

Expresión de IQGAP1 en células de líquido
ascítico de pacientes con cáncer de ovario

IQGAP expression in cells from ascitic fluid
from patients suffering from ovarian
cancer

Trabajo de Fin de Grado

Carmen Gutiérrez Guevara

Tutores: Prof. Pablo Martín Vasallo y Dra. Rebeca González
Fernández

Grado en Biología
Junio de 2018

Agradecimientos

Al Dr. Pablo Martín Vasallo por darme la oportunidad de realizar este Trabajo de Final de Grado.

A la Dra. Rebeca González Fernández por su paciencia y horas de dedicación en el laboratorio.

A la Dra. Miriam Dorta Suárez, del Servicio de Oncología del Hospital de Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC) por proporcionar las muestras utilizadas en el trabajo experimental, diagnosticar a las pacientes, proponerles formar parte del experimento.

A David Orrego, que ha estado trabajando con las mismas muestras de partida, por transmitirme su optimismo y a Rita Martín Ramírez, doctoranda en nuestro laboratorio, por resolver dudas que fuese surgiendo en la fase experimental.

A toda mi familia, especialmente a mi madre, por apoyarme y conseguir que nunca me rinda a pesar de las dificultades.

Índice

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
2.1. Cáncer de ovario y ascitis maligna.....	3
2.2. IQGAP (IQ Motif Containing GTPase Activating Protein).....	4
2.2.1. IQGAP y cáncer	5
2.2.1.1. IQGAP-1 y la vía de señalización MAPK.....	5
2.2.1.2. IQGAP-1 y la vía de señalización Wnt.....	6
2.2.1.3. IQGAP-1 y adhesión celular.....	6
2.2.1.4. IQGAP-1, exocitosis y migración celular.....	7
2.3. CA-125 y cáncer de ovario	7
Objetivos	8
Material y métodos	8
4.1. Obtención de muestras y aislamiento de células del líquido ascítico	8
4.2. Cultivo celular	9
4.2.1. Preparación del medio de cultivo	9
4.2.2. Cultivo y cambio de medio.....	9
4.2.3. Levantamiento de células	10
4.3. Inmunohistoquímica.....	10
4.3.1. Preparación de placas para inmunohistoquímica y siembra en placa.....	10
4.3.2. Fijación de células en placa	11
4.3.3. Inmunohistoquímica y observación con microscopía confocal	12
Resultados.....	13
5.1. Aislamiento y cultivo celular	13
5.2. Inmunohistoquímica.....	15
5.2.1. Paciente 1.....	15
5.2.1.1. Paciente 1, pase I.....	17
5.2.1.2. Paciente 1, pase II.....	18
5.2.2. Paciente 2.....	19
5.2.1.1. Paciente 1, pase I.....	20

5.2.1.2. Paciente 1, pase II.....	21
Discusión	22
6.1 Del método inmunohistoquímico.....	22
6.2 Del método estadístico utilizado	22
6.3 De los resultados obtenidos.....	23
6.3.1 Inmunolocalización de IQGAP-1.....	23
6.3.2 Inmunolocalización de CA-125.....	24
6.3.3 Co-localización de IQGAP-1 y CA-125.....	25
Conclusiones	26
Conclusions.....	27
Bibliografía	28

Resumen

El cáncer de ovario es la quinta causa de muerte por cáncer en mujeres. Los niveles del marcador tumoral CA125 en suero son útiles para el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad, ya que se sobreexpresa en las células epiteliales, presentes en el 80% de los carcinomas de ovario.

Varios estudios han implicado a la familia de proteínas IQGAP, es especial IQGAP-1, en el proceso tumoral, interviniendo en distintas vías de transducción de señales, regulación de expresión génica y migración celular, responsables del origen y desarrollo de dicha enfermedad.

El objetivo de este trabajo fue estudiar mediante técnicas inmunocitoquímicas los patrones de expresión diferencial de IQGAP1 en células aisladas a partir del líquido ascítico de pacientes con carcinoma de ovario, utilizando CA-125 como marcador de células tumorales de origen ovárico.

IQGAP-1 en células tumorales aisladas de ascitis se localiza por todo el citosol, sobre todo en la zona perinuclear, circunstancialmente en la membrana plasmática y zonas contacto entre células, con un patrón similar al del citoesqueleto. Este patrón sugiere la participación de esta proteína en el proceso tumoral, que incluye interacciones con vías de proliferación y migración celular en la transición epitelial a mesenquimal (EMT).

Abstract

Ovarian cancer is the fifth cause of death from cancer in women. The serum CA-125 tumor marker levels are fundamental for diagnostic and follow-up of the disease, since it is overexpressed in epithelial cells, it occurs in 80% of ovarian carcinomas.

Several studies associate the IQGAP family of proteins, specially IQGAP-1, in the tumour process, involved in different signal transduction pathways, regulation of gene expression and cell migration, all responsible for the origin and development of cancer.

The goal of this study was to assess the differential expression patterns of IQGAP-1 in cells isolated from the ascitic fluid of patients suffering from ovarian carcinoma using immunocytochemistry techniques, using CA-125 as a marker.

IQGAP-1 in tumor cells isolated from ascites is distributed throughout the cytoplasm, especially in the perinuclear zone, circumstancially in the plasma membrane and touching zones. This suggests the involvement of this protein in the tumour process, including interactions with proliferation and cell migration pathways in the epithelial to mesenchymal transition (EMT).

Introducción

2.1. Cáncer de ovario y ascitis maligna

El cáncer de ovario es predominante en mujeres premenopáusicas, con un 80% de casos diagnosticados en mujeres mayores de 50 años. Es el quinto tipo más común entre féminas y la cuarta causa más frecuente de muerte por cáncer entre dicho colectivo (Ledermann et al., 2013).

La mayoría de los casos de cáncer de ovario son de origen epitelial y según la OMS se clasifican en los subtipos endometriode, de celda clara, mucinoso, Brenner, tumores epiteliales mixtos, indiferenciado y sin clasificar. Además, hay una clasificación que no excluye a la anterior, en la que se pueden clasificar en carcinomas de tipo 1, de menor grado, y de tipo 2, más agresivos (Ledermann et al., 2013).

Aún se desconoce la causa exacta del cáncer de ovario, pero se han identificado factores influyentes, siendo destacable la historia reproductiva de la mujer. Las mujeres que han tenido embarazos múltiples corren menos riesgo de padecer este tipo de cáncer que aquellas con un menor número de embarazos y éstas últimas a su vez tienen menor riesgo que las nulíparas. Además, menopausias tardías o tempranas contribuyen también a un mayor riesgo de padecer dicho cáncer, mientras que la píldora anticonceptiva, ligadura de trompas, lactancia materna y supresión de la ovulación disminuyen el riesgo. En definitiva, parece ser que la ovulación está correlacionada con el desarrollo de cáncer de ovario (Ledermann et al., 2013).

Por otro lado, el patrón hereditario también interviene. Así, mujeres con familiar de primer grado diagnosticado de dicho cáncer supera el doble del riesgo que aquellas sin antecedentes familiares, sin embargo, solo el 10% de los casos de cáncer de ovario son debidos a una mutación genética identificable como por ejemplo en los genes BRCA 1 y BRCA2 (Alsop et al., 2012).

Su diagnóstico temprano es complicado, pues los síntomas se observan con mayor frecuencia en etapas avanzadas de la enfermedad. Entre los síntomas encontramos dolor abdominal o pélvico, estreñimiento, diarrea, frecuencia urinaria, sangrado vaginal, distensión abdominal y fatiga. Además, el cáncer avanzado suele diseminarse al peritoneo

en forma de ascitis maligna, que conllevan a la hinchazón abdominal, náuseas, anorexia, dispepsia y saciedad temprana (Ledermann et al., 2013)

La ascitis maligna o carcinomatosis peritoneal consiste en la acumulación de líquidos en la cavidad peritoneal debido al depósito de células tumorales en dicha cavidad. La acumulación impide la absorción del líquido por el peritoneo y la reabsorción de proteínas, lo cual provoca el movimiento del líquido desde los capilares a la cavidad abdominal. Se manifiesta en un 30% de pacientes con cáncer ovárico en el momento de su diagnóstico y en un 60% en el de su fallecimiento (Plancarte, Guillén, Guajardo, & Mayer, 2004).

2.2. IQGAP (IQ Motif Containing GTPase Activating Protein)

IQGAP es una familia de proteínas, multidominio muy conservada evolutivamente que intervienen en la regulación de numerosos procesos celulares tales como citocinesis, proliferación celular, migración celular, tráfico de vesículas, señalización intercelular y dinámica del citoesqueleto (Hedman, Smith, & Sacks, 2015).

En humano encontramos IQGAP1, IQGAP2 e IQGAP3, que comparten estructura de dominio similar y una considerable homología de secuencia. Constan de cinco dominios; CHD o dominio de homología de calponina, WW o dominio proteína-proteína poli-prolina, IQ, GRD o relacionado con el dominio RasGAP y RasGAP_C o secuencia carboxilo terminal (Fig.1).

