

TESIS DOCTORAL

Papel de las RHO GTPasas en el carcinoma de ovario

Estudi de doctorat en Ciències morfològiques i patologia estructural i molecular

Departament de Ciències Morfològiques

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

2013

Autor:

Belén Canet Lorente

Director:

Dr. Lluís Catasús i Cols

Tutor:

Dr. Íñigo Espinosa Mariscal

ÍNDICE

ABREVIATURAS	5
INTRODUCCIÓN.....	11
1. CARCINOMA DE OVARIO.....	11
1.1. Etiología.....	11
1.2. Diagnóstico	13
1.3. Patogénesis.....	14
1.4. Tratamiento	14
1.5. Clasificación histológica.....	15
1.5.1. Carcinomas serosos de alto grado (HGSC)	15
1.5.1.1. Características clínicas	15
1.5.1.2. Características patológicas	15
1.5.1.3. Alteraciones moleculares	16
1.5.1.4. Respuesta al tratamiento	16
1.5.1.5. Pronóstico y supervivencia	17
1.5.2. Carcinomas de células claras (CCC)	17
1.5.2.1. Características clínicas	17
1.5.2.2. Características patológicas	17
1.5.2.3. Alteraciones moleculares	18
1.5.2.4. Respuesta al tratamiento	19
1.5.2.5. Pronóstico y supervivencia	20
1.5.3. Carcinomas endometrioides (EC)	21
1.5.3.1. Características clínicas	21
1.5.3.2. Características patológicas	21
1.5.3.3. Alteraciones moleculares	21
1.5.3.4. Respuesta al tratamiento	22
1.5.3.5. Pronóstico y supervivencia	22
2. ENDOMETRIOSIS.....	23
2.1. Etiología.....	23
2.2. Características patológicas.....	23
2.3. Asociación con cáncer.....	24
2.3.1. Riesgo de cáncer.....	25
2.3.2. Transformación maligna.....	26
2.4. Microambiente	27
2.4.1. Genético	27
2.4.2. Hormonas esteroideas	28
2.4.3. Inflamación.....	29
2.4.4. Angiogénesis.....	30
2.4.5. Hierro y estrés oxidativo.....	31
3. RHO GTPASAS.....	33
3.1. Estructura y regulación	33
3.1.1. Estructura	33
3.1.2. Regulación	34
3.1.3. RHO GDIs	34
3.2. Funciones y vías de señalización	35
3.2.1. Efectores de las proteínas RHO	36
3.2.2. Funciones bioquímicas	37
3.2.2.1. Filamentos de actina.....	37
3.2.2.2. Microtúbulos.....	37
3.2.2.3. Tráfico intracelular.....	38

3.2.2.4. Expresión génica	38
3.2.3. Funciones biológicas.....	39
3.2.3.1. Ciclo celular	39
3.2.3.2. Morfogénesis	40
3.2.3.3. Migración celular	41
3.2.3.4. Fagocitosis.....	42
3.3. Proteínas RHO y cáncer.....	43
3.3.1. CDC42 y transformación celular	44
3.3.2. Invasión tumoral y metástasis	45
3.3.3. Las proteínas RHO como dianas terapéuticas	46
HIPÓTESIS	49
OBJETIVOS	51
RESULTADOS.....	53
1. ARTÍCULO 1	53
2. ARTÍCULO 2	54
DISCUSIÓN	71
1. PROTEÍNAS RHO Y DISEMINACIÓN TUMORAL	71
2. DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO.....	72
3. ENDOMETRIOSIS COMO LESIÓN PRECURSORA	74
4. MICROAMBIENTE ENDOMETRIÓTICO Y TUMORAL	75
5. MACRÓFAGOS Y FAGOCITOSIS	76
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	81

ABREVIATURAS

ACE2, *angiotensin I converting enzyme 2*

ADN, ácido desoxirribonucleico

AID, *autoinhibitory domain*

AKT, *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*

APC, *adenomatous polyposis coli*

ARF, *ADP Ribosylation Factor*

ARID1A, *AT rich interactive domain 1A*

ARN, ácido ribonucleico

BAF250a, *AT rich interactive domain 1A*

BRCA, *breast cancer gene*

CA125 (MUC16), *mucin 16, cell surface associated, ovarian cancer antigen*

CCC, *clear cell carcinoma*

CD163, *hemoglobin scavenger receptor*

CDC42, *cell division cycle 42*

CDC42BPB, *CDC42 binding protein kinase beta*

Cdk, *cyclin-dependent kinase*

C-FOS, *cellular oncogene C-FOS*

C-JUN, *jun proto-oncogene*

C-MYC, *v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*

COPI, *coat protein complex*

COX-2, *ciclooxigenasa 2*

CSF1, *colony stimulating factor 1*

C-t, *extreme carboxilo terminal*

CTNNB1, *catenin (cadherin-associated protein), beta 1*

DPPIV, *dipeptidyl-peptidase 4*

E2F, *E2F transcription factor*

EC, *endometrioid carcinoma*

EGFR, *epidermal growth factor receptor*

EM, *endometriosis*

ER, *receptor de estrógenos*

ERK, *extracellular signal-regulated kinase*

FAK, *focal adhesion kinase*

FIGO, *International Federation of Gynecology and Obstetrics*

Flk-1, *fetal liver kinase 1*

GAP, *GTPase-activating protein*

GBD, *GTPase-binding domain*

GDI, *GDP dissociation inhibitor*

GDP, *guanosin difosfato*

GEF, *guanine nucleotide exchange factor*

GGA, *geranyl-geranyl acetona*

GPC3, *glypican 3*

GSK3 β , *glycogen synthase kinase 3 beta*

GTP, *guanosin-5'-trifosfato*

Hb, *hemoglobina*

HGF, *hepatocyte growth factor*

HGSC, *high-grade serous carcinoma*

HIF1 α , *hypoxia inducible factor 1, alpha subunit*

HMGA2, *high mobility group AT-hook 2*

HMG-CoA, *3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A*

hMSH6, *mutS homolog 6*

HNF-1 β , *hepatocyte nuclear factor homeobox B*

Hp, haptoglobina

ID4, *inhibitor of DNA binding 4, dominant negative helix-loop-helix protein*

IGF, *insulin-like growth factor*

IL, interleucina

IPA-3, *p21-activated kinase inhibitor 3*

JNK, *c-Jun N-terminal kinase*

Ki67 (MKI67), *antigen identified by monoclonal antibody Ki-67*

KRAS, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LGSC, *low-grade serous carcinoma*

MAPK, *mitogen-activated protein kinase*

MC, *mucinous carcinoma*

mDia (DIAPH), *mammalian diaphanous-related formin*

MDM2, *MDM2 oncogene, E3 ubiquitin protein ligase*

MET, *met proto-oncogene*

MIF, *macrophage migration inhibitory factor*

MMP, *matrix metallopeptidase*

MTOC, *microtubule-organizing center*

NF2, *neurofibromatosis gene 2*

NF- κ B, *nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells*

N-t, extremo amino terminal

OP18 (STMN1), *stathmin 1*

p16 (CDKN2A), *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*

p21, (CDKN1A), *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*

p27, (CDKN1B), *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*

p38, *p38 mitogen-activated protein kinase*

PAK, *p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase*

PDGF, *platelet-derived growth factor*

PK1, *pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1*

PGE2, *prostaglandina E2*

PI3K, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PIK3CA, *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha*

PIP3, *fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato*

PR, *receptor de progesterona*

PTEN, *phosphatase and tensin homolog*

RAB, *miembro de la familia de oncogenes RAS*

RAC1, *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RAN, *RAS-related nuclear protein*

RANTES (CCL5), *chemokine (C-C motif) ligand 5*

RAS, *rat sarcoma viral oncogene homolog gene*

RHO, *ras homolog gene*

ROCK, *Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase*

ROS, *reactive oxygen species*

SF1, *splicing factor 1*

Src, *v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog*

SRF, *serum response factor*

STAT, *signal transducer and activator of transcription (acute-phase response factor)*

STIC, *serous tubal intraepithelial carcinoma*

Tf, *transferrina*

TGF β , *transforming growth factor beta*

TNF α , *tumor necrosis factor A*

TP53, *tumor protein p53*

UGT1A1, *UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1*

VEGF, *vascular endothelial growth factor*

Wnt, *wingless-type MMTV integration site family*

WT1, *Wilms tumor*

INTRODUCCIÓN

1. Carcinoma de ovario

Los carcinomas de ovario son tumores epiteliales malignos cuyo origen históricamente se ha atribuido a la superficie del ovario. El carcinoma es el tipo de tumor ovárico más común entre mujeres en edad adulta, representa el 90 % de los tumores ováricos y es el tumor ginecológico más letal ¹. Se trata de un grupo heterogéneo de tumores con distinto comportamiento y diferencias en las características clínico-patológicas. Según el grado de proliferación, atipia nuclear y presencia o ausencia de invasión estromal se clasifican en benignos, *borderline* (intermedios) o malignos (carcinomas). Según el tipo celular predominante, su histología, se pueden diferenciar cinco tipos principales de carcinomas: seroso de alto grado (HGSC), endometriode (EC), de células claras (CCC), mucinoso (MC) y seroso de bajo grado (LGSC) ². Los diferentes tipos histológicos pueden considerarse enfermedades distintas, ya que presentan diferentes alteraciones moleculares y diferencias en su manifestación clínica, progresión, respuesta al tratamiento y supervivencia ³. Por ello, el estudio del origen y de la patogénesis de cada uno de ellos es de gran importancia para personalizar el tratamiento considerando cada tipo tumoral como una enfermedad única.

1.1. Etiología

Tradicionalmente se ha aceptado que las células tumorales del carcinoma de ovario derivan de lesiones *in situ* del epitelio de la superficie ovárica (mesotelio) y de inclusiones quísticas de este epitelio. La transformación maligna del mesotelio se ha explicado gracias a la teoría de la ovulación incesante, entre otras, según la cual en cada ovulación hay una rotura del epitelio ovárico seguida de una proliferación reparativa. La continua reparación propiciaría la acumulación de mutaciones que darían lugar a carcinomas. La estimulación hormonal y la inflamación producidas por la ovulación aumentarían la susceptibilidad de este epitelio para adquirir mutaciones en proto-oncogenes y genes supresores de tumores. Los cambios metaplásicos en el mesotelio darían lugar a diferentes tipos de células desarrollándose así los distintos tipos tumorales (HGSC, EC, CCC y MC). Estos tumores se asemejan al epitelio de las trompas de Falopio, el endometrio y el tracto gastrointestinal o

el endocérvix, respectivamente. En contra de esta teoría está el hecho de que trompas de Falopio, endometrio y cérvix son derivados de los conductos müllerianos, mientras que el ovario se desarrolla a partir del epitelio mesodérmico. Otra teoría propone que los tumores de fenotipo mülleriano (HGSC, EC y CCC) derivan de los conductos de Müller y no del ovario. En los últimos años se ha sugerido que algunos tumores primarios se podrían originar en otros órganos de la pelvis y llegar al ovario desde éstos, lo que explicaría los pocos casos descritos de lesiones precursoras encontradas en el ovario. Se ha propuesto que la lesión precursora de los HGSC se encuentra en las fimbrias de la trompa de Falopio, mientras que los CCC y EC derivan de la endometriosis (EM) ovárica ⁴⁻⁶.

En 2001 se describieron por primera vez los carcinomas *in situ* de las trompas de Falopio, posteriormente conocidos como carcinomas serosos intraepiteliales del tubo (STIC), los cuales poseían un gran parecido a los HGSC del ovario ⁷. Se ha postulado que estos tumores se desprenden de la pared de las trompas, viajan como una masa celular y se implantan en la superficie del ovario. A pesar de que inicialmente se encontraron STIC en mujeres con predisposición genética a cáncer de ovario (portadoras de mutaciones en los genes *BRCA*), más tarde también se detectaron en mujeres sin cáncer de ovario o con cáncer de ovario esporádico no familiar. Además, se han identificado las mismas mutaciones de *TP53* en el STIC y en el HGSC asociado. Algunos autores señalan que a partir del epitelio de las fimbrias implantado en la superficie del ovario se forman inclusiones quísticas a partir de las cuales se desarrollarían los LGSC y los HGSC ⁸⁻¹⁰.

Hay evidencias moleculares y epidemiológicas que indican que tanto los CCC como los EC se desarrollan a partir de la EM ovárica. Por un lado, los CCC y los EC se encuentran más frecuentemente asociados a EM que otros tipos de carcinomas ováricos ^{11,12}. De hecho, la histología de los tumores asociados a EM (40-55 % CCC, 20-40 % EC, y < 10 % serosos y MC) es diferente a la que presentan todos los cánceres en general (70 % HGSC, 10 % EC, 10 % CCC, 3 % MC y < 5% LGSC) ^{2,13}. Además, se han descrito áreas de transición entre la EM benigna y los carcinomas de ovario pasando por EM atípica ¹¹. Estudios de genotipado y análisis mutacionales han identificado las mismas alteraciones genéticas en la EM y los carcinomas asociados en genes como *PTEN* ¹⁴, *PIK3CA* ¹⁵ y *ARID1A* ¹⁶.

1.2. Diagnóstico

La dificultad de detectar el cáncer de ovario radica principalmente en el hecho de ser una enfermedad asintomática. Los síntomas que presentan las pacientes no son específicos de esta enfermedad por lo que a menudo se asocian a diversas patologías. Además, suelen presentarse cuando la enfermedad ya está avanzada. Es posible diferenciar, atendiendo a los síntomas y con una alta sensibilidad y especificidad, pacientes con cáncer de ovario en estadios avanzados (según la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia, FIGO) de mujeres sanas o con tumores benignos, pero no casos en estadios bajos¹⁷. Desde los años 70 se intenta encontrar un método para diagnosticar el cáncer de ovario en sus primeros estadios debido a que 2/3 de los tumores se detectan una vez están diseminados, lo que hace que la mortalidad de las pacientes sea elevada¹. El desarrollo de una técnica de detección precoz mejoraría el pronóstico de las pacientes y su calidad de vida ya que se ha demostrado el éxito de los tratamientos (cirugía y quimioterapia combinada) en los casos diagnosticados en estadios bajos¹⁸. De hecho, los cánceres detectados por técnicas de cribado presentan mejor pronóstico que aquellos cánceres detectados clínicamente^{19,20}.

Los niveles del marcador CA125 se utilizan para la detección inicial y para la monitorización de las pacientes tras el tratamiento. CA125 (también llamado mucina 16) está codificado por el gen *MUC16*. Es una proteína glicosilada de alto peso molecular que, como otras mucinas, es secretada por células epiteliales formando una barrera que recubre la superficie del epitelio. Aunque también se expresa en células normales, los niveles en células epiteliales de cáncer de ovario son más elevados²¹. Un 80 % de las pacientes con tumores en estadios avanzados presentan niveles de CA125 elevados en el momento del diagnóstico. Sin embargo, esto solo ocurre en un 50 % de las pacientes con tumores en estadio I. Por otro lado, a pesar de que los niveles de CA125 se utilizan para detectar recurrencias antes de la aparición de nuevos síntomas, en pacientes asintomáticas estos niveles se asocian a otras causas (como la ansiedad), lo cual impide que estas mujeres sean candidatas para una segunda cirugía u otras terapias²². No obstante, se están haciendo esfuerzos por encontrar marcadores con una mayor sensibilidad y especificidad²³, tanto en el campo de la genómica como en el de la proteómica²⁴⁻²⁷.

En cáncer de ovario no se ha descrito un modelo de progresión tumoral satisfactorio para entender mejor los acontecimientos que llevan al desarrollo de un carcinoma invasivo a

partir de una lesión premaligna. De ahí la importancia de estudiar las lesiones precursoras conocidas de los distintos subtipos de carcinoma de ovario.

1.3. Patogénesis

Uno de los mayores problemas del cáncer de ovario es que no se conoce su patogénesis. Recientemente se ha propuesto un modelo dual en el que se dividen los tumores en dos grupos. El tipo I comprende los LGSC, EC, CCC y transicionales o de Brenner. Mientras que los de tipo II son los HGSC, indiferenciados y carcinosarcomas. La existencia de dos vías de tumorigénesis daría lugar a esta clasificación, según la cual los tumores de tipo I se originan a partir de precursores conocidos, tales como tumores *borderline*, cistoadenomas, adenofibromas y EM. Estos tumores suelen ser grandes, encontrarse en el ovario en el momento del diagnóstico y presentar un bajo índice de proliferación. En cambio, no se conoce la lesión precursora de los tumores de tipo II y se ha propuesto que se desarrollan *de novo* a partir de la superficie ovárica o de inclusiones de ésta. Tienen un alto índice de proliferación, invaden otros órganos y son más agresivos ²⁸. Recientemente se han identificado dos grupos de HGSC con diferente perfil molecular en un estudio de expresión génica, lo que sugiere que el grupo de tumores malignos de ovario es altamente heterogéneo y que limitarlo a dos grupos (tipo I y II) es artificial ²⁹.

1.4. Tratamiento

El tratamiento estándar de las pacientes con tumores ováricos en estadio I y II es la cirugía ³⁰ mientras que en el caso de tumores en estadio avanzado el tratamiento es la combinación de paclitaxel y cisplatino o carboplatino ³¹.

El paclitaxel es un fármaco antitumoral del grupo de los taxanos que inhibe la despolimerización de microtúbulos y, por tanto, bloquea la mitosis. Por otro lado, los fármacos basados en el platino como son el cisplatino y el carboplatino, actúan provocando defectos en la cadena de ADN que conducen a su reparación o a la muerte celular. Estas drogas citotóxicas son efectivas contra células proliferativas.

1.5. Clasificación histológica

Los tumores de ovario se clasifican en benignos, *borderline* o malignos según el grado de proliferación celular, atipia nuclear y presencia o ausencia de invasión estromal. Teniendo en cuenta la histología, el perfil inmunohistoquímico y las alteraciones genéticas, se pueden diferenciar cinco subtipos de carcinoma mayoritarios: HGSC, EC, CCC, MC y LGSC ^{2,32}. Estos cinco subtipos histológicos expresan de forma diferencial un panel de marcadores inmunohistoquímicos, algunos de los cuales se correlacionan con la supervivencia, apoyando así la idea de que se trata de cinco enfermedades diferentes ³.

Debido a que este trabajo se centra en los HGSC, CCC y EC, en este apartado solo se describirán las principales características clínicas y patológicas de estos tres tipos histológicos.

1.5.1. Carcinomas serosos de alto grado (HGSC)

1.5.1.1. Características clínicas

La edad media de las pacientes diagnosticadas de HGSC es de alrededor de 54-60 años y el rango de edad varía entre 23 y 82 años. Más del 80 % de estos tumores se diagnostican fuera del ovario ^{33,34}.

1.5.1.2. Características patológicas

Los HGSC son los carcinomas más frecuentes, representan el 70-80 % de todos los carcinomas de ovario y suelen presentarse en estadios avanzados (Tabla 1).

Tabla 1. Características patológicas de pacientes con HGSC

Estadio FIGO	Frecuencia (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
I	8-17	80-92
II	3-13	73
III	62-80	34
IV	10-16	4

Macroscópicamente, son tumores grandes, sólidos, de superficie rugosa o quística. Al microscopio se caracterizan por presentar un epitelio altamente estratificado y crecimiento en papilas (Figura 1). Las células son de tamaño intermedio exceptuando algunas células gigantes minoritarias, mononucleares y con nucléolo prominente. Tienen un alto índice de proliferación y suelen presentar focos de necrosis y hemorragia ^{2,32}.

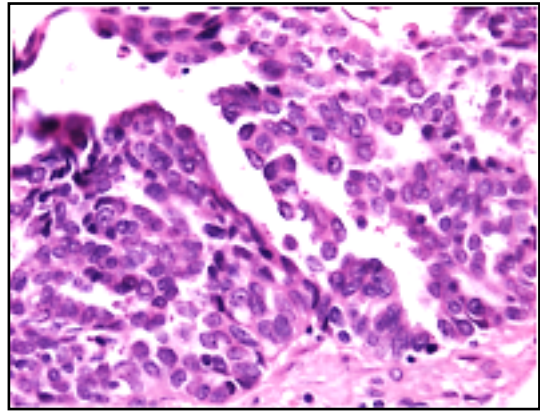


Figura 1. Histología de un carcinoma seroso de alto grado. Fotografía tomada a 400 aumentos.

1.5.1.3. Alteraciones moleculares

La alteración más característica de los HGSC es la mutación del gen *TP53*, identificada en aproximadamente el 97 % de los casos. Prácticamente el total de los tumores presentan una disfunción en la vía de p53 ya que en los que no se ha encontrado la mutación, se han identificado alteraciones en otros genes de la vía como la amplificación de *MDM2*. Se cree que la alteración de esta vía es clave en la patogénesis de los HGSC ³⁵. Muchos de estos tumores muestran mutaciones germinales o somáticas en los genes *BRCA1* o *BRCA2* y la expresión desregulada de pequeñas moléculas de ARN (microARN), independientemente de si tienen o no mutaciones en los genes *BRCA* ³⁶. Otra característica molecular de los HGSC es la alteración en el número de copias génicas, amplificaciones y deleciones en el ADN ³⁷. La sobreexpresión del gen *HMG2*, una proteína de unión al ADN, también está asociada a este tipo histológico ³⁸.

