

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS**



**Las isoformas del receptor de estrógenos  
modifican su expresión durante la progresión del  
cáncer ovárico epitelial**

**Tesis para optar al grado académico de Magíster en Bioquímica  
Área de especialización: Bioquímica Clínica**

**MACARENA PAZ LÉPEZ RIVERA**

**Directora de Tesis  
Prof. Dra. Carmen Romero Osses**

**Santiago, Chile**

**2009**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS**

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGÍSTER**

Se informa a la Dirección de Postgrado de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la tesis de Magíster presentada por la candidata:

**MACARENA PAZ LEPEZ RIVERA**

Ha sido aprobada por la comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, área de especialización Bioquímica Clínica, en el examen de defensa de tesis rendido el día.....

**Director de Tesis:**

Dra. Carmen Romero Osses

\_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dra. Ana María Kettlun (Presidente)

\_\_\_\_\_

Dr. Enrique Castellón

\_\_\_\_\_

Dr. Hernán Lara

\_\_\_\_\_

## **FINANCIAMIENTO**

- **Proyecto FONDECYT 1030661.** Investigador responsable: Dra. Carmen Romero O.
- **Proyecto FONDECYT 1071036.** Investigador responsable: Dra. Carmen Romero O.

*Dedicado a Álvaro y a mis padres*

## **AGRADECIMIENTOS**

No puedo dejar de agradecer a todas las personas que me rodearon durante el transcurso de esta tesis; sin ellos hubiera sido muy difícil desarrollar este proyecto.

A mis amigos del laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del HCUCH, principalmente a Marcela Muñoz, Paulina Ormazábal, María Paz Geraldo y Egardo Caamaño, quienes estuvieron todo el tiempo conmigo dándome alegrías, apoyo y cooperación.

A la Dra. Margarita Vega por su constante estímulo, motivación y cariño; y a mi tutora, la Dra. Carmen Romero a quien le agradezco su cariño, entrega y ayuda, y especialmente su paciencia con mis tiempos acotados y algunas caídas.

Al Dr. Enrique Castellón, por su ayuda fundamental en algunos momentos y por su enorme paciencia.

A mis compañeras de trabajo de la UST, María Soledad Depix y Francisca Blanco, por su apoyo y amistad.

Y por último, pero no menos importante, a mi marido Álvaro y a mis padres por su amor y apoyo incondicional.

# INDICE DE CONTENIDOS

	<b>Páginas</b>
<b>TABLA DE CONTENIDO</b>	i
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	iii
<b>INDICE DE TABLAS</b>	iv
<b>RESUMEN</b>	v
<b>ABSTRACT</b>	vii
<b>1. INTRODUCCION</b>	1
1.1. Cáncer de Ovario	1
1.2. Hipótesis de la carcinogénesis Ovárica	2
1.3. Estrógenos y Cáncer de Ovario	3
1.4. Isoformas del receptor de estrógenos en COE	6
1.5. Factor de Crecimiento nervioso en COE	6
1.6. Moléculas angiogénicas en COE	7
1.7. Gonadotrofinas en COE	8
1.8. HIPOTESIS	10
<b>2. OBJETIVOS</b>	11
2.1. Objetivo general	11
2.2. Objetivos específicos	11
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b>	12
3.1. Pacientes y Obtención de las muestras	12
3.2. Diseño Experimental	12
3.3. Estudio <i>ex – vivo</i>	13
3.4. Estudio <i>in – vitro</i>	13
3.5. Clasificación histológica	13
3.6. Inmunohistoquímica (IHQ)	14
3.7. Análisis estadístico	15
<b>4. RESULTADOS</b>	16
4.1. Características de las pacientes	16
4.2. Estudio <i>ex - vivo</i>	16
4.2.1. Inmunodetección de RE $\alpha$ en los tejidos ováricos	16
4.2.2. Inmunodetección de pRE $\alpha$ en los tejidos ováricos	17

4.2.3. Inmunodetección de RE $\beta$ en los tejidos ováricos	19
4.2.4. Relación RE $\alpha$ /RE $\beta$ en epitelio de los tejidos ováricos	21
4.3. Estudio <i>in - vitro</i>	22
4.3.1. Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con NGF	22
4.3.2. Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con FSH	23
4.3.3. Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con LH	25
4.3.4. Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con FSH + LH	26
<b>5. DISCUSION</b>	27
<b>6. CONCLUSION</b>	35
<b>7. ESTUDIOS FUTUROS</b>	36
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	37

## INDICE DE FIGURAS

		<b>Páginas</b>
<b>Figura 1.</b>	Representación esquemática de la estructura proteica de las isoformas $\alpha$ y $\beta$ del receptor de estrógenos.	4
<b>Figura 2.</b>	Mecanismos de acción de los RE.	4
<b>Figura 3.</b>	Esquematzación de la Hipótesis de trabajo.	10
<b>Figura 4.</b>	Localización y distribución de RE $\alpha$ en tejidos de ovario a través de una progresión neoplásica, determinada por IHQ.	17
<b>Figura 5.</b>	Análisis de la Inmunodetección de RE $\alpha$ en el Núcleo del Epitelio Ovárico, durante la progresión neoplásica de COE.	17
<b>Figura 6.</b>	Localización y distribución de pRE $\alpha$ en tejidos de ovario a través de una progresión neoplásica, determinada por IHQ.	18
<b>Figura 7.</b>	Análisis de la Inmunodetección de pRE $\alpha$ en el Núcleo del Epitelio Ovárico, durante la progresión neoplásica de COE.	18
<b>Figura 8.</b>	Localización y distribución de RE $\beta$ en tejidos de ovario a través de una progresión neoplásica, determinada por IHQ.	19
<b>Figura 9.</b>	Análisis de la Inmunodetección de RE $\beta$ en el citoplasma del epitelio ovárico durante la progresión neoplásica de COE.	20
<b>Figura 10.</b>	Análisis de la Inmunodetección de RE $\beta$ en el núcleo del epitelio ovárico durante la progresión neoplásica de COE.	20
<b>Figura 11.</b>	Análisis de la Inmunodetección de RE $\beta$ en el Tejido Ovárico Total, sumando la expresión en el citoplasma y nuclear del Epitelio y Estroma Ovárico, durante la progresión neoplásica de COE.	21
<b>Figura 12.</b>	Relación RE $\alpha$ /RE $\beta$ en Epitelio de la Superficie Ovárica (normal y transformado) durante la progresión neoplásica de COE.	21
<b>Figura 13.</b>	Localización y distribución de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con NGF, determinada por IHQ.	22
<b>Figura 14.</b>	Análisis de la Inmunodetección de RE en el epitelio de explantes de COE estimulados con NGF en concentraciones de 10 y 100 ng/ml.	23
<b>Figura 15.</b>	Correlación de Pearson entre pRE $\alpha$ y TrkA, evaluados por IHQ, desde COE I hasta COE III.	23
<b>Figura 16.</b>	Localización y distribución de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con FSH, determinada por IHQ.	24
<b>Figura 17.</b>	Análisis de la Inmunodetección de RE en el epitelio de explantes de COE estimulados con FSH en concentraciones de 10 y 100 mUI/ml.	24
<b>Figura 18.</b>	Localización y distribución de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con LH, determinada por IHQ.	25
<b>Figura 19.</b>	Análisis de la Inmunodetección de RE en el epitelio de explantes de COE estimulados con LH en concentraciones de 10 y 100 mUI/ml.	25
<b>Figura 20.</b>	Localización y distribución de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con FSH + LH, determinada por IHQ.	26
<b>Figura 21.</b>	Análisis de la Inmunodetección de RE en el epitelio de explantes de COE estimulados con FSH + LH en concentraciones de 50 y 500 mUI/ml.	26

## INDICE DE TABLAS

	<b>Páginas</b>
<b>Tabla 1.</b> Localización de las isoformas de RE en órganos reproductivos femeninos humanos	6
<b>Tabla 2.</b> Características de los Anticuerpos utilizados en la realización de las IHQ	14
<b>Tabla 3.</b> Características de edad de las pacientes incluidas en el estudio ex - vivo	16

## RESUMEN

**Introducción:** El Cáncer de Ovario Epitelial (COE) es el cáncer ginecológico con mayor mortalidad en mujeres post-menopáusicas. Su carcinogénesis y progresión neoplásica es atribuida a múltiples moléculas relacionadas con la proliferación, diferenciación y angiogénesis; entre las cuales, se ha estudiado el factor de crecimiento neuronal (NGF), su receptor de alta afinidad (TrkA) y el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF), que aumentan su expresión a medida que COE pierde su diferenciación. Además, las isoformas del Receptor de Estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ), que poseen efectos antagónicos de proliferación celular, modifican su expresión en COE al compararla con epitelio ovárico normal. Esto sugiere que los cambios en la expresión de ambos RE es un evento importante en la progresión de COE.

**Objetivos:** **1)** Determinar la localización subcelular de RE $\alpha$ , p-RE $\alpha$  ser 118 y RE $\beta$  y semicuantificar su expresión, en el epitelio superficial de ovario normal funcional e inactivo, tumores ováricos benignos, borderline y COE seroso grado I, II y III. **2)** Evaluar si NGF modifica la inmunodetección de RE $\alpha$ , p-RE $\alpha$  ser 118 y RE $\beta$  en explantes de COE. **3)** Analizar si las gonadotrofinas (LH y FSH) modifican la inmunodetección de RE $\alpha$ , p-RE $\alpha$  ser 118 y RE $\beta$  en explantes de COE

**Metodología:** Estudio *ex-vivo*: Se utilizaron biopsias de ovario pertenecientes a los siete grupos de estudio que siguen una progresión neoplásica de COE, incluidas en parafina para evaluación histológica y posterior estudio de Inmunodetección de las isoformas de RE por Inmunohistoquímica (IHQ). Estudio *in-vitro*: Se utilizaron explantes de COE estimulados por dos horas con NGF, FSH, LH y la mezcla de ambas gonadotrofinas. Luego se incluyeron en parafinas para su posterior análisis de Inmunodetección de las isoformas de RE por IHQ.

**Resultados: Estudio *ex-vivo*:** RE $\alpha$  se localiza en el núcleo de células epiteliales y estromales de todos los grupos de estudio, manteniendo constante su detección durante la progresión neoplásica de COE. pRE $\alpha$  se localiza a nivel nuclear en ambos compartimentos de los grupos de estudio, aumentando su expresión en forma significativa desde Ovario normal funcional hasta Borderline ( $p < 0.01$ ), sin embargo su expresión disminuye drásticamente en COE I, para volver a aumentar en forma significativa hasta COE III ( $p < 0.01$ ). RE $\beta$  se localiza principalmente en el citoplasma de células epiteliales y estromales de todos los grupos de estudio, sin hacer un cambio

en su inmunodetección entre los grupos estudiados. RE $\beta$  se expresa también en el núcleo de las células epiteliales y estromales de Ovario normal funcional hasta Tumor ovárico benigno con una expresión ascendente ( $p < 0,05$ ), y luego desaparece su expresión nuclear en los tres grados de diferenciación de COE ( $p < 0.01$ ). **Estudio *in-vitro*:** Existe un aumento de la Inmunodetección de pRE $\alpha$  en células epiteliales de explantes de COE al estimularlos con concentraciones crecientes de NGF. No existen cambios significativos de la expresión de las tres isoformas de RE al estimularlos con FSH, LH y la mezcla de ambas gonadotropinas.

**Conclusión:** La Inmunodetección de RE $\alpha$  total no se modifica durante la progresión neoplásica de COE, mientras que RE $\beta$  disminuye desde tumor benigno hasta COE II; aumentando así la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$ . La Inmunodetección de pRE $\alpha$  aumenta significativamente desde COE I hasta COE III. Este último resultado, junto al aumento de pRE $\alpha$  por efecto de NGF en explantes de COE, podría sugerir que existe una activación de RE $\alpha$  por vía no clásica ligando independiente, a través de la transducción vía MAPK/ERK desencadenada por la unión de factores de crecimiento y sus respectivos receptores, entre ellos NGF a través de TrkA.

## ABSTRACT

**Introduction:** Epithelial Ovarian Cancer (EOC) is the primary cause of death from gynecological malignancies in post menopause women. The carcinogenesis and neoplastic progression is due to many molecules involved with proliferation, differentiation and angiogenesis; such as neural growth factor (NGF), with its high affinity receptor (TrkA) and vascular endothelial growth factor (VEGF), which increases their expression in EOC. Although, estrogen receptor isoforms  $\alpha$  and  $\beta$  (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ), which have antagonist effects related with cellular proliferation, change their expression in EOC compared with normal ovarian surface epithelium (OSE). These findings suggest that changes in the RE expression could be an important event in EOC progression.

**Purpose:** 1) Determine ER $\alpha$ , p-ER $\alpha$  ser 118 and ER $\beta$  sub-cellular localization and semi-quantify their expression in OSE from normal functional and inactive ovary, benign tumors, borderline tumors and serous EOC stage I, II and III. 2) Evaluate if NGF modifies ER $\alpha$ , p-ER $\alpha$  ser 118 and ER $\beta$  immunodetection in EOC samples. 3) Analyse if gonadotropins modifies ER $\alpha$ , p-ER $\alpha$  ser 118 and ER $\beta$  immunodetection in EOC samples

**Methodology:** In *ex – vivo* study, ovarian biopsies from seven studied groups that reflect EOC tumor progression, which were embedded in paraffin for histological examination and then ER isoforms immunodetection performed by immunohistochemistry. *In – vitro* study, EOC samples were stimulated by two hours with NGF, FSH, LH and LH plus FSH. At the end of incubations, EOC samples were embedded in paraffin for ER isoforms detection by immunohistochemistry.

**Results:** *Ex – vivo* study: ER $\alpha$  is localized in epithelial and stromal cell nuclei from all the studied groups, with a constant detection in EOC tumor progression. pER $\alpha$  is localized in epithelial and stromal cell nuclei from all the studied groups, but there is a significant increase of pER $\alpha$  detection from normal functional ovary towards borderline tumors ( $p < 0,01$ ), however pER $\alpha$  detection is decreased in COE I and later increase from COE II to COE III ( $p < 0,01$ ). ER $\beta$  is localized in epithelial and stromal cell cytoplasm from all the studied groups, without differences in the immunodetection between the groups. Although, ER $\beta$  is detected in epithelial and stromal cell nuclei from

normal functional ovary towards benign tumor in a increased detection ( $p < 0,05$ ), however, nuclei ER $\beta$  immunodetection disappear in EOC different stages ( $p < 0,01$ ).