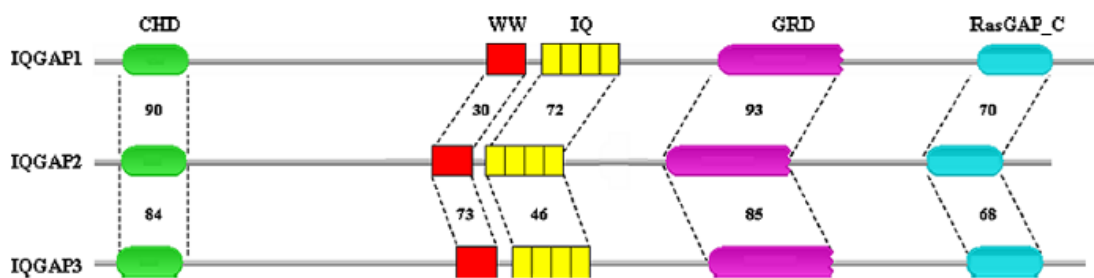


Figura 1. Diagrama de los dominios de las distintas proteínas IQGAP humanas y el porcentaje de identidad de aminoácidos que comparten.

Las distintas proteínas IQGAP tienen una distribución tisular que varía ligeramente. Mientras IQGAP1 tiene expresión ubicua, IQGAP2 se expresa principalmente en el hígado además de poder detectarse en próstata, riñón, tiroides, estómago, glándulas

salivales, órganos reproductores y plaquetas e IQGAP3 en el cerebro, pulmón, órganos reproductores e intestino (White, Brown, & Sacks, 2009).

En cultivos de células epiteliales, IQGAP1 se distribuye por todo el citoplasma con patrón de distribución parecido a los microtúbulos y se acumula en la membrana, especialmente en las uniones celulares junto a E-cadherinas, que son moléculas de adhesión celular, IQGAP2 en la membrana plasmática y vesículas e IQGAP3 en el núcleo (The Human Protein Atlas).

2.2.1. IQGAP y cáncer

De las tres proteínas, IQGAP-1 es la mejor definida en cuanto a funciones biológicas. Interviene en la regulación de distintas vías de señalización celular, el citoesqueleto y la unión a determinadas proteínas tales como E-cadherinas, B-catenina, Calmodulina, Cdc42 Y Rac1, y todo ello interviene en el cáncer.

El nivel de expresión de los genes IQGAP y los mRNAs son alterados frecuentemente en neoplasia. Estudios previos sobre la familia de proteínas IQGAP (White et al., 2009) en los que se comparan perfiles genéticos de tumores con tejido normal y cánceres más agresivos con menos agresivos, colocan a IQGAP-1 como un posible oncogén, ya que el gen y/o mRNA se encuentran sobreexpresados sobre determinados tumores frente a tejido normal. Entre ellos está el tumor de ovario, donde se sobreexpresa IQGAP-1 y esta sobreexpresión es mayor aún en el tumor de ovario agresivo (Dong et al., 2008). Mientras que hay teorías que postulan a IQGAP-2 como un gen supresor de tumores, ya que hay en torno a un 40% de pérdida de expresión en determinados tejidos tumorales en comparación a la expresión en tejidos sanos (White et al., 2009).

2.2.1.1. IQGAP-1 y la vía de señalización MAPK

IQGAP-1 interviene en la vía MAPK, una de las vías de señalización más importantes a nivel celular, pues participa en procesos celulares como la diferenciación, proliferación y división y se desregula en caso de neoplasia.

Actúa como andamio de MAPK uniéndose directamente a B-Raf, MEK y ERK, que son tres quinasas que intervienen en la cascada de fosforilación, donde ERK (MAP quinasa) tras ser fosforilada se transloca al núcleo y modula la transcripción de determinados genes. A su vez, todo está modulado por EGF (factor de crecimiento epidérmico).

Tras silenciar IQGAP-1 en determinadas células, B-Raf se hace más insensible a la estimulación por EGF, por el contrario que asociado a IQGAP-1, situación en la que tiene una actividad quinasa mucho mayor (White et al., 2009)

Por otro lado, ERK se une constitutivamente a IQGAP-1 y la unión es insensible a EGF, pero tras el tratamiento con EGF la interacción entre IQGAP-1 y MEK1 aumenta mientras que con MEK2 disminuye. Este hecho plantea la posibilidad de que IQGAP-1 active la vía de señalización MEK1, que promueve la proliferación celular y desactive la vía MEK2, que fomenta la diferenciación celular (White et al., 2009).

2.2.1.2. IQGAP-1 y la vía de señalización Wnt

IQGAP-1 favorece la vía de señalización Wnt, que fomenta la proliferación celular y la adhesión célula-célula, y lo hace uniéndose a la β -catenina, que generalmente es degradada por la caseína quinasa 1 (CK1) y la glucógeno quinasa-3 β (GSK-3 β), pero con la activación de la vía Wnt se transloca al núcleo. Aquí es donde entra en juego el papel de IQGAP-1, favoreciendo la localización nuclear de la β -catenina y activando la transcripción de un grupo de genes que participan en la división celular y la morfogénesis (White et al., 2009)

2.2.1.3. IQGAP-1 y adhesión celular

Las E-cadherinas juegan un papel importante en la adhesión celular, y parece ser que en caso de metástasis las células cancerosas pierden adhesión, hecho que coincide con la sobreexpresión de IQGAP1, que reduce la adhesión mediada por E-cadherinas. Además, hay indicios de que interviene en la regulación de la exocitosis y la degradación de la matriz extracelular para abrir paso a la metástasis (Berenice et al., 2012)

2.2.1.4. IQGAP1, exocitosis y migración celular

Para abrir paso a otros tejidos, las células tumorales deben remodelar la membrana basal y la matriz extracelular, eventos que ocurren por la acción de metaloproteinasas de matriz (MMP), que abren paso a través del invadopodio (Chang & Werb, 2001).

El exocisto es un complejo multiproteico implicado en la exocitosis, a cuyas subunidades sec3, sec8 y Exo70 se une IQGAP1, por lo que parece ser que ésta última interviene en la exocitosis. Además, se demostró que es necesaria la interacción entre IQGAP y el exocisto para la actividad del invadopodio, pues experimentos demuestran que el silenciamiento de IQGAP1 inhibe la invasión del carcinoma de ovario HO-8910PM (Dong et al., 2008).

IQGAP1 es un modulador de la migración celular ya que su aumento de expresión aumenta la cantidad de Cdc42 activa, una proteína implicada en el ciclo celular, y promueve la migración. Aunque es probable que la actina, calmodulina y APC también contribuyan a este efecto (White et al., 2009)

2.3. CA-125 y cáncer de ovario

CA-125 o antígeno carbohidrato 125 es una glicoproteína transmembrana de alto peso molecular (200-1000 kDa) de tipo mucina (Gu, Pan, Wu, Sun, & Huang, 2009) con función aún desconocida. Su dominio extracelular incluye repeticiones en tándem de 157 aminoácidos altamente glicosiladas (Bai et al., 2016).

Los anticuerpos anti-CA-125 reconocen epítomos de las regiones en tándem, OC125 Y M11, por lo que reaccionan con células epiteliales malignas de ovario (Bai et al., 2016)

El CA-125 se sobreexpresa consistentemente en las superficies de las células epiteliales, que se encuentran aproximadamente en el 80% de los carcinomas epiteliales de ovario (Gu et al., 2009). Además, puede expresarse en otros cánceres de origen ginecológico y otros de tipo no ginecológicos tales como de páncreas, pulmón, colon y mama. Debido a ello, esta glicoproteína se utiliza como biomarcador para controlar el crecimiento del carcinoma de ovario y en la detección de estadios avanzados del mismo. Así mismo, una caída rápida de CA125 durante la quimioterapia predice un pronóstico favorable (Gu et al., 2009; Bast et al., 2005).

Objetivos

Los objetivos de este trabajo son el establecimiento y caracterización de una línea celular de cáncer de ovario partiendo de muestras de líquido ascítico de pacientes. Concretamente este trabajo estudia la localización de la proteína IQGAP-1 mediante inmunolocalización por fluorescencia en estas células.

Objetivos concretos del trabajo experimental:

1. Aislar células del líquido ascítico extraído del peritoneo de las pacientes con cáncer de ovario con la finalidad de establecer una línea celular.
2. Estudio del patrón de expresión e inmunolocalización de la isoforma IQGAP-1, utilizando CA-125 como marcador de células tumorales ováricas de entre las células aisladas de líquido ascítico y de sus distintos pases.
3. Evaluación del patrón de localización y diferencias existentes entre pacientes y pases.

