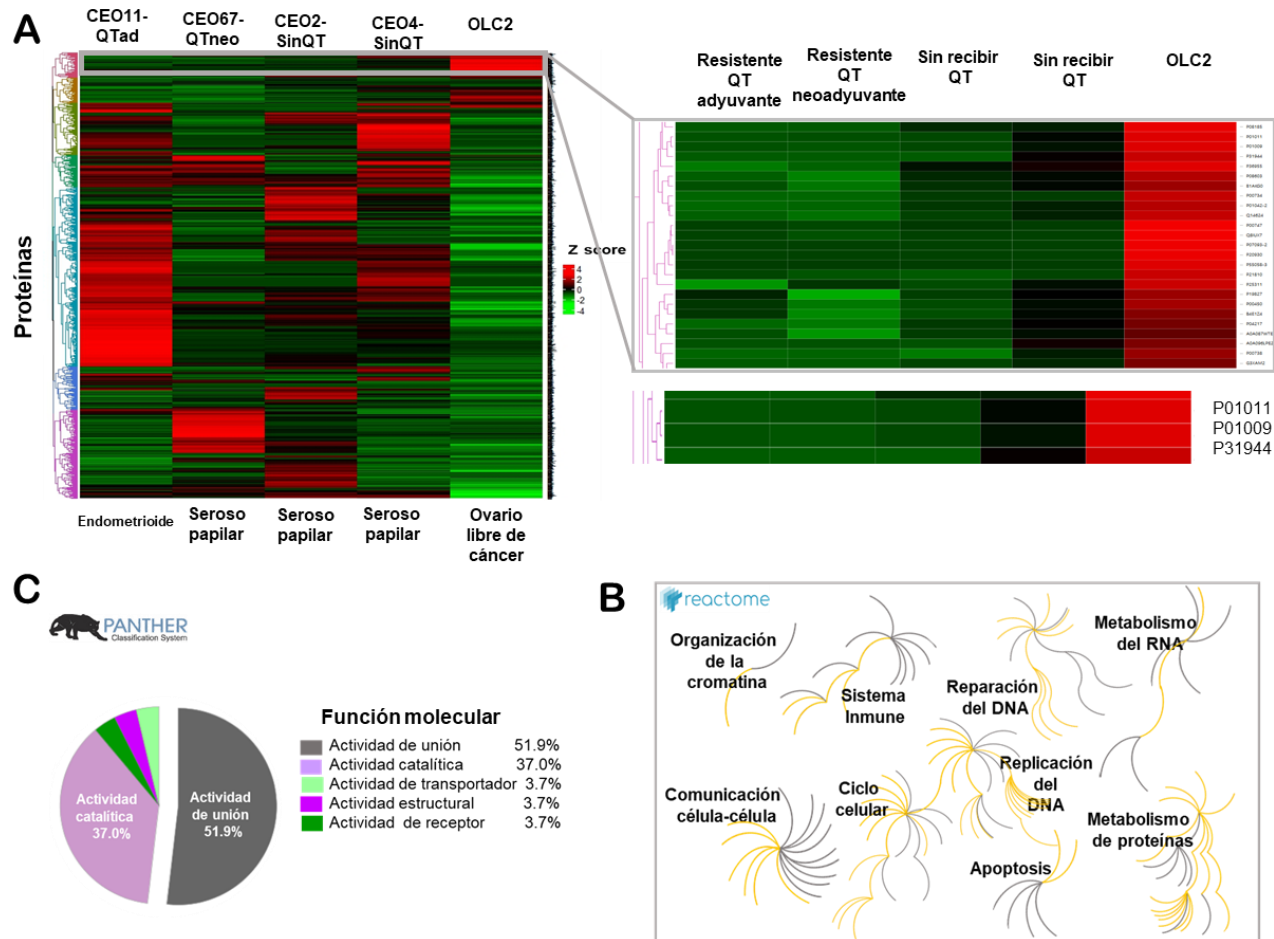


Figura 10. Análisis *in silico* de las proteínas sobreexpresadas en la muestra OLC2. A) Acercamiento de la zona que corresponde a las 61 proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO4-SinQT, se observa que en el resto de las muestras la expresión de estas proteínas está disminuida o ausente. **B)** Análisis de Reactome permitió obtener una visión general de los procesos celulares en los que participan las 61 proteínas, entre los cuales se encuentra sistema inmune y organización de la matriz extracelular (adaptado de Reactome). **C)** Análisis en *Panther* para identificar la función molecular de las proteínas que mostraron aumento en la expresión, destacan la actividad catalítica y la actividad de unión.