*In – vitro* study: The immunodetection of pER $\alpha$  increases in EOC samples stimulated by NGF, but the immunodetection of ER $\alpha$  and ER $\beta$  did not change by NGF effect. Besides, the ER isoforms immunodetection studied did not change by gonadotropins stimulation.

**Conclusion:** ER $\alpha$  immunodetection do not change through EOC tumor progression, while total ER $\beta$  decrease from benign tumor towards COE II; increasing ER $\alpha$ /ER $\beta$  ratio in EOC compared with normal ovaries. pER $\alpha$  detection increases from COE I towards COE III. Also, pER $\alpha$  detection increases when EOC samples are stimulated with NGF; suggesting that there is an activation of ER $\alpha$  by a non classical mechanism through MAPK/ERK pathway, activated by a growth factor binding to their receptors, as NGF through TrkA.

# 1. INTRODUCCION

## 1.1.Cáncer de Ovario

El cáncer de ovario es la primera causa de muerte de los cánceres ginecológicos y corresponde a la segunda malignidad con mayor incidencia después del cáncer de mama. Al ser una enfermedad silente, la mayoría de éstas mujeres son diagnosticadas en estadios muy avanzados, llegando a tener solo una supervivencia de hasta cinco años (1-4).

La edad media de presentación del cáncer de ovario es entre los 60 a 65 años de edad, lo que hace establecer que la incidencia de COE aumenta dramáticamente en mujeres posmenopáusicas (3, 5).

Más del 90% de los cánceres de ovario lo constituye el Cáncer de Ovario Epitelial (COE) (6) que se origina del Epitelio de Superficie Ovárico (OSE); un mesotelio que posee características multipotenciales que lo hacen adquirir complejas características müllerianas en una progresión neoplásica, con diferenciación en diversos epitelios (5), tales como de oviducto (Seroso) y endocervix (Mucinoso), entre otros. (1, 3, 6, 7); siendo el COE Seroso el más frecuente, constituyendo el 80% de todos los COE (7).

Estos tumores epiteliales se pueden clasificar según su comportamiento, en Benigno, Borderline y Maligno (2, 6). Los tumores Borderline usualmente son de tipo seroso o mucinoso, poseen un bajo potencial de crecimiento y son considerados un estadio más temprano que los carcinomas (3).

Además, COE se subclasifica en tres grados de diferenciación histológica: Grado I (Altamente diferenciado o con bajo grado de malignidad), Grado II (Moderadamente diferenciado) y Grado III (Mínimamente diferenciado o con alto grado de malignidad) (6).

La invasividad de COE se relaciona con la formación de metástasis de éste, hacia otros órganos; es un parámetro netamente clínico y se clasifica según la federación internacional de ginecología y obstetricia (FIGO) en estadios I, II, III, IV (3).

La etiología histopatológica de COE se explica por dos vías (1, 2, 7):

- Tipo 1: Desarrollo lento desde un quiste de inclusión a un adenoma benigno o cistoadenoma de bajo potencial maligno, y luego a un carcinoma metastásico.
- Tipo 2: Desarrollo espontáneo, agresivo y de infiltración directa de OSE en el estroma, sin una lesión precursora. Este tipo de COE se considera de alto potencial maligno.

Los quistes de inclusión benignos resultan de invaginaciones de OSE hacia el estroma ovárico y/o por OSE atrapado en el estroma después de la ovulación (1, 2). Estas estructuras pueden observarse en cualquier etapa de la vida de una mujer, pero es más frecuente encontrarlas en mujeres mayores (6).

## **1.2. Hipótesis de la Carcinogénesis Ovárica**

La etiología del cáncer de ovario aun no está totalmente comprendida. Numerosos estudios epidemiológicos han relacionado la incidencia del cáncer de ovario con diversos factores, tales como la dieta, contaminación, tabaquismo, agentes infecciosos y la historia familiar, siendo este último en un 5-10% de los casos (3, 7).

A la fecha, se han postulado numerosas hipótesis basadas en estudios epidemiológicos que explican la etiología del cáncer de ovario. Entre estas están:

Hipótesis de la Ovulación incesante: OSE sufre la proliferación y reparación después de cada ciclo ovulatorio, lo que hace a estas células susceptibles a anomalías genéticas con una posterior transformación maligna. Debido a esto, existe un mayor riesgo en desarrollar COE en situaciones que involucran más episodios de ovulación (menarquia prematura, menopausia tardía y nuliparidad); riesgo que disminuye en condiciones donde la ovulación está suprimida (embarazos múltiples y lactancia prolongada) (1, 3, 5, 8, 9).

La reparación postovulatoria de OSE también involucra su habilidad multipotencial de desarrollar una transición epitelio-mesenquimática que lo conlleva a una forma tipo fibroblástica; lo que permite que estas células al quedar atrapadas en el estroma ovárico, se diferencien y se incorporen como fibroblastos estromales. La incapacidad a esta transición de OSE, hace que estas células atrapadas en el estroma ovárico preserven su fenotipo de OSE en el estroma ovárico; donde la estimulación de estrógenos estromales, aumentan la proliferación y transformación neoplásica de OSE (9).

Hipótesis de las Gonadotropinas: Algunos estudios epidemiológicos asocian el aumento de la incidencia de cáncer de ovario (80 a 90%) con el aumento de gonadotropinas circulantes, como ocurre en el periodo de postmenopausia.

Condiciones como: más episodios de ovulación y altos niveles de gonadotropinas (tales como la menarquia prematura, menopausia tardía y mujeres que van a procesos de fertilización *in vitro*), poseen un mayor riesgo de desarrollar cáncer de ovario. Por el

contrario, condiciones como inhibición de la ovulación incesante y gonadotrofinas disminuidas (embarazos múltiples y el uso de anticonceptivos orales durante la edad reproductiva), son factores protectivos del cáncer de ovario, sobre todo en el uso prolongado de estos últimos (1, 9-11).

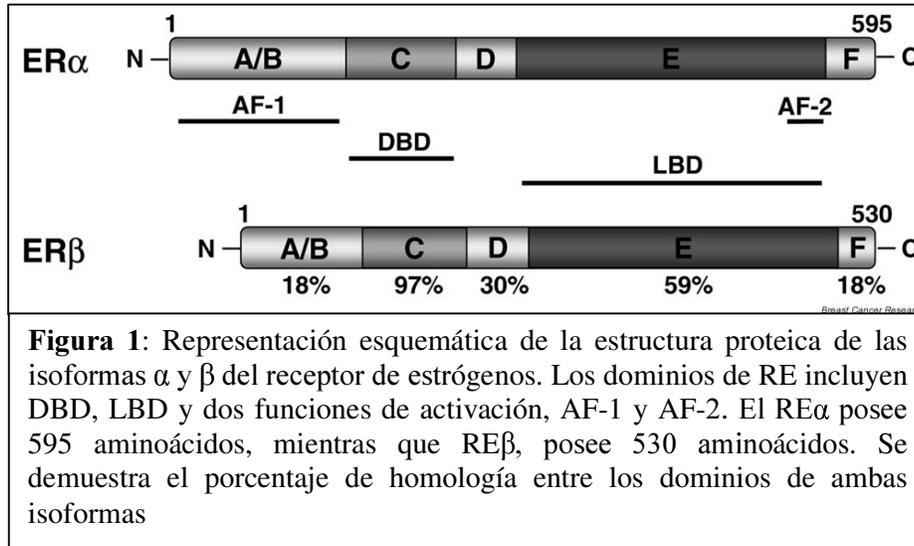
Hipótesis de Esteroides sexuales: Uno de los esteroides sexuales que poseen incidencia sobre COE son los estrógenos; que poseen efecto sobre el crecimiento y desarrollo de folículos ováricos (12) y sobre la proliferación tumoral del ovario (1, 3, 13).

### **1.3. Estrógenos y Cáncer de Ovario**

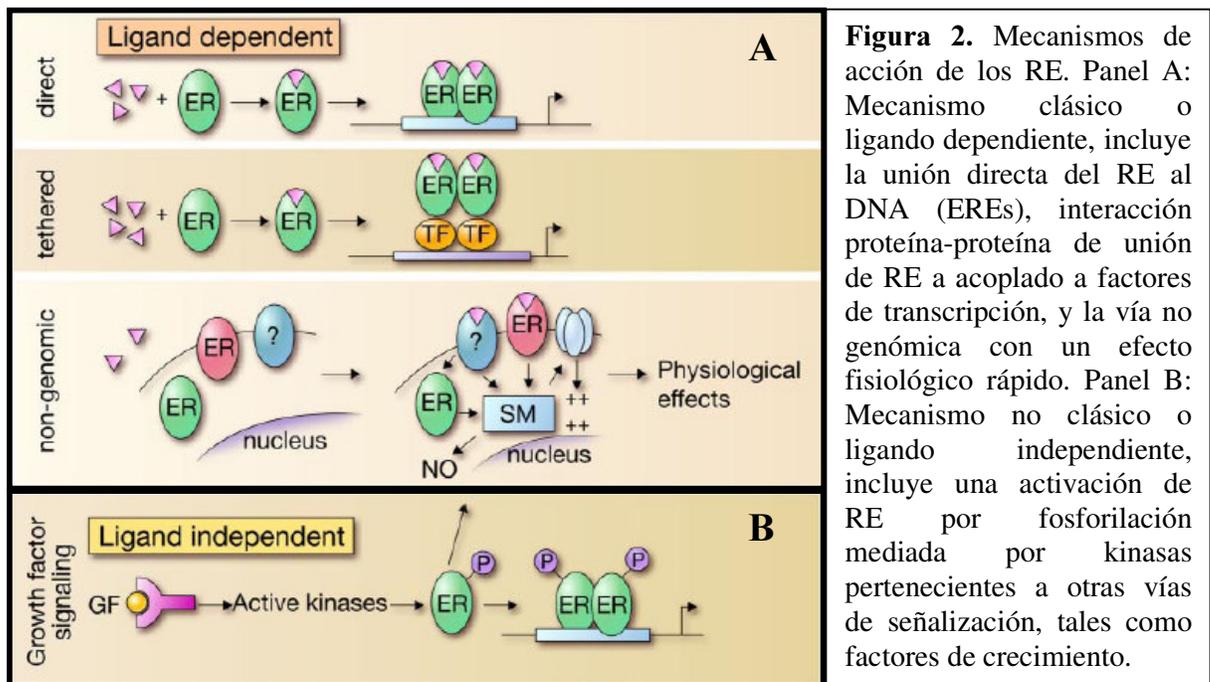
El rol de los estrógenos en la carcinogénesis ovárica se ha dilucidado por dos tipos de estudios clínicos que los postulan como posibles responsables de la promoción de la progresión del tumor ovárico en mujeres posmenopáusicas. Uno de ellos postula que las mujeres con terapia de reemplazo hormonal tienen un mayor riesgo de adquirir cáncer de ovario y de mama, y que esta terapia a largo plazo es proporcional a la incidencia de cáncer de ovario. Otro estudio postula que solo el 5-18% de los cánceres de ovario son sensibles a terapias antiestrogénicas (tamoxifeno), y que solo el 40-60% de ellos expresan Receptor de estrógenos (RE) (14-16).

Estos dos datos clínicos han sido demostrados *in vitro* en líneas celulares de COE (BG-1) que expresan RE, en las cuales el estradiol aumenta la proliferación, invasión y movilidad celular; los que son inhibidos por el uso de tamoxifeno (15).

Existen dos isoformas de RE, el RE $\alpha$  y RE $\beta$ ; los que son codificados por diferentes cromosomas, poseen distintas estructuras (Fig. 1), y responden de diferente manera a terapias antiestrogénicas; lo que sugiere que también difieren en su acción (16, 17); como se ha demostrado en animales knock out para los genes de RE $\alpha$  y RE $\beta$ , donde los ratones deficientes de RE $\alpha$  (RE $\alpha$ -KO) resultaron ser infértiles y desarrollaron múltiples quistes ováricos hemorrágicos, mientras que los ratones deficientes de RE $\beta$  (RE $\beta$ -KO) solo desarrollaron algunas deficiencias reproductivas (16).



El RE pertenece a la superfamilia de Receptores Nucleares, y posee diversos mecanismos de acción, que se pueden clasificar como Clásicos (Fig. 2A) y no clásicos (Fig. 2B).



El mecanismo de acción clásico más conocido es el de unión al DNA (Fig. 2A), donde estradiol se une a RE y lo activa, formando homodímeros (RE $\alpha$ /RE $\alpha$ , RE $\beta$ /RE $\beta$ ) y/o heterodímeros (RE $\alpha$ /RE $\beta$ ). Este dímero se une directamente a genes que poseen elementos de respuesta a Estrógenos (EREs) y regulan su transcripción. Estos genes están involucrados en diversas funciones celulares relacionada con; diferenciación celular

(Receptor de Progesterona), proliferación celular (c-myc, Ciclina D1 y HER-2), invasión celular (fibulina-1 y catepsina-D) y angiogénesis (VEGF y NGF) (15, 18, 19).

Los estrógenos pueden actuar uniéndose al dominio de unión al ligando (LBD) de RE, produciendo un cambio conformacional de la función AF-2 alterando la posición de la hélice 12, lo que permite el reclutamiento de coactivadores por unión proteína-proteína (Fig. 2A). Ejemplo de esto, es a través de la interacción física de RE $\alpha$  con el factor de transcripción Sp1 y con *c-rel* (subunidad del complejo NF $\kappa$ B) que activan la transcripción de ciertos genes. RE $\alpha$  y RE $\beta$  pueden interactuar con complejos de transcripción fos/jun en sitios AP1 para estimular la expresión génica. La unión de RE a estos coactivadores permite la unión a otros cofactores que modifican la cromatina para que exista transcripción génica, tales como histona aciltransferasa, entre otros (20, 21).

Un pequeño pool de RE se localiza en la membrana plasmática; al unirse al estradiol, activa segundos mensajeros (AMPc, IP3, Fosfolipasa C, MAPK) que modifican canales iónicos o niveles de óxido nítrico citoplasmáticos que ejercen un efecto rápido (Fig. 2A). Este es el denominado acción no genómica de RE. (17, 20, 21).

Por otro lado, existen el mecanismo de acción no clásico de RE (Fig. 2B), que se basa en que algunos factores de crecimiento se unen a su propio receptor, desencadenan actividad de kinasas que pueden fosforilar en diversos sitios al RE; se dimeriza, y se une al DNA para regular la expresión de ciertos genes o asociarse a correguladores (20).