Material y métodos

4.1. Obtención de muestras y aislamiento de células del líquido ascítico

El estudio se realizó en pacientes del Servicio de Oncología Médica del Hospital Universitario de Nuestra Señora de la Candelaria (HUNSC; Santa Cruz de Tenerife, España) y fue aprobado por el Comité de Ética del HUNSC. Las pacientes firmaron consentimiento informado antes de la obtención de la muestra.

Se seleccionaron dos pacientes para el estudio. En el momento de la extracción, ambas pacientes padecen carcinoma seroso de alto grado en estadio IIIC, la primera de origen ovárico y la segunda de origen peritoneal. De cada paciente se realizaron dos pases del cultivo. Cada pase se corresponde a un levantamiento. El procedimiento que será explicado a lo largo de Material y Métodos.

Se aislaron células a partir de líquido ascítico procedente del abdomen de pacientes con cáncer de ovario. Para ello, se transvasó el líquido de los contenedores de obtención a tubos de centrifuga de 200 ml (Herolab LongLife), esterilizados, y se centrifugaron a 2000 revoluciones por minuto (rpm) y 17-18 °C durante 20 minutos.

Los pellets se resuspendieron en 5ml de medio y se recolectaron en un nuevo tubo Falcon de 50 ml (SARSTEDT D-51588). Se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos a una temperatura de 17-18°C, posteriormente se descartó el sobrenadante para resuspender el pellet en 5 ml de medio con suero y antibióticos.

Se extrajeron 10 µl para contar el número de células presentes en la muestra mediante el contador automático de células (TC20 Automated Cell Counter-Bio-Rad) y para ello se añadió la misma cantidad de Trypan Blue (Bio-Rad 145-0021).

Seguidamente se procedió a conservar alícuotas celulares en medio de cultivo con un 10% de suero fetal bovino (FBS) y 8% de DMSO para su posterior utilización y a el establecimiento en cultivo de parte de las células obtenidas, como se describe en el siguiente apartado.

4.2. Cultivo celular

4.2.1. Preparación del medio de cultivo

Como medio, se usó Nutrient Mixture F12-K Ham (SIGMA N-6760) completado con 1,5 g de NaHCO₃ como indicador de pH, se ajustó el pH a 7-7,1 y, tras filtrar con bomba (MasterFlex), se añadió un 10% de suero fetal bovino (FBS) y solución estabilizada de penicilina-estreptomicina 1x (Sigma P-4333), a la que se le añadieron 25 µg/ml de anfotericina.

4.2.2. Cultivo y cambio de medio

Como se menciona en el apartado 4.1, parte de las células se cultivaron en frascos de cultivo (ThermoFisher Scientific) con medio F12-K con FBS y antibióticos en una incubadora a 37°C con 5% de CO₂. El medio se cambió cada dos o tres días, según el color del medio (se torna a amarillo por acidificación).

El cambio de medio se realizó manteniendo la esterilidad en campana de flujo laminar. 13 ml de medio nuevo en frascos de 75 cm² y 8 ml en los de 25 cm².

4.2.3. Levantamiento de células

Cuando se observó la suficiente confluencia en los frascos de cultivo (en torno a 90-95%) se procedió al levantamiento celular para la siembra en placa y realización de inmunohistoquímica. Para ello se desechó completamente el medio de cultivo de cada frasco y se introdujeron 5 ml de tripsina/EDTA en el caso de los de 25 cm² y 7 ml en los de 75 cm², incubados 5 minutos.

Se golpeó cada frasco vigorosamente para despegar las células y tras 2 minutos de incubación volvieron a golpearse, se pasó a tubo falcon y se centrifugó, junto con la misma cantidad de medio de cultivo, a 2300 rpm durante 15 minutos. Finalmente, se resuspendió el pellet y se realizó un conteo en el contador automático para estimar la cantidad de células.

4.3. Inmunohistoquímica

4.3.1. Preparación de placas para inmunohistoquímica y siembra en placa

La preparación de placas fue realizada días antes de la realización de la inmunohistoquímica.

Se procedió previamente al recubrimiento de placas de cuatro pocillos (FischerScientific 10756864) con poli-L-lisina. Para ello, se esterizaron cubres de 15 mm de diámetro con etanol y mechero y se colocó uno por cada pocillo donde previamente fue puesta una gota de agua mili-Q para una mejor fijación. Posteriormente se recubrió con una solución de gelatina (MERK) 0,25 mg/ml el interior de cada pocillo y tras 30 minutos se retiró con pipeta de Pasteur.

- Para la preparación de 100 ml de gelatina se colocaron 25 mg de gelatina en polvo y 100 ml de H₂O mQ y se autoclavaron.

Se añadió una solución de poli-L-lisina (0,2 mg/200 µl) en 100 ml de tampón borato (57 g/l de H₂O) 0,15 M y pH 8,4.

- Para la realización del tampón borato se añadieron 57 g de BORAX (SIGMA B-9876) a 1l de H₂O, con la ayuda del agitador magnético se mezcló bien y se ajustó el pH a 8,4. Posteriormente se autoclavó.
- Se disolvió una botella de Poli-L-lisina (Sigma P-6282) en 5 ml de agua estéril y se realizaron 25 alícuotas de 200 µl que se congelaron a -20°C para usos posteriores.

Se cubrió cada pocillo con la solución de poli-L-lisina y se incubó durante 1 hora.

Se aspiró la solución y los pocillos fueron lavados en dos ocasiones con PBS 1X estéril (138 Mm NaCl, 3Mm KCl, 8.1 Mm Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄ y agua mQ) y una última vez con H₂O mQ estéril. Tras la eliminación del agua se dejaron las placas destapadas bajo el ultravioleta (UV) durante toda la noche.

Media hora antes de poner el cultivo celular en la placa, se añadió una solución de PBS 1X estéril y justo antes de colocar las células fueron eliminados los restos de PBS. A continuación, se procedió a introducir un alícuota de cultivo con aproximadamente 50000 células en cada pocillo.

4.3.2. Fijación de células en placa

Cuando se observó la suficiente confluencia en los cultivos (en torno a 90-95%) se procedió a la fijación celular.

Se lavaron las placas 3 veces con PBS 1X, con cuidado de no levantar las células. Seguidamente se añadió metanol al 100%, con mucha precaución para no levantar las células, hasta cubrir bien el pocillo y se incubó durante 6 minutos a -20°C. Pasado este tiempo, se lavó de nuevo dos veces con PBS 1X dejando el último lavado y se guardaron las placas a 4°C hasta el momento de realizar la inmunohistoquímica.

4.3.3. Inmunohistoquímica y observación con microscopía confocal

La inmunohistoquímica se realizó con anticuerpos primarios de ratón para detectar la proteína CA-125 y anticuerpos policlonales primarios de conejo para detectar la isoforma IQGAP-1 de la familia de las proteínas IQGAP.

A lo largo del proceso, se fue incluyendo el anticuerpo primario para IQGAP-1 de forma más diluida como se refleja en la Tabla 1. La primera concentración corresponde al pase I de la paciente 1, la segunda dilución al pase I de la paciente 2 y la tercera al pase restante de cada paciente.

Como anticuerpos secundarios fueron usados anticuerpos policlonales de cabra contra IgG de ratón y de conejo.

En la Tabla 1 se puede encontrar la información referente a dichos anticuerpos.

Anticuerpo	Epítipo	Clase	Tipo	Hospedador	Dilución	Fuente
CA-125(OC125)	CA-125	M	P	R	-	Roche,Basilea,Suiza
Ras GTPase-activating protein IQGAP1	IQGAP-1	P	P	Co	1:250 1:500 1:1000	Merk Millipore
Goat Anti-Rabbit IgG H&L (FITC)	Ig.G Conejo	P	S	Ca	1:200	Sigma-Aldrich
Goat Anti-Mouse IgG H&L (Dylight® 650)	Ig.G Ratón	P	S	Ca	1:100	Abcam

Tabla 1. Anticuerpos usados para la detección de CA-125 e IQGAP-1. Clase: P (policlonal), M (monoclonal). Tipo: P (primario), S (secundario). Hospedador: R (ratón), Co (conejo), Ca (cabra).

En primer lugar, se bloqueó el pocillo durante 30 min en agitación con buffer de bloqueo (1% de BCA, 0.1% de gelatina y 0.5% de tritón X100 y 0.01% de azida sódica en 0.01M PBS pH 7.4)

Tras el bloqueo se incubó durante 30 minutos con el anticuerpo primario para CA-125, colocando 75 µl en cada pocillo, se retiró la solución del anticuerpo y se realizó un lavado con buffer de bloqueo para limpiar los restos del mismo.

Seguidamente se incubó con el anticuerpo primario IQGAP-1 durante toda la noche a 4°C.

Al día siguiente se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con una solución de TBS 1X (0,2M Tris, 1,5 M NaCl y H₂O a pH 7,2-7,4) y 0.5% de Tween (SIGMA P9461)

Se incubaron en oscuridad los anticuerpos secundarios, el Anti-rabbit y el Anti-mouse, durante 45 minutos. A continuación, se procedió a la realización de tres lavados con la solución de TBS/T

Para el montaje, se colocó una gota de Diamond Antifade Mountant with DAPI o DAPI (Molecular Probes P-36962) en la zona de un portaobjetos donde se procedería a montar el cristal procedente de la placa y seguidamente se colocó el cristal, siempre con la cara donde las células están pegadas hacia el DAPI.