De manera general los resultados obtenidos en *Panther* mostraron que la mayoría de las proteínas sobreexpresadas participan en funciones biológicas como actividad catalítica, actividad de unión, transporte, estructural, regulación de la traducción, transducción de señales, actividad antioxidante y como receptores, destacando que todos los grupos de proteínas sobreexpresadas corresponden a una sección distinta del mapa de calor por lo que se trata de proteínas diferentes. Sin embargo, en todos los grupos destacan con mayor número de proteínas las funciones de actividad catalítica y unión, también se observó que en las muestras de pacientes que no recibieron quimioterapia y el tejido de ovario libre de cáncer presentan coincidencia en las funciones de actividad catalítica, actividad de unión, estructural y de transporte, mientras que la muestra de las pacientes que recibieron quimioterapia previo a la cirugía coincide con estas funciones excepto la actividad de transporte ya que no se detectó ninguna proteína para esta función (Figura 11).

Funciones moleculares de tejidos analizados

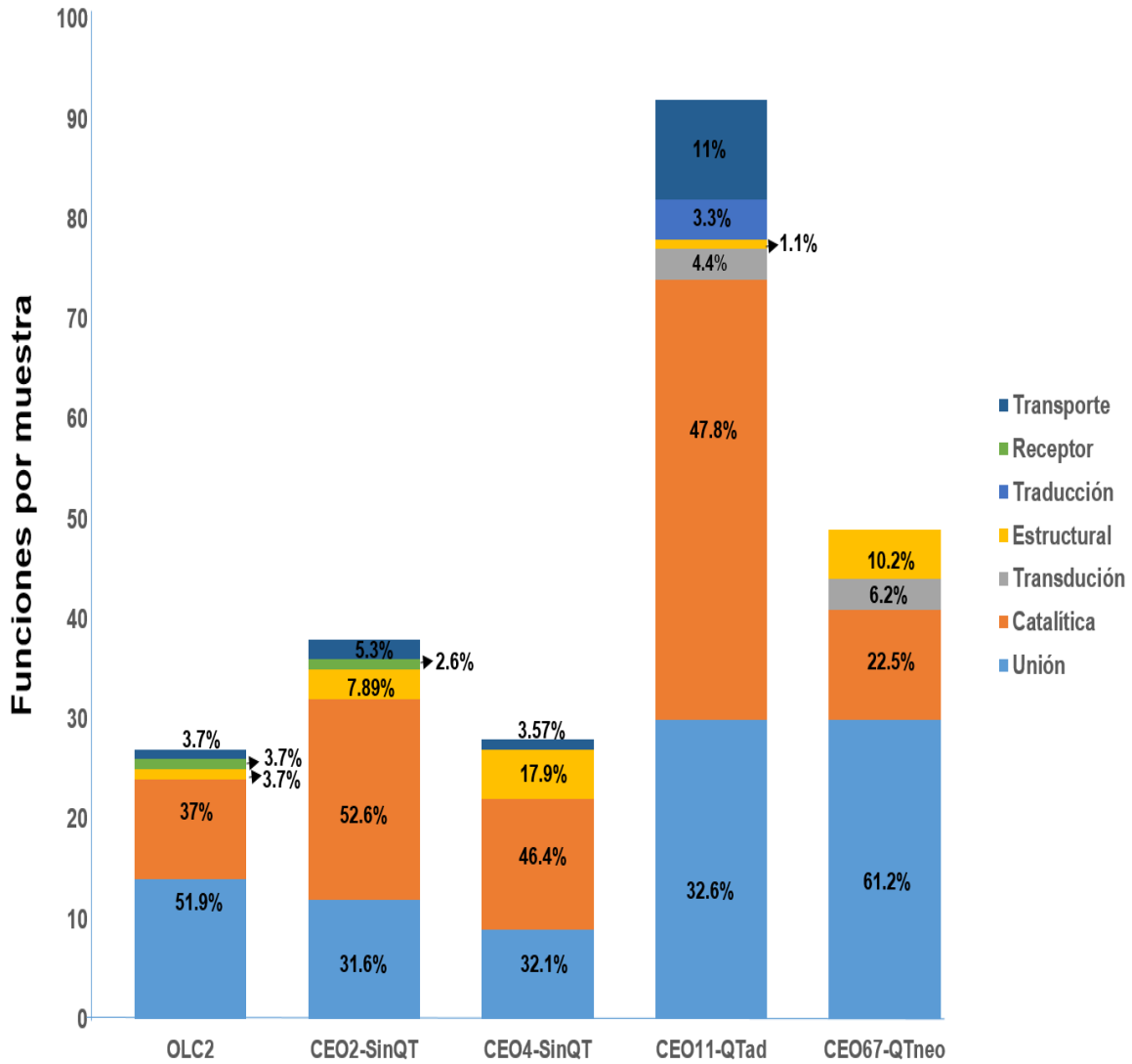


Figura 11. Funciones moleculares que llevan a cabo las proteínas sobreexpresadas en las muestras de CEO y OLC. En los cuatro grupos las funciones moleculares con el mayor número de proteínas implicadas fueron la actividad catalítica y actividad de unión. Las cuatro muestras que no recibieron tratamiento previo a la cirugía tienen similitud en las funciones moleculares. La muestra CEO67-QTneo no presentó proteínas con actividad de transporte.