La fosforilación de residuos de serina (ser) en RE $\alpha$  parece influir en el reclutamiento de co-activadores, resultando en la potenciación de la transcripción mediada por dicho receptor (22). Además, esta fosforilación puede ser potenciada por la unión del ligando y por la activación de kinasas pertenecientes a diversas vías de señalización como PI3-K/AKT, ERK-MAPK y PKA (17). Los sitios de fosforilación principales son ser 104, 106 y 118; siendo ser 118 el principal sitio de fosforilación en respuesta a estrógenos o por activación de la vía MAPK (23). No se ha descrito ninguna fosforilación de RE $\alpha$  en tumores malignos de ovario; solo en cáncer de mama, el cual posee un aumento de la expresión de RE $\alpha$  fosforilado en ser 118 con respecto a mama normal (24).

Los RE están ampliamente distribuidos en los órganos reproductivos femeninos humanos; su expresión diferencial se resume en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Localización de las isoformas de RE en órganos reproductivos femeninos humanos. (ref. 25)

Órgano	Isoforma	Tinción/Intensidad	Localización celular
Ovario	RE $\alpha$	Núcleo/++	- Células de la teca interna - Células glandulares intersticiales - Células de epitelio de la superficie
	RE $\beta$	Núcleo/+++	- Células de la Granulosa de folículos en crecimiento desde primario a maduro
Útero	RE $\alpha$	Núcleo/+++	- Células epiteliales luminales y glandulares - Células estromales
	RE $\beta$	Núcleo/+	- Células epiteliales luminales y glandulares
Vagina	RE $\alpha$	Núcleo/+++	- Estrato profundo del epitelio estratificado - Lamina propia
	RE $\beta$	(-)	(-)
Mama	RE $\alpha$	Núcleo/++ y Citopl/+	- Células epiteliales de alveolo y ductos
	RE $\beta$	Citoplasma/++	- Células estromales

#### 1.4. Isoformas de Receptor de estrógenos en COE

La isoforma RE $\beta$  esta altamente expresada en OSE normal y tumores benignos, mientras que RE $\alpha$  es la forma principal expresada de RE en tumores malignos de ovario. El mRNA de RE $\beta$  disminuye con la progresión tumoral mientras que el mRNA de RE $\alpha$  mantiene su expresión tanto en OSE normal como COE (14, 15, 26, 27); lo que hace que la relación de mRNA RE $\alpha$ / RE $\beta$  aumente en COE, jugando un rol importante en la carcinogénesis ovárica (15, 27). Esto sugiere que RE $\beta$  puede tener un rol protector contra la actividad mitogénica de RE $\alpha$ ; o que la pérdida de RE $\beta$  es un marcador de pérdida de la diferenciación celular y un evento muy importante en la patogénesis del cáncer (14, 15).

#### 1.5. Factor de Crecimiento Nervioso en COE

Los estrógenos a través de RE $\alpha$  y numerosos factores de crecimiento tienen una importante participación en la proliferación, diferenciación e invasión de COE (7). Entre estos factores, el factor de crecimiento nervioso (NGF) junto a su receptor Tirosina Kinasa de alta afinidad (TrkA) está expresado en un amplio espectro de células no neuronales, incluyendo al ovario (28, 31) y COE (29-31). Nuestro laboratorio demostró que no existen

cambios significativos en los niveles de mRNA de NGF entre los diferentes grados de diferenciación de COE, pero existe una diferencia significativa con OSE normal, tanto en mRNA como en la proteína; además el mRNA de TrkA está más expresado en COE seroso y mucinoso que en OSE normal; al igual que la proteína TrkA (31).

NGF y TrkA activa una señalización intracelular vía PI3-K/AKT y/o ERK-MAPK, la que estimula la expresión de diversos genes (32), incluyendo al Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular(VEGF), tanto en explantes de COE como en célula de granulosa (31, 33).

Además, en estudios realizados en corteza cerebral de rata, el estradiol regula la expresión de mRNA de NGF y a su vez, activa a ERK1 y ERK2. En este tejido existe una colocalización de RE y Trk en corteza cerebral de rata, lo que puede resultar en una convergencia de sus vías de transducción (34).

En endometrio de hamsters, el estradiol estimula la proliferación, crecimiento y la expresión de NGF, TrkA y p75 durante su ciclo estrogénico (35); y en una línea celular de urotelio (HUC) estimulada con NGF y Estradiol, aumenta la proliferación celular por activación de sus respectivos receptores. El Estradiol estimula la síntesis de NGF a través de RE, y NGF estimula la proliferación de HUC a través de su receptor TrkA. Por lo tanto Estradiol estimula la proliferación de HUC en parte mediada por NGF, el cual activa la fosforilación de TrkA (36).

### **1.6. Moléculas angiogénicas en COE**

Por otra parte, se sabe que los cánceres ováricos son altamente angiogénicos y que el componente crítico de la angiogénesis es la producción autocrina y paracrina de VEGF (37). Además, se ha encontrado una colocalización de NGF y moléculas involucradas en la angiogénesis, entre ellas el VEGF en carcinoma ovárico seroso (29, 31, 39). El NGF puede tener efectos directos e indirectos sobre la angiogénesis (40-42). Se sabe que NGF aumenta la proliferación de células endoteliales en cultivo de células HUVEC (40), e induce la migración de células endoteliales en cultivo aórtico (43), entre otras acciones. Además, nuestro grupo demostró que NGF aumenta la expresión del mRNA y proteína de tres isoformas de VEGF; VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> y VEGF<sub>189</sub> en explantes de COE, lo que sugiere que NGF aumenta la expresión de VEGF de una manera autocrina en células epiteliales de este tejido (31).

Existen evidencias que demuestran una regulación de VEGF por Estradiol y los antagonistas de RE, debido a un ERE en el gen de VEGF, por lo tanto E<sub>2</sub> regula a VEGF vía RE $\alpha$  (18).

En líneas celulares ZR-75 de cáncer de mama, RE $\alpha$  activa la expresión del receptor de VEGF tipo 2 (VEGFR2) vía Sp3 y Sp4 (44).

### **1.7. Gonadotrofinas en COE**

Como ya se mencionó, las gonadotrofinas (LH y FSH) están asociadas a un mayor riesgo de cáncer de ovario. Esta hipótesis se basa en que la exposición excesiva de OSE a gonadotrofinas (como ocurre en la menopausia), las que estimulan vías mitogénicas/oncogénicas, permitiendo la transformación maligna (9, 45).

Los receptores de FSH (FSH-R) y de LH (LH-R) se expresan en OSE normal, y también se han detectado en numerosos tumores ováricos epiteliales (46). La expresión de FSH-R, tanto a nivel transcripcional como proteico es mayor en tejido canceroso, comparado con tumores borderline, benignos y ovario normal (47). Nuestro laboratorio demostró que FSH-R y LH-R están presentes en COE y su expresión disminuye significativamente a medida que el tejido pierde su diferenciación (48).

El mecanismo de acción de estas gonadotrofinas en la patogénesis y progresión del cáncer de ovario aun es controversial, pero existen diversos antecedentes que apoyan la hipótesis de las gonadotrofinas. Algunos estudios demuestran que las gonadotrofinas estimulan la proliferación de OSE normal, pre-neoplásico y neoplásico (11, 49, 50), también la invasividad de líneas celulares de cáncer de ovario vía PKA y PI3K (9) y el crecimiento celular vía ERK1/2 y PI3-K (51, 52), Es importante mencionar que en otras líneas celulares de COE se ha demostrado que la proliferación celular del tejido tumoral se debe principalmente a FSH, y que LH tiene más bien un rol inhibitorio en el crecimiento tumoral (5, 10). Sin embargo, se ha demostrado que células de carcinoma ovárico OVCAR3 estimuladas con FSH sintetizan Estradiol, el cual aumenta la proliferación de estas células (53); y que FSH tiene una acción estrogénica en ovario sobre genes que poseen EREs, con lo cual modula el crecimiento, proliferación y diferenciación celular del ovario, sugiriendo que existe una comunicación entre FSH y RE vía cAMP/PKA (54).

Estas gonadotrofinas también influyen en la angiogénesis de COE (9), promovida por VEGF (55). En líneas celulares de tumores ováricos, las gonadotrofinas estimulan la expresión de VEGF en tumores borderline y significativamente en tumores malignos (56).

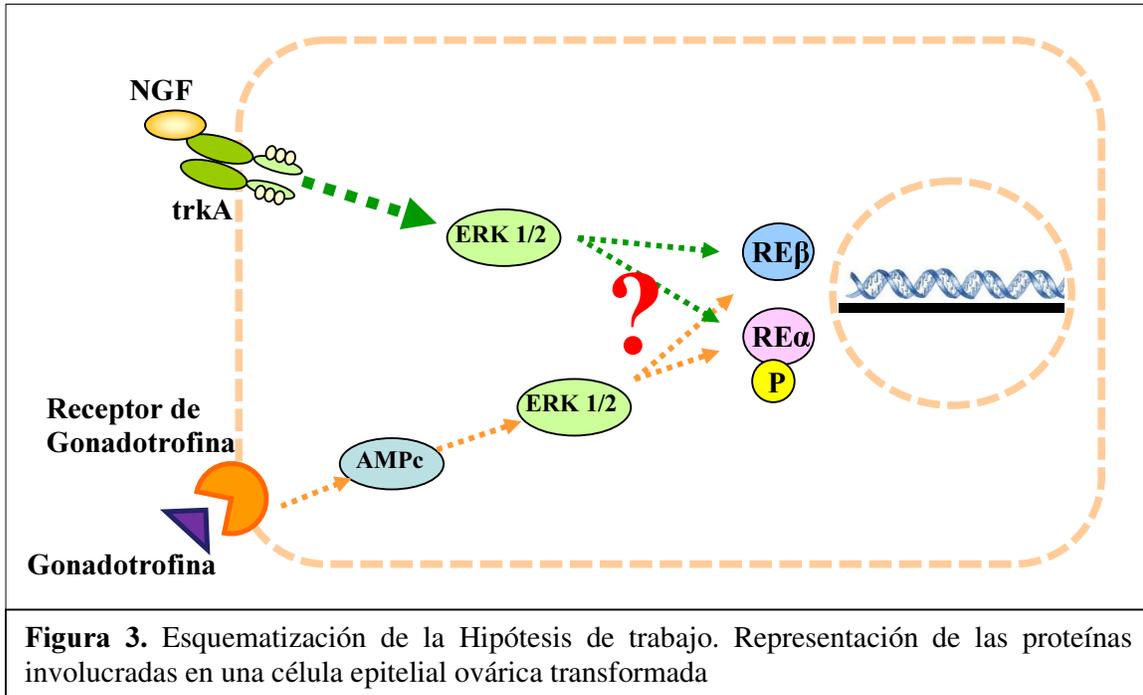
En nuestro laboratorio no se pudo demostrar el aumento de expresión de VEGF por acción de las gonadotrofinas, pero si el incremento significativo de la expresión génica y proteica de NGF y TrkA por acción de FSH y de la mezcla de ambas gonadotrofinas (48); ambos descritos como factores angiogénicos (40, 43). Por otro lado, ya que NGF aumenta la expresión de VEGF en explantes de COE (31), podemos postular que gonadotrofinas aumenta la expresión de VEGF indirectamente a través de NGF y TrkA.

Retomando la importancia de los REs en la carcinogénesis de COE, es posible pensar que la expresión proteica de RE $\alpha$  total debería mantenerse constante a través de la génesis y progresión tumoral de COE, y que RE $\beta$  disminuiría con esta progresión, aumentando así la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$  descrita anteriormente. Junto a la mayor disponibilidad relativa de RE $\alpha$ , este último puede activarse por fosforilación en ser 118, lo que aumentaría la transcripción de genes controlados por RE $\alpha$  y que están relacionados con proliferación, diferenciación y angiogénesis.

La fosforilación de RE $\alpha$  en ser 118 es realizada por kinasas pertenecientes a la vía MAPK/ERK. Esta vía es activada por la activación de diversos receptores, entre los cuales sería interesante conocer si los receptores de gonadotrofinas y de TrkA, cuyas expresiones tanto proteicas como génicas se encuentran elevadas en COE respecto a ovario normal, al unirse a su ligando pudiera activar la fosforilación del RE $\alpha$ , aumentando así la proliferación celular en COE.

### 1.8. Hipótesis

Las isoformas del Receptor de Estrógenos cambian durante la génesis y progresión del Cáncer Ovárico Epitelial y se modifican por acción de gonadotrofinas y NGF



**Figura 3.** Esquematización de la Hipótesis de trabajo. Representación de las proteínas involucradas en una célula epitelial ovárica transformada

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo general**

Evaluar la localización subcelular de RE $\alpha$ , p-RE $\alpha$  y RE $\beta$  desde Ovario normal a Cáncer Ovárico Epitelial y determinar la acción de NGF y Gonadotrofinas sobre los RE.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- 1.** Determinar la localización subcelular de RE $\alpha$ , p-RE $\alpha$  ser 118 y RE $\beta$  y semicuantificar su expresión, en el epitelio superficial de ovario normal funcional e inactivo, tumores ováricos benignos, borderline y COE seroso grado I, II y III
- 2.** Evaluar si NGF modifica la inmunodetección de RE $\alpha$ , p-RE $\alpha$  ser 118 y RE $\beta$  en explantes de COE
- 3.** Analizar si las gonadotrofinas (LH y FSH) modifican la inmunodetección de RE $\alpha$ , p-RE $\alpha$  ser 118 y RE $\beta$  en explantes de COE

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

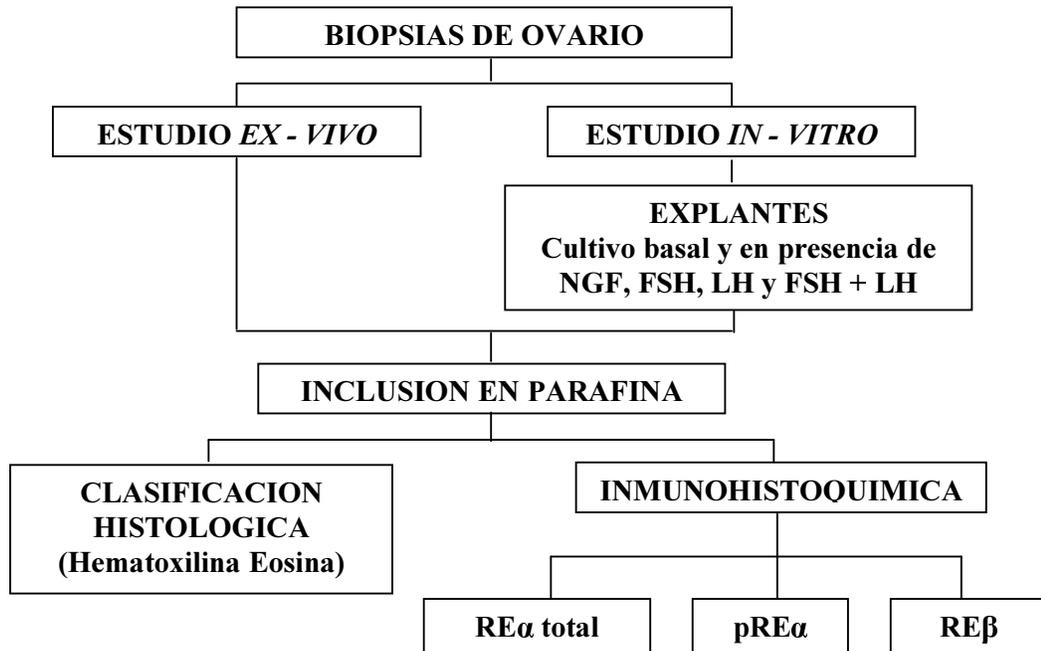
#### 3.1. Pacientes y Obtención de las muestras

Las muestras de tejido ovárico se obtuvieron del servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Instituto Nacional del Cáncer, Clínica Las Condes, Hospital FACH y Hospital San Borja-Arriarán, previo consentimiento escrito e informado, aprobado por el Comité de Ética de las distintas instituciones.