Estos tumores se caracterizan por ser positivos para la inmunotinción de p53, WT1, BRCA1, p16 y Ki-67 ².

1.5.1.4. Respuesta al tratamiento

Alrededor de un 70 % de las pacientes responden a la quimioterapia ³⁹. Los tumores de estas pacientes presentan una expresión génica diferente a los de aquellas mujeres que no responden al tratamiento. Se ha apuntado que los mecanismos implicados en la resistencia a la quimioterapia son la proliferación celular, la entrada y salida de drogas a la célula, la apoptosis y la inflamación ⁴⁰.

1.5.1.5. Pronóstico y supervivencia

La supervivencia global de las pacientes con HGSC a los 5 años disminuye considerablemente al aumentar el estadio (Tabla 1) ³⁹. Recientemente se han identificado dos grupos de pacientes con diferente probabilidad de supervivencia según la expresión de genes de la vía de señalización PI3K-AKT ²⁹.

1.5.2. Carcinomas de células claras (CCC)

1.5.2.1. Características clínicas

La media de edad de las pacientes con CCC es de entre 52 y 57 años y su rango de edad varía entre los 23 y 91 años. Estos tumores representan aproximadamente el 10 % de los carcinomas de ovario y se diagnostican con mayor frecuencia en estadios bajos (I y II). El 50 % de las pacientes presentan tumores en estadio I, el 10 % en estadio II, el 30 % en estadio III y el 10 % en estadio IV ^{41,42}.

1.5.2.2. Características patológicas

Los CCC son tumores sólidos que forman masas quísticas. Las células crecen formando papilas y frecuentemente se observan deposiciones hialinas en el estroma. Se caracterizan por la presencia de células claras, también llamadas células en anillo, las cuales tienen abundante glucógeno en el citoplasma (Figura 2). El 20-25 % de los CCC se encuentra asociado a EM y, junto con los EC, son los subtipos que con mayor frecuencia presentan esta asociación. Las pacientes con carcinomas asociados a EM presentan características diferentes a aquellas sin EM: tumores en estadios más bajos, de menor grado, y mejor supervivencia global ^{43,44}.

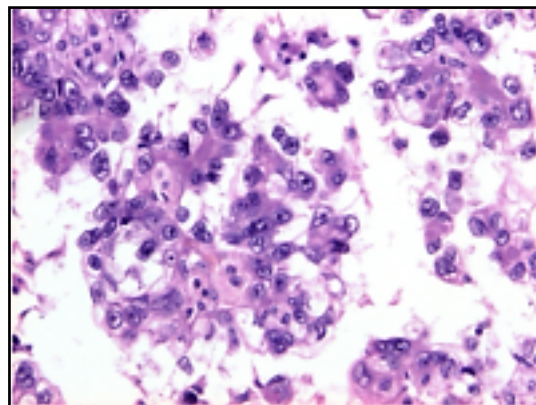


Figura 2. Histología de un carcinoma de células claras. Fotografía tomada a 400 aumentos.

1.5.2.3. Alteraciones moleculares

Los CCC son el tipo histológico más enigmático, pues hasta hace pocos años no se conocían alteraciones moleculares características de estos tumores. Recientemente se han identificado mutaciones y alteraciones en la expresión de genes supresores de tumores y en proto-oncogenes que podrían contribuir a la carcinogénesis de los CCC.

Uno de los marcadores moleculares característico de los CCC es el factor de transcripción HNF-1 β , el cual está sobreexpresado en prácticamente el 100 % de los casos analizados. Se ha sugerido que la hipometilación del promotor sería el mecanismo responsable de su sobreexpresión ⁴⁵, identificada también en tumores benignos, *borderline*, en quistes endometrióticos asociados a carcinoma y en EM atípica. Estos resultados sugieren que HNF-1 β participa en la carcinogénesis de los CCC a partir de EM. De hecho, la inhibición de HNF-1 β con ARN de interferencia induce apoptosis en líneas celulares de CCC ^{46,47}. El perfil génico de los CCC muestra la sobreexpresión de una serie de genes cuyo efecto biológico global es el aumento de la síntesis de glucógeno, el aumento de señales apoptóticas, la inhibición de la proliferación y el aumento de la resistencia a quimioterapia. Muchos de estos genes son dianas de HNF-1 β . Por ejemplo los genes de la glucosa-6-fosfatasa, glucoquinasa y dipeptidil peptidasa IV (DPPIV), enzimas implicados en el metabolismo de la glucosa y cuya expresión alterada podría explicar la acumulación de glucógeno en el citoplasma de las células claras. El enzima convertidor de angiotensina 2 (ACE2) está sobreexpresado en CCC e induce la síntesis de ferritina y la deposición de hierro, lo que inhibe la proliferación celular. Esto podría explicar el bajo índice de proliferación de estos tumores. Otro gen diana de HNF-1 β , la anexina 4, se ha asociado a la resistencia a paclitaxel, al igual que la sobreexpresión de UDP-glucosiltransferasa (UGT1A1), que también contribuye a la quimioresistencia debido a que es un enzima de detoxificación ⁴⁸.

PIK3CA se encuentra mutado en un 43-46 % de los CCC y en un 90 % de estos casos se ha identificado la misma mutación en la EM asociada. Los CCC con mutación de *PIK3CA* muestran resultados positivos para la inmunotinción de AKT, lo que sugiere que las mutaciones en *PIK3CA* son el principal mecanismo de activación de la vía PI3K-AKT. También se han identificado mutaciones de *PIK3CA* en EM adyacente a CCC, por lo que probablemente participe en la transformación maligna de la EM ^{15,49}.

Se han encontrado mutaciones en el gen *ARIDIA* en el 46-57 % de los CCC analizados. La pérdida de expresión de la proteína BAF250a codificada por este gen se ha identificado en los carcinomas y en la EM atípica contigua al tumor pero no en EM distante. Por ello se ha sugerido que este gen supresor de tumores podría estar implicado en la transformación maligna de EM a cáncer^{50,51}. BAF250a se une a secuencias del ADN ricas en AT y forma parte de un complejo proteico de remodelación de la cromatina que regula la expresión génica.

Recientemente se ha descrito la amplificación génica del proto-oncogén *MET* en el 37 % de los CCC analizados. *MET* se ha descrito como un proto-oncogén que codifica el receptor de HGF, el cual tiene actividad tirosina quinasa. También se ha descrito la amplificación génica de *AKT2* (8 %) en los CCC, una proteína diana de la vía de señalización MET-PIK3CA. *MET* podría estar implicado en la carcinogénesis de los CCC ya que su silenciamiento reduce la viabilidad celular al aumentar la apoptosis y la senescencia. De hecho, la amplificación de *MET* está asociada con un peor pronóstico⁵².

Glipican-3 (GPC3) es una glicoproteína de la superficie celular que podría explicar en parte el comportamiento agresivo de los CCC. Es una proteína de adhesión celular que también participa en la señalización regulando procesos como el crecimiento celular y la apoptosis. La inmunotinción para esta proteína es positiva en un 44 % de los CCC mientras que no se expresa o lo hace con baja frecuencia en otros tipos histológicos⁵³. En líneas celulares y en ratones con metástasis peritoneal se ha demostrado que el silenciamiento de la expresión de *GPC3* induce sensibilidad al paclitaxel al activarse la apoptosis⁵⁴.

El perfil inmunohistoquímico característico de los CCC muestra positividad para HNF-1 β y p21, y bajos niveles de BAF250a, ER, PR, WT1, p53 y Ki-67. Algunos de estos marcadores son de utilidad para diferenciarlos de los HGSC^{3,16,55}.

1.5.2.4. Respuesta al tratamiento

Las pacientes con CCC reciben el tratamiento estándar de quimioterapia basada en cisplatino o carboplatino y taxanos. Un bajo porcentaje de pacientes con la enfermedad en estadios avanzados responden al tratamiento (11-45 %) y además presentan una elevada incidencia de enfermedad progresiva (82 %), al contrario de lo que ocurre en el caso de pacientes con HGSC. Se ha demostrado que la quimioterapia basada en platino no mejora la supervivencia de estas pacientes. De hecho, estudios con líneas celulares de CCC indican que estas células muestran resistencia al platino⁵⁶. Se han descrito diversos

mecanismos que podrían estar detrás de la quimioresistencia en las pacientes con CCC, entre ellos, la baja acumulación de droga, la elevada detoxificación de ésta y el aumento en la reparación del ADN³³. Es por ello que se están buscando, sobre todo a nivel molecular, nuevos tratamientos efectivos y específicos para estas pacientes. Se están analizando inhibidores para HNF-1 β y para algunas de sus proteínas dianas en las diversas vías de señalización en las que está implicado⁵⁷. También se ha demostrado que la terapia génica con virus es efectiva en líneas celulares de CCC⁵⁸.

1.5.2.5. Pronóstico y supervivencia

El estadio es el factor pronóstico más predictivo en estas pacientes, tal como se ha descrito en varios estudios en los que se ha analizado el porcentaje de recidivas, la supervivencia libre de enfermedad y la supervivencia global según el estadio tumoral (Tabla 2).

Tabla 2. Características clínico-patológicas de pacientes con CCC

Estadio FIGO	Recidivas (%)	Supervivencia libre de enfermedad (%)	Supervivencia global (%)
I	29	84	88
II	30	57	70
III	62	25	33
IV	73	0	0

Las pacientes con tumores CCC en estadio avanzado (III y IV) presentan mal pronóstico. La probabilidad y el tiempo medio de supervivencia es menor que en aquellas pacientes con HGSC, sobre todo cuando la enfermedad se diagnostica en estadio III^{39,42}. No existen diferencias, en cambio, cuando se trata de tumores en estadios bajos⁵⁹.

1.5.3. Carcinomas endometrioides (EC)

1.5.3.1. Características clínicas

Son más comunes en mujeres en edad perimenopáusica, siendo la media de edad de 54 años. Las mujeres con EC asociado a EM suelen ser 5-10 años más jóvenes que las que no presentan EM ⁶⁰.

1.5.3.2. Características patológicas

Representan el 10-20 % de los carcinomas ováricos y hasta un 40 % de los casos están asociados a EM. Estudios moleculares evidencian que estos tumores se originan a partir de EM y no del epitelio de la superficie ovárica ⁶¹. Además, se han descrito casos de transición directa entre EM atípica y EC o CCC ¹¹. Frecuentemente se detectan en estadio I o II (Tabla 3). Macroscópicamente suelen medir entre 10-20 cm de diámetro, son masas sólidas predominantemente quísticas. Histológicamente son similares a los carcinomas de endometrio: presentan glándulas redondas, ovales o tubulares sobre un epitelio estratificado (Figura 3). Típicamente muestran diferenciación escamosa (30-50 % de los casos) ⁶⁰.

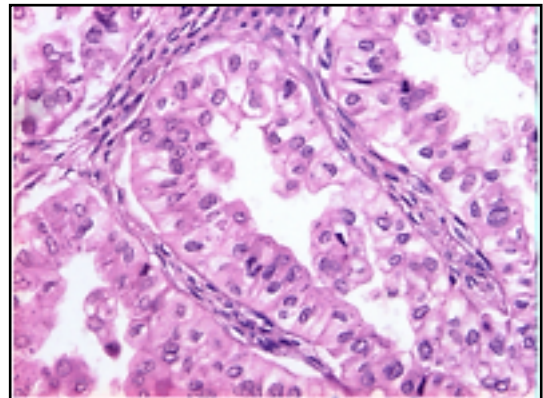


Figura 3. Histología de un carcinoma endometriode. Puede apreciarse el epitelio de las glándulas. Fotografía tomada a 400 aumentos.

1.5.3.3. Alteraciones moleculares

Las alteraciones moleculares más frecuentes en los EC se encuentran en el gen de la β -catenina (*CTNNB1*) y en el gen supresor de tumores *PTEN*. La incidencia de mutaciones en *CTNNB1* es del 38 % ⁶². El 20 % de los EC tienen mutaciones en *PTEN* y un 42 % presenta pérdidas de heterocigosidad de este gen ⁶¹. La inactivación de *PTEN*, por tanto, es un rasgo característico de los EC que lleva a la activación de la vía de señalización PI3K-AKT, provocando inhibición de la apoptosis celular. Es tal la importancia de esta alteración que ratones con EM y mutaciones en *KRAS* desarrollaron EC tras la deleción de *PTEN* ⁶³.

La inestabilidad de microsatélites debida a defectos en genes de reparación del ADN es otra alteración característica de los EC y se ha detectado en el 18-33 % de los casos ^{62,64}.

La pérdida de expresión de una de estas proteínas, hMSH6, se ha detectado en el 12 % de los EC y está asociada a los tipos histológicos EC y CCC ⁶⁵.

Los EC comparten con los CCC algunas alteraciones implicadas en la transformación maligna de la EM, como las encontradas en el gen *ARID1A*, las cuales se han descrito en un 30 % de los EC analizados ⁵⁰. La mutación o amplificación génica de *PIK3CA* se ha descrito en el 45 % de los EC y CCC y la mutación se ha encontrado en el 20 % de estos tumores ⁶⁶.

Al igual que los CCC, los EC son negativos para la inmunotinción de p53 y WT1, y presentan un índice de expresión de Ki-67 similar. Muestran tinción positiva para la metaloproteasa 7 (MMP-7), p21, ER y PR entre otros ³.

1.5.3.4. Respuesta al tratamiento

Las pacientes con EC reciben el mismo tratamiento que el resto de pacientes. Este tipo de tumor está asociado a buen pronóstico, probablemente, por diagnosticarse en estadios tempranos de la enfermedad (I o II) y presentar generalmente bajo grado.

1.5.3.5. Pronóstico y supervivencia

Al igual que en otros tipos histológicos, la supervivencia disminuye al aumentar el estadio (Tabla 3). Las pacientes con tumores de grado 1 o 2 tienen mayor probabilidad de supervivencia que las que tienen tumores de grado 3. Además, las pacientes con EC mixtos con CCC, HGSC o carcinomas indiferenciados tienen peor pronóstico ⁶⁰.

Tabla 3. Características clínico-patológicas de los EC

Estadio FIGO	Frecuencia (%)	Supervivencia a los 5 años (%)
I	31	78
II	20	63
III	38	24
IV	11	6

2. Endometriosis

La endometriosis (EM) se define como la presencia de tejido endometrial fuera de la cavidad uterina, frecuentemente en el peritoneo de la cavidad pélvica y en ovarios. En países occidentales la incidencia de EM es del 7-15 % entre mujeres en edad reproductiva y menos de un 2 % en mujeres con menopausia ⁶⁷. Afecta a un mayor número de mujeres en países desarrollados que en zonas subdesarrolladas y no hay relación entre la edad de diagnóstico y la severidad de la enfermedad. Algunos riesgos incluyen menarquia a una edad temprana, ciclos menstruales cortos, sangrado abundante durante la menstruación y nuliparidad ⁶⁰. Los antecedentes familiares también son un factor de riesgo ya que la incidencia de EM es mayor en mujeres con familiares afectadas que en el resto de la población ⁶⁸.

La EM se ha descrito como una enfermedad de herencia poligénica, codificada por varios genes, y aunque éstos no se conocen con exactitud, algunos estudios indican que está ligada a los cromosomas 7 y 10 pero no se han identificado genes relevantes en esta región ⁶⁹. Un estudio de asociación genómica con 1176 parejas de hermanas afectadas ha identificado una susceptibilidad significativa del locus 10q26 para la EM ⁷⁰.

2.1. Etiología

Existen dos hipótesis principales para explicar el origen de la EM: la teoría metastásica y la teoría metaplásica. La primera propone que durante la menstruación, pequeños fragmentos de endometrio pasan a través de las trompas de Falopio hacia la cavidad peritoneal, donde las células endometriales se implantan. La segunda teoría propone que las células mesoteliales del peritoneo se diferencian en tejido endometriótico al recibir la estimulación de sustancias liberadas por el endometrio durante la menstruación. Aunque existen otras, la teoría de la implantación es la más aceptada a pesar de que no explica por qué la EM no ocurre en todas las mujeres, teniendo en cuenta que la mayoría tienen reflujo endometrial hacia la cavidad peritoneal durante la menstruación ⁶⁷.

2.2. Características patológicas

La EM aparece en la superficie ovárica en forma de manchas de colores, desde rojo hasta marrón blanquecino, atribuidos a la sangre menstrual hemolizada y encapsulada por tejido

fibroso. La perforación del córtex ovárico da lugar al desarrollo de endometriomas (conocidos como quistes de chocolate). Son lesiones profundas que se vuelven quísticas, formadas por una cápsula fibrosa que contiene material marrón semifluido. También suelen encontrarse adhesiones fibrosas a las trompas de Falopio y otros órganos adyacentes. En casi un 50 % de los casos la EM suele afectar a ambos ovarios ⁶⁰.

En su primer estadio la EM ovárica es superficial y no quística. Tras la hemorragia, en los quistes endometrióticos el tejido endometrial suele reemplazarse por tejido fibroso. La EM ovárica, al igual que el endometrio eutópico, puede presentar pólipos e hiperplasia, desde simple hasta atípica. Histológicamente se caracteriza por la presencia de estroma o epitelio endometrial, hemorragia crónica y signos de inflamación (Figura 4).

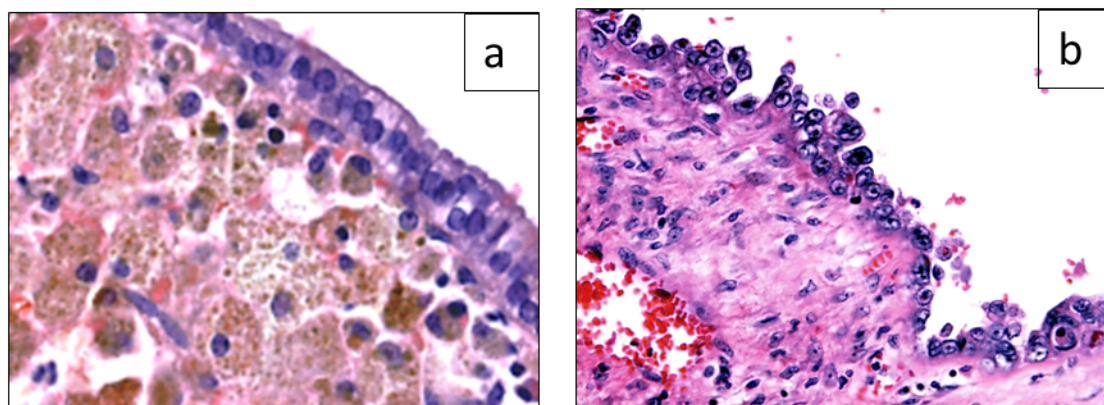


Figura 4. Endometriosis benigna y atípica. a) Epitelio endometriótico sin atipia celular. En el estroma pueden observarse deposiciones hemolíticas. b) Epitelio endometriótico con atipia celular. 400 aumentos.

2.3. Asociación con cáncer

Datos epidemiológicos, clínico-patológicos y moleculares sugieren que existe relación entre EM y cáncer de ovario. Los CCC y los EC son los subtipos que se encuentran asociados a EM con mayor frecuencia, por lo que la histología de los carcinomas de ovario asociados a EM (40-55 % CCC, 20-40 % EC y 10 % subtipos serosos y MC) difiere considerablemente de la histología encontrada en todos los cánceres de ovario ⁷¹⁻⁷³.

La EM atípica está considerada como una fase de transición entre la EM benigna y el tumor. De hecho, aproximadamente el 60 % de los carcinomas de ovario asociados a EM muestran EM atípica (Figura 4). Además, en un 25-30 % de estos casos se ha descrito una

transición directa desde EM benigna hasta EM atípica contigua al carcinoma. En un 23 % de los EC y un 36 % de los CCC se ha descrito EM atípica ^{11,72}.

Zonas de EM contiguas al tumor y el carcinoma presentan alteraciones comunes en genes como *PTEN*, *ARIDIA*, *KRAS* o *HNF-1 β* y las mismas pérdidas de heterocigosidad ^{47,50,61,74}. En cambio, algunas de estas alteraciones no se encuentran en EM distante, sugiriendo que los tumores se desarrollan a partir de células endometrióticas que han sufrido ciertos cambios genéticos.

Las células endometrióticas presentan el fenotipo característico de las células cancerosas (Tabla 4) ⁷⁵. Son consideradas potencialmente malignas y pueden sufrir un proceso de transformación neoplásica ^{75,76}. A pesar de estar descrita como una enfermedad benigna, la EM tiene la capacidad de invadir los tejidos de su alrededor e incluso de metastatizar en nódulos linfáticos y otros tejidos más allá de la cavidad abdominal ⁷⁷.