En las muestras CEO11-QTad, CEO2-SinQT y CEO4-SinQT que comparten la característica de provenir de pacientes que al momento de la cirugía no habían recibido quimioterapia el mayor número de proteínas tienen una función catalítica (Figura 12A).

El análisis en *Panther* reveló que la actividad catalítica implica proteínas con actividad específica como: oxidorreductasas, hidrolasas, isomerasas, transferasas, ligasas, helicasas y liasas, de estas actividades destaca la actividad oxidorreductasa que comprende mayor número de proteínas con un 32.6% (Figura 12B), este grupo incluye las proteínas mitocondriales citocromo C1 y citocromo oxidasa.

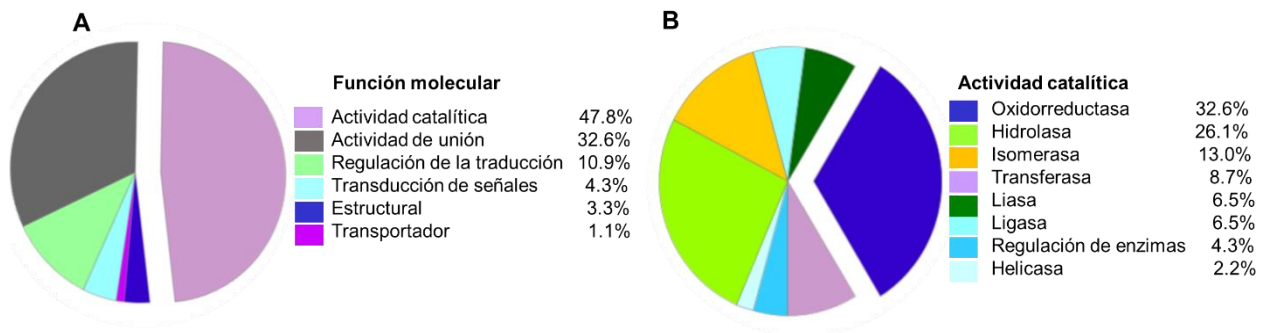


Figura 12. Distribución de las funciones moleculares y actividad de catalítica en la muestra CEO11-QTady. A) Funciones moleculares en las que participan las proteínas sobreexpresadas en la muestra CEO11-QTad, resalta la actividad catalítica con mayor número de proteínas implicadas. B) Actividad catalítica específica, se identificaron hidrolasas, isomerasas, transferasas, liasas, ligasas, regulación de enzimas, helicasas y destacan las proteínas con actividad oxidorreductasa en un 32.6%.

Por otro lado, en la muestra CEO67-QTneo la función predominante fue la actividad de unión, que a su vez implica unión a proteínas, unión a ácidos nucleicos y unión a iones Ca^{2+} . (Figura 13A). La función de unión a proteínas incluye el mayor número de proteínas con un 59.5%, por lo que se identificó a través de *Panther* a qué tipo de proteínas se unen. Se detectó que estas proteínas se unen a receptores, factores de transcripción, proteínas de citoesqueleto y a la calmodulina, de estas funciones específicas, resaltan las proteínas de unión a receptores con un 33.3% (Figura 13B).