La visualización de la fluorescencia fue posible mediante la utilización del microscopio confocal (Leica DMI6000) situado en el Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la ULL.

Resultados

5.1. Aislamiento y cultivo celular

El aislamiento celular se llevó a cabo en muestras de líquido ascítico de dos pacientes, como queda reflejado en Material y Métodos, y tanto de la paciente 1 como de la 2 se consiguieron aislar 5×10^6 células, aproximadamente.

Las distintas etapas del aislamiento celular quedan reflejadas en las siguientes imágenes [Fig.1], desde el líquido ascítico [Fig.1A] extraído del peritoneo de cada paciente, pasando por la fase de centrifugación en la que podemos observar el pellet celular [Fig.2B] en la base de los tubos de centrifuga, hasta las células aisladas antes de ser cultivadas [Fig.2C]. En esta última fase se observan las células redondeadas al no encontrarse aún adheridas a una superficie, además de apreciarse contaminación por eritrocitos que no son capaces de proliferar y mueren tras varias horas. La muestra de la paciente 2 tenía un color mucho más rojizo debido a una mayor contaminación de eritrocitos.

Posteriormente, ya en cultivo [Fig.3.A], las células se encuentran adheridas al frasco de cultivo y se percibe su forma original, además de la ausencia de eritrocitos. Una vez que hubo un 90-95% de confluencia y las células fueron fijadas se realizaron fotografías con óptica Nomarski [Fig.3B] donde se aprecia con más detalle la forma celular.

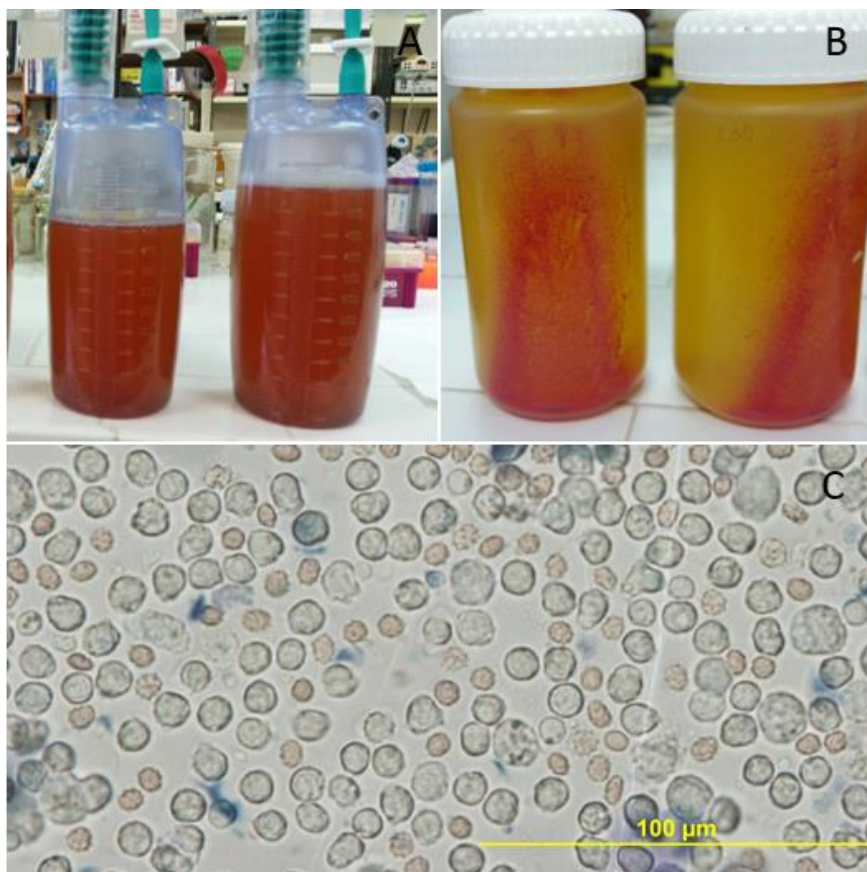


Figura 2. Aislamiento de células de líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario A) Líquido ascítico extraído de la paciente. B) Líquido ascítico tras la centrifugación en el que se puede observar el pellet celular C) Imagen al microscopio de las células recién aisladas del líquido ascítico, con contaminación de eritrocitos, en cámara de Neubauer (Escala 100µm).

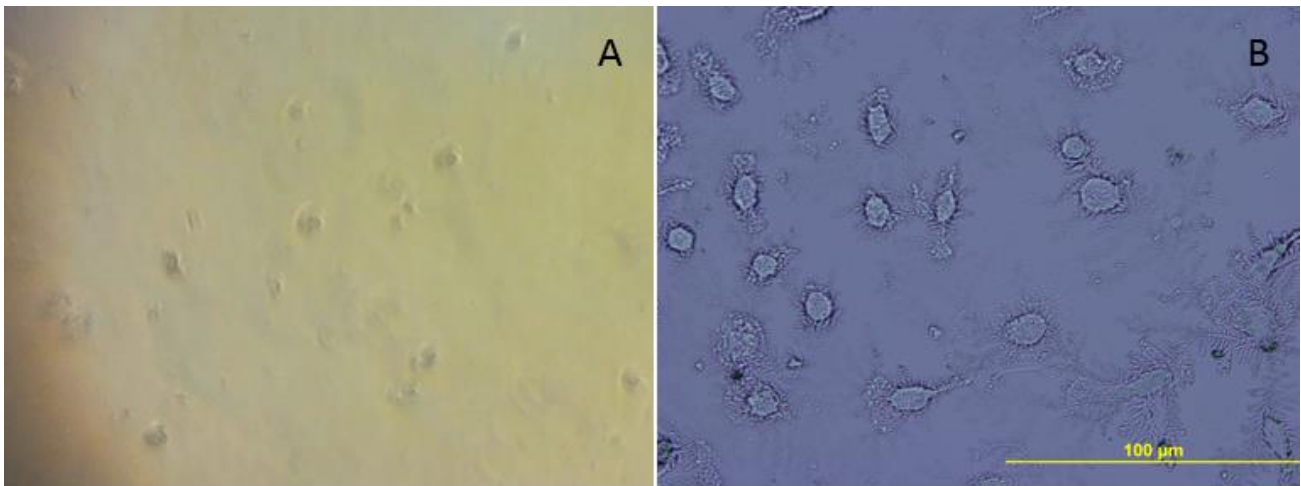


Figura 3. Imágenes del cultivo y la fijación celular. A) Fotografía tomada al microscopio de células cultivadas en frasco de cultivo B) Imagen con óptica Nomarski de las células fijadas con metanol (Escala 100µm en ambas).

5.2. Inmunohistoquímica

La visualización de CA-125 junto a IQGAP-1 no fue posible en los casos en los que la concentración de IQGAP-1 fue de 1:250 y 1:500, que se corresponden al pase I de la paciente 1 y pase I de la paciente 2 respectivamente. Esto fue debido a que, como era de esperar según experiencias previas del laboratorio, la señal para IQGAP fue muy elevada y la fluorescencia en verde pasó a rojo y camufló los resultados de la visualización de CA-125.

En estos casos, las imágenes de células CA-125⁺ que se muestran fueron tomadas por David Orrego, que se encontraba trabajando con las mismas células y pacientes, para un estudio diferente.

En todos los casos, el recuento para calcular el porcentaje de células CA-125⁺ en ambas pacientes fue realizado en las mismas fotografías confocales tomadas por David Orrego.

5.2.1. Paciente 1

Se trata de un cáncer de un carcinoma seroso agresivo en estadio IIIC de origen ovárico, es decir, que se distribuye por el abdomen y afecta al peritoneo.

El patrón de tinción de IQGAP-1 es homogéneo. En todas las células se observa la localización de IQGAP principalmente por todo el citosol, además de, en ciertas células, intuirse por la membrana [Fig.5D,5E]. Y en la mayoría de los casos también se percibe una fuerte tinción en áreas adyacentes al núcleo [Figs.5 y Fig.6]. En cuanto a la expresión de la “escafolina” IQGAP-1 en las células, siendo cuantificada según el nivel de fluorescencia, es muy elevado en ambos pases, aunque ligeramente mayor en el pase I.

Únicamente fue visible co-localización de las dos proteínas en una célula del pase II, debido a elevada señal de IQGAP-1, como se ha comentado con anterioridad [Fig.6D]

CA-125 sigue un patrón totalmente distinto a IQGAP-1, únicamente alrededor de la membrana plasmática de forma muy intensa [Fig.4A]. Además, hay grandes diferencias de señal entre ambos pases, siendo aproximadamente el doble en el pase II [Tabla 2]. En cuanto a la expresión, esa mayor intensidad en la fluorescencia del pase II corresponde con una mayor expresión de la proteína.