Las muestras se clasificaron en siete grupos de estudio; Ovario Normal Funcional (OVF) y Ovario Normal Inactivo (OVI), obtenidos por patología ginecológica no ovárica; Tumor Ovárico Benigno, Tumor Ovárico Borderline, Carcinoma Ovario Epitelial Seroso con grado de diferenciación I (COE I), grado de diferenciación II (COE II) y grado de diferenciación III (COE III), las que se obtuvieron para diagnóstico histológico de masa tumoral.

#### 3.2. Diseño Experimental

Esta tesis está basada en dos tipos de estudios, *ex vivo* e *in vitro*; los cuales se realizaron en forma retrospectiva y prospectiva.



### **3.3. Estudio *ex – vivo***

Se obtuvieron tejidos ováricos incluidos en parafina de los siete grupos de pacientes (OVF, OVI, tumor ovárico benigno, tumor ovárico Borderline y COE I, II y III). La clasificación histológica fue evaluada por dos anatómicos patólogos. El estudio de los RE se realizó mediante Inmunohistoquímica.

### **3.4. Estudio *in – vitro***

Muestras frescas de Cáncer Ovárico Epitelial, con diferentes grados de diferenciación, fueron fraccionadas en asepsia obteniendo trozos de tejidos (explantes) de aproximadamente 100 mg. Estos explantes fueron cultivados a 37°C, en una interfase de medio de cultivo y aire, en una atmósfera húmeda de 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. Los tejidos fueron cultivados por 2 horas en placas de 24 pocillos y cada pocillo contenía 1 ml de medio DMEM/F12 (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA), suplementado con bicarbonato (600mg/L), penicilina (50 mg/L), gentamicina (80 mg/L), estreptomycin (50 mg/L) y ketoconazol (5 mg/L) en presencia de las siguientes concentraciones crecientes de estímulos: NGF 10 y 100 ng/ml (Sigma, St Louis, MO, USA); FSH 10 y 100 mUI/ml; LH 10 y 100 mUI/ml y una mezcla de FSH + LH 50 y 500 mUI/ml. (gonadotropinas provenientes de hipófisis de cadáveres humanos, proyecto OMS).

Las concentraciones de gonadotropinas simulan los niveles circulantes en mujeres durante la etapa fértil (10 mUI/ml) y postmenopáusica (100 mUI/ml).

Al término de los diferentes cultivos, los explantes se fijaron en Bouin y se incluyeron en parafina, para los estudios de Inmunohistoquímica.

### **3.5. Clasificación histológica**

Un anatómico patólogo de vasta experiencia evaluó las tinciones de Hematoxilina Eosina de las muestras de tejido ovárico (tanto para los estudios *ex – vivo* como *in – vitro*), con el fin de evaluar la integridad del tejido y clasificarla dentro de los siete grupos de estudio.

### 3.6. Inmunohistoquímica (IHQ)

Esta técnica se realizará para evaluar la localización y semicuantificación de las proteínas RE $\alpha$  total, RE $\beta$  y p-RE $\alpha$  ser 118 en los siete grupos estudiados y los explantes de COE tratados *in vitro* con NGF y gonadotrofinas.

Los tejidos de ovario fijados en parafina, se cortaron en secciones de 4  $\mu$ m y fijados sobre portaobjetos silanizados; realizando cada cinco cortes un control de morfología con tinción Hematoxilina Eosina.

Estos tejidos se desparafinaron, rehidrataron y se les realizó la recuperación antigénica con un buffer citrato 10 mM a pH 6,0. Se inhibió la peroxidasa endógena del tejido con Peróxido de Hidrógeno 3% y se bloquearon los sitios de unión inespecíficos con Albúmina Bovina 4% durante una hora. Luego se incubó con el anticuerpo específico por 18-20 hr, a 4°C en cámara húmeda (Tabla 2). La detección se realizó mediante el kit Histostain SP® (ZYMED), que contiene un anticuerpo secundario unido a biotina, la cual reacciona con avidina-peroxidasa, que oxida al cromógeno diaminobenzidina (DAB, DAKO Cytomation) resultando en una coloración café. Luego, se realizó una contratinción con hematoxilina y se deshidrató con una batería de alcoholes y xilol. Cada muestra fue evaluada mediante porcentaje (%) de células teñidas obtenidas del conteo de 1000 células e intensidad de la tinción evaluada como 1 (leve), 2 (moderada) y 3 (intensa); considerando el % de células positivas como la suma de las intensidades 2 y 3. Los controles negativos se realizaron en secciones adyacentes incubadas sólo con Albúmina bovina 4%, en ausencia del anticuerpo primario.

**Tabla 2.** Características de los Anticuerpos utilizados en la realización de las IHQ.

Anticuerpo	Tipo	Marca	Concentración utilizada
RE $\alpha$	Mouse monoclonal	# SC-8005; Santa Cruz	4 $\mu$ g/ml
RE $\beta$	Rabbit polyclonal	# 06-629; Upstate	3,3 $\mu$ g/ml
p-RE $\alpha$ ser 118	Rabbit polyclonal	#07-487; Upstate	1:300 *

\* Se utilizó una dilución 1:300 de la solución de anticuerpo anti p-RE $\alpha$  concentrada, sin conocer cual era la concentración inicial de ésta; información que no fue entregada por el fabricante (Upstate).

### **3.7. Análisis estadístico**

En el análisis estadístico de los datos se probó la normalidad de su distribución utilizando el Test de Kolmogorov-Smirnov. En los grupos de estudio que tenían distribución normal se empleó el test para datos paramétricos ANOVA y el post test de Bonferroni para identificar diferencias significativas entre grupos. En los grupos de estudio que no poseían distribución normal, se aplicó el Test no paramétrico de Kruskal-Wallis y el post test de Dunns para identificar diferencias significativas entre grupos.

Los resultados se expresaron en promedio  $\pm$  error estándar, y la significancia se considera con un  $p < 0.05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Características de las pacientes

Las características de las pacientes al estudio *ex-vivo*, se resumen en la Tabla 3.

<b>Grupo de Estudio</b>	<b>Edad (años)</b>
Ovario Normal Funcional (n=11)	39 ± 3,61
Ovario Normal Inactivo (n=9)	46 ± 1,25
Tumor seroso benigno (n=10)	36 ± 3,08
Tumor borderline (n=11)	46 ± 5,67
COE I (n=13)	53 ± 4,07
COE II (n=12)	53 ± 4,54
COE III (n=8)	68 ± 2,24

Todas las pacientes incluidas en el estudio *in - vitro* fueron diagnosticadas de COE en distintos grados histológicos (COE I, n = 3; y COE III, n = 5); y sus edades fluctuaron entre 58 ± 6,56 años.

### 4.2. Estudio *ex - vivo*

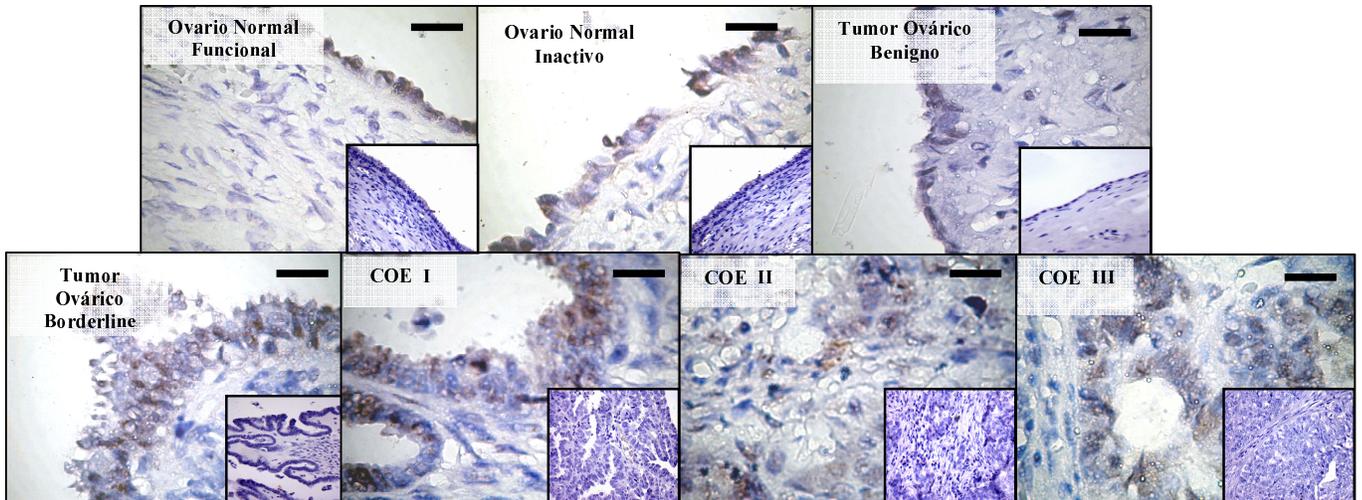
Se analizó la Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$  y RE $\beta$  en tejidos ováricos pertenecientes a siete grupos de estudio que siguen una progresión neoplásica de COE. El análisis de la Inmunodetección se realizó por porcentaje de núcleos/citoplasmas positivos.

#### 4.2.1. Inmunodetección de RE $\alpha$ en los tejidos ováricos

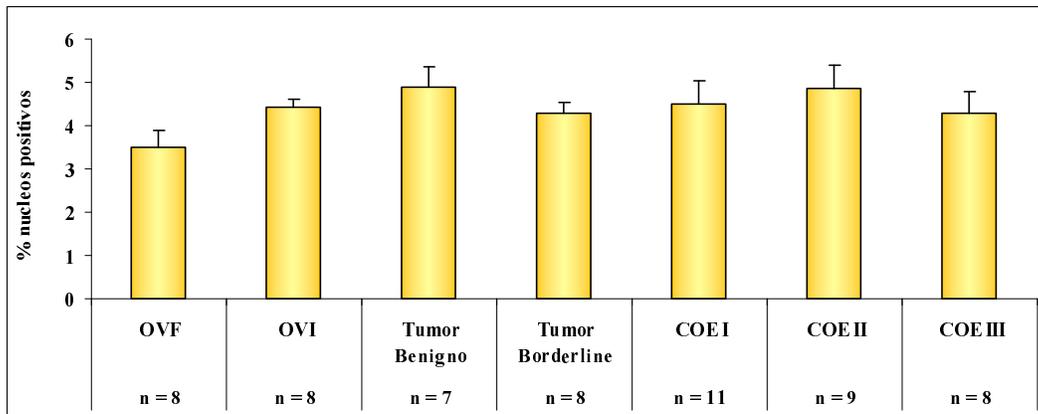
El RE $\alpha$  se localiza principalmente en el núcleo del epitelio de la superficie (normal y tumoral) y estroma ovárico en todos los grupos de estudio (Fig. 4).

El análisis de porcentaje de núcleos positivos para RE $\alpha$  no posee una distribución normal en cada grupo de estudio, y aplicando un test no paramétrico, no existen diferencias significativas de la Inmunodetección de RE $\alpha$  entre los siete grupos estudiados, existiendo

una inmunodetección homogénea en el epitelio ovárico durante la progresión neoplásica de COE (Fig. 5). La inmunodetección de RE $\alpha$  en el estroma ovárico tampoco posee diferencias significativas (datos no mostrados).



**Figura 4.** Localización y distribución de RE $\alpha$  en tejidos de ovario a través de una progresión neoplásica, determinada por IHQ. La barra en cada recuadro representa 50  $\mu$ m. Aumento 1000X.

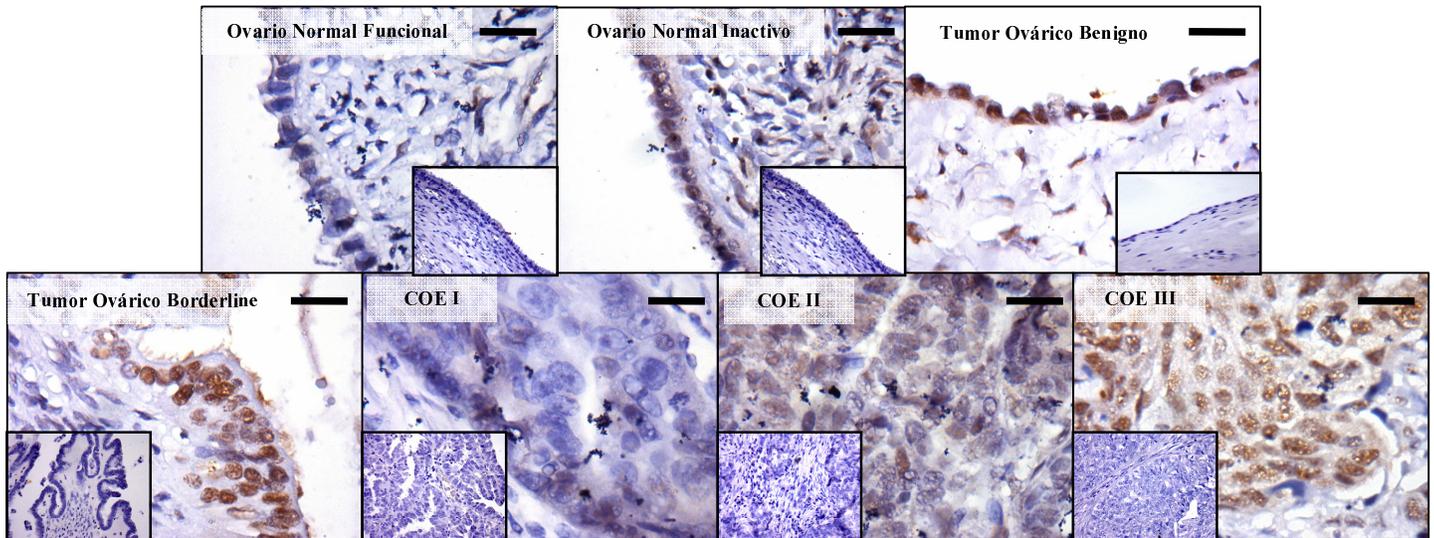


**Figura 5.** Análisis de la Inmunodetección de RE $\alpha$  en el Núcleo del Epitelio Ovárico, durante la progresión neoplásica de COE. Promedio  $\pm$  error estándar.