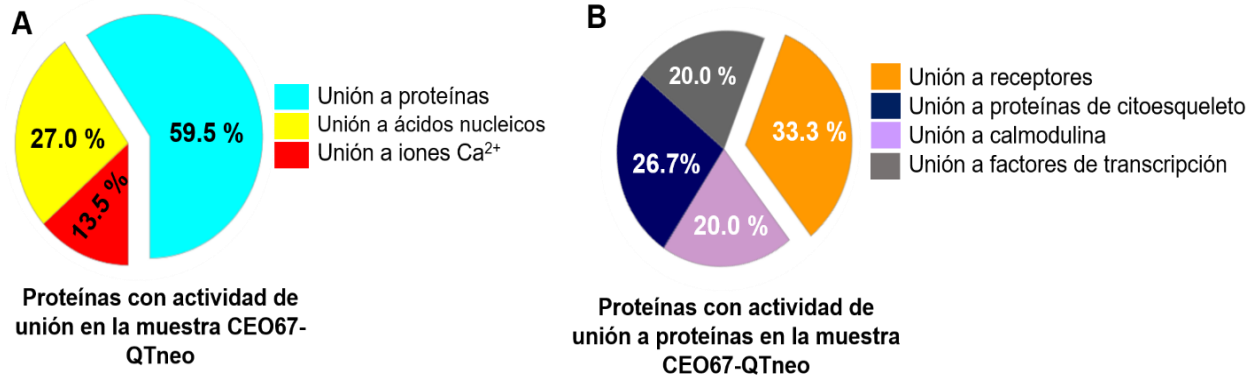


Figura 13. Distribución de la actividad de unión en las proteínas sobreexpresadas de la muestra CEO67-QTneo. **A)** La actividad de unión está conformada por tres tipos funciones específicas: unión a otras proteínas en un 59.5%, unión a ácidos nucleicos con un 27.0 % y unión a iones Ca²⁺ en un 13.5% **B)** Actividades específicas de unión de las proteínas identificadas en la figura A, destacan con un 33.3% las proteínas de unión a receptores, seguido de las proteínas de unión a ácido nucleicos, a factores de transcripción y a la calmodulina.

Debido a que en la muestra CE067-QTneo la actividad de unión a receptores fue la función con el mayor porcentaje de proteínas se identificó en *Panther* el nombre de estas proteínas: galectina 1, proteína de unión a calcio (S100A7) que se une a receptores de tipo hormonal, neurotransmisores o fármacos, proteína de unión a CD2, factor de crecimiento derivado de hepatoma y la proteína 2 relacionada con el factor de crecimiento derivado de hepatoma.

VI. DISCUSIÓN

El tratamiento estándar del CEO en etapas avanzadas III y IV es la citorreducción seguida de la administración de quimioterapia adyuvante (Martín-Carmeán *et al.*, 2016), basada en la combinación de cisplatino o carboplatino y taxanos como paclitaxel o decetaxel, cada cuatro semanas durante seis ciclos (Raja *et al.*, 2012; Marth *et al.*, 2017).

Una variación del tratamiento estándar es la quimioterapia neoadyuvante la cual se ha propuesto como un modelo terapéutico para el tratamiento de carcinomas ováricos cuando se prevé que la enfermedad no va a ser erradicada con la cirugía primaria (Morrison *et al.*; 2007; Yang *et al.*, 2017; Melamed *et al.*, 2018).

El principal desafío al que se enfrentan las pacientes con CEO que son diagnosticadas en etapas III y IV es la resistencia a carboplatino y paclitaxel (Galluzzi *et al.*, 2012). A pesar de las investigaciones que se han realizado en diferentes modelos de estudio se desconoce cómo se desarrolla la quimiorresistencia en el CEO.

En la última década, ha habido un aumento en el interés de la aplicación de un enfoque proteómico utilizando técnicas de análisis masivos para comprender los mecanismos involucrados en la quimiorresistencia del cáncer epitelial de ovario e identificar biomarcadores de predicción de la respuesta a los fármacos quimioterapéuticos (Elzek y Rodland 2015; Swiatly *et al.*, 2018).

En este estudio se incluyeron A) pacientes que recibieron quimioterapia con carboplatino y paclitaxel. B) pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante (previo a la cirugía) y C) pacientes que recibieron quimioterapia adyuvante (posterior a la cirugía), todas con diagnóstico de resistencia a la quimioterapia de primera línea.

De acuerdo con los lineamientos del National Comprehensive Cancer Network (NCCN) los tumores intrínsecamente quimiorresistentes se definen como aquellos con enfermedad persistente o recurrente dentro de los seis meses posteriores a la inicio de la quimioterapia de primera línea y definen a los tumores quimiosensibles como aquellos con una respuesta completa a la quimioterapia y un periodo libre de platino mayor a seis meses. De acuerdo con esto las pacientes CEO67-QTneo, CEO67-QT neo y

CEO11-QTad presentaron resistencia intrínseca ya que durante la administración de los antineoplásicos mostraron enfermedad progresiva.

La resistencia intrínseca se asocia con mecanismos de supervivencia que desarrollan las células tumorales independiente de la quimioterapia (Cornelison *et al.*, 2017), muchas células tumorales quimiorresistentes muestran un fenotipo pleomórfico es decir, presentan alteraciones en varias vías moleculares que implican disminución en la absorción de platino, aumento en el eflujo de los medicamentos y en la expresión de proteínas antioxidantes (Kelland, 2007; Cornelison *et al.*, 2017).