Tabla 4. Características fenotípicas de una célula cancerosa

1. Crecimiento independiente de señales
2. Insensibilidad a señales antiproliferativas
3. Evasión de la apoptosis
4. Potencial de replicación ilimitado
5. Angiogénesis mantenida
6. Invasión tisular y metástasis

2.3.1. Riesgo de cáncer

Existe cierta contradicción a la hora de señalar si hay o no riesgo de cáncer de ovario incrementado en mujeres con EM. Lo cierto es que si no hubiese asociación entre EM y cáncer de ovario, la incidencia de EM en mujeres con cáncer de ovario debería ser similar a la de la población general. La incidencia de EM en mujeres en edad reproductiva es de 7-15 % y menos de un 2 % en mujeres en edad postmenopáusica. Sin embargo, la incidencia de EM entre mujeres con cáncer de ovario es del 8-30 % ⁷⁶. Estos datos concuerdan con algunos estudios que apuntan que el riesgo de cáncer de ovario en mujeres con EM está aumentado ^{78,79}. Algunos señalan que además tienen un riesgo incrementado

de otros tipos de cáncer (endocrino, renal, de tiroides, mama o melanoma) ⁷⁹. Un estudio en población canadiense advierte que la presencia de EM es un riesgo que acelera la aparición de cáncer de ovario en 5.5 años, basándose en la edad de las pacientes (Tabla 5) ⁸⁰. En cambio, otros estudios no encuentran asociación entre EM y riesgo de cáncer de ovario ni de otro tipo de cáncer (mama, endometrio, cáncer de pulmón, del tracto urinario o melanoma), aunque sí describen un mayor riesgo de presentar linfoma no de Hopkins ⁸¹.

Tabla 5. Edad media (años) de pacientes con cáncer de ovario y/o endometriosis

EM	40 ± 10
Cáncer de ovario asociado a EM	48 ± 10
Cáncer de ovario	54 ± 11

2.3.2. Transformación maligna

En 1925 se publicó por primera vez que la EM podía sufrir transformación maligna ⁸² a través de una fase de transición de EM atípica. La incidencia de la transformación maligna de EM se estima en aproximadamente el 0.3-0.8 % ^{83,84}. Las alteraciones moleculares implicadas en dicha transformación pueden dividirse en tres grupos ⁸⁵:

1. Alteraciones comunes a EM y cáncer, las cuales suceden en un primer estadio de la carcinogénesis.
2. Alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores, típicas de cualquier tipo de cáncer.
3. Las específicas de los tumores asociados a la transformación de EM, como son los CCC y los EC.

Se ha propuesto un modelo de patogénesis de la transformación maligna de EM en el que el epitelio endometriótico sería el precursor de tumores, como sucede con la superficie del ovario. La influencia estrogénica de este epitelio daría lugar a EC, lo que se asemeja a la carcinogénesis del endometrio. El microambiente de los quistes endometrióticos (estrés

oxidativo e inflamación) daría lugar a CCC, tumores resistentes al estrés y de crecimiento lento ⁸⁵, los cuales habrían perdido la dependencia a estrógenos ⁸⁶.

La mayor frecuencia de aberraciones cromosómicas (aneuploidías) encontradas en los EC respecto a la EM contigua indica una expansión clonal de células aberrantes ya presentes en EM. Estas aberraciones parecen estar implicadas en la carcinogénesis de EC a partir de EM ⁸⁷. Diversos estudios apuntan que la inactivación de *PTEN* por pérdidas de heterocigosidad o por mutación está implicada en la transformación maligna de EM ^{61,88-90}. Ratones con EM y mutaciones en *KRAS* desarrollaron EC tras la delección de *PTEN* ⁶³.

Las mutaciones en *TP53* participarían en la transformación maligna de EM a CCC pero no a EC. Se han descrito mutaciones de *TP53* en EM asociada a CCC (30 %) mientras que no se observaron en EM solitaria (sin cáncer) ni en EM asociada a EC ⁹¹. La pérdida de expresión de receptores hormonales, del gen supresor de tumores *ARIDIA* y la sobreexpresión de HNF-1 β , se han descrito en CCC y en la EM asociada. Se ha apuntado a que la acumulación de estas alteraciones moleculares en la EM benigna daría lugar a EM atípica y posteriormente a CCC ^{16,47,50,86}.

2.4. Microambiente

La mayoría de mujeres tiene reflujo del tejido menstrual hacia la cavidad peritoneal pero la EM ocurre solo en el 5-10 % de estas mujeres. El endometrio normal (eutópico) de mujeres con EM es diferente al endometrio de mujeres sanas. Además, el ambiente de los quistes endometrióticos es notablemente distinto al del endometrio. Estas diferencias se dan a nivel genético, endocrino, inmunológico y en el metabolismo celular.

2.4.1. Genético

El endometrio eutópico y el endometrio ectópico de mujeres con EM muestran diferencias en la expresión de microARNs ⁹², de genes relacionados con la pluripotencialidad celular ⁹³, de oncogenes y de genes supresores de tumores ^{94,95}.

El endometrio ectópico presenta un menor nivel de apoptosis que el endometrio eutópico. Al contrario de lo que ocurre en el endometrio normal, no hay variación en la actividad apoptótica de las células endometrióticas durante el ciclo menstrual. Además, no hay

correlación entre la actividad apoptótica, proliferativa y los niveles de receptores de estrógenos y progesterona, como sí ocurre en el endometrio normal ⁹⁶. Por otro lado, hay una expresión aumentada de genes que regulan la supervivencia celular en el endometrio eutópico de mujeres con EM ⁹⁷.

2.4.2. Hormonas esteroideas

La EM es una enfermedad dependiente de estrógenos. En el tejido endometriótico hay un mayor nivel de estrógenos que en el endometrio normal causado por diversos factores ⁶⁷:

- El colesterol es la molécula precursora en la síntesis de estrógenos. Las mujeres con EM tienen niveles más elevados de colesterol que mujeres sanas ⁹⁸.
- La vía de producción de estrógenos está anormalmente activa debido a una elevada expresión de aromatasa, enzima que cataliza la síntesis de estrógenos y que normalmente no se expresa en el endometrio normal (Figura 5).
- En EM la expresión de enzimas de la vía esteroidogénica está estimulada por la prostaglandina E2 (PGE2). En endometrio normal la ausencia del factor de transcripción SF1 impide la expresión de estos genes ⁹⁹. WT1 es un represor transcripcional de estos enzimas y sus niveles en EM son bajos ¹⁰⁰.
- En mujeres con EM hay un exceso de producción de PGE2 (en endometrio eutópico y ectópico) que induce la síntesis local de estrógenos en los quistes endometrióticos.
- La ciclooxigenasa-2 (COX-2), enzima que cataliza la síntesis de prostaglandinas, está sobreexpresada en EM. Los niveles de COX-2 son más elevados en el endometrio eutópico de mujeres con EM que en el endometrio de mujeres sanas.
- La inactivación de estrógenos activos (estradiol) por oxidación está disminuida en el tejido endometriótico debido a una menor actividad de los enzimas responsables ¹⁰¹.
- La progesterona tiene un efecto antiestrogénico induciendo la inactivación de estradiol. El endometrio eutópico y el ectópico de mujeres con EM son resistentes a progesterona. En EM los niveles de PR son extremadamente bajos a pesar de que produce grandes cantidades de progesterona.

El hiperestrogenismo estimula el crecimiento de las células endometrióticas y está asociado a la transformación maligna de la EM ¹⁰².

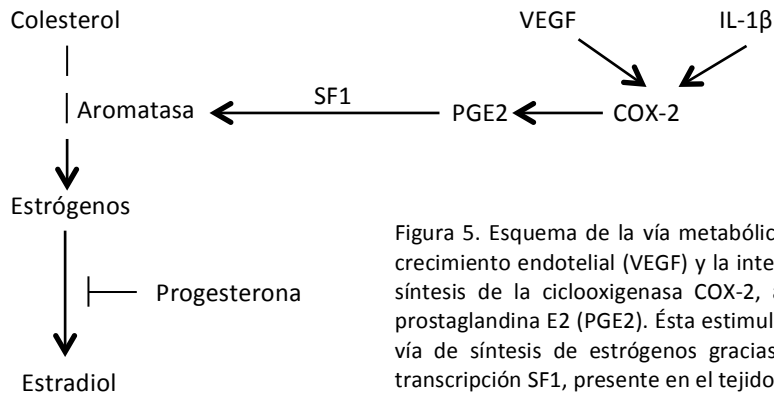


Figura 5. Esquema de la vía metabólica esteroidogénica. El factor de crecimiento endotelial (VEGF) y la interleucina 1 β (IL-1 β) estimulan la síntesis de la ciclooxigenasa COX-2, aumentando los niveles de la prostaglandina E2 (PGE2). Ésta estimula la expresión de enzimas de la vía de síntesis de estrógenos gracias a la presencia del factor de transcripción SF1, presente en el tejido endometriótico.

2.4.3. Inflamación

Un análisis genético de las vías de señalización implicadas en EM ovárica, peritoneal y cáncer de ovario ha revelado que las vías relacionadas con el sistema inmunitario e inflamación son las más comúnmente alteradas en EM ovárica, indicando que podrían jugar un papel esencial en su desarrollo ¹⁰³. Las mujeres con EM tienen una mayor prevalencia de enfermedades autoinmunitarias, estados de fatiga y dolor crónico. Alteraciones en la respuesta inmunitaria y la inflamación las predispondría a cáncer e infecciones ¹⁰⁴.

Los macrófagos son células monocíticas diferenciadas que pueden adquirir diferentes fenotipos durante la progresión tumoral: M1, macrófagos protumorales, proinflamatorios o de activación clásica, y M2, macrófagos antitumorales o de activación alternativa. Los M2 expresan el marcador CD163, un receptor para el complejo hemoglobina-haptoglobina asociado a un fenotipo fagocítico. Al inicio de una lesión los macrófagos crean un ambiente inflamatorio y cuando ésta progresa hacia una lesión tumoral éstos inhiben la respuesta antitumoral del sistema inmunitario y promueven la inflamación, la angiogénesis, la invasión tumoral y la metástasis a través de diversos mecanismos ¹⁰⁵.

Los macrófagos son las células monocíticas más abundantes en el líquido peritoneal y son esenciales para limpiar la cavidad peritoneal de restos endometriales. Las mujeres con EM

tienen una mayor infiltración de macrófagos en el endometrio eutópico y en el líquido peritoneal y, como consecuencia, un aumento en la síntesis y secreción de diferentes mediadores proinflamatorios: interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), TNF α , RANTES y factores de crecimiento (VEGF, IGF PDGF, CSF1, TGF β o HGF), los cuales están implicados en la patogénesis de la EM ^{106,107}.

Los macrófagos presentes en lesiones endometrióticas expresan el marcador CD163 de activación alternativa ¹⁰⁸. IL-4 es una citoquina típicamente secretada por estos macrófagos y se ha demostrado que estimula la proliferación de células estromales del tejido endometriótico ¹⁰⁹. IL-1 promueve la secreción de MIF, una citoquina proinflamatoria y protumorigénica que favorece la proliferación, migración y angiogénesis e inhibe la apoptosis. En el líquido peritoneal y en el tejido endometriótico de mujeres con EM se ha observado un aumento en la expresión y en la actividad proteica de MIF ¹¹⁰. El líquido peritoneal de mujeres con EM también tiene niveles de IL-8 significativamente más elevados que en mujeres sin EM. IL-8 estimula la expresión de COX-2 en macrófagos peritoneales y en células endometrióticas ¹¹¹. Estas células también producen niveles más elevados de IL-6 comparando con las células del estroma endometrial ¹¹².

2.4.4. Angiogénesis

Las lesiones endometrióticas se caracterizan por tener una densa vascularización creada por un proceso de angiogénesis. La expresión de factores de crecimiento y citoquinas en EM regula el reclutamiento y la proliferación de células endoteliales para la formación de nuevos vasos ¹¹³. Utilizando un modelo murino se ha demostrado que la angiogénesis promovida por neutrófilos y macrófagos ocurre en un estadio temprano de la EM ¹¹⁴. VEGF es un potente factor de crecimiento proangiogénico implicado en procesos de angiogénesis fisiológicos y patológicos ¹¹⁵ y es secretado por el endometrio eutópico, ectópico y por macrófagos peritoneales. Los niveles de VEGF y su receptor Flk-1, el número de macrófagos activados y el número de vasos son más elevados en tejido endometriótico que en endometrio eutópico ¹¹⁶. Recientemente se ha sugerido que el líquido peritoneal de mujeres con EM reduce la expresión de microARNs inhibidores de VEGF ¹¹⁷.

Se ha demostrado que el aumento en la síntesis y secreción de VEGF en EM está estimulado por citoquinas inflamatorias, sobretodo $TNF\alpha$ e $IL-6$ ¹¹⁴. $IL-1\beta$ secretada por macrófagos activa la expresión de VEGF e $IL-6$ en células del estroma endometriótico pero no en células endometriales debido a que las primeras tienen mayores niveles del receptor tipo 1 de $IL-1\beta$ ($IL-1$ RI). VEGF e $IL-6$ estimulan la proliferación de células endoteliales¹¹⁸. Otras citoquinas y factores de crecimiento sobreexpresados en EM como son $IL-8$ y $TGF\beta$ también promueven la angiogénesis¹⁰⁷.

2.4.5. Hierro y estrés oxidativo

Las mujeres con EM presentan un incremento sistémico del estrés oxidativo¹¹⁹. Durante el desarrollo de la EM grandes cantidades de sangre sufren hemólisis, dando lugar a elevados niveles de hierro libre, el cual puede oxidar proteínas y lípidos, causar daños en el ADN y alterar el ciclo celular aumentando el riesgo de cáncer (Figura 6).

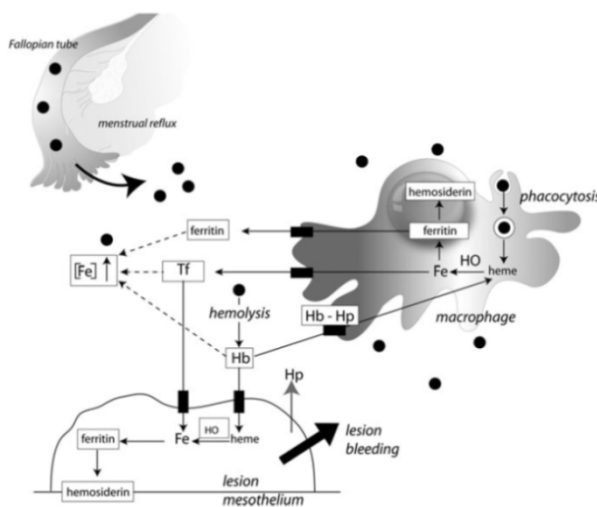


Figura 6. Origen del hierro en la cavidad pélvica de pacientes con endometriosis (extraído de DeFrère et al., 2008)¹¹⁶. Los eritrocitos llegan a la cavidad pélvica por menstruación retrógrada y hemorragia del tejido endometriótico. Muchos de ellos son fagocitados por macrófagos peritoneales. El hierro y la hemoglobina liberados por estos macrófagos pueden ser asimilados por las células endometrióticas, formándose en ellas depósitos de hierro y hemosiderina. Hb: hemoglobina; Hp: haptoglobina; Tf: transferrina.

El estrés oxidativo inducido por hierro afecta a células mesoteliales, endometrióticas, endoteliales y macrófagos. En el mesotelio peritoneal causa daños creando sitios para la implantación de las células endometrióticas, en las cuales el hierro promueve la proliferación celular. En macrófagos, las grandes cantidades de hierro adquiridas al fagocitar eritrocitos senescentes provocan su activación y la consecuente inflamación. Por otro lado, genera radicales libres en las células endoteliales y adhesión de monocitos a

éstas, promoviendo la respuesta angiogénica necesaria para el desarrollo de las lesiones endometrióticas ¹²⁰. En las células endometrióticas hay un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y una alteración de las vías de detoxificación comparando con endometrio normal. Los niveles endógenos elevados de ROS se correlacionan con el aumento de la proliferación celular ¹²¹.

3. RHO GTPasas

Las RHO GTPasas pertenecen a una familia de proteínas, llamadas proteínas G, que tienen actividad trifosfatasa de guanosina (o GTPasa). Son enzimas tipo hidrolasas capaces de unirse e hidrolizar moléculas de guanósín trifosfato (GTP). Estas proteínas están altamente conservadas y se encuentran en todas las células eucarióticas. Pertenecen a la superfamilia de proteínas RAS. En mamíferos existen alrededor de 60 miembros diferentes y se agrupan en cinco familias: RAS, RHO, RAB, ARF y RAN (Figura 7). Los 20 miembros de la familia de RHO se agrupan a su vez en 8 subfamilias. Los más conservados evolutivamente son RHOA, RAC1 y CDC42, que junto a RHOB y RHOC forman el grupo de las RHO GTPasas más estudiadas ¹²². Un 1% del genoma humano codifica proteínas que regulan o son reguladas por miembros de la familia de las RHO GTPasas ¹²³.

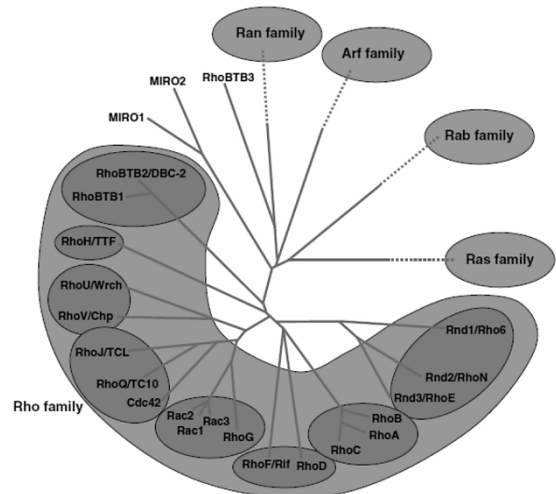


Figura 7. Árbol filogenético de las proteínas de la superfamilia RAS (extraído de Vega and Ridley, 2008) ¹⁶⁶.

3.1. Estructura y regulación

3.1.1. Estructura

Las RHO GTPasas son proteínas G monoméricas y reciben el nombre de pequeñas GTPasas (*small GTPases*) debido a su bajo peso molecular (entre 20 y 40 kD). Están formadas por entre 190 y 250 aminoácidos y su estructura consta de una pequeña región en el extremo N-terminal (N-t), un dominio GTPasa central y extensiones en el extremo C-terminal (C-t). Las RHO GTPasas se diferencian de otras pequeñas GTPasas por poseer un dominio tipo RHO localizado dentro del dominio GTPasa. La mayoría de estas proteínas sufren modificaciones post-transcripcionales por adición de lípidos isoprenoides en la caja CAAX que poseen en el extremo C-t. Dichas modificaciones son cruciales para realizar su función, ya que facilitan su localización subcelular y su asociación con proteínas reguladoras ^{124,125}.

3.1.2. Regulación

Las RHO GTPasas son interruptores celulares cuya actividad está altamente regulada. Ciclan entre una forma activa, unida a GTP, y una forma inactiva, unida a GDP. Este intercambio está regulado por tres grupos de proteínas: factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEF), proteínas aceleradoras de la actividad GTPasa (GAP), e inhibidores de la disociación de nucleótidos de guanina (GDI) (Figura 8).

El genoma humano contiene alrededor de 60 GEF, 70 GAP y 3 GDI. Los GEF estimulan el intercambio de GDP por GTP favoreciendo la activación de las RHO GTPasas, mientras que las GAP favorecen la ruptura del enlace fosfodiéster del GTP a GDP. Los GDI se unen a las RHO GTPasas impidiendo su activación tanto espontánea como inducida por las proteínas GAP ^{126,127}. Además, las proteínas GDI también regulan la

localización de las RHO GTPasas, las cuales ciclan entre la forma citosólica y la unida a membrana. De forma simplificada, las RHO GTPasas se mantienen inactivas en el citosol gracias a la unión con GDI. Tras disociarse, las RHO GTPasas se translocan a membrana donde se da el intercambio GDP-GTP ¹²⁸. En algunos tipos celulares hay RHO GTPasas no asociadas a GDI disponibles para ser activadas inmediatamente tras un estímulo. Algunos autores han descrito un cuarto grupo de moléculas reguladoras específicas de tipo celular encargadas de provocar la disociación entre los GDI y las RHO GTPasas antes de ir a membrana ¹²⁶.

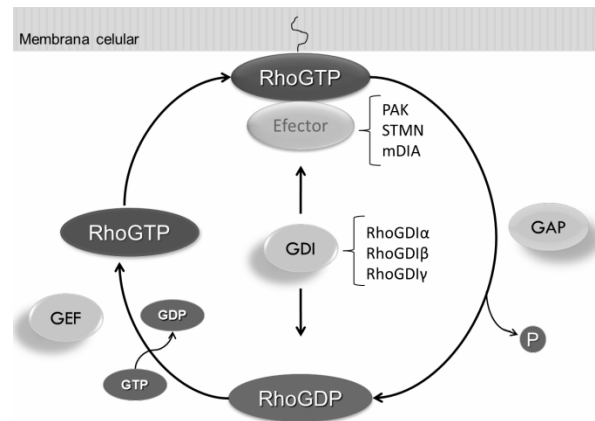


Figura 8. Regulación de las RHO GTPasas. Estas proteínas ciclan entre un estado activo (GTP) e inactivo (GDP) y entre su posición en la membrana celular y el citosol.