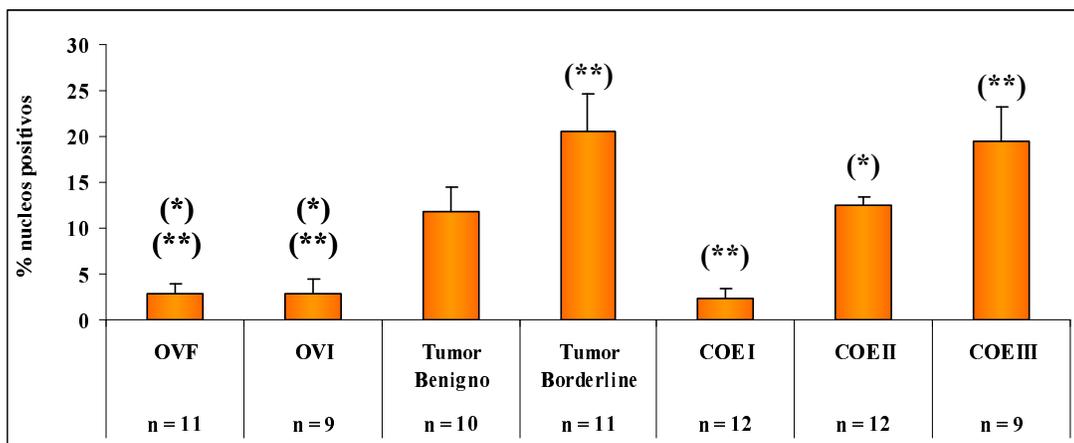
#### 4.2.2. Inmunodetección de pRE $\alpha$ en los tejidos ováricos

El receptor de estrógenos alfa fosforilado (pRE $\alpha$ ) se localiza solo en el núcleo del epitelio de la superficie (normal y tumoral) y estroma ovárico de los siete grupos de estudio (Fig. 6).

El análisis del porcentaje de núcleos positivos para pRE $\alpha$  mediante un test no paramétrico demostró que existen diferencias significativas entre los grupos de estudio (Fig. 7). En el epitelio ovárico, la Inmunodetección de pRE $\alpha$  aumenta en forma significativa entre OVF v/s Borderline ( $p < 0.01$ ); luego desciende a COE I ( $p < 0.01$  v/s Borderline), para aumentar significativamente desde COE I hasta COE III ( $p < 0.01$ ). Estos cambios también se pueden observar en el estroma ovárico (dato no mostrado)



**Figura 6.** Localización y distribución de pRE $\alpha$  en tejidos de ovario a través de una progresión neoplásica, determinada por IHQ. La barra en cada recuadro representa 50  $\mu$ m. Aumento 1000X.



**Figura 7.** Análisis de la Inmunodetección de pRE $\alpha$  en el Núcleo del Epitelio Ovárico, durante la progresión neoplásica de COE. Promedio  $\pm$  error estándar.

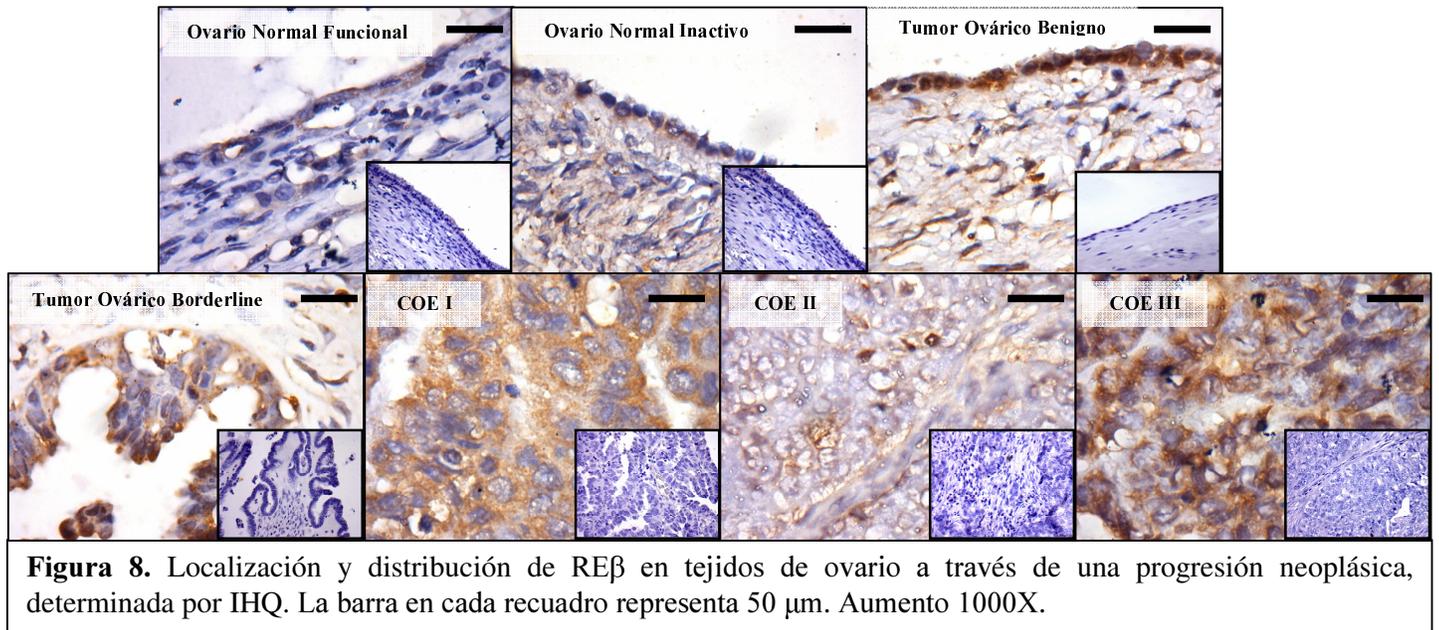
(\*)  $p < 0.05$ ; OVF v/s COE II, OVI v/s COE II, COE I v/s COE II. (\*\*)  $p < 0.01$ ; OVF v/s Borderline, OVF v/s COE III, OVI v/s Borderline, Borderline v/s COE I, COE I v/s COE III.

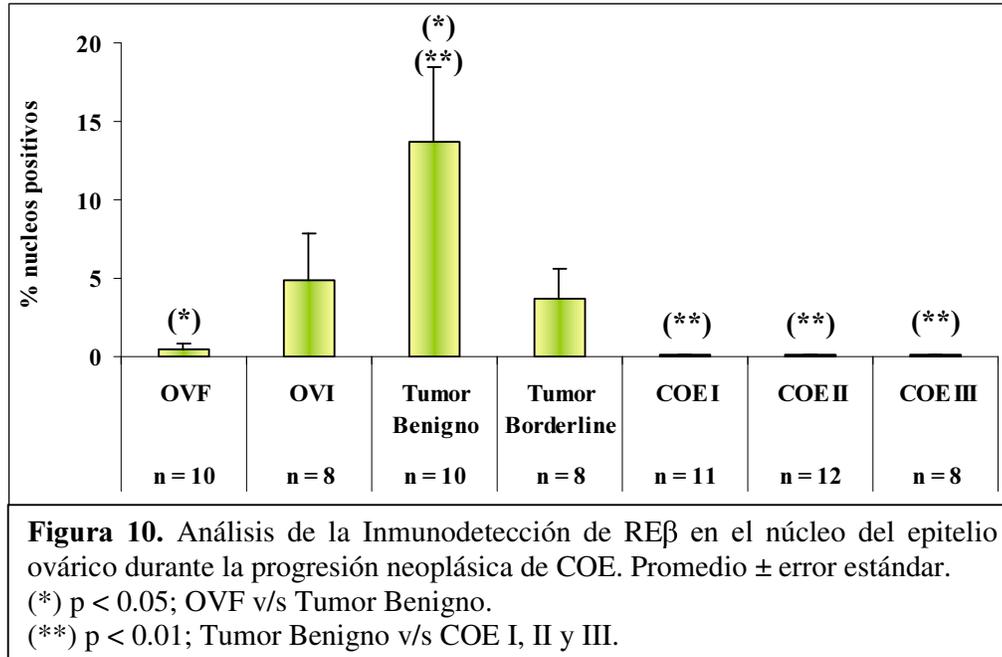
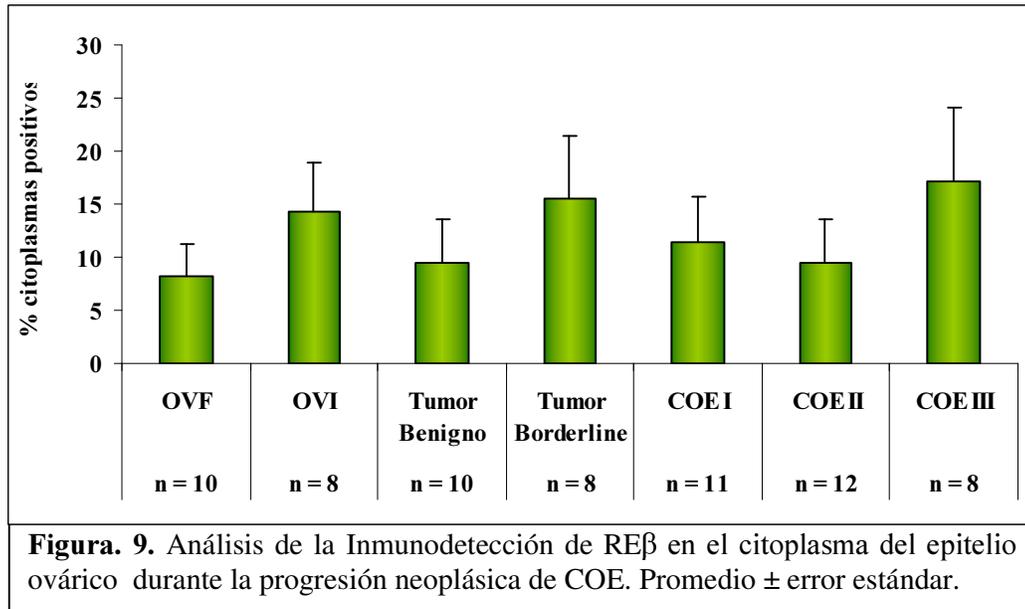
#### 4.2.3. Inmunodetección de REβ en los tejidos ováricos

El análisis por IHQ del receptor de estrógenos beta (REβ) demostró que esta proteína se localiza tanto en el citoplasma como en el núcleo del epitelio de la superficie (normal y transformado) y en el estroma ovárico de todos los grupos de estudio (Fig. 8).

El análisis de la IHQ considerando porcentaje de citoplasmas positivos para REβ, demostró que los grupos de estudios no poseen una distribución normal, y que no existen diferencias significativas en la Inmunodetección de REβ entre los grupos de estudio, tanto en el epitelio (Fig. 9), como en estroma ovárico (dato no mostrado).

Sin embargo, realizando el análisis de la Inmunodetección de REβ a nivel nuclear en el epitelio y estroma Ovárico existen diferencias significativas de la expresión de REβ entre OVF y tumor benigno ( $p < 0,05$ ) y entre tumor benigno con los tres grados de diferenciación de COE ( $p < 0.01$ ); en estos últimos prácticamente desaparece la detección nuclear de REβ. (Fig. 10).

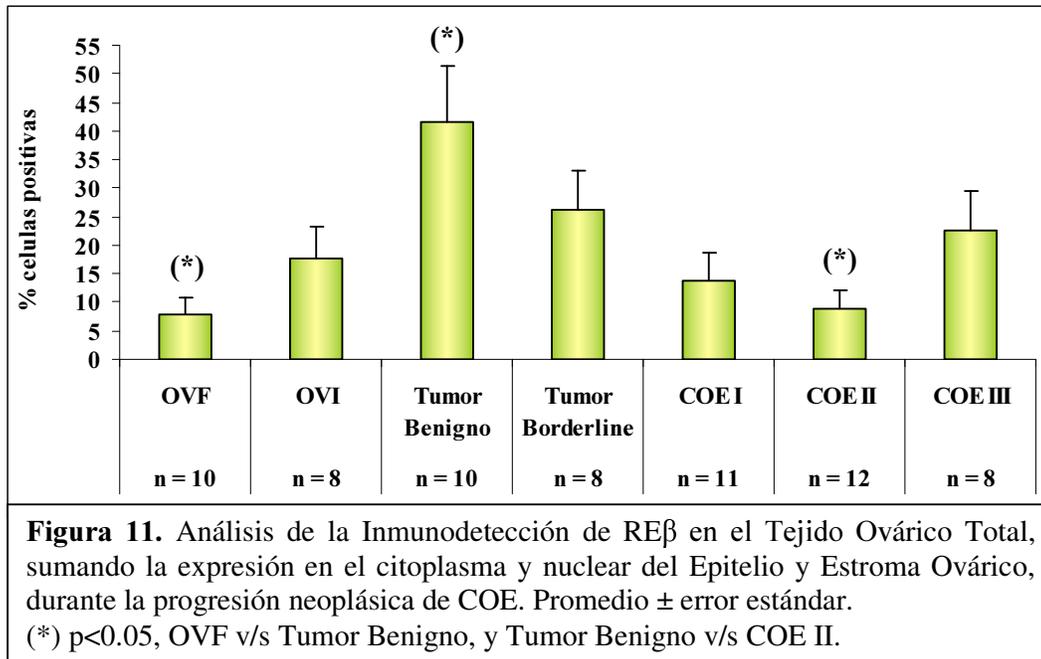




Como ya se mencionó, numerosos estudios demuestran que la expresión del mRNA de REβ disminuye a medida que avanza la progresión neoplásica desde ovario normal (11, 12, 14, 26) y lo mismo se espera observar en este estudio por IHQ.