Recientes estudios han reportado que la quimiorresistencia intrínseca, puede surgir como consecuencia de la heterogeneidad celular intratumoral, esto se refiere a que los tumores están formados por células cancerosas que varían en su sensibilidad a los fármacos quimioterapéuticos debido a diferencias genóticas y fenotípicas (Saunders *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2018).

Se ha sugerido que las poblaciones de células de tumores epiteliales de ovario emplean una estrategia de supervivencia dinámica en la que las células individuales asumen transitoriamente un estado reversible de tolerancia a los medicamentos (Sharma *et al.*, 2010).

Es importante analizar el perfil de proteínas de las pacientes quimiorresistentes de acuerdo con el momento en que les fue administrada la quimioterapia, debido a que se incluyeron pacientes que recibieron quimioterapia previa a la cirugía y una paciente que recibió quimioterapia posterior a la cirugía.

En ese sentido se ha reportado que el hecho de que un tejido analizado no haya estado expuesto a quimioterapia antes de la toma de muestra, implica que la firma de proteínas identificadas es indicativa de los mecanismos innatos o intrínsecos de respuesta al tratamiento con carboplatino y paclitaxel (Sehrawat *et al.*, 2016), por lo que con el perfil de expresión de proteínas de la paciente CEO11-QTad podría mostrar probables proteínas involucradas en la respuesta a la quimioterapia de primera línea.

Por otro lado, en las pacientes que recibieron quimioterapia antes de la cirugía, el perfil de proteínas podría ser indicativo de cambios ocurridos como consecuencia de la administración de los medicamentos. Se ha reportado que las células tumorales evaden el efecto citotóxico de los antineoplásicos activando un fenotipo activo/defensivo al silenciar o activar la expresión de genes como respuesta a la exposición a compuestos de platino (Shen *et al.*, 2012).

A partir de un estudio de metaanálisis se reportó que la administración de quimioterapia neoadyuvante se asocia con una supervivencia general inferior en comparación con la cirugía primaria y quimioterapia adyuvante (Bristow y Chi, 2006). Asimismo recientes estudios han reportado que la administración de quimioterapia neoadyuvante es un factor de riesgo independiente de recaída en los carcinomas ováricos resistentes al platino estadio III y IV (Luo *et al.*, 2016). En ese sentido, es posible que los resultados de este estudio pueden sugerir que la quimiorresistencia a carboplatino y paclitaxel en las pacientes con CEO en etapas III y IV es intrínseca e independiente de la administración de quimioterapia en forma adyuvante o neoadyuvante y se asocia más con la etapa clínica que con el tipo de quimioterapia.

Por otro lado con respecto a los efectos de la administración de quimioterapia neoadyuvante en el perfil de proteínas, recientemente han evaluado el perfil proteómico de tumores epiteliales de ovario tratados con quimioterapia neoadyuvante comparados con carcinomas ováricos libres de contacto con quimioterapia y han reportado que los tumores epiteliales de ovario que recibieron quimioterapia neoadyuvante presentaron alteraciones significativas a nivel de proteínas implicadas en la supervivencia celular y metabolismo (Penick *et al.*, 2018).

En este estudio se observó la ausencia de proteínas implicadas en transporte en la paciente que recibió quimioterapia neoadyuvante, esto podría estar contribuyendo a la falta de respuesta a la quimioterapia con carboplatino y paclitaxel, ya que uno de los mecanismos de ingreso del platino a las células es a través transportadores, como el transportador de cobre hCtr1 (Ishida *et al.*, 2002; Kilari *et al.*, 2016) que tiene en su estructura una secuencia de unión a metales y en esta secuencia se une el platino (Rae *et al.*, 1999). En este sentido se ha reportado un estudio de 30 pacientes con cáncer de

pulmón de células no pequeñas que recibieron quimioterapia neoadyuvante basada en platino, los pacientes con expresión de CTR1 indetectable por inmunohistoquímica, redujeron las concentraciones intratumorales de platino y la respuesta al tratamiento (Kim *et al.*, en 2014).

Así mismo, se observó que en las muestras de CEO que no fueron sometidas a quimioterapia, la función molecular con mayor número de proteínas involucradas fue la actividad catalítica y en esta destaca la actividad oxidorreductasa principalmente con la participación de proteínas mitocondriales como citocromo C1 y citocromo oxidasa, diferentes estudios han reportado que alteraciones en las proteínas mitocondriales y los procesos que se llevan a cabo en este orgánulo se han asociado con la quimiorresistencia en cáncer de mama, cervical y de ovario (Kingnate *et al.*, 2018), por lo que es probable que citocromo C1 y citocromo oxidasa estén relacionadas con la falta de respuesta a la quimioterapia con carboplatino y paclitaxel en los tumores ováricos, sin embargo, no existen reportes donde se haya estudiado específicamente a las proteínas citocromo C1 y citocromo oxidasa por lo que es necesario estudiar estas proteínas a mayor profundidad.