	Pase I	Pase II
Paciente 1	15%	30%

Tabla.2. Porcentaje de células CA-125⁺ en los distintos pases de la paciente 1.

5.2.1.1 Paciente 1, Pase I

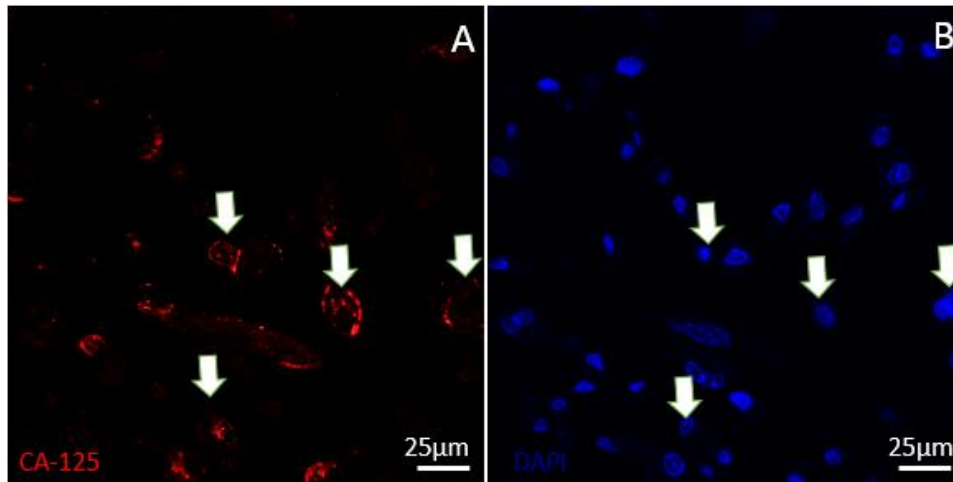


Figura 4. Immunolocalización de CA-125 en células de la paciente 1 pase I. CA-125 (rojo), DAPI (azul). A) CA-125+ (flechas) cuyo patrón en la célula es alrededor de la membrana. B) Localización de núcleos, indicando donde hay células CA-125+ (flecha).

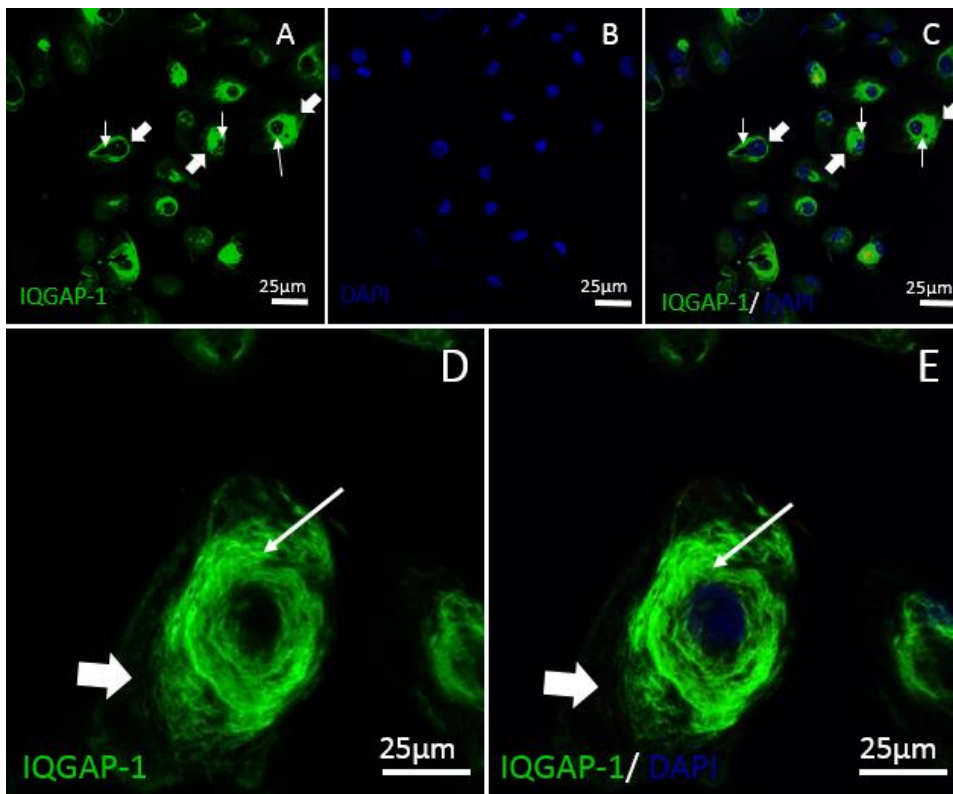


Figura 5. Imágenes confocales de inmunofluorescencia de IQGAP en las células aisladas del líquido ascítico de la paciente 1, pase I. IQGAP (verde), DAPI (azul). A) IQGAP⁺ en el citoplasma (flechas gruesas), destacando una tinción más intensa en la zona perinuclear (flechas finas). B) núcleos. C) Co-localización de IQGAP y DAPI. D) Célula IQGAP⁺ por el citoplasma (flecha gruesa) y zona perinuclear más intensa (flecha fina) E) Se observa la localización de IQGAP por todo el citoplasma (flecha gruesa) de la célula y más intensamente alrededor del núcleo (flechas finas), además de observarse los núcleos en azul (DAPI).

5.2.1.2. Paciente 1, Pase II

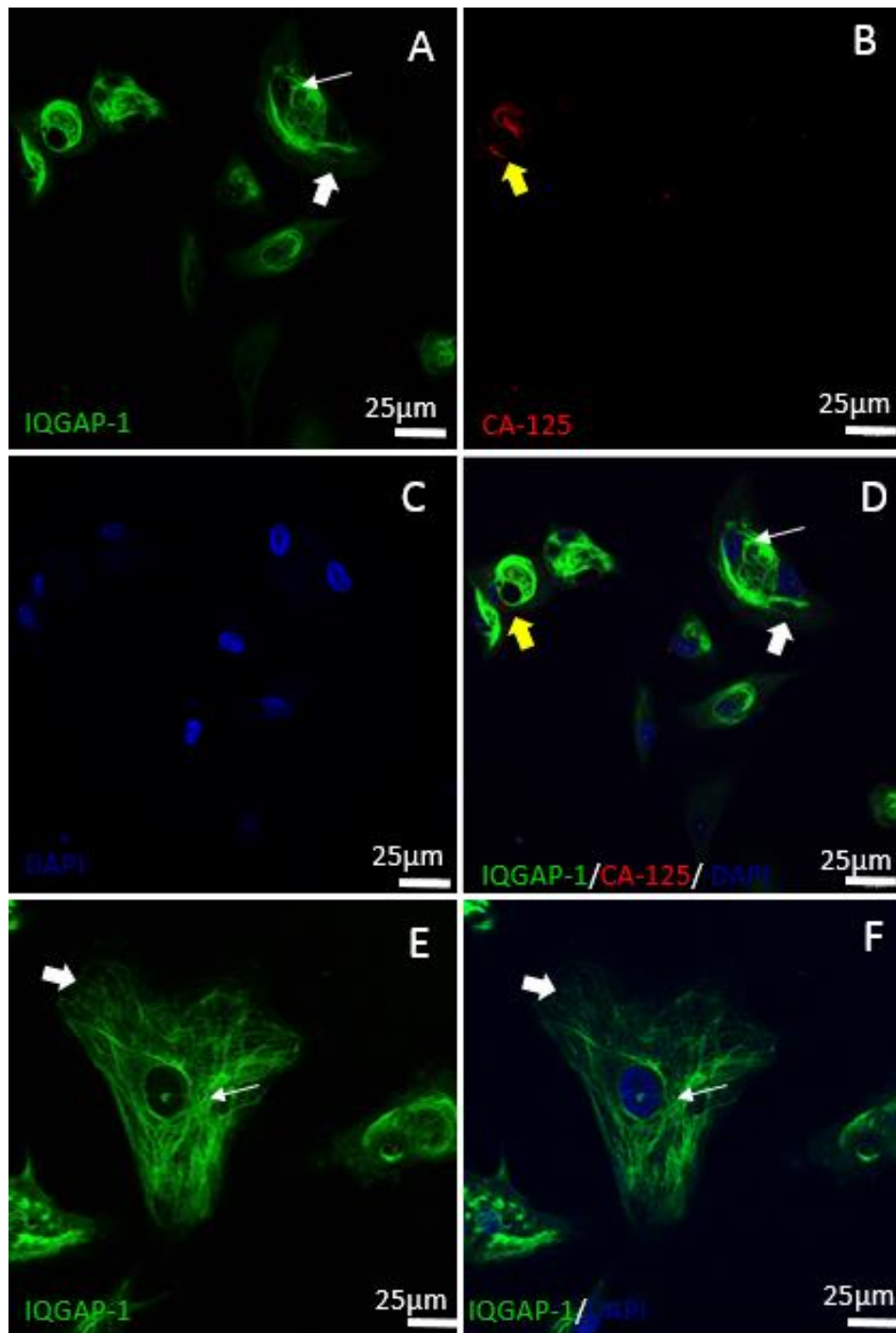


Figura 6. Imágenes confocales de células IQGAP-1⁺ del paciente 1, pase II. IQGAP-1 (verde), CA-125 (rojo), DAPI (azul). A) IQGAP-1⁺ cuyo patrón de localización es por todo el citoplasma (flecha gruesa), especialmente alrededor del núcleo (flecha fina). B) CA-125⁺ (flecha amarilla). C) Núcleos con DAPI. D) Co-localización de IQGAP-1, CA-125 y DAPI. E) Se observa la distribución aparentemente fibrilar de IQGAP-1 en la célula por todo el citoplasma (flecha gruesa) y más intensamente por las proximidades del núcleo (flecha fina). F) IQGAP-1⁺ y núcleos.