3.1.3. RHO GDIs

Las RHO GTPasas combinan el ciclo GDP/GTP, regulado por GAP y GEF, y el ciclo citosol/membrana, regulado por GDI. A diferencia de las GAP o GEF, solo existen 3 proteínas GDI en mamíferos. RHO GDI1 (también llamado RHO GDI α) es el más abundante, su expresión es ubicua y es capaz de formar complejos citosólicos con varios

miembros de la familia de las RHO GTPasas, entre ellos RHOA, RHOC, RAC1, RAC2 y CDC42. RHO GDI2 (también llamado RHO GDI β) se expresa predominantemente en células hematopoyéticas y parece tener una mayor afinidad por miembros de la subfamilia RAC. RHO GDI α y RHO GDI β se encuentran en el citosol. RHO GDI3 (también llamado RHO GDI γ) es menos abundante, se expresa preferentemente en cerebro y páncreas, y aunque interacciona con diferentes RHO GTPasas, parece ser más específico para RHOB y RHOG. Este último inhibidor se diferencia de los otros dos por tener una extensión en el extremo N-t responsable de su localización en el aparato de Golgi ¹²⁹⁻¹³¹.

En general, solo una pequeña fracción de las proteínas RHO en una célula se encuentra activa en la membrana y un 90-95 % de ellas están en el citosol, inactivas, unidas a las proteínas GDI, que no solo son meros inhibidores ya que de algún modo funcionan como chaperonas manteniendo un reservorio de RHO GTPasas inactivas, las cuales pueden ser trasladadas a la membrana rápidamente en respuesta a una señal. Una vez dissociado el complejo GDI-GTPasa, la proteína RHO debe estar asociada a membrana para evitar su degradación ¹³².

Se han descrito diversos mecanismos que determinan la disociación GDI-GTPasa: por unión a lípidos, a GEF, por interacción con proteínas específicas y por fosforilación ¹³². Algunos autores han descrito que también son reguladas por degradación en el proteosoma vía ubiquitina ^{133,134}. Por otro lado, se han descrito proteínas reguladoras que poseen dominios con actividades antagónicas (dominios GEF y GAP) las cuales activan ciertas proteínas RHO mientras que inhiben a otras ¹³⁵. También se ha sugerido que los GDI pueden ser los intermediarios en la regulación entre dos RHO GTPasas como es el caso de RHOA y RHOB ¹³⁶.

3.2. Funciones y vías de señalización

Las RHO GTPasas son moléculas transductoras de señales que llevan información desde receptores de la membrana celular, encargados de captar estímulos extracelulares, a otras proteínas efectoras intracelulares. Una vez activadas, las RHO GTPasas interaccionan con proteínas efectoras a través de las cuales regulan una gran variedad de procesos celulares tales como la morfogénesis, migración, desarrollo neuronal, división y adhesión celular, transporte de vesículas, reordenamiento del citoesqueleto, progresión del ciclo celular y

expresión génica^{123,137,138} (Figura 9). Cabe destacar que todas las RHO GTPasas comparten funciones antagónicas: promueven el crecimiento y poseen también funciones antiapoptóticas^{125,139,140}.

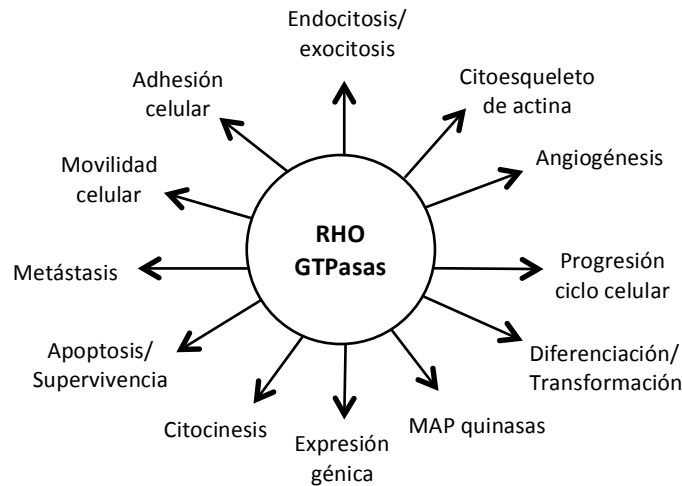


Figura 9. Algunas de las funciones atribuidas a las RHO GTPasas (modificado de Fritz and Kaina, 2006)¹⁸⁷.

3.2.1. Efectores de las proteínas RHO

Una vez activadas, las RHO GTPasas se unen a moléculas efectoras desencadenando la activación de determinadas vías de señalización. Las proteínas RHO poseen un sitio de reconocimiento y acoplamiento para unirse a sus efectores. La unión provoca en las moléculas efectoras un cambio de conformación, que puede resultar en la activación o inhibición de éstas. Para que la unión sea estable se requiere la participación de las colas en el extremo C-t de las RHO GTPasas que, en última instancia, determinan su localización subcelular. Por ejemplo, se ha visto que algunas proteínas efectoras únicamente son activadas cuando la GTPasa se encuentran en la membrana plasmática y no en el citosol¹⁴¹. Se conocen más de 70 proteínas efectoras para los tres miembros mejor caracterizados: RHOA, RAC1 y CDC42, que incluyen serina/treonina quinasa, tirosina quinasa, quinasa de lípidos, lipasa, oxidasa y proteínas del citoesqueleto¹⁴⁰.

PAK1 es el primer miembro conocido de los seis que forman la familia de proteínas PAK. Es una serina/treonina quinasa activada por varias proteínas mediante autofosforilación, entre ellas, CDC42 y RAC1. La activación de PAK1 por parte de las RHO GTPasas

depende de su localización en la membrana celular ¹⁴². Las proteínas PAK están implicadas en la regulación de diversas funciones celulares tales como la reorganización del citoesqueleto (el papel más conocido), la apoptosis y transformación celular, y la señalización hormonal ^{143,144}. Además, PAK1 también puede localizarse en el núcleo donde regula la transcripción de algunos genes ¹⁴⁵. Estructuralmente, está formada por dos subunidades, la catalítica en el extremo C-t y la reguladora en el extremo N-t. En esta última subunidad posee un dominio de unión a GTPasas (GBD) sobrepuesto parcialmente a un dominio de autoinhibición (AID). La subunidad catalítica se une al dominio AID quedando inhibida la función de PAK1. Esta conformación autoinhibida cambia cuando alguna RHO GTPasa se une al GBD ¹⁴⁶.

3.2.2. Funciones bioquímicas

3.2.2.1. Filamentos de actina

Las células reorganizan su citoesqueleto de actina en respuesta a diversas señales extracelulares. La activación de RHOA, RAC y CDC42 promueve la reorganización del citoesqueleto de actina con diferentes efectos en la forma y movimiento celular. La activación de RHOA provoca el ensamblaje de filamentos de actina y miosina, conocidos como fibras de estrés. RAC es responsable de la formación de lamelipodios mientras que la activación de CDC42 da lugar a la formación de filopodios. Aunque parece haber una cierta especialización, también existe activación cruzada entre los diferentes miembros, y además, dicha activación tiene diferentes efectos según el tipo celular ¹²³.

3.2.2.2. Microtúbulos

Gracias a su polaridad intrínseca, los microtúbulos son las estructuras del citoesqueleto que más contribuyen a la polaridad y morfología celular, siendo también responsables de la distribución de organelas. La activación de RAC y CDC42 resulta en la elongación de los microtúbulos (Figura 10). Estas GTPasas activan a PAK, una quinasa que inhibe el complejo Op18/statmina, responsable de promover la despolimerización e inhibir la polimerización de microtúbulos ¹⁴⁷. PAK1 durante la mitosis celular se localiza en los centros organizadores de microtúbulos (MTOC) promoviendo su crecimiento ¹⁴⁸. Algunos autores sugieren que el estado de ensamblaje de los microtúbulos regula la activación de las proteínas RHO. En fibroblastos la despolimerización de microtúbulos provoca la activación de RHOA, en cambio, RAC1 se activaría con la polimerización ¹⁴⁹.

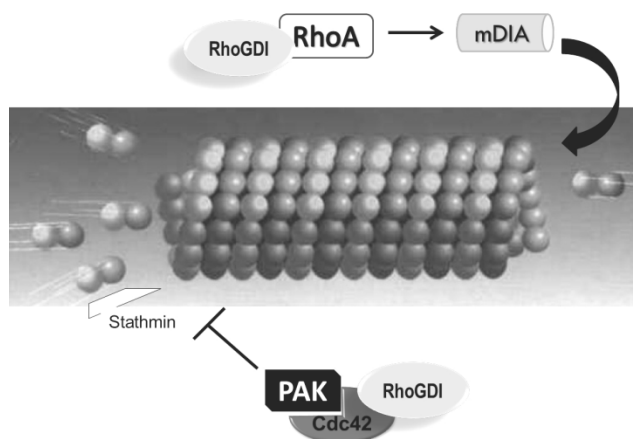


Figura 10. Regulación de microtúbulos por parte de las proteínas RHO. CDC42 y RAC1 favorecen la polimerización de microtúbulos al activar a PAK, la cual impide que la proteína estatmina inhiba dicha polimerización. RHOA, a través de su efector mDIA, estabiliza los microtúbulos formados evitando que se despolimericen.

3.2.2.3. Tráfico intracelular

Las proteínas RHO son reguladores clave en el transporte de vesículas. Están implicadas en la formación de vesículas, en su transporte y fusión con la membrana de destino. También regulan la maduración de las cisternas del aparato de Golgi y la formación de endosomas desde la membrana celular ^{150,151}. Un estudio *in vitro* con fibroblastos ha revelado que, entre otros efectos, la inhibición de CDC42 provoca la ruptura de las estructuras del aparato de Golgi ¹⁵². CDC42 también está implicada en el transporte del colesterol desde compartimentos intracelulares hasta la membrana celular ¹⁵³. Por otro lado, se han asociado bajos niveles de CDC42 con un transporte intracelular de lípidos más lento ¹⁵⁴.

3.2.2.4. Expresión génica

Las RHO GTPas regulan la transcripción de genes que codifican proteínas del citoesqueleto como la actina. Además, activan diferentes vías de señalización que llevan a la activación de diversos factores de transcripción. RHOA, RAC1 y CDC42 activan el factor de respuesta a serum (SRF), NF- κ B, y otros factores de transcripción dependientes de las quinasas JNK y p38. Un ejemplo es la activación del proto-oncogén *C-FOS* por parte de RHOA ¹⁵⁵. Se sabe que CDC42 utiliza distintas vías de señalización para regular la reorganización del citoesqueleto de actina y la transcripción génica, ya que determinadas mutaciones en *CDC42* impiden que esta proteína active la transcripción génica mientras que no pierde la capacidad de reorganizar el citoesqueleto ¹⁵⁶.

Las proteínas RHO no sólo están implicadas directamente en la regulación de la expresión génica sino que también lo hacen a través de los complejos de unión intercelular en los que participan. La activación de las proteínas RHO permite el mantenimiento de los complejos

de adhesión focal y parece ser que éstos están implicados en la transducción de señales que afectaría la transcripción génica ¹⁵⁷.

3.2.3. Funciones biológicas

3.2.3.1. Ciclo celular

Las RHO GTPasas regulan dos puntos del ciclo celular (la fase G1 y la fase M) a través de la organización de microtúbulos, de filamentos de actina y de la regulación de quinasas dependientes de ciclina (Cdk). Al inhibir la función de las proteínas RHO el ciclo celular queda truncado en varios puntos ¹⁵⁸.

La progresión de la fase G1 está regulada por Cdk, las cuales pueden ser activadas por ciclinas o inhibidas por unión a proteínas inhibidoras. Los niveles de ciclinas e inhibidores de Cdk son regulados por factores de crecimiento y por proteínas de la matriz extracelular. Las dos principales ciclinas de la fase G1 son la ciclina D1 y la ciclina E. RAC y CDC42 estimulan la transcripción de la ciclina D1 y CDC42 estimula la expresión de la ciclina E. Además, las proteínas RHO hacen disminuir los niveles de dos inhibidores de Cdk, p21 y p27, favoreciendo así la progresión del ciclo celular ¹²³.

Las dos estructuras citoesqueléticas implicadas en la división celular son el huso mitótico y el anillo contráctil. El huso mitótico está formado por microtúbulos y es el responsable de la alineación de los cromosomas. El anillo contráctil está formado por filamentos de actina y miosina II y es el responsable de que las dos células hijas reciban no solo una serie de cromosomas sino también la mitad del citoplasma ¹⁵⁹. mDia3, proteína efectora de CDC42, forma parte del complejo proteico del cinetocoro, el cual interacciona con los cromosomas y los microtúbulos cinetocóricos. Se ha observado que la inhibición de CDC42 o mDia3 causa arresto mitótico debido a que los cromosomas no se unen correctamente a los microtúbulos ¹⁶⁰. Además, PAK1 activada por el complejo ciclina B1/Cdc2 también se localiza en MTOC, y se ha visto que su presencia es necesaria para la correcta organización de éstos durante la mitosis ¹⁴⁸. Las proteínas RHO también juegan un papel esencial en la función del anillo contráctil. Utilizando levaduras como modelo, se ha demostrado que CDC42 se localiza junto con dos de sus proteínas efectoras en el surco de segmentación, la zona de estrangulamiento de la membrana plasmática que da lugar a la división en dos células ¹⁶¹.

3.2.3.2. Morfogénesis

El establecimiento de la polaridad apico-baso-lateral de las células epiteliales, el crecimiento de neuritas en neuronas o la migración direccional en respuesta a un gradiente de señales son tres procesos en los que se puede apreciar la polarización de la morfología celular (Figura 11a). Para ello es necesaria la reorganización del citoesqueleto, la participación de moléculas de adhesión y una distribución asimétrica de moléculas de señalización. Las proteínas RHO controlan la morfología celular a través de la regulación de los microtúbulos y filamentos de actina y de la formación de uniones adherentes¹²³.

Durante la polarización celular hay crecimiento de microtúbulos desde el MTOC hasta la membrana celular del frente invasivo. Una vez las células están polarizadas, los microtúbulos son estabilizados cerca de la membrana, donde juegan un papel crucial en el transporte de proteínas y vesículas. RAC1 y CDC42 a través de las proteínas PAK regulan el crecimiento y elongación de los microtúbulos, mientras que RHOA, a través de sus efectores mDia1 y mDia2, participa en la estabilización de estas estructuras¹⁶².

La interacción de cadherinas que precede a la formación de uniones adherentes activa a CDC42 y RAC1, implicadas en la formación de filopodios y lamelipodios. En cambio, esta interacción inhibe a RHOA con el fin de facilitar la formación dichas uniones. De ahí la importancia del balance entre estas proteínas, las cuales están sujetas a vías de señalización antagónicas.

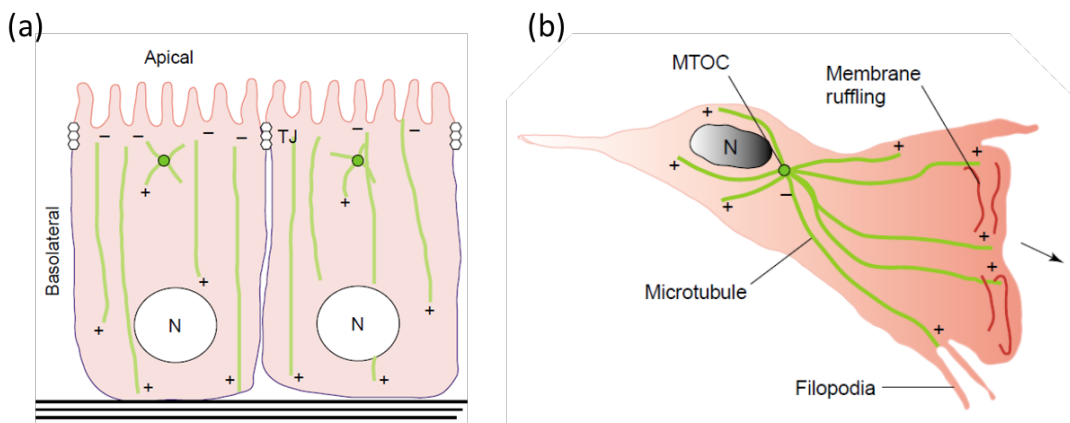


Figura 11. Ejemplos de polarización celular (extraído de Fukata, Nakagawa and Kaibuchi, 2003)¹⁵⁸. (a) Las células epiteliales polarizadas tienen una superficie apical y una basolateral. El extremo negativo de los microtúbulos está asociado al MTOC y a la superficie apical. (b) Los fibroblastos en migración muestran un frente activo y filopodios, donde se activan RAC1 y CDC42, respectivamente. Los microtúbulos son estabilizados cerca del frente celular en su extremo positivo. La flecha señala la dirección del movimiento.

3.2.3.3. Migración celular

La migración celular en los organismos es direccional. El principal mecanismo de migración en las células animales es la elongación de los filamentos de actina en el frente celular acoplada a la contracción de los filamentos de actina-miosina en la parte trasera. Además, los microtúbulos son estabilizados en la dirección de la migración permitiendo el tráfico de vesículas desde el aparato de Golgi hacia el límite anterior de la célula (Figura 11b). Mientras RAC es necesaria para la polimerización de filamentos de actina en el frente celular y la formación de adhesiones focales, RHOA actúa en la parte trasera generando fuerzas contráctiles que provocan el movimiento de la célula hacia delante. CDC42 es el nexo de unión entre las señales extracelulares y la polaridad celular; de este modo determina la dirección de la migración. Experimentos *in vitro* con células animales han demostrado que éstas se mueven hacia un gradiente. CDC42 es necesaria para que los macrófagos migren hacia un gradiente de señal quimiotáctica, y aunque la inhibición de CDC42 no inhibe el movimiento, sí se pierde su dirección. En cambio, la inhibición de RAC inhibe totalmente el movimiento. Además, CDC42 es necesaria para la localización de RAC en el frente celular. La migración direccional implica reorganización de los centrosomas, aspecto regulado también por CDC42^{123,149}.

Durante la migración celular, el gradiente de PIP3 activa algunas GEF provocando la activación de RAC1, que a su vez activa a PI3K en el frente invasivo generándose así más PIP3. En esta zona también se localiza CDC42, responsable de la formación de pseudópodos¹⁶². CDC42 regula la polaridad celular a través de la activación del complejo proteico GSK3 β -APC, el cual se localiza en el extremo positivo de los microtúbulos que crecen hacia el frente invasivo de las células en movimiento¹⁶³.

Un trabajo reciente ha publicado la importancia que tienen las modificaciones post-transcripcionales de las proteínas RHO en la migración celular. Las RHO GTPasas sufren prenilación y metilación en su extremo C-t, lo que aumenta su afinidad por las membranas celulares y estabiliza las interacciones proteicas. Al inhibir la prenilación hay una disminución en la actividad de RHOA debido a que aumenta su degradación y su unión con GDI. Al inhibir el enzima responsable de esta modificación se inhibe la migración celular no sólo debido a la pérdida de adhesión celular sino también a la ruptura y desorganización del citoesqueleto de actina¹⁶⁴.

3.2.3.4. Fagocitosis

La fagocitosis es el mecanismo utilizado por el organismo para mantener la homeostasis tisular, eliminar microorganismos y células tumorales ¹⁶⁵. Los macrófagos poseen receptores para discriminar entre células propias del organismo de otras células foráneas. También poseen receptores para anticuerpos y para proteínas del complemento con las que reconocen qué microorganismos o células fagocitar. Las células del propio organismo que entran en apoptosis expresan en su superficie moléculas que las identifican como candidatas para ser fagocitadas. De este modo se eliminan tanto restos celulares como microorganismos ¹⁶⁶.

Se han descrito dos tipos de fagocitosis en los que están implicadas las proteínas RHO. En la fagocitosis tipo I, o mediada por el receptor de inmunoglobulinas, participan CDC42 y RAC, mientras que en la fagocitosis tipo II, mediada por proteínas del complemento, participa RHO ¹⁶⁷.

Durante las tres fases de la fagocitosis –unión de partículas, extensión de pseudópodos y cierre del fagosoma– hay reorganización del citoesqueleto, fusión y constricción de membranas para el cierre del fagosoma. Durante la fagocitosis mediada por el receptor Fcγ las proteínas G se activan preferentemente en la copa fagocítica. La activación de CDC42 predomina en los márgenes de las extensiones celulares, mientras que la activación de RAC1 y RAC2 aumenta durante el cierre del fagosoma (Figura 12) ¹⁶⁸. CDC42 se activa en el frente invasivo de las protusiones fagocíticas y se desactiva en la base de estas extensiones. Esta desactivación es necesaria para el cierre del fagosoma, sobretodo en el caso de grandes partículas, y está mediado por PIP3, producto de PI3K, cuya concentración aumenta en la zona debido a que CDC42 activa a PI3K ¹⁶⁹.