En las pacientes con quimioterapia neoadyuvante la función molecular con mayor número de proteínas involucradas fue la de unión y en segundo lugar la actividad catalítica. Se identificaron las proteínas con actividad de unión específicas, estas proteínas fueron: galectina 1, proteína de unión a calcio (S100A7) que se une a receptores de tipo hormonal, neurotransmisores o fármacos, proteína de unión a CD2, factor de crecimiento derivado de hepatoma y la proteína 2 relacionada con el factor de crecimiento derivado de hepatoma.

Galectina 1 es una glicoproteína que se une a una amplia variedad de carbohidratos (Kim *et al.*, 2012). Diversos estudios reportan la sobreexpresión de galectina 1 en diferentes tipos de tumores, incluido el cáncer epitelial de ovario y han reportado que se asocia con la progresión y quimiorresistencia a carboplatino (Kim *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2014).

S100A7 es una proteína de unión a calcio, se ha reportado su expresión aberrante en múltiples tipos de cáncer entre los cuales se encuentra el cáncer de ovario (Gagnon *et al.*, 2008). También se ha reportado que S100A7 regula la metástasis y la quimiorresistencia en células de cáncer de ovario a través de la señalización de la vía MAPK (Lin *et al.*; 2018).

El factor de crecimiento derivado de hepatoma (FCDH) es una proteína secretada por células del hígado, riñón, cerebro, sistema cardiovascular e intestino. La asociación entre FCDH y el cáncer se ha revelado recientemente y su sobreexpresión se ha reportado en diferentes tipos de tumores. La expresión de FCDH en cáncer epitelial de ovario se correlaciona con un pronóstico desfavorable (Liu *et al.*, 2015).

Por otro se ha reportado que la proteína 2 relacionada con el factor de crecimiento derivado de hepatoma promueve la reparación del daño al DNA por la vía de la recombinación homóloga en células de osteosarcoma (Baude *et al.*, 2016).

Existe evidencia experimental de la participación de estas proteínas en la progresión y quimiorresistencia en diferentes tipos de cáncer, por lo que queda claro que es necesario seguir estudiando la expresión de estas y otras proteínas en los tumores ováricos de tal manera que se realice un análisis integral que identifique que mecanismos se activan en los tumores ováricos para no responder a la quimioterapia con carboplatino y paclitaxel y no solo identificar proteínas individuales ya que de este modo sigue limitada la progresión en el tratamiento de la quimiorresistencia en CEO.

VII. CONCLUSIONES

Se sugiere que el fenotipo quimiorresistente en etapas avanzadas es intrínseco e independiente de la administración de la quimioterapia en forma adyuvante o neoadyuvante y se asocia más con la etapa clínica que con el tipo de quimioterapia.

El aumento en la expresión de las proteínas mitocondriales citocromo C1 y citocromo oxidasa en la paciente que recibió quimioterapia adyuvante podría estar confiriendo resistencia intrínseca al carboplatino, por lo que es necesario seguir investigando la función de estas proteínas en el cáncer epitelial de ovario.

La falta de aumento en la expresión de proteínas con actividad de transporte en las pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante puede ser el mecanismo de quimiorresistencia a carboplatino al limitar el ingreso del fármaco a las células tumorales, la ausencia de estas proteínas probablemente sea consecuencia de cambios en la expresión debido a la exposición previa a los quimioterapéuticos, sin embargo, es necesario validar estos resultados.

Las diferencias entre los perfiles de expresión de proteínas de las pacientes que recibieron quimioterapia neoadyuvante versus quimioterapia adyuvante sugieren que los mecanismos moleculares de quimiorresistencia dependen del estado innato de las células tumorales o que pueden ser adquiridos/potenciados por la exposición a los medicamentos a través de la quimioterapia neoadyuvante, por lo que es necesario evaluar los patrones proteicos que se presentan antes y después de la administración sistémica de los quimioterapéuticos en una población con mayor número de pacientes.