5.2.2. Paciente 2

Se trata de un carcinoma seroso de alto grado, en estadio IIIC, de origen peritoneal, es decir, que el tumor se distribuye por todo el abdomen.

La distribución de IQGAP-1 en la paciente 2 tiene lugar siguiendo un patrón aparentemente fibrilar que se extiende por todo el citosol y en la mayoría de las células la fluorescencia es más alta en las zonas adyacentes al núcleo [Fig.8 y 10]. Además, se puede apreciar la presencia de la proteína en las uniones celulares, apreciándose con mayor detalle en las figuras 8D-E y 10D-E.

El nivel de expresión de IQGAP-1 determinado por la intensidad de la fluorescencia es muy alto en ambos pases.

En cuanto a la localización de CA-125 es la habitual, visualizándose un rojo intenso alrededor de la membrana plasmática [Fig.7A y 9]. La co-localización de IQGAP-1 y CA-125 solo fue posible en una célula del pase II [Fig.9]

En la paciente 2 se observa menor diferencia en la proporción de células CA-125⁺ de los distintos pases [Tabla 3] en comparación con la paciente 1.

	Pase I	Pase II
Paciente 2	2%	15%

Tabla 3. Proporción de células CA-125⁺ en porcentaje de la paciente 2 en los pases I y II.

5.2.2.1 Paciente 2, pase I

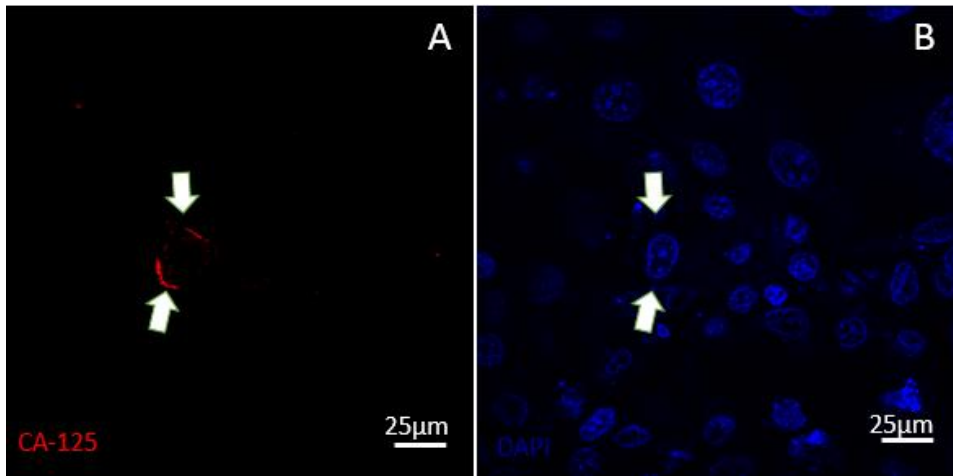


Figura 7. Inmunohistoquímica para CA-125 en células de la paciente 2, pase I. CA-125 (rojo), DAPI (azul). A) CA-125⁺ (flechas) cuyo patrón en la célula es alrededor de la membrana. B) Localización de núcleos, indicando donde hay una célula CA-125⁺ (flechas).

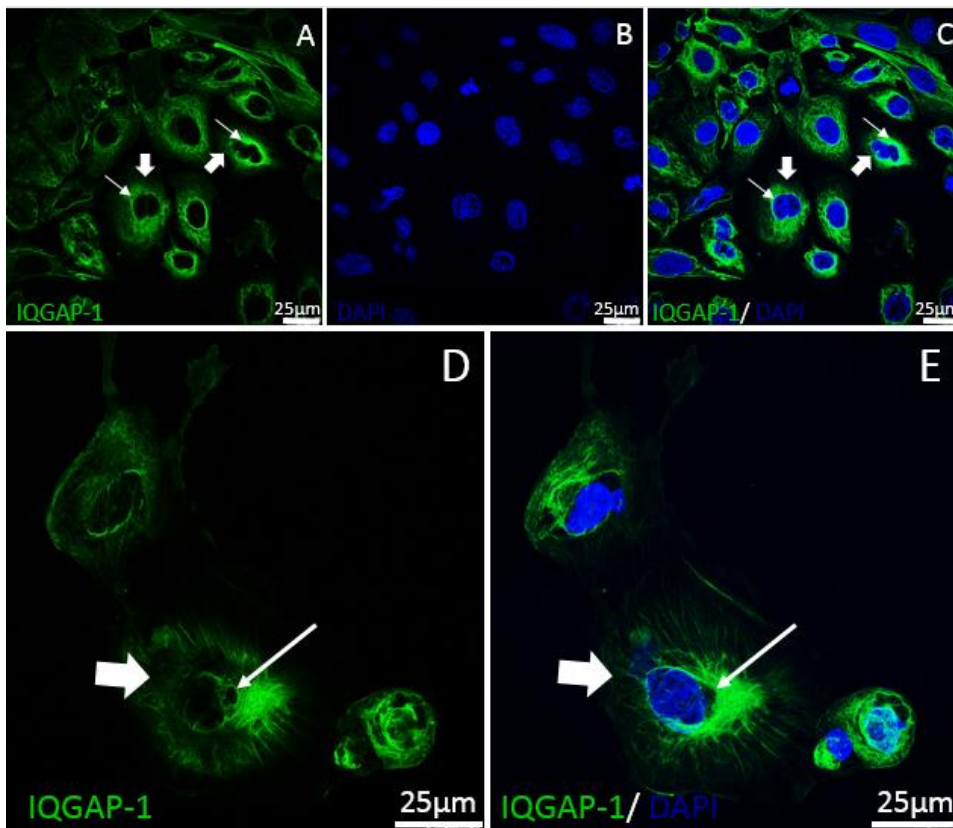


Figura 8. Inmunolocalización de IQGAP en las células de la paciente 2, pase I. IQGAP (verde), DAPI (azul). A) IQGAP⁺ se distribuye por todo el citoplasma (flechas gruesas) y con mayor intensidad de la señal en la zona periférica al núcleo (flechas finas). B) Se observan los núcleos (flechas amarillas). C) Co-localización de IQGAP (flechas blancas) y núcleos (flechas amarillas). D) IQGAP⁺ por todo el citoplasma (flechas gruesas), especialmente en la zona perinuclear (flechas finas). E) Localización de IQGAP (flechas gruesas y finas) y núcleos (DAPI).

5.2.2.2. Paciente 2, Pase II

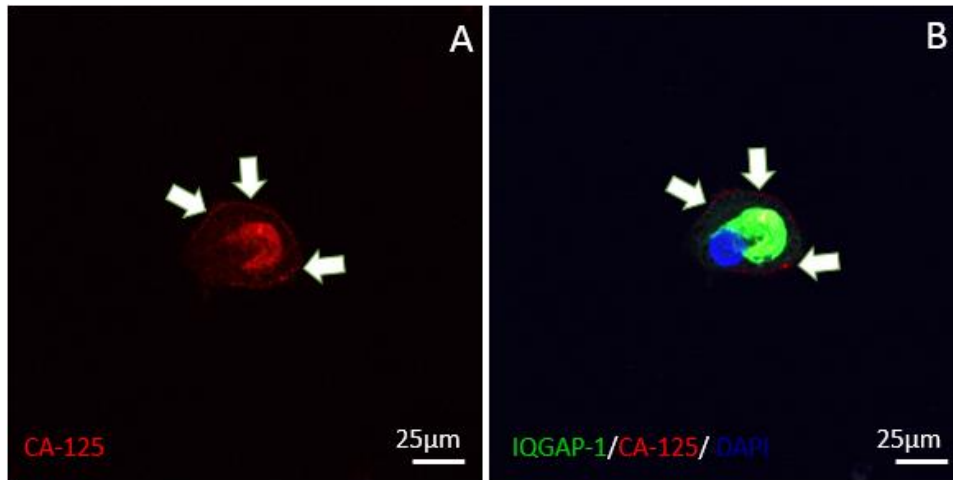


Figura 9. Inmunolocalización de CA-125 e IQGAP-1 en células de la paciente 2, pase II. CA-125 (rojo), IQGAP-1 (verde), DAPI (azul). A) CA-125⁺ alrededor de la membrana celular (flechas). La fluorescencia roja central se corresponde a IQGAP-1, la abundante señal por alta expresión ha provocado su pase de color verde a rojo. B) Co-localización de CA-125 (flechas), IQGAP-1 y núcleos con DAPI en la única célula CA-125⁺ que pudo visualizarse.