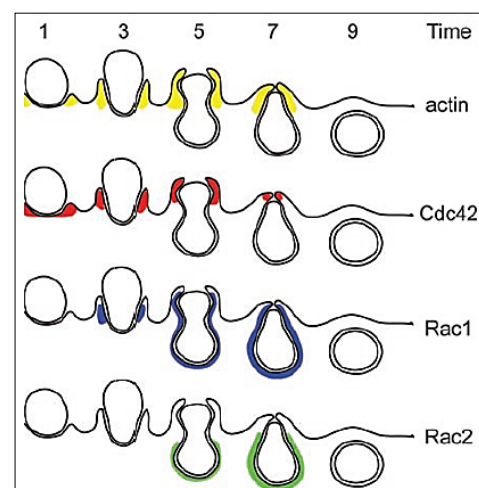


Figura 12. Representación de la activación temporal de las distintas RHO GTPasas durante la fagocitosis (extraído de Hoppe and Swanson, 2004) ¹⁶⁴.

3.3. Proteínas RHO y cáncer

Las proteínas RHO no suelen encontrarse mutadas en las células tumorales pero su expresión y/o actividad está frecuentemente alterada. Las propiedades oncogénicas de las RHO GTPasas residen en la capacidad de estimular la progresión del ciclo celular, regular la transcripción génica y, en algunos casos, regular la secreción de factores que promueven la angiogénesis. En cáncer juegan un papel central en la invasión y metástasis debido a que regulan aspectos como la adhesión celular, la reorganización del citoesqueleto o la migración celular. La expresión y/o actividad de las proteínas reguladoras de las RHO GTPasas y sus proteínas efectoras también se ha visto alterada en cáncer, aunque no está claro si es relevante para la progresión tumoral. Diversos trabajos han publicado que la expresión de RHOA y RHOC está frecuentemente aumentada en tumores mientras que la expresión de RHOB está disminuida. RHOA está implicada en la proliferación y supervivencia celular estimulando la transformación y durante la progresión tumoral afecta a las uniones epiteliales. En cambio RHOC parece tener un papel más tardío, durante la invasión y metástasis, tal como se ha descrito en cáncer de mama, o durante la transición epitelio-mesénquima donde se ha visto incrementada en cáncer de colon. Por otro lado, RAC1 está sobreexpresada en diversos tipos de cáncer y es de las pocas RHO GTPasas que se encuentran mutadas en algunos tumores. La estimulación de la progresión del cáncer por parte de CDC42 parece ser dependiente de tejido. Dicha estimulación puede deberse a sus múltiples funciones, como son el tráfico y degradación de receptores, la segregación cromosómica o la invasión de células tumorales individuales ¹⁷⁰.

La proliferación celular también depende del anclaje de la célula a la matriz extracelular. Este mecanismo está regulado por RHO GTPasas y la pérdida de esta dependencia es una de las principales características de las células tumorales. Por tanto, la desregulación de las vías de señalización de las proteínas RHO podría contribuir a la progresión tumoral ¹²³.

Las RHO GTPasas estimulan vías de señalización que llevan a la activación de diversos factores de transcripción, a pesar de que este proceso no se da de forma directa y parece tener cierta complejidad. RHOA a través de las quinasas p38 y JNK, y CDC42 y RAC1 a través de la familia de citoquinas IL-6, activan al factor de transcripción STAT3. Una sobreactivación de este factor lleva a la transformación celular, resistencia a la quimioterapia y aumento en la migración celular. La transformación a través de la señalización de PAK es un tema controvertido debido a que algunos resultados apuntan a

PAK en la transformación dependiente de RAC, mientras que otros afirman lo contrario^{155,171}. Durante la transformación celular de fibroblastos murinos *in vitro* con proteínas RHO constitutivamente activas, se ha demostrado que las proteínas de la familia RHO activan hasta cuatro principales vías de señalización. Los factores de transcripción de dichas vías, p53, c-myc, c-Jun y E2F, están sobreexpresados en estas células¹⁷².

3.3.1. CDC42 y transformación celular

Existen suficientes evidencias que demuestran que CDC42 induce transformación celular, directa o indirectamente. CDC42 participa en el tráfico intracelular y en la progresión del ciclo celular y se ha sugerido que ambas funciones están acopladas. CDC42 se asocia en el aparato de Golgi con la subunidad γ COP de un complejo proteico llamado COPI¹⁷³. Mutantes de *CDC42* defectuosos en el ciclo GTP/GDP bloquean el transporte de vesículas del retículo endoplasmático al aparato de Golgi, mientras que la activación constitutiva de CDC42 lo estimula. Por otro lado, los dominantes positivos que ciclan espontáneamente a un estado activo son estables en células *in vitro* e inducen transformación¹⁷⁴. Estas células presentan niveles elevados de receptores del factor de crecimiento epitelial (EGFR), debido a que su ubiquitinización está bloqueada, y sobreactivan la vía de señalización de la quinasa ERK. Solo los mutantes de *CDC42* capaces de unirse a γ COP inducen el aumento de EGFR, lo que supone un nexo de unión entre el tráfico intracelular y la transformación maligna inducida por CDC42. Por otra parte, a pesar de que los mutantes negativos de *CDC42* actúan inhibiendo el crecimiento celular, hay trabajos que indican que expresados a bajos niveles pueden inducir transformación¹⁷⁵. A pesar de parecer contradictorio, RHO GDI también contribuye a la transformación inducida por CDC42 debido a que es responsable de liberar esta GTPasa activada de la membrana plasmática y transportarla a otras membranas intracelulares donde interacciona con proteínas diana¹⁷⁶. Además, se ha descrito que la unión con RHO GDI es necesaria para inducir transformación¹⁷⁷. Un papel más directo se ha observado en cáncer colorectal, donde la sobreexpresión de CDC42 reduce los niveles del gen supresor de tumores *ID4* por metilación¹⁷⁸. Por otro lado, en los últimos años también se ha descrito *CDC42* como un supresor de tumores, y aunque el mecanismo no está claro, parece que el mantenimiento de la polaridad celular le otorgaría esta propiedad¹⁷⁹.

3.3.2. Invasión tumoral y metástasis

Existen diversos tipos de cáncer donde la expresión de algunas RHO GTPasas está incrementada. Un ejemplo son los tumores de mama, los cuales presentan niveles de RHOC significativamente más elevados que el tejido normal y un menor nivel de transcripción del inhibidor RHO GDI γ . Además, los niveles de RHOC se relacionan con una mayor probabilidad de recaer, presentar metástasis o con un peor pronóstico ¹⁸⁰. En carcinoma de pulmón los niveles elevados de RHOC se han relacionado con un mayor potencial invasivo de los tumores ¹⁸¹. En carcinoma de ovario la sobreexpresión de RHOA y RHOC está relacionada con la progresión e invasión tumoral ¹⁸². Al contrario que estas dos RHO GTPasas, se ha sugerido que RHOB es un supresor de metástasis. El silenciamiento génico de *RHOB* con ARN de interferencia en células bronquiales *in vitro* promovió migración e invasión de estas células, observándose modificaciones en el citoesqueleto de actina y en la adhesión celular ¹⁸³. Asimismo RHO GDI β se ha descrito como un supresor de metástasis, en cambio en cáncer gástrico su expresión se ha correlacionado con la progresión tumoral y metástasis ¹⁸⁴. El papel de este inhibidor no está claramente definido ya que también se ha descrito que activa la expresión del oncogén *COX-2*, lo que resulta en rotura de uniones adherentes y un aumento de la invasión celular y metástasis ^{185,186}.

Igualmente CDC42 está implicada en la invasión y migración de células cancerosas. Su activación por parte del receptor TGF β tipo III resulta en la inhibición de la motilidad celular de células epiteliales normales y cancerosas gracias a que la migración no direccional queda inhibida ¹⁸⁷. Las proteínas PAK, efectoras de RAC1 y de CDC42, suelen encontrarse sobreexpresadas en diferentes tipos de cáncer. En carcinoma de ovario la amplificación génica de *PAK1* ocurre en un 30 % de los tumores y la sobreexpresión proteica en un 85 % ¹⁸⁸. En cáncer de ovario también hay sobreexpresión de PAK1 y PAK2 activas (fosforiladas). Los carcinomas serosos presentan la mayor expresión de PAK1 mientras que la expresión de PAK1 nuclear activa es mayor en los tumores de grado 3. Ambas formas se asocian con un peor pronóstico. Además, la inhibición de PAK1 y PAK2 reduce la migración e invasión celular en líneas celulares de cáncer de ovario ¹⁸⁹. No sólo la proteína efectora PAK regula la migración a través de las proteínas RHO; estudios *in vitro* con células de carcinoma de colon han demostrado que las quinasas ERK y MAPK promueven movilidad celular e invasión a través de RHOA y RAC ¹⁹⁰.

3.3.3. Las proteínas RHO como dianas terapéuticas

La inhibición de la actividad de las proteínas RHO puede realizarse a distintos niveles: inhibiendo su transcripción, las modificaciones lipídicas post-transcripcionales, los factores que las activan, impidiendo la unión con sus proteínas efectoras o inhibiendo la acción de estas últimas. Una gran parte de las aproximaciones terapéuticas contra las proteínas RHO se han enfocado hacia las modificaciones post-transcripcionales que sufren en su extremo C-t, como es el caso de la isoprenilación. Ésto se debe a que esta modificación lipídica es esencial para su correcta localización subcelular y para su función. Inhibidores de los enzimas encargados de dicha modificación han sido investigados como terapias antitumorales ¹⁹¹.

La familia de fármacos de las estatinas inhibe uno de estos enzimas, la HMG-CoA reductasa, quedando así reducida la actividad de las pequeñas GTPasas al inhibirse la isoprenilación. El tratamiento de modelos murinos de cáncer de ovario con Lovastatina ha provocado la disminución del número de metástasis ¹⁹². Otra estatina (Atorvastatina) se ha utilizado en osteosarcoma inhibiendo la vía RHOA→JNK→MMP, la cual promueve invasión celular ¹⁹³. En líneas celulares de ratones con melanoma la utilización de Simvastatina ha reducido la metástasis pulmonar, la invasión y adhesión celular, la expresión de metaloproteasas y la localización de proteínas RHO en la membrana celular ¹⁹⁴.

El Alendronato es un fármaco del grupo de los bifosfatos que también inhibe la prenilación proteica. En un modelo murino de cáncer de ovario este fármaco comúnmente usado para la osteoporosis inhibe la diseminación tumoral. Los resultados indican que hay una disminución de la invasión estromal y una reducción de los niveles de MMP-2, con lo que se inhibe la migración celular y la actividad proteolítica. El tratamiento ha reducido los niveles séricos del marcador CA125, que generalmente se encuentran elevados en cáncer de ovario diseminado ¹⁹⁵.

GGA (geranil geranil acetona) es un compuesto isoprenoide de estructura similar a un componente metabólico de la vía de modificación post-transcripcional de las proteínas RHO. Este análogo suprime la prenilación de las proteínas RHO reduciendo su actividad. En líneas de cáncer de ovario la inducción de invasión celular queda suprimida por la acción de GGA. La consecuente inactivación de RHO va acompañada de cambios en la morfología celular, pérdida de formación de fibras de estrés y adhesiones focales e

inhibición de la proteína efectora FAK, implicada en la migración celular ¹⁹⁶. Además, GGA también inhibe la progresión tumoral *in vivo* en un modelo murino de cáncer de ovario. En estos ratones hay una disminución de la proliferación celular, y por tanto del crecimiento tumoral, e inhibición de la vía RAS-MAPK ¹⁹⁷. La farnesil transferasa es otro enzima que cataliza la prenilación de las proteínas RHO. Su inhibición induce un fenotipo durmiente en células de cáncer de mama gracias a la disminución de los niveles de RHOA ¹⁹⁸.

Fasudil es un inhibidor de las quinasas ROCK, activadas por las proteínas RHO. Este compuesto provoca cambios conformacionales en estas proteínas efectoras que hacen que aumente la afinidad por su inhibidor. Fasudil se ha utilizado en modelos humanos de cáncer de mama y fibrosarcoma *in vitro* así como en un modelo murino de hepatocarcinoma. En ellos se ha inhibido la migración de las células tumorales y el crecimiento independiente de anclaje. Además, en tres modelos *in vivo* se ha demostrado que la progresión tumoral se reduce con el tratamiento ¹⁹⁹. En líneas celulares de cáncer de ovario Fasudil mejora el efecto del cisplatino en la inhibición del crecimiento y apoptosis. Este fármaco inhibe a la proteína HIF1 α , la cual media la transcripción de VEGF, con lo que se inhibe la angiogénesis del tumor ²⁰⁰.

Por otro lado, Salvicine es un inhibidor de la ADN topoisomerasa II que utilizada en modelos murinos ha logrado disminuir la metástasis pulmonar disminuyendo los niveles de RHOC y la translocación de RHOA y RHOC del citosol a la membrana celular ²⁰¹. Recientemente se ha identificado un compuesto que inhibe la transcripción génica de *RHOA* y *RHOC* y su uso *in vitro* en un modelo de cáncer de próstata ha reducido la invasión de estas células tumorales ²⁰². Además, también se han utilizado compuestos naturales extraídos de plantas con fines terapéuticos dirigidos a inhibir el crecimiento tumoral que implican a las proteínas RHO. Un ejemplo es el bencilisotiocianato, presente en las plantas crucíferas, y se ha demostrado que reduce la angiogénesis e invasión de tumores pancreáticos al inhibir la vía HIF α →VEGF→RHOC→STAT3 ²⁰³. Morelloflavone, un biflavonoide extraído de la planta *Garnicia dulcis*, inhibe la expresión de VEGF en cultivos primarios de células endoteliales humanas. Reduce el crecimiento tumoral y angiogénesis *in vivo* en un modelo murino de cáncer de próstata gracias a la inhibición de RHOA y RAC1 ²⁰⁴. Otro compuesto natural, el ácido 6-pentadecilsalicílico, es un ácido anacárdico que inhibe la histona acetiltransferasa. Al igual que los compuestos

anteriores, inhibe la angiogénesis tumoral. En cáncer de próstata bloquea las quinasas Src y FAK y como consecuencia activa a RHOA e inactiva a RAC1 y CDC42²⁰⁵.

Por último, las proteínas PAK se han descrito como buenas dianas terapéuticas debido a la variedad de funciones celulares que regulan y a su implicación en diversas enfermedades. Sin embargo, actualmente no se ha descrito ningún compuesto adecuado para uso clínico. Su inhibición como principales efectores de las proteínas RAC1 y CDC42 no ha resultado exitosa debido a la existencia de varios miembros y a la poca especificidad de los inhibidores. A pesar de que se ha conseguido inhibir la actividad catalítica de algunas proteínas PAK, no hay que olvidar que éstas también pueden tener un papel de soporte para la interacción y activación de otras proteínas como es el caso de AKT-PDK1²⁰⁶. Una alternativa para la inhibición específica de PAK1 ha sido prevenir las interacciones proteicas de PAK1 con RAC1 y CDC42 evitando así su activación. Este efecto se ha logrado con una molécula llamada IPA-3, pero experimentos *in vitro* han evidenciado la inespecificidad del compuesto al inhibirse también otras quinasas²⁰⁷. Además, la unión de IPA-3 es reversible y queda inactivada dentro de las células. El uso de pequeñas moléculas químicas como inhibidores alostéricos que estabilizan la conformación autoinhibida de PAK1, resuelve en parte el problema de la especificidad ya que el dominio AID solo está presente en las proteínas PAK del grupo I y no está conservado en otras quinasas. De hecho, existen inhibidores endógenos con estas características como la proteína merlin, producto del gen supresor de tumores *NF2*¹⁴⁶. La viabilidad de animales deficientes en PAK1 hace pensar que su inhibición como diana terapéutica será tolerada en pacientes aunque aún no hay estudios concluyentes y tampoco se descarta que se den mecanismos de compensación. Por otro lado, la especificidad de las moléculas de ARN de interferencia para inhibir PAK1 queda contrarrestada por la poca estabilidad que tiene este tipo de moléculas *in vivo*^{207,208}.

HIPÓTESIS

Las proteínas de la familia RHO están implicadas en diversos mecanismos celulares como la polaridad, movilidad celular, transformación, etc. que participan en la invasión y progresión tumoral. Los carcinomas de células claras y los serosos de alto grado presentan diferentes patrones de diseminación y se cree que las proteínas RHO podrían estar implicadas en su patogénesis. Por otro lado, se ha descrito que los carcinomas de células claras y endometrioides de ovario podrían derivar de la endometriosis como lesión precursora. Se propone que la alteración de la expresión y activación de la RHO GTPasa CDC42 podría estar implicada en la progresión tumoral de la endometriosis ovárica.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo consiste en estudiar el papel de las RHO GTPasas en el carcinoma de ovario. Más concretamente, analizar y correlacionar la expresión y la actividad de las proteínas RHO con las diferentes características biológicas y clínicas de los carcinomas de ovario serosos de alto grado y de células claras. Otro objetivo es conocer la implicación de la RHO GTPasa CDC42 en la transformación celular de endometriosis a carcinoma.

RESULTADOS

1. Artículo 1

“Ovarian clear cell carcinomas: RHO GTPases may contribute to explain their singular biologic behavior”

Los carcinomas de células claras (CCC) se encuentran frecuentemente confinados al ovario en el momento del diagnóstico mientras que la mayoría de los carcinomas serosos de alto grado (HGSC) se diagnostican diseminados fuera del ovario. Por otro lado, se conoce que las proteínas RHO están implicadas en la invasión tumoral y metástasis. Analizamos la expresión de las principales RHO GTPasas y sus inhibidores con el fin de saber si existe una expresión diferencial de estas proteínas entre CCC y HGSC que pudiera explicar el patrón de diseminación de ambos tumores.

Se analizaron las características clínico-patológicas de 22 pacientes con CCC y de 31 pacientes con HGSC. La edad de las pacientes con HGSC fue ligeramente mayor a la de aquellas que presentaban CCC (62 vs. 56 años). El estadio tumoral en el momento del diagnóstico fue significativamente diferente entre ambas. El 38 % de los CCC se diagnosticaron en estadio I, mientras que el 90 % de los HGSC se encontraron en estadio avanzado (III y IV) y solo un 10 % de éstos se clasificaron en estadio I. El 59 % de los CCC (frente al 0 % de los HGSC) está asociado a endometriosis (EM). Al finalizar el seguimiento casi el 60 % de las pacientes con HGSC murieron a causa del tumor o vivían con la enfermedad, mientras que este porcentaje fue del 31 % en pacientes con CCC. La supervivencia global a los 5 años también fue mayor en las pacientes con CCC (71 % vs. 41 %) así como la supervivencia libre de enfermedad (61 % vs. 30 %). La respuesta a la quimioterapia (taxanos y carboplatino o cisplatino) fue similar en ambos tipos histológicos y en ambos estadios, temprano y avanzado.

Se estudió la expresión del ARN mensajero de tres miembros de la familia RHO (RHOA, RHOC y CDC42), de tres inhibidores RHO GDI (RHO GDI α , RHO GDI β , RHO GDI γ) y la expresión proteica de PAK1, una proteína activada por CDC42. Se analizó la relación de la expresión de estos genes con el estadio tumoral, el tipo histológico y la respuesta al tratamiento en un grupo de 27 CCC y 75 HGSC.

Los CCC mostraron niveles del inhibidor RHO GDI α más elevados que los HGSC. Los niveles de CDC42 y el porcentaje de casos positivos para PAK1 fue menor en los CCC que en los HGSC. Por otro lado, en los CCC la expresión de RHOA y RHOC fue mayor en estadios avanzados (II-IV) que en los casos de estadio I. Los HGSC resistentes a la quimioterapia presentaron mayores niveles de expresión de RHOA.

2. Artículo 2

“CDC42-positive macrophages may prevent malignant transformation of ovarian endometriosis”

En el trabajo anterior los resultados obtenidos de CDC42 pueden explicar, en parte, que los CCC se diagnostiquen frecuentemente en estadios iniciales y no diseminados fuera del ovario. Por otro lado, se cree que entre un 40 y 50 % de casos de CCC se originan a partir de EM. El objetivo de este trabajo fue saber si CDC42 tenía un papel relevante en la transformación de EM a carcinoma. Para ello se compararon 22 quistes endometrióticos no asociados a cáncer (solitarios), 19 asociados a carcinoma (contiguos al tumor) y los 19 tumores correspondientes (11 CCC, 4 endometrioides (EC) y 4 mixtos CCC-EC).

La edad media de las pacientes diagnosticadas de carcinoma fue mayor que la de las pacientes con EM sin cáncer (51 vs. 36 años). El 60 % de los CCC se diagnosticaron en estadio I, el 30 % en estadio III y el 10 % en estadio IV. Todos los EC se clasificaron en estadio I. De los carcinomas mixtos, 1 se diagnosticó en estadio I, 1 en estadio II y 1 en estadio III.