Debido a que la técnica de IHQ semicuantifica la proteína por compartimento celular, se procedió a sumar la expresión de REβ en el núcleo y citoplasma del Epitelio y Estroma, con el fin de comparar lo publicado en expresión de mRNA.

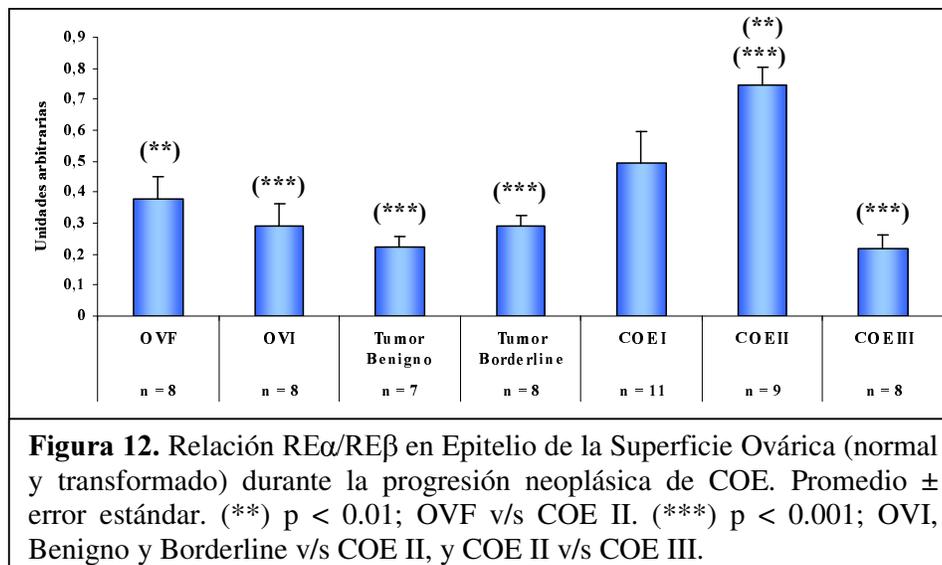
Con este análisis se puede observar que la Inmunodetección total de RE $\beta$  aumenta desde OVF hasta Tumor Benigno ( $p < 0.05$ ), y luego disminuye significativamente hasta COE II ( $p < 0.05$ ) (Fig. 11).



#### 4.2.4. Relación RE $\alpha$ /RE $\beta$ en epitelio de los tejidos ováricos

Se quiso analizar la relación entre la Inmunodetección de RE $\alpha$  (núcleo) y RE $\beta$  (núcleo mas citoplasma) en el epitelio durante la progresión neoplásica de COE, con el fin de conocer la tasa de proliferación asociada a RE $\alpha$  y de protección, dado por RE $\beta$ .

A través de un test no paramétrico, se observa una diferencia significativa de la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$  entre OVF v/s COE I ( $p < 0.05$ ) y COE II ( $p < 0.01$ ), (Fig. 12).



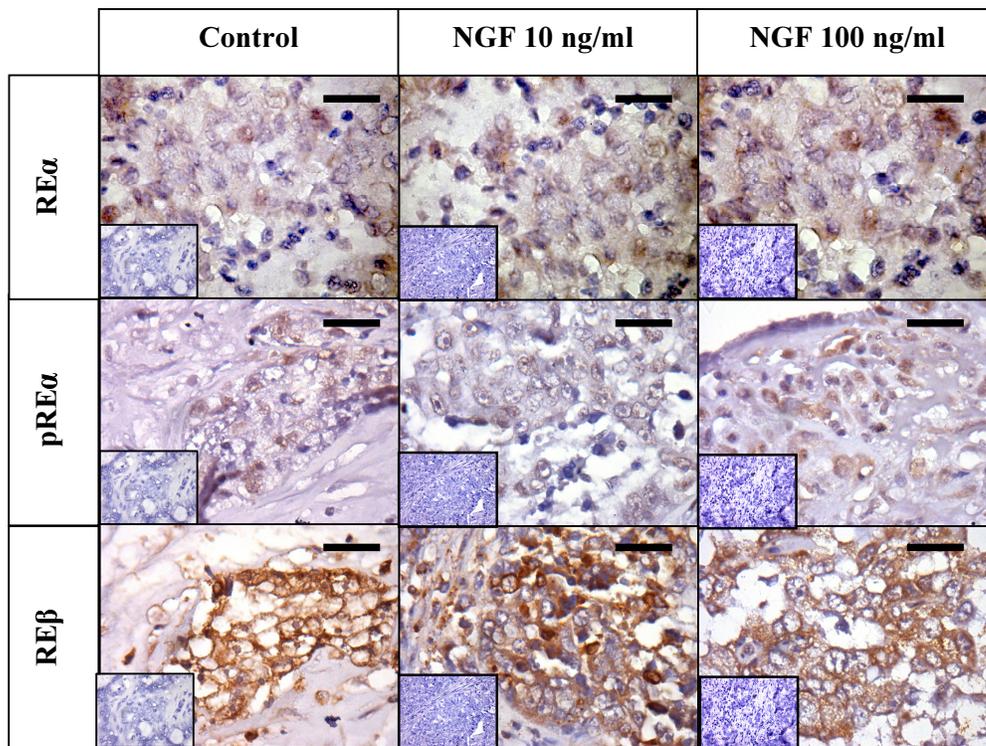
### 4.3. Estudio *in - vitro*

Se analizó la Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$  y RE $\beta$  en explantes de COE. El análisis de la Inmunodetección se realizó por porcentaje de núcleos/citoplasmas positivos.

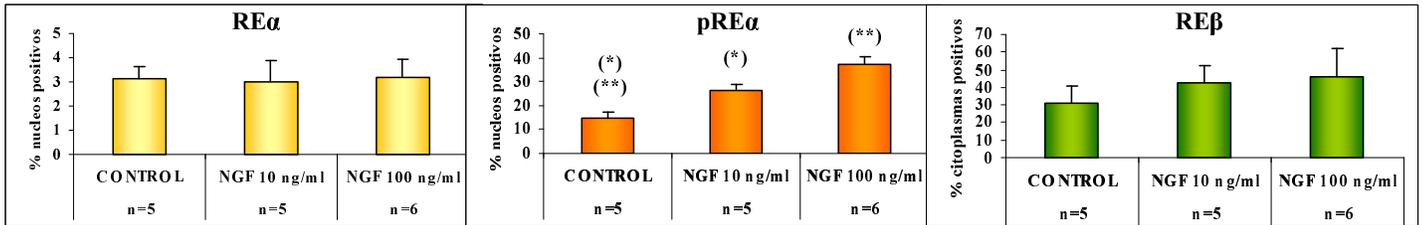
#### 4.3.1. Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con NGF

Los explantes de COE estimulados por dos horas con NGF a 10 y 100 ng/ml presentaron una localización diferencial de las isoformas de RE estudiadas; siendo RE $\alpha$  y pRE $\alpha$  nuclear, mientras que la de RE $\beta$  es citoplasmática (Fig. 13).

La Inmunodetección de RE $\alpha$  y RE $\beta$  no presentaron cambios significativos en ser estimulado con NGF en concentración creciente, al compararlo con el control sin estímulo (Fig. 14). Sin embargo, la Inmunodetección de pRE $\alpha$  aumenta en forma significativa en los explantes estimulados con NGF 10 y 100 ng/ml ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente v/s el control) (Fig. 14)



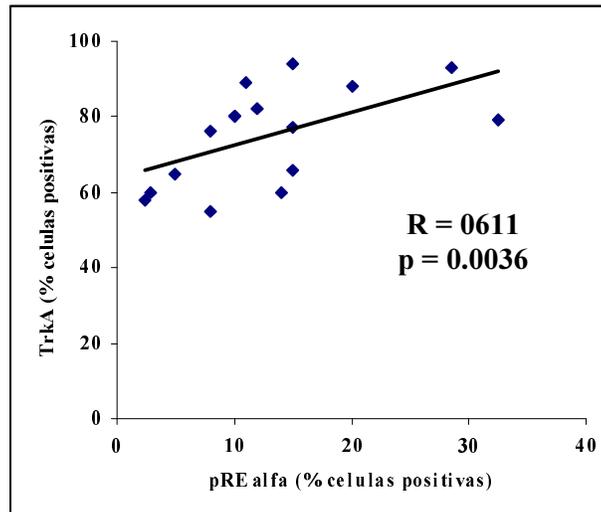
**Figura 13.** Localización y distribución de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$  y RE $\beta$  en explantes de COE estimulados con NGF, determinada por IHQ. La barra en cada recuadro representa 50  $\mu$ m. Aumento 1000X.



**Figura 14.** Análisis de la Inmunodetección de RE en el epitelio de explantes de COE estimulados con NGF en concentraciones de 10 y 100 ng/ml. Promedio  $\pm$  error estándar.

(\*)  $p < 0.05$ ; Control v/s NGF 10 ng/ml. (\*\*)  $p < 0.01$ ; Control v/s NGF 100 ng/ml.

El resultado del aumento de la inmunodetección de pRE $\alpha$  por acción de NGF se quiso complementar con un estudio de correlación entre el porcentaje de células positivas para TrkA y pRE $\alpha$  en los diferentes grados de diferenciación de COE, desde COE I hasta COE III (Fig. 15). Esto demuestra que existe una correlación positiva significativa (1/pendiente = 0.95,  $R=0.611$  y  $p < 0.01$ ) entre el aumento de la detección de TrkA y pRE $\alpha$  a medida que COE pierde su diferenciación celular.

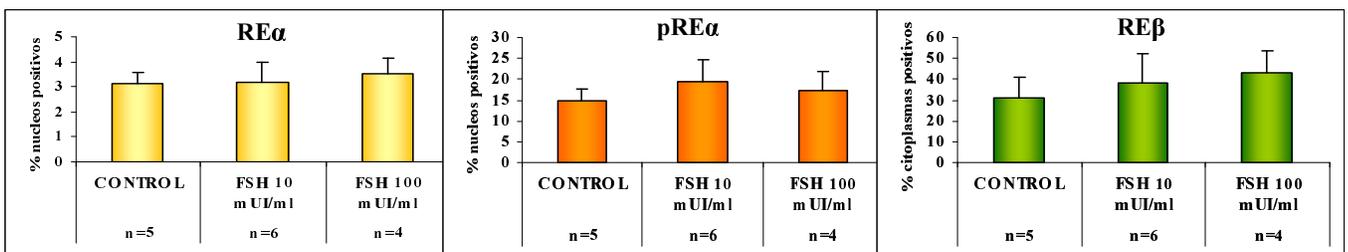
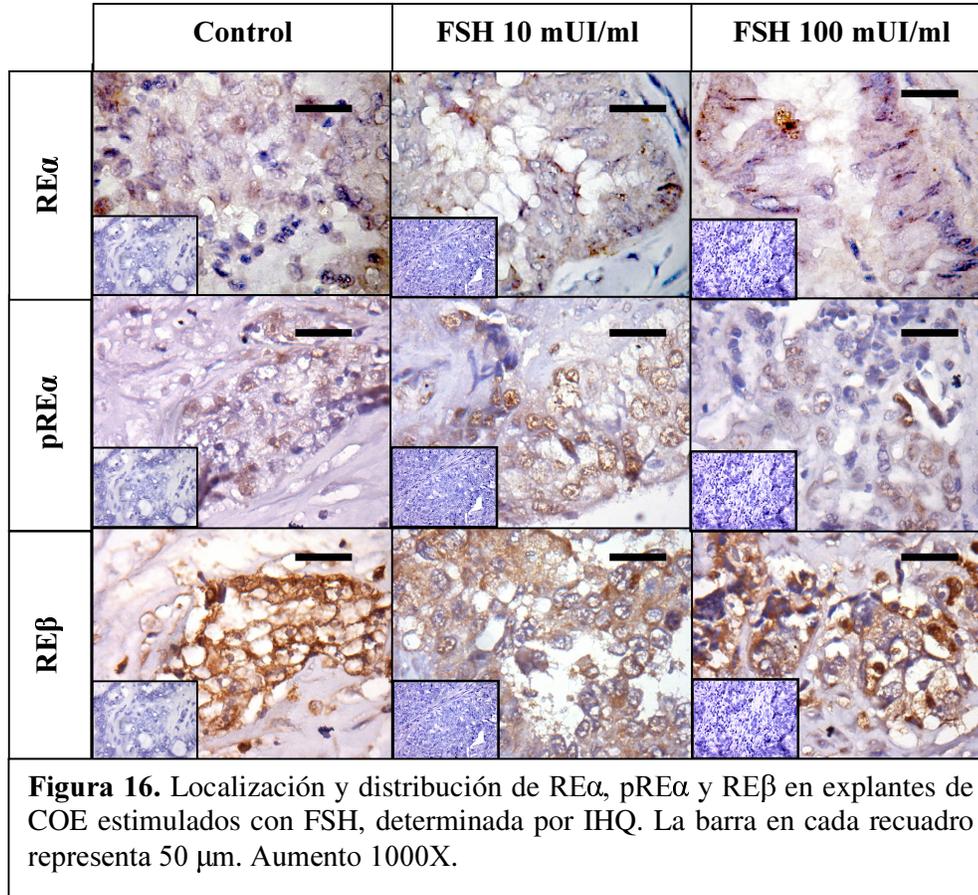


**Figura 15.** Correlación de Pearson entre pRE $\alpha$  y TrkA, evaluados por IHQ, desde COE I hasta COE III. 1/pendiente = 0.95,  $R=0.611$  y  $p = 0.0036$ . (\*\*),  $p < 0.01$ .

#### 4.3.2. Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con FSH

Los explantes de COE estimulados por dos horas con FSH 10 y 100 mUI/ml presentaron una localización diferencial de las isoformas de RE estudiadas; siendo RE $\alpha$  y pRE $\alpha$  nuclear, mientras que la de RE $\beta$  es citoplasmática (Fig. 16).