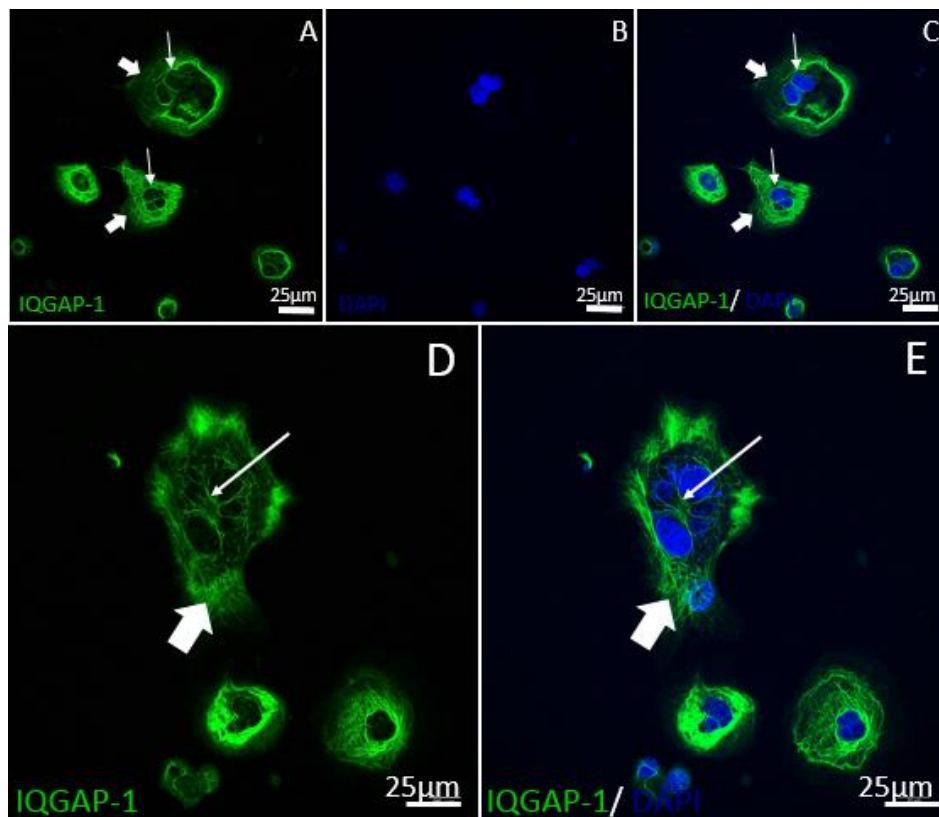


Figura 10. Inmunolocalización de IQGAP-1 en células de la paciente 2, pase II. IQGAP-1 (verde), DAPI (azul) A) Localización de IQGAP-1 en todo el citoplasma con marcaje tenue (flechas gruesas) y zonas más intensas próximas del núcleo (flechas finas) B) Núcleos con DAPI. C) IQGAP-1⁺ (flechas) y núcleos. D) IQGAP-1⁺ en una célula por todo el citoplasma. E) IQGAP-1 (flechas) y núcleos con DAPI.

Discusión

6.1 Del método inmunohistoquímico

La inmunohistoquímica es una técnica que emplea anticuerpos monoclonales o policlonales para determinar la distribución de antígenos específicos (Kaliyappan, Palanisamy, Duraiyan, & Govindarajan, 2012), generalmente una proteína, en células o secciones de tejidos. Se usa ampliamente para el diagnóstico de cáncer, ya que los antígenos tumorales se expresan de novo o se incrementan en ciertos tipos de cáncer (M^a Carmen Alarcón Leiva, Laura Plaza Guerrero, 2005). La finalidad de este estudio hace que esta técnica sea idónea, pues busca la detección de las proteínas IQGAP-1 y CA-125 para posteriormente determinar la localización y el patrón de distribución en las células, además de su abundancia o patrones de expresión.

El western blot podría haber proporcionado un resultado exacto en cuanto al nivel de expresión total de la proteína de estudio pero supone la lisis celular para extraer las proteínas (Mahmood & Yang, 2012) y el objetivo principal del estudio es la visualización de la distribución de la señal en las células para realizar comparaciones entre pacientes y los distintos países, pudiendo establecer patrones, no solo cuantitativos, sino también funcionales, de la proteína.

6.2 Del método estadístico utilizado

Los resultados obtenidos acerca de la expresión de CA-125 en las células procedentes del líquido ascítico de ambas pacientes se valoraron como porcentaje, una herramienta estadística básica, para así estimar la proporción de células CA-125⁺ sobre el total de células.

Además de cualitativamente, también puede establecerse el nivel de expresión de IQGAP-1 mediante la intensidad de la fluorescencia.

6.3 De los resultados obtenidos

6.3.1. Inmunolocalización de IQGAP-1

En todos los casos, IQGAP-1 se distribuye por todo el citoplasma y envoltura nuclear y se aprecia discreta señal en la membrana de algunas células. Además, en la paciente 2 se puede apreciar la localización de IQGAP-1 en las zonas de unión celular, principalmente en el pase I.

Generalmente, la localización de IQGAP-1 es ubicua y fibrilar, con mayor proporción de esta proteína en la membrana y uniones intercelulares (The Human Protein Atlas), al contrario de lo que hemos encontrado en este trabajo, donde la proporción es mayor en el citosol y, sobre todo, en la zona perinuclear.

Esta distribución fibrilar observada y ubicua, coincidente con los microfilamentos concuerda con su papel en la dinámica del citoesqueleto, pues IQGAP-1 interacciona con la GTP-asa Cdc42 en presencia de EGF, cuya activación desencadena una cascada que se traduce en el desensamblado de las adhesiones focales y la estabilización de los filamentos de actina (Erickson, Cerione, & Hart, 1997). La ausencia de IQGAP-1 en las zonas de adhesión entre células en la paciente 1 y la pérdida de estas adhesiones del pase I al pase II en la paciente 2, podría deberse a la desaparición de las mismas debido a la activación de Cdc42 por IQGAP-1 y esto último sería una consecuencia de la transición epitelial a mesenquimal (EMT). La EMT puede reprogramar células epiteliales diferenciadas en una célula madre epitelial menos diferenciada con rasgos mesenquimatosos, estableciendo un vínculo entre EMT y la adquisición de propiedades de células madre sin adhesiones celulares (Friedmann-Morvinski & Verma, 2014). Así, las células no tienen impedimento para migrar y producir metástasis, hecho que también coincidiría con el estadio de desarrollo de ambos carcinomas, pues son de estadio IIIC y por lo tanto están totalmente extendidos por la zona abdominal, además de que, al menos, en el caso del carcinoma de origen ovárico ya ha habido migración desde el mismo hasta al peritoneo.

Las diferencias en la intensidad de fluorescencia se han correlaciona con el nivel de expresión de la proteína. En todos los casos el nivel de expresión de IQGAP es muy

elevado. En el paciente 1 podría ser algo más elevado en el pase I y en el paciente 2 está más igualado.

Podría estipularse que la diferencia de intensidad fuese debido a las distintas concentraciones a las que se puso la proteína para evitar el exceso de fluorescencia, pero en el microscopio se ajustó el láser a la hora de hacer la fotografía, por lo que no debería mermar los resultados. Aún así, se pueden comparar los pases II de ambas pacientes, ya que se puso en ambos la misma concentración (1:1000), y puede apreciarse mayor expresión de IQGAP en la paciente 2.

Pese a los posibles distorsiones en los resultados debidas a las distintas concentraciones, la expresión es elevada en todos los pases y tiene lugar en todas las células presentes, lo que apoya las teorías que señalan a la “escafolina” como un posible oncogén (White et al., 2009).

6.3.2. Inmunolocalización de CA-125

En todos los casos, la localización del marcador tumoral CA-125 es la misma en todas las células, alrededor de la membrana plasmática.

Sin embargo, a diferencia de IQGAP-1, no en todas las células hay expresión de dicha proteína. En la paciente 1 encontramos un aumento de un 15% a un 30% en la proporción de células CA-125⁺ entre el pase I y el pase II respectivamente y en la paciente 2 un aumento de un 2% a un 15%.

El aumento en la proporción demuestra la utilidad del antígeno carbohidrato 125 en el diagnóstico de estadios avanzados de cáncer de ovario y sobre todo en el seguimiento del mismo, ya que estas células han estado sin tratamiento contra el cáncer y esto implica que ha ido evolucionando el tumor de forma directamente proporcional al aumento de la cantidad de CA-125.