VIII. REFERENCIAS

1. Agarwal, R. and Kaye, S. B. (2003). Ovarian cancer: strategies for overcoming resistance to chemotherapy. *Nat Rev Cancer*. 3:502-516
2. Bast, Jr., Robert, C., Hennessy, B. and Gordon B. M. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat Rev Cancer*. 9:415-453.
3. Baude, A., Aaes, T. L., Zhai, B., Al-Nakouzi, N., Oo, H. Z., Daugaard, M., *et al.*, (2015). Hepatoma-derived growth factor-related protein 2 promotes DNA repair by homologous recombination. *Nucleic Acids Res*. 44(5):2214-2226.
4. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 72:248-254.
5. Bristow, R. E. and Chi, D. S. (2006). Platinum-based neoadjuvant chemotherapy and interval surgical cytoreduction for advanced ovarian cancer: A meta-analysis. *Gynecol Oncol*. 103(3):1070-1076.
6. Cornelison, R., Llana, D. C., and Landen, C. N. (2017). Emerging therapeutics to overcome chemoresistance in epithelial ovarian cancer: A Mini-Review. *Int J Mol Sci*. 18(10): 2171.
7. Dasari, S. and Tchounwou, P. B. (2014). Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *Eur J Pharmacol*. 0:364-378.
8. Davis, A., Tinker, V. A. and Friedlander, M. (2014). Platinum resistant ovarian cancer: what is it, who to treat and how to measure benefit? *Gynecol Oncol*. 133(3):624-631.
9. Elzek, M. A. and Rodland, K. D. (2015). Proteomics of ovarian cancer: functional insights and clinical applications. *Cancer metastasis rev*. 34(1):83-96.
10. Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D. M., *et al.* (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 36 (5):E359-386.
11. Gagnon, A., Kim, J. H., Schorge, J. O., Ye, B., Liu, B., Hasselblatt, K., *et al.*, (2008). antigens and their corresponding autoantibodies in ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res*. 14:764–71.
12. Galluzzi, L., Senovilla, L., Vitale, I., Michels, J., Martins, I., Kepp, O., *et al.* (2012). Molecular mechanisms of cisplatin resistance. *Oncogene*. 31(15):1869–1883.
13. Heintz, A. P., Odicino, F., Maisonneuve, P., Quinn, M. A., Benedet, J. L., Creasman, W. T., *et al.* (2006). Carcinoma of the ovary. FIGO 26th annual report on the results of treatment in gynecological cancer. *Int J Gynaecol Obstet*. Suppl 1:S161-192
14. Huang, H., Li, Y., Liu, J., Zheng, M., Feng, Y., Hu, K., *et al.*, (2012). Screening and identification of biomarkers in ascites related to intrinsic chemoresistance of serous epithelial ovarian cancers. *Plos One*. 7(12):e51256.
15. Ishida, S., Lee, J., Thiele, D. J. and Herskowitz, I. (2002). Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(22):14298-302.

16. Johnstone, T. C., Suntharalingam, K., and Lippard, S. J. (2015). Third row transition metals for the treatment of cancer. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci.* 307:10 - 13.
17. Kelland, L. (2007). The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.* 7(8):573–584.
18. Kilari, D., Guancial, E., and Kim, E. S. (2016). Role of copper transporters in platinum resistance. *World J Clin.* 7(1):106-113.
19. Kim, E. S., Tang, X., Peterson, D. R., Kilari, D., Chow, C. W., Fujimoto, J., *et al.*, (2014). Copper transporter CTR1 expression and tissue platinum concentration in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 85(1):88-93.
20. Kim, H. J., Jeon, H. K., Cho, Y. J. Park, Y. A., Choi, J. J., *et al.*, (2012). High galectin-1 expression correlates with poor prognosis and is involved in epithelial ovarian cancer proliferation and invasion. *Eur J Cancer.* 48(12):1914-1921.
21. Kim, S., Han, Y., Ik, K. S., Kim, Hee-Seung, Jin, K. S., and Sang, S. Y. (2018). Tumor evolution and chemoresistance in ovarian cancer. *NPJ Precis Oncol.* 2 (20):1-8.
22. Kingnate, C., Charoenkwan, K., Kumfu, S., Chattipakorn, N., and Chattipakorn, S. C. (2018). Possible roles of mitochondrial dynamics and the effects of pharmacological interventions in chemoresistant ovarian cancer. *EBioMedicine.* 34:256-266.
23. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
24. Lin, M., Xia, B., Qin, L., Chen, H., and Lou, G. (2018). S100A7 regulates ovarian cancer cell metastasis and chemoresistance through MAPK signaling and is targeted by miR-330-5p. *DNA Cell Biol.* 37(5):22-26.
25. Lippert, H. T., Ruoff, H. J., Volm, M. (2008). Intrinsic and acquired drug resistance in malignant tumors the main reason for therapeutic failure. *Arzneimittelforschung.* 58(6):261–264.
26. Liu, X. M., Chan, W. D. and Ngan, Y. S. H. (2012). Mechanisms of chemoresistance in human ovarian cancer at a glance. *Gynecol Obstet.* 2:e104.
27. Luo, Y., Lee, M., Kim, H. S., Chung, H. H., and Song, Y. S. (2016). Effect of neoadjuvant chemotherapy on platinum resistance in stage IIIc and IV epithelial ovarian cancer. *Medicine.* 95(36):e4797.
28. Marth, C., Reimer, D., and Zeimet, A. G. (2017). Front-line therapy of advanced epithelial ovarian cancer: standard treatment. *Ann Oncol.* 28(8):36-39.
29. Martín-Carreañ, M., Delgado-Sánchez, E., Piñera, A., Diestro, M. D., De Santiago, J., and Zapardiel, I. (2016). The role of surgery in advanced epithelial ovarian cancer. *Ecancermedicalscience.* 10: 666.
30. Melamed, A., Fink, G., Wright, A. A., Keating, N. L., Gockley, A. A., Del Carmen, M. G., *et al.*, (2018). Effect of adoption of neoadjuvant for advanced ovarian cancer on all cause mortality: quasi-experimental study. *BMJ.* 2018;360:j5463.
31. Morrison, J., Swanton, A., Collins, S., and Kehoe, S. (2012). Chemotherapy versus surgery for initial treatment in advanced ovarian epithelial cancer. *Cochrane Database Syst Rev.* 8(8). CD005343.