Ninguna isoforma de RE, RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ , ni RE $\beta$ , presentó cambios significativos en su Inmunodetección al ser estimulado con FSH en concentración creciente, en comparación al control sin estímulo (Fig. 17).

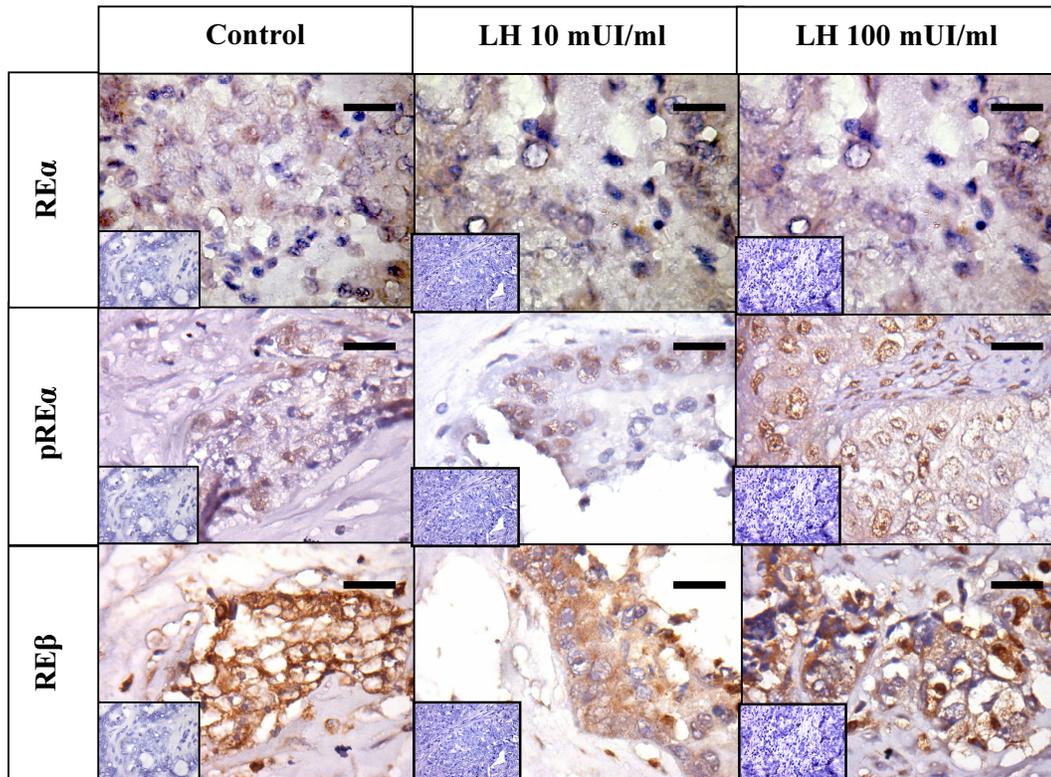


**Figura 17.** Análisis de la Inmunodetección de RE en el epitelio de explantes de COE estimulados con FSH en concentraciones de 10 y 100 mUI/ml. Promedio  $\pm$  error estándar.

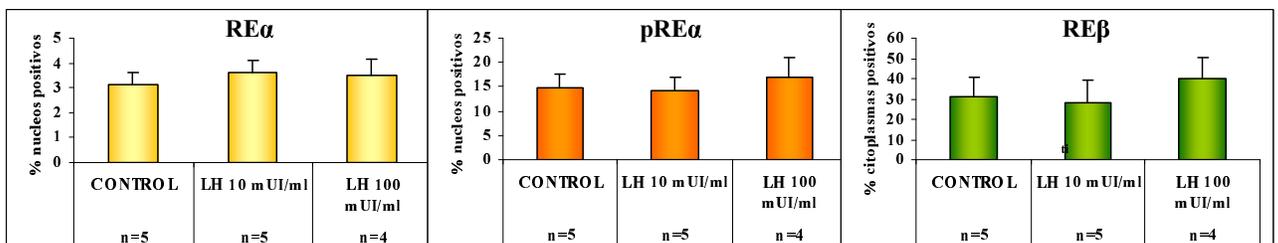
### 4.3.3. Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con LH

Los explantes de COE estimulados por dos horas con LH 10 y 100 mUI/ml presentaron una localización diferencial de las isoformas de RE estudiadas; siendo de RE $\alpha$  y pRE $\alpha$  nuclear, mientras que la de RE $\beta$  es citoplasmática (Fig. 18).

Ninguna isoforma de RE, RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ , ni RE $\beta$ , presentó cambios significativos en su Inmunodetección al ser estimulado con LH en concentración creciente, en comparación al control sin estímulo (Fig. 19).



**Figura 18.** Localización y distribución de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$  y RE $\beta$  en explantes de COE estimulados con LH, determinada por IHQ. La barra en cada recuadro representa 50  $\mu$ m. Aumento 1000X.

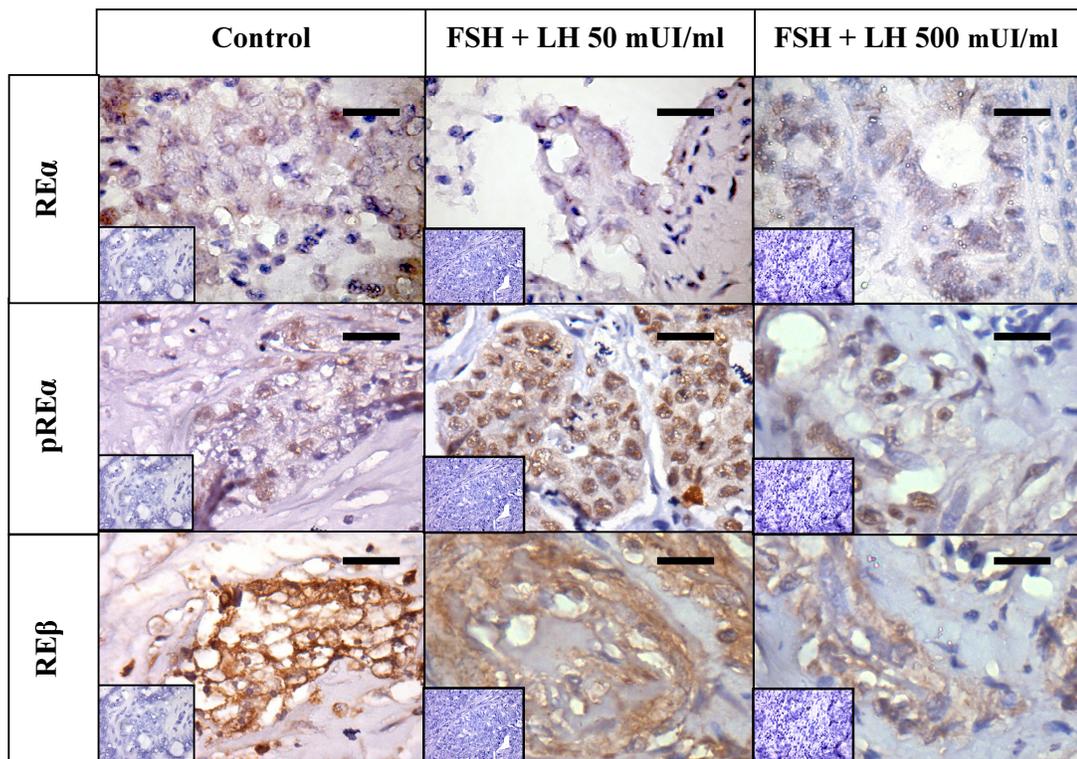


**Figura 19.** Análisis de la Inmunodetección de RE en el epitelio de explantes de COE estimulados con LH en concentraciones de 10 y 100 mUI/ml. Promedio  $\pm$  error estándar.

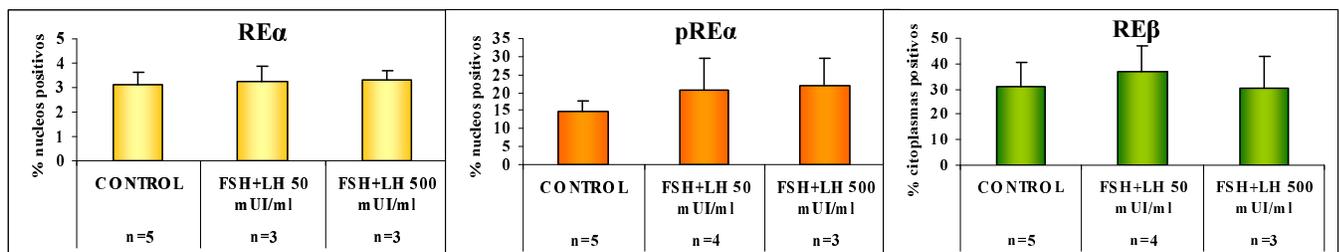
#### 4.3.4. Inmunodetección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ y RE $\beta$ en explantes de COE estimulados con FSH + LH

Los explantes de COE estimulados por dos horas con FSH + LH 50 y 500 mUI/ml presentaron una detección diferencial de las isoformas de RE estudiadas; siendo RE $\alpha$  y pRE $\alpha$  nuclear, mientras que la de RE $\beta$  es citoplasmática (Fig. 20).

Ninguna isoforma de RE, RE $\alpha$ , pRE $\alpha$ , ni RE $\beta$ , presentó cambios significativos en su Inmunodetección al ser estimulado con la mezcla de ambas gonadotropinas en concentración creciente, en comparación al control sin estímulo (Fig. 21).



**Figura 20.** Localización y distribución de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$  y RE $\beta$  en explantes de COE estimulados con FSH + LH, determinada por IHQ. La barra en cada recuadro representa 50  $\mu$ m. Aumento 1000X.



**Figura 21.** Análisis de la Inmunodetección de RE en el epitelio de explantes de COE estimulados con FSH + LH en concentraciones de 50 y 500 mUI/ml. Promedio  $\pm$  error estándar.

## 5. DISCUSION

En el ovario de la mujer postmenopáusica, OSE se invagina en el estroma ovárico donde está sometido a un ambiente de altas concentraciones de gonadotrofinas y andrógenos, lo que provoca una transformación maligna progresiva, formando primero un quiste de inclusión y luego un cistoadenoma seroso, que progresa a tumor borderline y los tres grados de diferenciación neoplásica de COE (9). A pesar que en estas mujeres no se sintetiza estradiol por parte de las células de la granulosa (al no poseer folículos activos), los RE están presentes en OSE y estroma ovárico; los que podrían tener un rol en la patogénesis de COE (15). Existen evidencias que postulan a RE $\beta$  como protector frente a la carcinogénesis ovárica, mientras que a RE $\alpha$  se le atribuyen los efectos de proliferación de OSE en un curso neoplásico (14, 15).

Diversos autores han demostrado la expresión de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en ovario normal y COE (14-17, 26, 27, 57). La mayoría de ellos, observa una disminución de la expresión de RE $\beta$  en COE con respecto a ovario normal, mientras que RE $\alpha$  mantiene su expresión; aumentando la relación de RE $\alpha$ /RE $\beta$  en COE. Estos estudios se basan en expresión génica de los receptores y no la cuantificación de la proteína, además de no incluir la evaluación de los cambios de expresión de los REs en los distintos grados de diferenciación histológica de COE (Grado I, II y III).

Los resultados del presente estudio demuestran que la proteína RE $\alpha$  se localiza en el núcleo del epitelio de la superficie ovárica durante la progresión carcinogénica de COE; sin embargo esta detección se mantiene constante y no varía desde OVF hasta COE III. En cambio, la Inmunodetección de RE $\beta$  disminuye significativamente en el tejido ovárico desde tumor benigno hasta COE II. Además, se analizó el balance entre ambas isoformas, donde la razón RE $\alpha$ /RE $\beta$  aumenta desde OVF y OVI hasta COE II.

Otros autores han determinado los mismos cambios de expresión de RE $\alpha$  y RE $\beta$  en cáncer de ovario epitelial (14-17, 26, 27, 57); pero a diferencia de este estudio, ellos lo han realizado por análisis de expresión génica (Ej: RT-PCR), los que utilizan un macerado de tejido ovárico; mientras que la IHQ empleada en este estudio puede diferenciar la localización de los RE. Por esta razón, para comparar los resultados con los descritos por los otros autores, es que se analizó la expresión de RE $\beta$  en tejido total.

Estos efectos antagónicos de las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de RE en COE puede deberse principalmente a sus estructuras (ver fig. 1). Tanto RE $\alpha$  como RE $\beta$  contienen una

estructura con dominios funcionales propios de la familia de receptores nucleares. El dominio de unión al DNA (DBD) es altamente conservada entre ambas isoformas (95%); en cambio la región A/B en el extremo amino terminal es la menos conservada entre ambas isoformas (20%). Esta región posee una función de activación independiente de ligando (AF-1) que puede reclutar coactivadores y ser fosforilado; AF-1 es muy activo en RE $\alpha$ , no así en RE $\beta$ . Las diferencias en el extremo amino terminal tanto en secuencia aminoacídica como en el largo de ambas isoformas de RE, han sido sugeridas como una posible explicación a la respuesta diferencial a antiestrógenos (58).

El dominio de unión al ligando (LBD) se une principalmente a 17- $\beta$ -Estradiol y tiene una homología de un 60% entre las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de RE. Esta región posee la función de activación dependiente de ligando (AF-2) en el extremo carboxilo terminal que permite la dimerización del receptor, interacción con co-reguladores, localización nuclear y fosforilación de RE (20).

A pesar de que RE  $\alpha$  y  $\beta$  poseen similares mecanismos de acción, tanto clásico como no clásico; en muchas instancias ambas isoformas exhiben acciones opuestas en la regulación de ciertos promotores de EREs. La activación de RE $\alpha$  por estrógeno depende de la unión al factor de transcripción AP-1, mientras que RE $\beta$  no se activa. Además, los antiestrógenos sintéticos, tales como Tamoxifeno y Raloxifeno, poseen acciones diferenciales dependiendo de la isoforma que predomina en un tejido. Es así como en líneas de cáncer de mama ha sido ampliamente estudiado el efecto de hidroxitamoxifeno, el cual posee un efecto mezclado de agonista/antagonista a través de RE $\alpha$ , mientras que es un antagonista puro a través de RE $\beta$ , efecto que es explicado a las diferencias de activación de AF-1. (21)

Debido a esta diferencia de activación de ambas isoformas es que controlan en forma opuesta a diversos genes regulados por estrógenos en líneas celulares de cáncer de ovario, tales como receptor de progesterona y Ciclina D1, entre otros genes relacionados con la carcinogénesis ovárica; donde RE $\alpha$  aumenta la expresión de estos genes, mientras que RE $\beta$  la reprime (14, 19).