Por otro lado, el 20% de los cánceres de ovario tienen poca o ninguna expresión de CA125 (Bast et al., 2005), lo que podría explicar la escasez de células CA-125⁺ en la paciente 2. También podría deberse a que es un cáncer de origen peritoneal y este tipo de carcinoma puede haber tenido origen, además de en el ovario, en otras tipos partes del cuerpo, explicando este segundo caso la escasez de células con expresión de CA-125 (Sadeghi et al., 2000).

6.3.3. Co-localización de IQGAP-1 y CA-125

En las imágenes en las que ha sido posible visualizar la co-localización de ambos péptidos [Fig.5D Y 9] se observa que el patrón de distribución no es coincidente. Aparentemente, no estarían relacionadas, ni estructural, ni funcionalmente. Aunque, habría que realizar una inmunolocalización de IQGAP-1 y CA-125 en células sanas y en células cancerígenas, con menor concentración de IQGAP-1 para intentar visualizar CA-125 y comparar los resultados de ambos tipos celulares para ver si hay diferencias en el nivel de expresión.

La liberación o secreción de CA-125 aparece directamente relacionada con la vía de transducción de señal del receptor del factor de crecimiento epitelial (O'Brien, Tanimoto, Konishi, & Gee, 1998), al igual que en el caso de IQGAP-1, que aumenta su interacción con MEK1 en la vía de señalización MAPK1, que promueve la diferenciación celular, en presencia de EGF (White et al., 2009).

Conclusiones

1. Las células aisladas del líquido ascítico de pacientes con cáncer de ovario expresan IQGAP-1, distribuyéndose por todo el citoplasma, especialmente en la zona perinuclear, además, en la membrana de ciertas células, en cantidad menos abundante, y únicamente en los contactos celulares de la paciente 2 (cáncer de ovario de origen aparentemente peritoneal), fase I. El hecho de que no haya señal de IQGAP-1 en las zonas de contacto intercelular o desaparezca de un pase a otro puede relacionar a dicha proteína con la reprogramación celular sufrida en células cancerosas debido a EMT, en la que las células adquieren características de células madres y pierden las uniones intercelulares.
2. Se obtuvo señal de CA-125 en células de ambas pacientes. La proporción de células CA-125⁺ fue en aumento en los dos casos estudiados, lo que demuestra su eficiencia en el diagnóstico y seguimiento de cáncer.
3. La escasa presencia de células positivas para CA-125 en la paciente 2 podría deberse al distinto origen tumoral (peritoneal), pudiendo haberse originado en una parte del organismo distinta al ovario.
4. El patrón de co-localización de IQGAP-1 y CA-125 no es coincidente por lo que su función parece no estar relacionada.

Conclusions

1. Isolated cells of ascitic fluid from patients suffering from ovarian cancer express IQGAP-1, located throughout the cytoplasm, especially in the perinuclear zone, in addition, less abundant in the plasma membrane of some cells, and only in the contacts of cells from patient 2 (ovarian cancer of peritoneal origin), pass I. The fact that there is no IQGAP-1 signal in the intercellular contact areas or it disappears from one pass to another may relate IQGAP1 with cell reprogramming during epithelial mesenchymal transition (EMT), in which the cells acquire characteristics of stem cells and lose the intercellular junctions.
2. CA-125 signal was obtained in cells from both patients. The percentage of CA-125⁺ cells was increasing in the two cases studied with culture time and the number of cell passages, which demonstrates their efficiency in the diagnosis and follow-up of cancer.
3. The low presence of cells positive for CA-125 in patient 2 could be due to the different tumor origin (peritoneal), which may have been originated in a part of the organism different than the ovary.
4. The co-localization pattern of IQGAP-1 and CA-125 is not coincident, so its function seems to be unrelated.

Bibliografía

- Alarcón, M.C., Plaza, L. (2005). Fundamentos Biológicos De Inmunohistoquímica. *Anatomía Patológica y Citológica*, 5, 17–44. Retrieved from <https://www.faeditorial.es/capitulos/anatomia-patologica-MANUAL-7.pdf>
- Alsop, K., Fereday, S., Meldrum, C., DeFazio, A., Emmanuel, C., George, J., ... Mitchell, G. (2012). BRCA mutation frequency and patterns of treatment response in BRCA mutation-positive women with ovarian cancer: A report from the Australian ovarian cancer study group. *Journal of Clinical Oncology*, 30(21), 2654–2663. <https://doi.org/10.1200/JCO.2011.39.8545>
- Bai, H., Sha, G., Xiao, M., Gao, H., Cao, D., Yang, J., ... Shen, K. (2016). The prognostic value of pretreatment CA-125 levels and CA-125 normalization in ovarian clear cell carcinoma: a two-academic-institute study. *Oncotarget*, 7(13), 15566–15576. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7216>
- Bast, R. C., Badgwell, D., Lu, Z., Marquez, R., Rosen, D., Liu, J., ... Lu, K. (2005). New tumor markers: CA125 and beyond. *International Journal of Gynecological Cancer: Official Journal of the International Gynecological Cancer Society*, 15 Suppl 3, 274–281. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1438.2005.00441.x>
- Berenice, A., Ibet, C., Ochoa-hernández, A. B., Juárez-vázquez, C. I., Rosales-reynoso, M. A., & Barros-núñez, P. (2012). way and its relationship with cancer WNT- β -catenin signaling path. *Cir Cir*, 80(4), 389–398. Rescatado de <http://www.redalyc.org/pdf/662/66224459015.pdf>
- Chang, C., & Werb, Z. (2001). The many faces of metalloproteases: Cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends in Cell Biology*, 11(11). [https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(01\)02122-5](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(01)02122-5)
- Dong, P. X., Jia, N., Xu, Z. J., Liu, Y. T., Li, D. J., & Feng, Y. J. (2008). Silencing of IQGAP1 by shRNA inhibits the invasion of ovarian carcinoma HO-8910PM cells in vitro. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 27(1), 1–8. <https://doi.org/10.1186/1756-9966-27-77>
- Erickson, J. W., Cerione, R. A., & Hart, M. J. (1997). Identification of an actin cytoskeletal complex that includes IQGAP and the CDc42 GTPase. *Journal of Biological Chemistry*, 272(39), 24443–24447. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.39.24443>
- Friedmann-Morvinski, D., & Verma, I. M. (2014). Dedifferentiation and reprogramming: Origins of cancer stem cells. *EMBO Reports*. <https://doi.org/10.1002/embr.201338254>
- Gu, P., Pan, L. L., Wu, S. Q., Sun, L., & Huang, G. (2009). CA 125, PET alone, PET-CT, CT and MRI in diagnosing recurrent ovarian carcinoma. A systematic review and meta-analysis. *European Journal of Radiology*, 71(1), 164–174. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2008.02.019>
- Hedman, A. C., Smith, J. M., & Sacks, D. B. (2015). The biology of IQGAP proteins: beyond the cytoskeleton. *EMBO Reports*, 16(4), 427–446. <https://doi.org/10.15252/embr.201439834>

- Kaliyappan, K., Palanisamy, M., Duraiyan, J., & Govindarajan, R. (2012). Applications of immunohistochemistry. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*, 4(6), 307. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100281>
- Ledermann, J. A., Raja, F. A., Fotopoulou, C., Gonzalez-Martin, A., Colombo, N., & Sessa, C. (2013). Newly diagnosed and relapsed epithelial ovarian carcinoma: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 24(SUPPL.6). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdt333>
- Mahmood, T., & Yang, P. C. (2012). Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434. <https://doi.org/10.4103/1947-2714.100998>
- O'Brien, T. J., Tanimoto, H., Konishi, I., & Gee, M. (1998). More than 15 years of CA 125: What is known about the antigen, its structure and its function. *International Journal of Biological Markers*.
- Plancarte, R., Guillén, M. R., Guajardo, J., & Mayer, F. (2004). Ascitis en los pacientes oncológicos: Fisiopatogenia y opciones de tratamiento . *Revista de La Sociedad Española Del Dolor* . scieloes .
- Sadeghi, B., Arvieux, C., Glehen, O., Beaujard, A. C., Rivoire, M., Baulieux, J., ... Gilly, F. N. (2000). Peritoneal carcinomatosis from non-gynecologic malignancies: Results of the EVOCAPE 1 multicentric prospective study. *Cancer*, 88(2), 358–363. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0142\(20000115\)88:2<358::AID-CNCR16>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0142(20000115)88:2<358::AID-CNCR16>3.0.CO;2-O)
- The Human Protein Atlas.<https://www.proteinatlas.org/search/IQGAP>
- White, C. D., Brown, M. D., & Sacks, D. B. (2009). IQGAPs in cancer: A family of scaffold proteins underlying tumorigenesis. *FEBS Letters*, 583(12), 1817–1824. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.05.007>