Se estudió la expresión del ARN mensajero de CDC42 en quistes endometrióticos solitarios, asociados a carcinoma y en el carcinoma adyacente. La expresión de CDC42 fue significativamente mayor en los quistes solitarios que en los asociados a cáncer. Dicha expresión también fue mayor en los carcinomas que en los quistes endometrióticos contiguos al tumor. Los niveles de ARN mensajero de CDC42 en ovario normal fueron similares a los de los quistes endometrióticos, mientras que en los carcinomas fueron superiores a los del ovario normal. La tinción inmunohistoquímica con CDC42 reveló que las células que expresaban CDC42 con mayor intensidad eran macrófagos, lo que se confirmó con el marcador de macrófagos CD163. La expresión proteica de CDC42 fue

mayor en los quistes endometrióticos solitarios (58 % casos positivos) que en los quistes asociados a cáncer (28 %) y que en los carcinomas asociados a éstos (5 %). Todas las muestras presentaron una densa infiltración de macrófagos CD163 y no se encontró relación entre CDC42, la edad, el estadio, el grado o el tipo de carcinoma. La discrepancia entre los resultados de expresión del ARN y proteína de CDC42 pueden ser debidos a un efecto de compensación según el cual la maquinaria de transcripción génica se activa para compensar los bajos niveles de proteína.

DISCUSIÓN

1. Proteínas RHO y diseminación tumoral

Los carcinomas de ovario de células claras (CCC) y los serosos de alto grado (HGSC) presentan características clínico-patológicas muy distintas entre sí. Los CCC suelen diagnosticarse en estadios más bajos que los HGSC, tienen una menor incidencia de metástasis en nódulos linfáticos, presentan una peor respuesta a la quimioterapia y peor pronóstico^{30,39,209,210}. Además, en los últimos años se ha sugerido que tienen un origen diferente²¹¹. Numerosos estudios indican que la endometriosis (EM) es la lesión precursora de los CCC^{12,14,74}, aunque éste no sería el único origen ya que también se ha sugerido que pueden originarse a partir de adenofibromas por otra vía carcinogénica²¹². Recientemente se ha apuntado que los HGSC podrían desarrollarse a partir de lesiones *in situ* de las trompas de Falopio^{8,213-215}. Ésta podría ser la causa que explicaría las diferencias entre estos dos tipos de tumores en cuanto a su grado de invasión. Mientras que los CCC se originan en el ovario y por ello se encuentran frecuentemente confinados en él en el momento del diagnóstico, los HGSC se desarrollan fuera del ovario y llegarían a él al adquirir un fenotipo invasivo.

En el presente trabajo los HGSC mostraron niveles más elevados de CDC42 y PAK1 y menor expresión de RHO GDI α que los CCC, lo que sugiere que los HGSC son más invasivos que los CCC en sí mismos. Además, los CCC en estadio avanzado (II-IV) presentaron mayores niveles de expresión de RHOA y RHOC que los CCC en estadio I. Estos resultados concuerdan con los de otros autores que también observaron un aumento de RHOA y RHOC en estadios avanzados y en metástasis de carcinoma de ovario¹⁸² y un aumento de CDC42 en cáncer de pulmón relacionado con una mayor invasión²¹⁶. Además, CDC42 participa en la activación de PAK1, que a su vez activa diversas vías de señalización celular. De este modo, regula un amplio número de procesos celulares como la movilidad celular, proliferación, supervivencia, y muerte celular²¹⁷. Por lo tanto, los procesos regulados por CDC42 pueden verse alterados por la sobreexpresión de PAK1, que es la que en última instancia activa o inhibe las distintas vías de señalización. En carcinomas de ovario de alto grado se ha descrito la amplificación génica de *PAK1*, identificado como un oncogén, y se ha asociado su sobreexpresión y activación con mal pronóstico¹⁸⁸. Además, se ha demostrado que la inhibición de PAK1 en líneas celulares de

cáncer de ovario reduce la migración e invasión sin afectar la proliferación ni la apoptosis. Inversamente, la sobreexpresión de PAK1 *in vitro* aumenta la migración celular e invasión^{189,218}. Nuestros resultados indican que hay una menor expresión de CDC42 y de PAK1 en los CCC comparando con los HGSC.

2. Diagnóstico y tratamiento

Otro aspecto que diferencia los HGSC de los CCC es la respuesta al tratamiento y, por ende, la probabilidad de supervivencia. Una de las características clínicas de los CCC es el alto porcentaje de tumores diagnosticados en estadio I⁵⁶. A pesar de ello, este tipo histológico se considera un factor de mal pronóstico. En estadios avanzados (III y IV) estos tumores presentan resistencia al tratamiento y peor pronóstico que otros subtipos como el HGSC³⁹. El pronóstico de las pacientes con CCC en estadio I y II es similar al de otros tipos histológicos. En cambio, en estadios avanzados (III y IV) la probabilidad de supervivencia es menor⁴¹. Sin embargo, en nuestra serie el porcentaje de pacientes con CCC y HGSC en estadios II-IV que respondieron con éxito al tratamiento fue similar (50 % vs. 48 %). Además, la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad a los 5 años fueron ligeramente mayores en las pacientes con CCC. Estos resultados podrían explicarse por el bajo número de casos analizados y por las diferencias en el estadio de los CCC y HGSC, lo cual pudo haber influenciado el análisis de la supervivencia que se realizó con todos los casos y no por estadios.

El tratamiento estándar que reciben las pacientes con carcinoma de ovario está basado en drogas citotóxicas (platino y taxanos) que son eficaces contra células proliferativas. No es el caso de los CCC, en los que se ha descrito la baja proliferación como uno de los mecanismos de resistencia a la quimioterapia³³. En cambio, los HGSC típicamente presentan un alto índice de proliferación³. Además, aproximadamente el 95 % de los HGSC tienen mutaciones en el gen *TP53* o mecanismos alternativos de inactivación de la proteína p53³⁵. Se sabe que p53 puede ser regulada negativamente por CDC42. En un estudio *in vitro* se ha demostrado que al inhibir CDC42 aumentan los niveles y la actividad de p53. Además, se conoce que CDC42 es diana de una molécula de microARN (miR-29). Por tanto, p53 puede ser activada por este microARN a través de la supresión de CDC42²¹⁹ (Figura 13). Estos datos van en concordancia con nuestros resultados, que indicaron una mayor expresión de CDC42 en los HGSC. La alteración de p53 impediría a

la célula poner en marcha los mecanismos de supervivencia activados por daño en el ADN. En consecuencia, las células acumularían errores en el ADN que, finalmente, llevarían a la muerte celular.

Además, en líneas celulares de carcinoma seroso de ovario se ha identificado una proteína quinasa activada por CDC42 (CDC42BPB) cuya expresión está aumentada en las células resistentes a cisplatino ²²⁰. Se ha identificado esta proteína como diana terapéutica en otro estudio *in silico* ²²¹. Por otro lado, niveles elevados de RHOA podrían inducir resistencia a la quimioterapia. En un estudio funcional con células de cáncer gástrico se relacionó la alta expresión de RHOA con peor respuesta al tratamiento ²²². Y en líneas celulares de mieloma se ha descrito la vía de señalización Wnt-RHOA como la responsable de inducir el mecanismo de resistencia a drogas en estas células ²²³. Nuestros datos indican que en los HGSC los niveles elevados de RHOA podrían inducir resistencia a la quimioterapia.

Debido a que las proteínas de la familia RHO están implicadas en la patogénesis de varios tipos de tumores resultan buenas candidatas para ser dianas terapéuticas. Se han empleado diversos compuestos para inactivar RHOA en cáncer de ovario ^{192,195,196}, osteosarcomas ¹⁹³ y recientemente en leucemia mieloide crónica ²²⁴. La inhibición de RHOA resulta en una disminución de la invasión, diseminación y metástasis peritoneal. En células de cáncer gástrico se ha utilizado un microARN (miR-29) para reducir la expresión de CDC42 y su efector PAK1, inhibiendo así la proliferación, invasión y migración de estas células ²²⁵.

La probabilidad de supervivencia depende del diagnóstico precoz ya que el éxito del tratamiento depende del estadio en que se encuentre el tumor en el momento del diagnóstico. Por este motivo el diagnóstico precoz es de vital importancia para las pacientes con tumores epiteliales de ovario. Actualmente no existen programas de cribado suficientemente sensibles y específicos y la ultrasonografía, el examen de pelvis y los niveles en suero del marcador CA125 son las herramientas que se utilizan para la detección de estos tumores. Además, el carcinoma de ovario es un tumor que no produce síntomas ni signos clínicos específicos ²²⁶ y en muchos casos son diagnosticados casualmente en

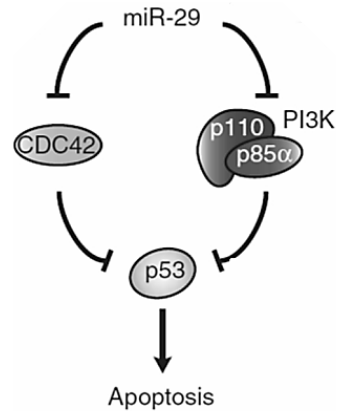


Figura 13. Modelo en el que el microARN miR-29 inhibe la función de p53 a través de CDC42 (extraído de Park, Lee, Ha, Nam and Kim, 2009) ²¹⁵. En el modelo planteado miR-29 también inhibe la subunidad alfa de PIK3.

exámenes rutinarios. CA125 es el marcador más utilizado para monitorizar la respuesta al tratamiento y para detectar recidivas pero no se utiliza para el cribado y detección de la enfermedad por su baja especificidad. A partir de un estudio retrospectivo se ha creado una guía-índice de los síntomas de cáncer de ovario para diferenciar entre mujeres sanas de aquellas con tumores de ovario benignos y malignos. De validarse en un estudio prospectivo, esta guía sería de gran utilidad para el cribado de las pacientes ¹⁸.

En el caso de los CCC, debido a las características clínicas de estos tumores (resistencia a la quimioterapia y mal pronóstico), es de gran importancia el estudio de su lesión precursora. El conocimiento de las alteraciones moleculares que ocurren entre la EM y los carcinomas asociados a ella es el primer paso para buscar nuevas dianas terapéuticas. De algún modo, el estudio de la EM como lesión precursora de un tumor sería, quizás a largo plazo, una herramienta de diagnóstico precoz. El seguimiento de estas pacientes brindaría la oportunidad de detectar tumores ováricos en estadios bajos.

3. Endometriosis como lesión precursora

A pesar de que la EM está descrita por la Organización Mundial de la Salud como una lesión benigna, diversos estudios han sugerido que se trata de una lesión clonal de naturaleza neoplásica. Las alteraciones genéticas de las células endometrióticas indican que se trata de una lesión premaligna. El endometrio eutópico de mujeres con EM presenta alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores ⁹⁴. Se ha sugerido que estos cambios son causados por el endometrio ectópico que, a través de diversas vías de señalización, causaría cambios epigenéticos y alteraciones genéticas en el endometrio eutópico ²²⁷. La inactivación de genes supresores de tumores es un mecanismo común en la EM y está implicado en la proliferación y mantenimiento de los implantes endometrióticos ²²⁸.

Diversos estudios apuntan que la EM atípica es la lesión precursora de los carcinomas endometrioides y de los CCC debido a que frecuentemente se encuentra en un área de transición entre EM benigna y cáncer de ovario ^{85,229}. En nuestra serie, las muestras de EM contigua al tumor mostraron atipia mientras que no se observó EM atípica en los quistes endometrióticos solitarios (no asociados a cáncer).

4. Microambiente endometriótico y tumoral

Está ampliamente aceptado que la EM está asociada a una desregulación de la respuesta inmunitaria. El sistema inmunitario, y en particular los macrófagos, juegan un papel esencial en la patogénesis de la EM ²³⁰. Los macrófagos participan en numerosas funciones: fagocitosis, degradación de antígenos foráneos, degradación de la matriz extracelular, remodelación del tejido, producción y secreción de citoquinas y factores de crecimiento. Los macrófagos son abundantes en los tejidos reproductivos femeninos donde participan en el normal desarrollo de la función ovárica. Están implicados en la formación del folículo, en la formación y regresión del cuerpo lúteo y en la reestructuración del tejido ovárico durante la ovulación ²³¹.

Anomalías en el microambiente del tejido invadido hacen posible que las células endometriales se adhieran a él y proliferen. Endometrio eutópico y ectópico difieren en la expresión de genes relacionados con la adhesión celular, citoesqueleto, matriz extracelular, transducción de señales y sistema inmunitario ²³². La presencia de células endometriales en la cavidad peritoneal ocurre en todas las mujeres durante el ciclo menstrual. Se ha postulado que, en condiciones normales, estas células son destruidas por macrófagos, y que dichos macrófagos están alterados en mujeres con EM ²³³. De hecho, el ambiente peritoneal de las mujeres con EM es propicio para la implantación y proliferación de las células endometriales recién llegadas. Las mujeres con EM tienen un mayor número de macrófagos en el endometrio eutópico, en las lesiones endometrióticas y en el líquido peritoneal que mujeres sin EM, y además estos macrófagos presentan activación alternativa ^{106,108}. Estas mujeres tienen una mayor secreción de citoquinas y factores de crecimiento, los cuales no sólo están implicados en la patogénesis de la EM, sino que también estimulan la proliferación celular en carcinomas de ovario ^{107,234}. En nuestra serie todas las muestras (quistes endometrióticos asociados y no asociados a cáncer y tumores) mostraron una densa infiltración de macrófagos con activación alternativa (CD163+).

Para la implantación de las células endometrióticas es de vital importancia que el ambiente peritoneal favorezca la formación de una red de vasos, dentro y alrededor de estas lesiones necesaria para su mantenimiento. La angiogénesis requiere proliferación, migración y extensión de las células endoteliales, remodelación, adhesión a la matriz extracelular y formación del lumen. Este proceso se da de forma no patológica durante el ciclo menstrual y la formación del cuerpo lúteo y está controlado por factores de crecimiento y

citoquinas¹¹⁵. En el endometrio ectópico hay un mayor número de vasos y macrófagos activados y niveles más elevados de VEGF comparando con el endometrio eutópico¹¹⁶. Los macrófagos peritoneales secretan VEGF en respuesta a hormonas esteroideas y citoquinas inflamatorias (elevadas en EM)^{114,235}. Las RHO GTPasas CDC42 y RAC1 participan en la síntesis de VEGF a través de la quinasa c-Jun²³⁶. En nuestra serie las células que mostraron inmunotinción positiva para CDC42 eran macrófagos. Desde los quistes endometrióticos solitarios hasta la EM atípica contigua al tumor y los carcinomas observamos una disminución de macrófagos CDC42 positivos (CDC42+). Hipotéticamente, este hecho podría resultar en una disminución de la síntesis de VEGF, presumiblemente debido a que los nuevos vasos sanguíneos se formarían en los primeros estadios de la EM, tal y como han sugerido algunos autores¹¹⁴.

5. Macrófagos y fagocitosis

Se ha postulado que durante la iniciación del tumor los macrófagos tendrían un fenotipo inflamatorio y que durante la progresión tumoral irían adquiriendo un fenotipo fagocítico¹⁰⁵. En concordancia con esta teoría, se ha descrito que los macrófagos en EM presentan activación alternativa (fenotipo fagocítico) y son necesarios para el crecimiento y desarrollo de los implantes endometrióticos¹⁰⁸. De hecho, las células tumorales de carcinoma de ovario inducen en los macrófagos dicha activación²³⁷. Nuestros resultados indican que en EM y en carcinoma de ovario hay una densa infiltración de macrófagos con fenotipo fagocítico (CD163+).

Por otro lado, se ha descrito que tanto en EM como en carcinoma de ovario los macrófagos presentan deficiencias en la habilidad para fagocitar^{238,239}. La formación de pseudópodos durante la fagocitosis requiere reorganización del citoesqueleto, proceso en el que están implicadas las proteínas RHO. Algunos trabajos han demostrado que los macrófagos deficientes en CDC42 no tienen la capacidad de fagocitar debido a que disminuye la formación de pseudópodos²⁴⁰ y que CDC42 y RAC1 son necesarias para la formación de estas estructuras fagocíticas^{241,242}. En las muestras analizadas en el presente trabajo encontramos una mayor proporción de macrófagos CDC42+ en quistes endometrióticos solitarios (no asociados a cáncer) que en los asociados a carcinoma. La menor proporción de macrófagos CDC42+ se encontró en los tumores. Entonces, podríamos sugerir que la habilidad de los macrófagos para fagocitar células tumorales en los quistes endometrióticos

iría disminuyendo conforme aumenta la transformación maligna de la EM y la progresión tumoral. Nuestros resultados indican la posibilidad de que los macrófagos CDC42+ previenen la transformación maligna de la EM y, aunque es necesario confirmar estos resultados en más casos y realizar estudios funcionales, podrían utilizarse como una técnica de cribado para identificar pacientes con EM con alto riesgo de transformación maligna.

CONCLUSIONES

1. Los niveles más elevados de CDC42 y PAK1 y la menor expresión de RHO GDI α en los HGSC respecto a los CCC, sugiere que los HGSC son más invasivos que los CCC en sí mismos.
2. La expresión de RHOA y RHOC está correlacionada con el estadio tumoral en los CCC (estadio I vs. II-IV).
3. En los HGSC, los niveles elevados de RHOA podrían inducir resistencia a la quimioterapia.
4. La vía de señalización de las RHO GTPasas parece estar implicada en la patogénesis de los HGSC y de CCC y podría explicar las diferencias en el patrón de diseminación que hay entre estos dos tumores.
5. En EM y en carcinoma de ovario hay una densa infiltración de macrófagos con fenotipo fagocítico (CD163+).
6. La RHO GTPasa CDC42 podría estar implicada en la transformación maligna de la endometriosis ovárica: hay una mayor proporción de macrófagos CDC42+ en quistes endometrióticos no asociados a cáncer que en los asociados a carcinoma y que en el tumor.
7. Los macrófagos que expresan CDC42 podrían prevenir la transformación maligna de la EM ovárica.

BIBLIOGRAFÍA

1. Scully, R. E. Ovarian Tumors. *Am J Pathol* **87**, 686–720 (1977).
2. Prat, J. Ovarian carcinomas: five distinct diseases with different origins, genetic alterations, and clinicopathological features. *Virchows Arch* **460**, 237–49 (2012).
3. Köbel, M. *et al.* Ovarian carcinoma subtypes are different diseases: implications for biomarker studies. *PLoS Med* **5**, e232 (2008).
4. Bell, D. A. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Mod Pathol* **18**, 19–32 (2005).
5. Kurman, R. & Shih, I. The Origin and pathogenesis of epithelial ovarian cancer—a proposed unifying theory. *Am J Surg Pathol* **34**, 433–43 (2010).
6. Kuhn, E., Kurman, R. & Shih, I. Ovarian Cancer is an Imported Disease: Fact or Fiction? *Curr Obstet Gynecol Rep* **1**, 1–9 (2012).
7. Piek, J. M. *et al.* Dysplastic changes in prophylactically removed Fallopian tubes of women predisposed to developing ovarian cancer. *J Pathol* **195**, 451–6 (2001).
8. Lee, Y. *et al.* A candidate precursor to serous carcinoma that originates in the distal fallopian tube. *J Pathol* **211**, 26–35 (2007).
9. Crum, C. P. *et al.* Lessons from BRCA: the tubal fimbria emerges as an origin for pelvic serous cancer. *Clin Med Res* **5**, 35–44 (2007).
10. Kurman, R. J. & Shih, I.-M. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer—shifting the paradigm. *Hum Pathol* **42**, 918–31 (2011).
11. Sainz de la Cuesta, R. *et al.* Histologic transformation of benign endometriosis to early epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* **60**, 238–44 (1996).
12. Vercellini, P. *et al.* Site of origin of epithelial ovarian cancer: the endometriosis connection. *BJOG - Int J Obstet Gy* **107**, 1155–7 (2000).
13. Jimbo, H. *et al.* Prevalence of ovarian endometriosis in epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Obstet* **59**, 245–50 (1997).
14. Prowse, A. H. *et al.* Molecular genetic evidence that endometriosis is a precursor of ovarian cancer. *Int J Cancer* **119**, 556–62 (2006).
15. Yamamoto, S. *et al.* PIK3CA mutation is an early event in the development of endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma. *J Pathol* **225**, 189–94 (2011).
16. Xiao, W., Awadallah, A. & Xin, W. Loss of ARID1A/BAF250a expression in ovarian endometriosis and clear cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* **5**, 642–50 (2012).