32. Parness, J., and Horwitz, B. (1981). Taxol binds to polymerized tubulin in vitro. *J. Cell Biol.* 91:479-487.
33. Penick, E. R., Mhawech-Fauceglia, P., Conrads, K. A., Batemaa, G., Parikh, N., Hood, B.L., Hamilton, C. A. *et al.*, (2018). Proteomics profiling of chemotherapy naïve versus neoadjuvant treated ovarian tumors. *Memory*.
34. Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C., and O'Halloran, T. V. (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science.* 284:805–808.
35. Raja, A. F., Chopra, N., and Ledermann, A. J. (2012). Optimal first-line treatment in ovarian cancer. *Ann Oncol.* 23:118-127.
36. Saunders, N. A., Simpson, F., Thompson, E. W., Hill, M. M., Endo-Munoz, L., Leggatt, G., Minchin, R. F., Guminski, A. (2012). Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance: molecular and clinical perspectives. *EMBO Mol Med.* 4(8):675-684.
37. Sehrawat, U., Pokhriyal, R., Gupta, A. K., Hariprasad, R., Khan, M. I., Gupta, D., *et al.* (2016). Comparative proteomic analysis of advanced ovarian cancer tissue to identify potential biomarkers of responders and nonresponders to first-line chemotherapy of carboplatin and paclitaxel. *Biomark Cancer.* 8:43-56.
38. Sharma, S. V., Lee, D. Y., Li, B., Quinlan, M. P. Takahashi, F., Maheswaran, S., McDermott, U., *et al.*, (2010). A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell.* 141(1):69-80.
39. Shen, D. W., Pouliot, L. M., Hall, M. D., and Gottesman, M. M. (2012). Cisplatin resistance: a cellular self-defense mechanism resulting from multiple epigenetic and genetic changes. *Pharmacol Rev.* 64(3):706-21.
40. Siegel, L. R., Miller, D. K., and Ahmedin, J. (2016). Cancer Statistics, 2016. *Cancer J Clin.* 66:7-30.
41. Stewart, D. J. (2007). Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin. *Crit Rev Oncol Hematol.* 63(1):12-31.
42. Swiatly, A., Horala, A., Matysiak, J., Hajduk, J., Nowak-Markwitz, E., and Kokot, Z. J. (2018). Understanding ovarian cancer: iTRAQ-based proteomics for biomarker discovery. *Interl J Mol Sciences.* 19(8):2240.
43. Taylor, D. D., Atay, S., Metzinger, D. S. and Gercel-Taylor, C. (2010). Characterization of humoral responses of ovarian cancer patients: antibody subclasses and antigenic components. *Gynecol Oncol.* 116 (2):213-221.
44. Yang, L., Zhang, B., Xing, G., Du, J., Yang, B., Yuan, Q., and Yang, Y. (2017). Neoadjuvant chemotherapy versus primary debulking surgery in advanced epithelial ovarian cancer: A meta-analysis of peri-operative outcome. *PloS one.* 12(10):e0186725.
45. Zhang, B., Feng, F. C. and Xiao, Y. Z. (2011). An overview of biomarkers for the ovarian cancer diagnosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod.* 158:119-123.

46. Zhang, P., Zhang, P., Shi, B., Zhou, M., Jiang, H., Zhang, H., Pan, X., Gao, H., Sun, H., and Li, Z. (2014). Galectin-1 overexpression promotes progression and chemoresistance to cisplatin in epithelial ovarian cancer. *Cell Death Dis.* 5(1):e991.
47. Zheng, H. C. (2017). The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget.* 8(35):59950-59964.