17. Goff, B. A. *et al.* Development of an ovarian cancer symptom index: possibilities for earlier detection. *Cancer* **109**, 221–7 (2007).
18. Lutz, A. M., Drescher, C. W., Ray, P., Cochran, F. V & Urban, N. Early Diagnosis of Ovarian Carcinoma : Is a Solution in Sight ? *Radiology* **259**, 329–45 (2011).
19. Hogg, R. & Friedlander, M. Biology of epithelial ovarian cancer: implications for screening women at high genetic risk. *J Clin Oncol* **22**, 1315–27 (2004).
20. Pavlik, E. J. & van Nagell, J. R. Early detection of ovarian tumors using ultrasound. *Womens Health (Lond, Engl)* **9**, 39–57 (2013).
21. Klug, T. L., Bast, R. C. & Niloff, J. M. Monoclonal Antibody Immunoradiometric Assay for an Antigenic Determinant (CA 125) Associated with Human Epithelial Ovarian Carcinomas. *Cancer Res* **44**, 1048–53 (1984).
22. Karam, A. K. & Karlan, B. Y. Ovarian cancer: the duplicity of CA125 measurement. *Nat Rev Clin Oncol* **7**, 335–9 (2010).
23. Visintin, I. *et al.* Diagnostic markers for early detection of ovarian cancer. *Clin Cancer Res* **14**, 1065–72 (2008).
24. Kristjansdottir, B., Levan, K., Partheen, K., Carlsohn, E. & Sundfeldt, K. Potential tumor biomarkers identified in ovarian cyst fluid by quantitative proteomic analysis, iTRAQ. *Clin Proteomics* **10**, 4 (2013).
25. Zhang, Q. *et al.* A multiplex methylation-specific PCR assay for the detection of early-stage ovarian cancer using cell-free serum DNA. *Gynecol Oncol* **130**, 132–9 (2013).
26. Toss, A. *et al.* Ovarian cancer: can proteomics give new insights for therapy and diagnosis? *Int J Mol Sci* **14**, 8271–90 (2013).
27. Ying, H., Lv, J., Ying, T., Li, J. & Yang, Q. Screening of feature genes of the ovarian cancer epithelia with DNA microarray. *J Ovarian Res* **6**, 39 (2013).
28. Shih, I.-M. & Kurman, R. J. Ovarian Tumorigenesis. *Am J Pathol* **164**, 1511–8 (2004).
29. Espinosa, I. *et al.* Gene expression analysis identifies two groups of ovarian high-grade serous carcinomas with different prognosis. *Mod Pathol* **24**, 846–54 (2011).
30. Takano, M. *et al.* Survival analysis of ovarian clear cell carcinoma confined to the ovary with or without comprehensive surgical staging. *Oncol Rep* **19**, 1259–64 (2008).
31. Högberg, T., Glimelius, B. & Nygren, P. A systematic overview of chemotherapy effects in ovarian cancer. *Acta Oncol* **40**, 340–60 (2001).
32. Kaku, T. *et al.* Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc* **36**, 9–17 (2003).

33. Itamochi, H., Kigawa, J. & Terakawa, N. Mechanisms of chemoresistance and poor prognosis in ovarian clear cell carcinoma. *Cancer Sci* **99**, 653–8 (2008).
34. Cho, Y.-H. *et al.* Mutational analysis of KRAS, BRAF, and TP53 genes of ovarian serous carcinomas in Korean women. *Yonsei Med J* **50**, 266–72 (2009).
35. Ahmed, A. A. *et al.* Driver mutations in TP53 are ubiquitous in high grade serous carcinoma of the ovary. *J Pathol* **221**, 49–56 (2010).
36. Lee, C.-H. *et al.* MicroRNA profiling of BRCA1/2 mutation-carrying and non-mutation-carrying high-grade serous carcinomas of ovary. *PLoS one* **4**, e7314 (2009).
37. Kuo, K.-T. *et al.* Analysis of DNA copy number alterations in ovarian serous tumors identifies new molecular genetic changes in low-grade and high-grade carcinomas. *Cancer Res* **69**, 4036–42 (2009).
38. Mahajan, A. *et al.* HMGA2: a biomarker significantly overexpressed in high-grade ovarian serous carcinoma. *Mod Pathol* **23**, 673–81 (2010).
39. Sugiyama, T. *et al.* Clinical characteristics of clear cell carcinoma of the ovary: a distinct histologic type with poor prognosis and resistance to platinum-based chemotherapy. *Cancer* **88**, 2584–9 (2000).
40. Bachvarov, D. *et al.* Gene expression patterns of chemoresistant and chemosensitive serous epithelial ovarian tumors with possible predictive value in response to initial chemotherapy. *Int J Oncol* **29**, 919–33 (2006).
41. Kennedy, a W., Markman, M., Biscotti, C. V, Emery, J. D. & Rybicki, L. a. Survival probability in ovarian clear cell adenocarcinoma. *Gynecol Oncol* **74**, 108–14 (1999).
42. Takano, M. *et al.* Clear cell carcinoma of the ovary: a retrospective multicentre experience of 254 patients with complete surgical staging. *Br J Cancer* **94**, 1369–74 (2006).
43. Erzen M, Rakar S, Klancnik B, S. K. Endometriosis-associated ovarian carcinoma (EAOC): an entity distinct from other ovarian carcinomas as suggested by a nested case-control study. *Gynecol Oncol* **83**, 100–8 (2001).
44. Soslow, R. A. Histologic subtypes of ovarian carcinoma: an overview. *Int J Gynecol Pathol* **27**, 161–74 (2008).
45. Kato, N., Tamura, G. & Motoyama, T. Hypomethylation of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) CpG island in clear cell carcinoma of the ovary. *Virchows Arch* **452**, 175–80 (2008).
46. Tsuchiya, A. *et al.* Expression Profiling in Ovarian Clear Cell Carcinoma Identification of Hepatocyte Nuclear Factor-1beta as a Molecular Target for Therapy of Ovarian Clear Cell Carcinoma. *Am J Pathol* **163**, 2503–12 (2003).
47. Kato, N., Sasou, S. & Motoyama, T. Expression of hepatocyte nuclear factor-1beta (HNF-1beta) in clear cell tumors and endometriosis of the ovary. *Mod Pathol* **19**, 83–9 (2006).

48. Kobayashi, H. *et al.* The role of hepatocyte nuclear factor-1beta in the pathogenesis of clear cell carcinoma of the ovary. *Int J Gynecol Cancer* **19**, 471–9 (2009).
49. Kuo, K.-T. *et al.* Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. *Am J Pathol* **174**, 1597–601 (2009).
50. Wiegand, K. & Shah, S. ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* **363**, 1532–43 (2010).
51. Jones, S. *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* **330**, 228–31 (2010).
52. Yamashita, Y., Akatsuka, S., Shinjo, K., Yatabe, Y. & Kobayashi, H. Met Is the Most Frequently Amplified Gene in Endometriosis-Associated Ovarian Clear Cell Adenocarcinoma and Correlates with Worsened Prognosis. *PloS one* **8**, 1–11 (2013).
53. Maeda, D. *et al.* Glypican-3 expression in clear cell adenocarcinoma of the ovary. *Mod Pathol* **22**, 824–32 (2009).
54. Umezu, T. *et al.* Gene silencing of glypican-3 in clear cell carcinoma of the ovary renders it more sensitive to the apoptotic agent paclitaxel in vitro and in vivo. *Cancer Sci* **101**, 143–8 (2010).
55. Köbel, M. & Kalloger, S. A limited panel of immunomarkers can reliably distinguish between clear cell and high-grade serous carcinoma of the ovary. *Am J Surg Pathol* **33**, 14–21 (2009).
56. Pectasides, D., Pectasides, E., Psyrri, A. & Economopoulos, T. Treatment issues in clear cell carcinoma of the ovary: a different entity? *Oncologist* **11**, 1089–94 (2006).
57. Yoshida, S. *et al.* Theoretical model of treatment strategies for clear cell carcinoma of the ovary: focus on perspectives. *Cancer Treat Rev* **35**, 608–15 (2009).
58. Itamochi, H. *et al.* Adenovirus type 5 E1A gene therapy for ovarian clear cell carcinoma: a potential treatment strategy. *Mol Cancer Ther* **6**, 227–35 (2007).
59. Timmers, P., Zwinderman, A., Teodorovic, I., Vergote, I. & Trimbos, J. Clear cell carcinoma compared to serous carcinoma in early ovarian cancer: same prognosis in a large randomized trial. *Int J Gynecol Cancer* **19**, 88–93 (2009).
60. Prat, J. *Pathology of the ovary*. (Philadelphia, PA: Saunders, 2004).
61. Sato, N. *et al.* Loss of Heterozygosity on 10q23 . 3 and Mutation of the Tumor Suppressor Gene PTEN in Benign Endometrial Cyst of the Ovary : Possible Sequence Progression from Benign Endometrial Cyst to Endometrioid Carcinoma and Clear Cell Carcinoma of the Ovary. *Cancer Res* **60**, 7052–6 (2000).

62. Catasús, L. *et al.* Molecular genetic alterations in endometrioid carcinomas of the ovary: similar frequency of beta-catenin abnormalities but lower rate of microsatellite instability and PTEN alterations than in uterine endometrioid carcinomas. *Hum Pathol* **35**, 1360–8 (2004).
63. Dinulescu, D. M. *et al.* Role of K-ras and Pten in the development of mouse models of endometriosis and endometrioid ovarian cancer. *Nat Med* **11**, 63–70 (2005).
64. Irving, J. A. *et al.* Synchronous endometrioid carcinomas of the uterine corpus and ovary: alterations in the beta-catenin (CTNNB1) pathway are associated with independent primary tumors and favorable prognosis. *Hum Pathol* **36**, 605–19 (2005).
65. Zhai, Q. J., Rosen, D. G., Lu, K. & Liu, J. Loss of DNA Mismatch Repair Protein hMSH6 in Ovarian Cancer is Histotype-Specific. *Int J Exp Pathol* **1**, 502–9 (2008).
66. Campbell, I. G. *et al.* Mutation of the PIK3CA Gene in Ovarian and Breast Cancer Mutation of the PIK3CA Gene in Ovarian and Breast Cancer. *Cancer Res* **64**, 7678–81 (2004).
67. Bulun, S. E. Mechanisms of disease Endometriosis. *N Engl J Med* **360**, 268–79 (2009).
68. Bischoff, F. Z. & Simpson, J. L. Heritability and molecular genetic studies of endometriosis. *Hum Reprod Update* **6**, 37–44 (2000).
69. Montgomery, G. W. *et al.* The search for genes contributing to endometriosis risk. *Hum Reprod Update* **14**, 447–57 (2008).
70. Treloar, S. a *et al.* Genomewide linkage study in 1,176 affected sister pair families identifies a significant susceptibility locus for endometriosis on chromosome 10q26. *Am J Hum Genet* **77**, 365–76 (2005).
71. Yoshikawa, H. *et al.* Prevalence of endometriosis in ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* **50**, 11–7 (2000).
72. Fukunaga, M., Nomura, K., Ishikawa, E. & Ushigome, S. Ovarian atypical endometriosis: its close association with malignant epithelial tumours. *Histopathology* **30**, 249–55 (1997).
73. Stern, R. *et al.* Malignancy in endometriosis: frequency and comparison of ovarian and extraovarian types. *Int J Gynecol Pathol* **20**, 133–9 (2001).
74. Otsuka, J. *et al.* K-ras mutation may promote carcinogenesis of endometriosis leading to ovarian clear cell carcinoma. *Med Electron Microsc* **37**, 188–92 (2004).
75. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. The Hallmarks of Cancer. *Cell* **100**, 57–70 (2000).
76. Varma, R., Rollason, T., Gupta, J. K. & Maher, E. R. Endometriosis and the neoplastic process. *Reproduction* **127**, 293–304 (2004).
77. Abrao, M. S. *et al.* Deeply infiltrating endometriosis affecting the rectum and lymph nodes. *Fertil Steril* **86**, 543–7 (2006).

78. Brinton, L. A., Gridley, G., Persson, I., Baron, J. & Bergqvist, A. Cancer risk after a hospital discharge diagnosis of endometriosis. *Am J Obstet Gynecol* **176**, 572–9 (1997).
79. Melin, a, Sparén, P. & Bergqvist, A. The risk of cancer and the role of parity among women with endometriosis. *Hum Reprod* **22**, 3021–6 (2007).
80. Aris, A. Endometriosis-associated ovarian cancer: A ten-year cohort study of women living in the Estrie Region of Quebec, Canada. *J Ovarian Res* **3**, 2 (2010).
81. Olson, J. E. *et al.* Postmenopausal cancer risk after self-reported endometriosis diagnosis in the Iowa Women's Health Study. *Cancer* **94**, 1612–8 (2002).
82. Sampson, J. A. Endometrial carcinoma of the ovary arising in endometrial tissue in that organ. *Arch Surg* **10**, 1–72 (1925).
83. Heaps, J. M., Nieberg, R. K. & Berek, J. S. Malignant neoplasms arising in endometriosis. *Obstet Gynecol* **75**, 1023–8 (1990).
84. Moll, U. M., Chumas, J. C., Chalas, E. & Mann, W. J. Ovarian carcinoma arising in atypical endometriosis. *Obstet Gynecol* **75**, 537–9 (1990).
85. Mandai, M., Yamaguchi, K., Matsumura, N., Baba, T. & Konishi, I. Ovarian cancer in endometriosis: molecular biology, pathology, and clinical management. *Int J Clin Oncol* **14**, 383–91 (2009).
86. Akahane T, Sekizawa A, Okuda T, Kushima M, Saito H, O. T. Disappearance of steroid hormone dependency during malignant transformation of ovarian clear cell cancer. *Int J Gynecol Pathol* **24**, 369–76 (2005).
87. Körner, M., Burckhardt, E. & Mazzucchelli, L. Higher frequency of chromosomal aberrations in ovarian endometriosis compared to extragonadal endometriosis: A possible link to endometrioid adenocarcinoma. *Mod Pathol* **19**, 1615–23 (2006).
88. Ali-Fehmi, R. *et al.* Patterns of loss of heterozygosity at 10q23.3 and microsatellite instability in endometriosis, atypical endometriosis, and ovarian carcinoma arising in association with endometriosis. *Int J Gynecol Pathol* **25**, 223–99 (2006).
89. Martini, M. *et al.* Possible involvement of hMLH1, p16(INK4a) and PTEN in the malignant transformation of endometriosis. *Int J Cancer* **102**, 398–406 (2002).
90. Obata, K. & Hoshiai, H. Common genetic changes between endometriosis and ovarian cancer. *Gynecol Obstet Invest* **50**, 39–43 (2000).
91. Akahane, T., Sekizawa, A., Purwosunu, Y., Nagatsuka, M. & Okai, T. The role of p53 mutation in the carcinomas arising from endometriosis. *Int J Gynecol Pathol* **26**, 345–51 (2007).
92. Filigheddu, N. *et al.* Differential Expression of MicroRNAs between Eutopic and Ectopic Endometrium in Ovarian Endometriosis. *J Biomed Biotechnol* **2010**, 369549 (2010).

93. Forte, A. *et al.* Expression pattern of stemness-related genes in human endometrial and endometriotic tissues. *Mol Med* **15**, 392–401 (2009).
94. Laudanski, P. *et al.* Expression of selected tumor suppressor and oncogenes in endometrium of women with endometriosis. *Hum Reprod* **24**, 1880–90 (2009).
95. Honda, H., Barrueto, F. F., Gogusev, J., Im, D. D. & Morin, P. J. Serial analysis of gene expression reveals differential expression between endometriosis and normal endometrium. Possible roles for AXL and SHC1 in the pathogenesis of endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* **6**, 59 (2008).
96. Béliard, A., Noël, A. & Foidart, J.-M. Reduction of apoptosis and proliferation in endometriosis. *Fertil Steril* **82**, 80–85 (2004).
97. Johnson, M. C. *et al.* Augmented cell survival in eutopic endometrium from women with endometriosis: Expression of c-myc, TGF-beta1 and bax genes. *Reprod Biol Endocrinol* **3**, 45 (2005).
98. Melo, A. S. *et al.* Unfavorable lipid profile in women with endometriosis. *Fertil Steril* **93**, 2433–6 (2010).
99. Attar, E. *et al.* Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 623–31 (2009).
100. Gurates, B. *et al.* WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* **87**, 4369–77 (2002).
101. Delvoux, B. *et al.* Increased production of 17beta-estradiol in endometriosis lesions is the result of impaired metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* **94**, 876–83 (2009).
102. Zanetta, G. M., Webb, M. J., Li, H. & Keeney, G. L. Hyperestrogenism: a relevant risk factor for the development of cancer from endometriosis. *Gynecol Oncol* **79**, 18–22 (2000).
103. Zhao, H., Wang, Q., Bai, C., He, K. & Pan, Y. A cross-study gene set enrichment analysis identifies critical pathways in endometriosis. *Reprod Biol Endocrinol* **7**, 94 (2009).
104. Gemmill, J. A. L., Stratton, P., Cleary, S. D., Ballweg, M. Lou & Sinaii, N. Cancers, infections, and endocrine diseases in women with endometriosis. *Fertil Steril* **94**, 1627–31 (2010).
105. Qian, B.-Z. & Pollard, J. W. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell* **141**, 39–51 (2010).
106. Berbic, M. *et al.* Macrophage expression in endometrium of women with and without endometriosis. *Hum Reprod* **24**, 325–32 (2009).
107. Gazvani, R. & Templeton, A. Peritoneal environment, cytokines and angiogenesis in the pathophysiology of endometriosis. *Reproduction* **123**, 217–26 (2002).

108. Bacci, M. *et al.* Macrophages are alternatively activated in patients with endometriosis and required for growth and vascularization of lesions in a mouse model of disease. *Am J Pathol* **175**, 547–56 (2009).
109. OuYang, Z. *et al.* Interleukin-4 Stimulates Proliferation of Endometriotic Stromal Cells. *The American journal of pathology* **173**, 463–469 (2008).
110. Herrmann Lavoie, C., Fraser, D., Therriault, M.-J. & Akoum, A. Interleukin-1 stimulates macrophage migration inhibitory factor secretion in ectopic endometrial cells of women with endometriosis. *Am J Reprod Immunol* **58**, 505–13 (2007).
111. Oku, H. *et al.* Role of IL-18 in pathogenesis of endometriosis. *Hum Reprod* **19**, 709–14 (2004).
112. Tsudo, T. *et al.* Altered gene expression and secretion of interleukin-6 in stromal cells derived from endometriotic tissues. *Fertil Steril* **73**, 205–11 (2000).
113. Rocha, A. L. L., Reis, F. M. & Taylor, R. N. Angiogenesis and endometriosis. *Gynecol Obstet Int* **2013**, 1–8 (2013).
114. Lin, Y.-J., Lai, M.-D., Lei, H.-Y. & Wing, L.-Y. C. Neutrophils and macrophages promote angiogenesis in the early stage of endometriosis in a mouse model. *Endocrinology* **147**, 1278–86 (2006).
115. McLaren, J. Vascular endothelial growth factor and endometriotic angiogenesis. *Hum Reprod Update* **6**, 45–55 (2000).
116. Machado, D. E., Berardo, P. T., Palmero, C. Y. & Nasciutti, L. E. Higher expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptor VEGFR-2 (Flk-1) and metalloproteinase-9 (MMP-9) in a rat model of peritoneal endometriosis is similar to cancer diseases. *J Exp Clin Cancer Res* **29**, 4 (2010).
117. Braza-Boïls, A. *et al.* Peritoneal Fluid Reduces Angiogenesis-Related MicroRNA Expression in Cell Cultures of Endometrial and Endometriotic Tissues from Women with Endometriosis. *PloS one* **8**, e62370 (2013).
118. Lebovic, D. I. *et al.* Induction of an angiogenic phenotype in endometriotic stromal cell cultures by interleukin-1 β . *Mol Hum Reprod* **6**, 269–75 (2000).
119. Lambrinoudaki, I. V. *et al.* Measurable serum markers of oxidative stress response in women with endometriosis. *Fertil Steril* **91**, 46–50 (2009).
120. Defrère, S. *et al.* Potential involvement of iron in the pathogenesis of peritoneal endometriosis. *Mol Hum Reprod* **14**, 377–85 (2008).
121. Ngô, C. *et al.* Reactive Oxygen Species Controls Endometriosis Progression. *Am J Pathol* **175**, 225–34 (2009).
122. Heasman, S. J. & Ridley, A. J. Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 690–701 (2008).

123. Jaffe, A. B. & Hall, A. Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* **21**, 247–69 (2005).
124. Fauré, J. & Dagher, M. C. Interactions between Rho GTPases and Rho GDP dissociation inhibitor (Rho-GDI). *Biochimie* **83**, 409–14 (2001).
125. Wennerberg, K. & Der, C. J. Rho-family GTPases : it ' s not only Rac and Rho (and I like it). *J Cell Sci* **117**, 1301–12 (2004).
126. DerMardirossian, C. & Bokoch, G. M. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* **15**, 356–63 (2005).
127. Tcherkezian, J. & Lamarche-Vane, N. Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* **99**, 67–86 (2007).
128. Robbe, K., Otto-Bruc, A., Chardin, P. & Antony, B. Dissociation of GDP dissociation inhibitor and membrane translocation are required for efficient activation of Rac by the Dbl homology-pleckstrin homology region of Tiam. *J Biol Chem* **278**, 4756–62 (2003).
129. Adra, C. N. *et al.* RhoGDIgamma: a GDP-dissociation inhibitor for Rho proteins with preferential expression in brain and pancreas. *Proc Natl Acad Sci* **94**, 4279–84 (1997).
130. Olofsson, B. Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cel Signal* **11**, 545–54 (1999).
131. Dransart, E., Olofsson, B. & Cherfils, J. RhoGDIs revisited: novel roles in Rho regulation. *Traffic* **6**, 957–66 (2005).
132. Garcia-Mata, R., Boulter, E. & BurrIDGE, K. The invisible hand : regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 493–504 (2012).
133. Nethe, M. & Hordijk, P. L. The role of ubiquitylation and degradation in RhoGTPase signalling. *J Cell Sci* **123**, 4011–8 (2010).
134. Mettouchi, A. & Lemichez, E. Ubiquitylation of active Rac1 by the E3 ubiquitin-ligase HACE1. *Small GTPases* **3**, 102–6 (2012).
135. Vaughan, E. M., Miller, A. L., Yu, H.-Y. E. & Bement, W. M. Control of local Rho GTPase crosstalk by Abr. *Curr Biol* **21**, 270–7 (2011).
136. Ho, T. T. G., Merajver, S. D., Lapière, C. M., Nusgens, B. V & Deroanne, C. F. RhoA-GDP regulates RhoB protein stability. Potential involvement of RhoGDIalpha. *J Biol Chem* **283**, 21588–98 (2008).
137. Mackay, D. J. G. & Hall, A. Rho GTPases. *J Biol Chem* **273**, 20685–8 (1998).
138. Govek, E., Newey, S. E. & Aelst, L. Van. The role of the Rho GTPases in neuronal development. *Genes Dev* **19**, 1–49 (2005).

139. Shepelev, M. V, Chernoff, J. & Korobko, I. V. Rho family GTPase Chp/RhoV induces PC12 apoptotic cell death via JNK activation. *Small GTPases* **2**, 17–26 (2011).
140. Etienne-Manneville, S. & Hall, A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**, 629–35 (2002).
141. Bustelo, X., Sauzeau, V. & Berenjano, I. M. GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* **29**, 356–370 (2007).
142. Lu, W. & Mayer, B. J. Mechanism of activation of Pak1 kinase by membrane localization. *Oncogene* **18**, 797–806 (1999).
143. Jaffer, Z. M. & Chernoff, J. p21-activated kinases: three more join the Pak. *Int J Biochem Cell Biol* **34**, 713–7 (2002).
144. Eswaran, J., Soundararajan, M., Kumar, R. & Knapp, S. UnPAKING the class differences among p21-activated kinases. *Trends Biochem Sci* **33**, 394–403 (2008).
145. Singh, R. R., Song, C., Yang, Z. & Kumar, R. Nuclear localization and chromatin targets of p21-activated kinase 1. *J Biol Chem* **280**, 18130–7 (2005).
146. Deacon, S. W. & Peterson, J. R. Chemical Inhibition Through Conformational Stabilization of Rho GTPase Effectors. *Handb Exp Pharmacol* **186**, 431–60 (2008).
147. Daub, H., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Sobel, A. & Hall, A. Rac/Cdc42 and p65PAK regulate the microtubule-destabilizing protein stathmin through phosphorylation at serine 16. *J Biol Chem* **276**, 1677–80 (2001).
148. Banerjee, M., Worth, D., Prowse, D. M. & Nikolic, M. Pak1 phosphorylation on t212 affects microtubules in cells undergoing mitosis. *Curr Biol* **12**, 1233–9 (2002).
149. Wittmann, T. & Waterman-Storer, C. M. Cell motility: can Rho GTPases and microtubules point the way? *J Cell Sci* **114**, 3795–803 (2001).
150. Wallar, B. J., Deward, A. D., Resau, J. H. & Alberts, A. S. RhoB and the mammalian Diaphanous-related formin mDia2 in endosome trafficking. *Exp Cell Res* **313**, 560–71 (2007).
151. Segev, N. Coordination of Intracellular Transport Steps by GTPases. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 33–8 (2011).
152. Friesland, A. *et al.* Small molecule targeting Cdc42-intersectin interaction disrupts Golgi organization and suppresses cell motility. *Proc Natl Acad Sci* **110**, 1261–6 (2013).
153. Nofer, J.-R. *et al.* Involvement of Cdc42 signaling in apoA-I-induced cholesterol efflux. *J Biol Chem* **278**, 53055–62 (2003).
154. Tsukamoto, K. *et al.* Retarded Intracellular Lipid Transport Associated With Reduced Expression of Cdc42, a Member of Rho-GTPases, in Human Aged Skin Fibroblasts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **22**, 1899–904 (2002).

155. Aznar, S. & Lacal, J. C. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett* **165**, 1–10 (2001).
156. Lamarche-vane, N. & Hall, A. CdGAP , a Novel Proline-rich GTPase-activating Protein for Cdc42 and Rac. *J Biol Chem* **273**, 29172–7 (1998).
157. Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509–14 (1998).
158. Yasuda, S. & Narumiya, S. Analysis of a mitotic role of Cdc42. *Methods Enzymol* **406**, 656–65 (2006).
159. Alberts, B. *et al. Biología molecular de la célula*. (Barcelona: Omega, 1996).
160. Narumiya, S. & Yasuda, S. Rho GTPases in animal cell mitosis. *Curr Opin Cell Biol* **18**, 199–205 (2006).
161. Rincon, S., Coll, P. M. & Pilar Perez. Spatial Regulation of Cdc42 During Cytokinesis. *Cell Cycle* **6**, 1687–91 (2007).
162. Fukata, M., Nakagawa, M. & Kaibuchi, K. Roles of Rho-family GTPases in cell polarisation and directional migration. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 590–7 (2003).
163. Etienne-manneville, S. & Hall, A. Cdc42 regulates GSK-3 b and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. *Nature* **421**, 753–56 (2003).
164. Cushman, I. & Casey, P. J. RHO methylation matters: a role for isoprenylcysteine carboxylmethyltransferase in cell migration and adhesion. *Cell Adh Migr* **5**, 11–15 (2011).
165. Munn, D. H. & Cheung, N. K. Phagocytosis of tumor cells by human monocytes cultured in recombinant macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* **172**, 231–7 (1990).
166. Delves, P. J. & Roitt, I. M. The immune system (First of Two Parts). *N Engl J Med* **343**, 37–49 (2000).
167. Caron, E. & Hall, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**, 1717–21 (1998).
168. Hoppe, A. D. & Swanson, J. A. Cdc42, Rac1, and Rac2 Display Distinct Patterns of Activation during Phagocytosis. *Mol Cell Biol* **15**, 3509–19 (2004).
169. Beemiller, P. *et al.* A Cdc42 Activation Cycle Coordinated by PI 3-Kinase during Fc Receptor-mediated Phagocytosis. *Mol Cell Biol* **21**, 470–80 (2010).
170. Vega, F. M. & Ridley, A. J. Rho GTPases in cancer cell biology. *FEBS Lett* **582**, 2093–101 (2008).
171. Raptis, L., Arulanandam, R., Geletu, M. & James Turkson. The R(h)oads to Stat3: Stat3 activation by the Rho GTPases. *Exp Cell Res* **317**, 1787–95 (2011).

172. Berenjeno, I., Nuñez, F. & XR Bustelo. Transcriptomal profiling of the cellular transformation induced by Rho subfamily GTPases. *Oncogene* **16**, 4295–305 (2007).
173. Wu, W. J., Erickson, J. W., Lin, R. & Cerione, R. a. The gamma-subunit of the coatomer complex binds Cdc42 to mediate transformation. *Nature* **405**, 800–4. (2000).
174. Tu, S. S. *et al.* Antiapoptotic Cdc42 mutants are potent activators of cellular transformation. *Biochemistry* **41**, 12350–8 (2002).
175. Qiu, R. G., Abo, A., McCormick, F. & Symons, M. Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol* **17**, 3449–58 (1997).
176. Cerione, R. a. Cdc42: new roads to travel. *Trends Cell Biol* **14**, 127–32 (2004).
177. Lin, Q., Fuji, R. N., Yang, W. & Cerione, R. a. RhoGDI is required for Cdc42-mediated cellular transformation. *Curr Biol* **13**, 1469–79 (2003).
178. Gómez Del Pulgar, T. *et al.* Cdc42 is highly expressed in colorectal adenocarcinoma and downregulates ID4 through an epigenetic mechanism. *Int J Oncol* **33**, 185–193 (2008).
179. Stengel, K. & Zheng, Y. Cdc42 in oncogenic transformation, invasion, and tumorigenesis. *Cell Signal* **23**, 1415–23 (2011).
180. Jiang, W. G. *et al.* Prognostic value of rho GTPases and rho guanine nucleotide dissociation inhibitors in human breast cancers. *Clin Cancer Res* **9**, 6432–40 (2003).
181. Shikada, Y. *et al.* Higher expression of RhoC is related to invasiveness in non-small cell lung carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**, 5282–6 (2003).
182. Horiuchi, A. *et al.* Up-regulation of small GTPases, RhoA and RhoC, is associated with tumor progression in ovarian carcinoma. *Lab Invest* **83**, 861–70 (2003).
183. Bousquet, E. *et al.* Loss of RhoB expression promotes migration and invasion of human bronchial cells via activation of AKT1. *Cancer Res* **69**, 6092–9 (2009).
184. Cho, H. J. *et al.* RhoGDI2 expression is associated with tumor growth and malignant progression of gastric cancer. *Clin Cancer Res* **15**, 2612–9 (2009).
185. Schunke, D. *et al.* Cyclooxygenase-2 is a target gene of rho GDP dissociation inhibitor beta in breast cancer cells. *Cancer Res* **67**, 10694–702 (2007).
186. Chang, Y.-W. E., Marlin, J. W., Chance, T. W. & Jakobi, R. RhoA mediates cyclooxygenase-2 signaling to disrupt the formation of adherens junctions and increase cell motility. *Cancer Res* **66**, 11700–8 (2006).
187. Myhre, K. & Blobe, G. C. The type III TGF-beta receptor regulates epithelial and cancer cell migration through beta-arrestin2-mediated activation of Cdc42. *Proc Natl Acad Sci* **106**, 8221–6 (2009).

188. Schraml, P. *et al.* Combined Array Comparative Genomic Hybridization and Tissue Microarray Analysis Suggest PAK1 at 11q13.5-q14 as a Critical Oncogene Target in Ovarian Carcinoma. *Am J Pathol* **163**, 985–92 (2003).
189. Siu, M. K. Y. *et al.* Differential expression and phosphorylation of Pak1 and Pak2 in ovarian cancer: effects on prognosis and cell invasion. *Int J Cancer* **127**, 21–31 (2010).
190. Vial, E., Sahai, E. & Marshall, C. J. ERK-MAPK signaling coordinately regulates activity of Rac1 and RhoA for tumor cell motility. *Cancer Cell* **4**, 67–79 (2003).
191. Fritz, G. & Kaina, B. Rho GTPases: promising cellular targets for novel anticancer drugs. *Curr Cancer Drug Targets* **6**, 1–14 (2006).
192. Horiuchi, A. *et al.* Overexpression of RhoA enhances peritoneal dissemination: RhoA suppression with Lovastatin may be useful for ovarian cancer. *Cancer Sci* **99**, 2532–9 (2008).
193. Fromigué, O., Hamidouche, Z. & Marie, P. J. Blockade of the RhoA-JNK-c-Jun-MMP2 Cascade by Atorvastatin Reduces Osteosarcoma Cell Invasion. *J Biol Chem* **283**, 30549–56 (2008).
194. Kidera, Y. *et al.* Reduction of lung metastasis, cell invasion, and adhesion in mouse melanoma by statin-induced blockade of the Rho/Rho-associated coiled-coil-containing protein kinase pathway. *J Exp Clin Cancer Res* **29**, 127 (2010).
195. Hashimoto, K. *et al.* Alendronate inhibits intraperitoneal dissemination in in vivo ovarian cancer model. *Cancer Res* **65**, 540–5 (2005).
196. Hashimoto, K. *et al.* Geranylgeranylacetone inhibits lysophosphatidic acid-induced invasion of human ovarian carcinoma cells in vitro. *Cancer* **103**, 1529–36 (2005).
197. Hashimoto, K. *et al.* Geranylgeranylacetone inhibits ovarian cancer progression in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **356**, 72–7 (2007).
198. Chatterjee, M. & van Golen, K. L. Farnesyl transferase inhibitor treatment of breast cancer cells leads to altered RhoA and RhoC GTPase activity and induces a dormant phenotype. *Int J Cancer* **129**, 61–9 (2011).
199. Ying, H. *et al.* The Rho kinase inhibitor fasudil inhibits tumor progression in human and rat tumor models. *Mol Cancer Ther* **5**, 2158–64 (2006).
200. Ohta, T. & Takahashi, T. Inhibition of the Rho/ROCK pathway enhances the efficacy of cisplatin through the blockage of hypoxia-inducible factor-1 α in human ovarian cancer cells. *Cancer Biol Ther* **13**, 25–33 (2012).
201. Lang, J.-Y. *et al.* Antimetastatic effect of salvicine on human breast cancer MDA-MB-435 orthotopic xenograft is closely related to Rho-dependent pathway. *Clin Cancer Res* **11**, 3455–64 (2005).

202. Evelyn, C., Bell, J., Ryu, J. & Wade, S. Design, synthesis and prostate cancer cell-based studies of analogs of the Rho/MKL1 transcriptional pathway inhibitor, CCG-1423. *Bioorg Med Chem Lett* **20**, 665–72 (2010).
203. Boreddy, S. R., Sahu, R. P. & Srivastava, S. K. Benzyl isothiocyanate suppresses pancreatic tumor angiogenesis and invasion by inhibiting HIF- α /VEGF/Rho-GTPases: pivotal role of STAT-3. *PLoS one* **6**, e25799 (2011).
204. Pang, X., Yi, T., Yi, Z., Cho, S. G. & Qu, W. Morelloflavone, a biflavonoid, inhibits tumor angiogenesis by targeting Rho GTPases and ERK signaling pathways. *Cancer Res* **69**, 518–25 (2010).
205. Wu, Y., He, L., Zhang, L., Chen, J. & Yi, Z. Anacardic Acid (6-Pentadecylsalicylic Acid) Inhibits Tumor Angiogenesis by Targeting Src/FAK/Rho GTPases Signaling Pathway. *J Pharmacol Exp Ther* **339**, 403–11 (2011).
206. Higuchi, M., Onishi, K., Kikuchi, C. & Gotoh, Y. Scaffolding function of PAK in the PDK1-Akt pathway. *Nat Cell Biol* **10**, 1356–64 (2008).
207. Zhao, Z.-S. & Manser, E. Do PAKs make good drug targets? *F1000 Biol Rep* **2**, 70 (2010).
208. Kichina, J. & Goc, A. PAK1 as a therapeutic target. *Expert Opin Ther Targets* **14**, 703–25 (2010).
209. Eltabbakh, G. H., Mount, S. L., Beatty, B., Simmons-Arnold, L. & Cooper, K. Clinical and molecular differences between clear cell and papillary serous ovarian carcinoma. *J Surg Oncol* **93**, 379–86 (2006).
210. Takano, M., Tsuda, H. & Sugiyama, T. Clear cell carcinoma of the ovary: is there a role of histology-specific treatment? *J Exp Clin Cancer Res* **31**, 53 (2012).
211. Birrer, M. J. The Origin of Ovarian Cancer — Is It Getting Clearer ? *N Engl J Med* **363**, 1574–5 (2010).
212. Yamamoto, S. *et al.* Clear-cell adenofibroma can be a clonal precursor for clear-cell adenocarcinoma of the ovary: a possible alternative ovarian clear-cell carcinogenic pathway. *J Pathol* **216**, 103–10 (2008).
213. Crum, C. P. Intercepting pelvic cancer in the distal fallopian tube: Theories and realities. *Mol Oncol* **3**, 165–70 (2009).
214. Karst, A. M., Levanon, K. & Drapkin, R. Modeling high-grade serous ovarian carcinogenesis from the fallopian tube. *Proc Natl Acad Sci* **108**, 7547–52 (2011).
215. Levanon, K. *et al.* Primary ex-vivo cultures of human fallopian tube epithelium as a model for serous ovarian carcinogenesis. *Oncogene* **29**, 1103–13 (2010).
216. Chen, Q.-Y. *et al.* Expression analysis of Cdc42 in lung cancer and modulation of its expression by curcumin in lung cancer cell lines. *Int J Oncol* **40**, 1561–8 (2012).

217. Ong, C. C. *et al.* p21-activated kinase 1: PAK'ed with potential. *Oncotarget* **2**, 491–2 (2011).
218. Brown, L. a *et al.* Amplification of 11q13 in ovarian carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* **47**, 481–9 (2008).
219. Park, S.-Y., Lee, J. H., Ha, M., Nam, J.-W. & Kim, V. N. miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 23–9 (2009).
220. Stewart, J. J. *et al.* Proteins associated with Cisplatin resistance in ovarian cancer cells identified by quantitative proteomic technology and integrated with mRNA expression levels. *Mol Cel Proteomics* **5**, 433–43 (2006).
221. Nagaraj, S. H. & Reverter, A. A Boolean-based systems biology approach to predict novel genes associated with cancer: Application to colorectal cancer. *BMC Syst Biol* **5**, 35 (2011).
222. Kang, W. K., Lee, I. & Park, C. Characterization of RhoA -mediated Chem oresistance in Gastric Cancer Cells. *Cancer Res Treat* **37**, 251–6 (2005).
223. Kobune, M. *et al.* Wnt3/RhoA/ROCK signaling pathway is involved in adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma in an autocrine mechanism. *Mol Cancer Ther* **6**, 1774–84 (2007).
224. Molli, P. R., Pradhan, M. B., Advani, S. H. & Naik, N. R. RhoA: A therapeutic target for chronic myeloid leukemia. *Mol Cancer* **11**, 16 (2012).
225. Lang, N. *et al.* Effects of microRNA 29 family members on proliferation and invasion of gastric cancer cell lines. *Chin J Cancer* **29**, 603–10 (2010).
226. Burges, A. & Schmalfeldt, B. Ovarian cancer: diagnosis and treatment. *Dtsch Arztebl Int* **108**, 635–41 (2011).
227. Lee, B., Du, H. & Taylor, H. S. Experimental murine endometriosis induces DNA methylation and altered gene expression in eutopic endometrium. *Biol Reprod* **80**, 79–85 (2009).
228. Campbell, I. G. & Thomas, E. J. Endometriosis : candidate genes. *Hum Reprod Update* **7**, 15–20 (2001).
229. Higashiura, Y., Kajihara, H., Shigetomi, H. & Kobayashi, H. Identification of multiple pathways involved in the malignant transformation of endometriosis (Review). *Oncol Lett* **4**, 3–9 (2012).
230. Lebovic, D. I., Mueller, M. D. & Taylor, R. N. Immunobiology of endometriosis. *Fertil Steril* **75**, 1–10 (2001).
231. Wu, R., Van Der Hoek, K. H., Ryan, N. K., Norman, R. J. & Robker, R. L. Macrophage contributions to ovarian function. *Hum Reprod Update* **10**, 119–33 (2004).
232. Eyster, K. M., Klinkova, O., Kennedy, V. & Hansen, K. a. Whole genome deoxyribonucleic acid microarray analysis of gene expression in ectopic versus eutopic endometrium. *Fertil Steril* **88**, 1505–33 (2007).

233. Santanam, N. Macrophages, oxidation, and endometriosis. *Ann N Y Acad Sci* **955**, 183–98 (2002).
234. Seppänen, M. *et al.* Regulation of UT-OC-3 ovarian carcinoma cells by cytokines: inhibitory effects on cell proliferation and activation of transcription factors AP-1 and NF-kappaB. *Eur J Endocrinol* **142**, 393–401 (2000).
235. McLaren, J. *et al.* Vascular endothelial growth factor is produced by peritoneal fluid macrophages in endometriosis and is regulated by ovarian steroids. *J Clin Invest* **98**, 482–9 (1996).
236. Saniger, M. L. *et al.* c-Jun kinase mediates expression of VEGF induced at transcriptional level by Rac1 and Cdc42Hs but not by RhoA. *J Cel Biochem* **98**, 650–60 (2006).
237. Hagemann, T. *et al.* Ovarian cancer cells polarize macrophages toward a tumor-associated phenotype. *J Immunol* **176**, 5023–32 (2006).
238. Gordon, I. O. & Freedman, R. S. Defective antitumor function of monocyte-derived macrophages from epithelial ovarian cancer patients. *Clin Cancer Res* **12**, 1515–24 (2006).
239. Chuang, P.-C., Wu, M.-H., Shoji, Y. & Tsai, S.-J. Downregulation of CD36 results in reduced phagocytic ability of peritoneal macrophages of women with endometriosis. *J Pathol* **219**, 232–41 (2009).
240. Hirano, K. *et al.* Decreased expression of a member of the Rho GTPase family, Cdc42Hs, in cells from Tangier disease - the small G protein may play a role in cholesterol efflux. *FEBS Lett* **484**, 275–9 (2000).
241. Cox, D. *et al.* Requirements for both Rac1 and Cdc42 in membrane ruffling and phagocytosis in leukocytes. *J Exp Med* **186**, 1487–94 (1997).
242. Leverrier, Y. & Ridley, a J. Requirement for Rho GTPases and PI 3-kinases during apoptotic cell phagocytosis by macrophages. *Curr Biol* **11**, 195–9 (2001).