Esto puede ser explicado en parte a través de diversos estudios basados en ensayos que estudian la regulación temporal de los templados de cromatina (ChIP assays) dirigidos al análisis del reclutamiento de cofactores ligando dependiente de RE sobre promotores que responden a estrógeno. Estos han demostrado que tanto las isoformas  $\alpha$  y  $\beta$  de RE poseen una actividad similar sobre DNA desnudo, mientras que difieren sobre templados de cromatina (59). RE $\alpha$  activa fuertemente la transcripción sobre templados de cromatina, no

así RE $\beta$ . Estas diferencias pueden deberse a la inhabilidad de RE $\beta$  para reclutar un complejo de preiniciación estable sobre los templados de cromatina atribuido a la diferencia de la función AF-1 amino terminal de ambas isoformas. (59)

Sin embargo, a pesar que las isoformas de RE poseen una acción diferencial, la actividad de cada una puede estar regulada mediante diversos mecanismos que han sido estudiados en modelos de cáncer de mama (60). Uno de estos mecanismos es la hipermetilación en islas CpG del promotor de RE, lo que conlleva a una disminución significativa de la expresión de mRNA de RE. Este mecanismo de regulación ha sido estudiado en los promotores del RE $\beta$  en tejidos de cáncer de ovario, donde existe una hipermetilación del promotor en cáncer de ovario al compararlo con una línea celular de OSE lo que disminuye la expresión de mRNA de las variantes 1, 2 y 3 de RE $\beta$  en estas muestras (60).

Los antecedentes de regulación de RE por hipermetilación explicarían en parte los resultados expuestos en este estudio, donde RE $\beta$  disminuye en la progresión neoplásica de COE mientras que RE $\alpha$  mantiene su expresión, y los de acción diferencial explican las consecuencias de esta expresión de ambas isoformas sobre genes que se relacionan con la carcinogenesis de COE; lo que se podría corroborar con experimentos que detectan a RE $\beta$  metilado a través de la progresión de COE.

Ahora, el predominio de RE $\alpha$  sobre RE $\beta$  en COE permite el desarrollo de la acción de esta isoforma sobre los genes antes mencionados, sin la acción opuesta de RE $\beta$ . Sin embargo, cabe discutir cual es el mecanismo de acción de RE $\alpha$  involucrado, considerando que en estas mujeres de edad postmenopáusicas no existe producción de estrógenos por parte de las células de la granulosa; principalmente 17- $\beta$  Estradiol (E<sub>2</sub>) que activa a RE $\alpha$ . La deficiencia de E<sub>2</sub> hace que se utilice terapia de reemplazo hormonal basada solo en estrógenos en mujeres postmenopáusicas, la que aumenta la incidencia y mortalidad por cáncer de ovario (15).

Existen evidencias que comprueban que las mujeres con cáncer de ovario poseen niveles elevados de esteroides sexuales en la periferia y venas ováricas, incluyendo E<sub>2</sub> y Estrona (61), y que E<sub>2</sub> es producido por las células de COE humano (62). Además, existe actividad Aromatasa en OSE, tumores ováricos epiteliales y algunas líneas celulares de COE (63); y que existe un aumento de la actividad Estrona Sulfato en COE avanzado, lo que aumenta la disponibilidad de síntesis de E<sub>2</sub> (64). Estos hallazgos sugieren que los estrógenos proveen

un ambiente hormonal que promueve la progresión tumoral y/o juega un rol importante en la regulación de la proliferación y supervivencia de estas células.

Estos niveles de estrógenos intratisular en COE participarían en el mecanismo de acción clásico o ligando dependiente de unión directa o indirecta al DNA. Sin embargo, en líneas celulares de cáncer de ovario se ha demostrado la vía no genómica, que depende de E<sub>2</sub> y que activa múltiples señales de transducción mediando un efecto muy rápido en la célula. El tratamiento con E<sub>2</sub> rápidamente activa la vía PI3K/AKT/NFκβ que fosforila a la subunidad catalítica de telomerasa (hTERT) (65) y estimula a HIF-1α y VEGF-A vía PI3K/AKT/FRAP (66).

La activación ligando independiente o no clásica de REα también ha sido estudiada en cáncer de ovario, la que involucra fosforilaciones de RE para su activación. Estos estudios no han caracterizado que residuos son fosforilados, otros sugieren que la fosforilación en residuos tirosina de AF-1 no depende del ligando (23), pero parece ser importante la vía de transducción de ERK desencadenada por CD44 o EGF (67).

Este mecanismo de acción no clásico ha sido estudiado principalmente en cáncer de mama, donde describen que la fosforilación de REα mediada por segundos mensajeros es aumentada en presencia de E<sub>2</sub>, sobre todo en residuos serina 104, 106 y 118 del extremo AF-1 amino terminal, siendo ser118 el sitio de mayor fosforilación en respuesta a E<sub>2</sub> o activación de la vía MAPK por unión de factores de crecimiento a sus receptores (23). La fosforilación en ser 118 del dominio AF-1 de REα influye en el reclutamiento de coactivadores, aumentando así la transcripción mediada por RE.

El presente estudio demuestra que, además de que la Inmunodetección de REα no varía en contraste a la disminución de REβ durante la progresión neoplásica de COE; existe un aumento de la detección de REα fosforilado en ser118 en el epitelio ovárico, desde OVF hasta Borderline y desde COE I hasta COE III. Lo que llama la atención es la expresión similar de pREα ser 118 entre borderline y COE III, ya que lo lógico de pensar es que exista un aumento de pREα desde OVF hasta COE III.

Un estudio demostró que existen algunos tumores Borderline que pueden comportarse como lesión pre-maligna de un COE de alto grado maligno, exhibiendo las mismas mutaciones que presentan los COE de carcinogénesis agresiva tipo 2, tales como mutaciones en KRAS, BRAF y p53. (68). Quizás, los tejidos borderline que se utilizaron en nuestro estudio poseen este comportamiento, información que no tenemos disponible en nuestro laboratorio; lo que explicaría en parte la similar Inmunodetección.

Lo mismo se explica con la detección de RE $\beta$  en COE III, que en vez de disminuir su como una progresión, aumenta con respecto a COE II. Probablemente estas muestras de COE III provienen de una progresión tumoral rápida o agresiva tipo 2, lo que hace comportarse molecularmente diferente. Otro estudio a través de IHQ, demuestra que RE $\alpha$  en Borderline y benigno poseen una Inmunodetección mayor que en COE, sin explicar de que grado de diferenciación son esas muestras. Este estudio no midió la detección de RE $\beta$ , pero sugiere que tanto Borderline como tumor Benigno poseen un comportamiento muy similar entre ellos, y no con COE (69).

Lo otro que llama la atención en los resultados de la expresión de pRE $\alpha$  es su aumento significativo desde OVF y OVI hasta Borderline o de RE $\beta$  total desde OVF hasta tumor benigno. Entonces se debe analizar que sucede desde un ovario normal hasta benigno o borderline. El tumor benigno seroso proviene de la proliferación aumentada de células epiteliales de un quiste de inclusión o directamente de OSE. Un estudio que compara los niveles de estradiol tisulares de estos tumores benignos demuestra que poseen significativamente mayor concentración de estradiol tisular al compararlos con COE (70), lo que puede sugerir que durante la progresión desde OVF, o bien de OVI, hasta tumor benigno aumenta también progresivamente la concentración tisular de estradiol, a pesar que en una mujer postmenopáusica (OVI) los niveles plasmáticos de estradiol están muy disminuidos. Así mismo, se podría deducir que este aumento de estradiol hasta tumor benigno pudiera autorregular su propio receptor. Algunos autores han demostrado que la exposición a estrógenos puede autorregular su propio receptor, tanto a RE $\alpha$  y RE $\beta$ , en uno a más promotores que responden a estrógenos (58).

Uno de los resultados más importantes encontrados en este trabajo, fue el aumento significativo en la Inmunodetección de pRE $\alpha$  ser 118 desde COE diferenciado (COE I) hasta el pobremente diferenciado (COE III). El aumento de la fosforilación de RE $\alpha$  se explica con el mecanismo de acción no clásica de RE o independiente de ligando, donde RE se activa mediante fosforilaciones que permiten un mayor reclutamiento de co-activadores, resultando en la potenciación de la transcripción mediada por dicho receptor. La fosforilación del RE $\alpha$  puede producirse por alguna de las vías de transducción de kinasas; siendo la fosforilación en ser 118 del RE $\alpha$  exclusiva de la vía MAPK/ERK activada por la unión de un factor de crecimiento a su receptor de membrana (23).

El RE, al pertenecer a la familia de receptores nucleares, ejerce su acción a nivel nuclear; pero nuestros resultados demuestran que la isoforma RE $\beta$  se localiza en el citoplasma del epitelio de la superficie ovárica a través de la progresión carcinogénica, y en el núcleo hasta Borderline para luego desaparecer en los tres grados de diferenciación de COE. Si RE tiene su efecto ya sea por diversos mecanismos en el núcleo, la pregunta es, ¿por que desaparece en el núcleo de COE y mantiene su expresión en citoplasma?

La desaparición de RE $\beta$  en el núcleo de COE no se había reportado ya que la mayoría de los estudios están basados en expresión génica, y sería interesante atribuir este cambio a la hipótesis de hipermetilación de RE $\beta$  en COE que disminuye el mRNA de diversas isoformas producidas por splicing alternativo de RE $\beta$  (60), y que disminuiría la expresión proteica de este receptor en el núcleo. La desaparición de RE $\beta$  en el núcleo, permitiría la acción de RE $\alpha$  sin oposición de la acción protectora de RE $\beta$ , quien no cambia su expresión en la progresión carcinogénica y que además aumenta su activación por fosforilación en ser 118; resultando en un aumento de la transcripción de genes controlados por RE $\alpha$  y que se relacionan con la carcinogénesis.

La presencia de RE $\beta$  en el citoplasma puede deberse a que existe un pool de RE en la mitocondria. Estas evidencias han sido reportadas en células uterinas y ováricas de conejo, donde ambas isoformas de RE se localizan en la matriz mitocondrial; mientras que otros estudios sugieren que RE $\beta$  predomina en este organelo, tanto en una línea celular de cristalino humana como en células cardíacas y neuronales de rata (71), y en células de osteosarcoma y hepatosarcoma (72). Otro estudio en tejido neuronal demuestra la función mitocondrial de RE $\beta$  se relaciona con la regulación transcripcional de genes mitocondriales a través de diversos mecanismos; genes importantes para el tratamiento con estrógenos en la enfermedad de Alzheimer y Parkinson (73), pero no se reporta la regulación de genes relacionados con carcinogénesis.

Por otra parte, se ha experimentado la introducción de RE $\beta$  en líneas celulares de cáncer de ovario, donde se observó que RE $\beta$  inhibía la proliferación y movilidad celular a través de un mecanismo no clásico o ligando independiente, además de aumentar la apoptosis de estas células (14). Otro grupo de investigadores, transfectaron la línea celular de cáncer de ovario SK-OV-3 con vectores que codificaban para RE $\beta$ 1 o sus variantes por splicing RE $\beta$ - $\delta$ 125 y RE $\beta$ - $\delta$ 1256, y probaron su respuesta a estrógenos y tamoxifeno en comparación a las células no transfectadas. Solo RE $\beta$ 1 y no sus variantes produjeron una disminución en el crecimiento celular de SK-OV-3, aumentando la expresión de p21 y apoptosis y

reduciendo ciclina A2 y la movilidad; efectos que no son modificados por la incorporación de estradiol o tamoxifeno, lo que sugiere que los efectos antitumorales de RE $\beta$  son ligando independiente (74).

La incidencia de COE es mayor en mujeres postmenopáusicas, en las cuales los niveles de gonadotrofinas circulantes son hasta tres veces mayores que en una mujer de edad fértil, lo que permite asociar estas evidencias a una hipótesis de mecanismo carcinogénico de COE. Esta hipótesis ha sido apoyada por diversos estudios que demuestran *in-vitro* que las gonadotrofinas estimulan la proliferación celular, invasión y angiogénesis de COE mediante diversos mecanismos de transducción de señales, tales como PI3K/AKT y MAPK/ERK (9, 11, 49-52). La regulación de estos mecanismos aun no están totalmente estudiados, pero existen algunos estudios que han demostrado que células de carcinoma ovárico OVCAR3 estimuladas con FSH sintetizan Estradiol, el cual aumenta la proliferación de estas células (53); y que FSH tiene una acción estrogénica en ovario sobre genes que poseen ERE, con lo cual modula el crecimiento, proliferación y diferenciación celular del ovario (54).

Los antecedentes demuestran que LH-R y FSH-R aumentan su expresión desde ovario normal hasta COE I (11), y nuestro laboratorio demostró que estos dos receptores disminuyen su expresión desde COE I hasta COE III (48), por lo tanto se puede deducir que la acción de gonadotrofinas sobre su receptor tienen mayor importancia durante la primera etapa de la formación del tumor; es decir, durante la carcinogénesis y no tanto en la progresión de COE.

Por lo tanto, asociando estos antecedentes con los resultados descritos en este estudio, se podría deducir que; si en estas pacientes postmenopáusicas con los tres grados de COE las gonadotrofinas están en niveles séricos muy elevados, pero sus receptores disminuyen significativamente a medida que COE pierde su diferenciación, pareciera ser que la pérdida de la diferenciación histológica de COE asociada a su mayor proliferación e invasión celular no está mediada por gonadotrofinas, sino que a otras moléculas que aumentan en esta progresión, tales como pRE $\alpha$  y TrkA. Buscando el posible mecanismo de activación de RE $\alpha$  por fosforilación a través de vía no clásica, las gonadotrofinas y su acción sobre su receptor no serían la causa de esta fosforilación. Para comprobar esta hipótesis, se hicieron estudios *in-vitro*, donde explantes de COE se trataron con LH, FSH y la mezcla de ambas gonadotrofinas en concentraciones ascendentes, y se determinó la Inmunodetección de las isoformas de RE. Los resultados demuestran que no hay cambios significativos de la

detección de RE $\alpha$ , pRE $\alpha$  y RE $\beta$  en presencia de gonadotrofinas; por lo tanto se sugiere que en COE pobremente diferenciado, las gonadotrofinas no influyen en la activación de RE $\alpha$  por fosforilación.

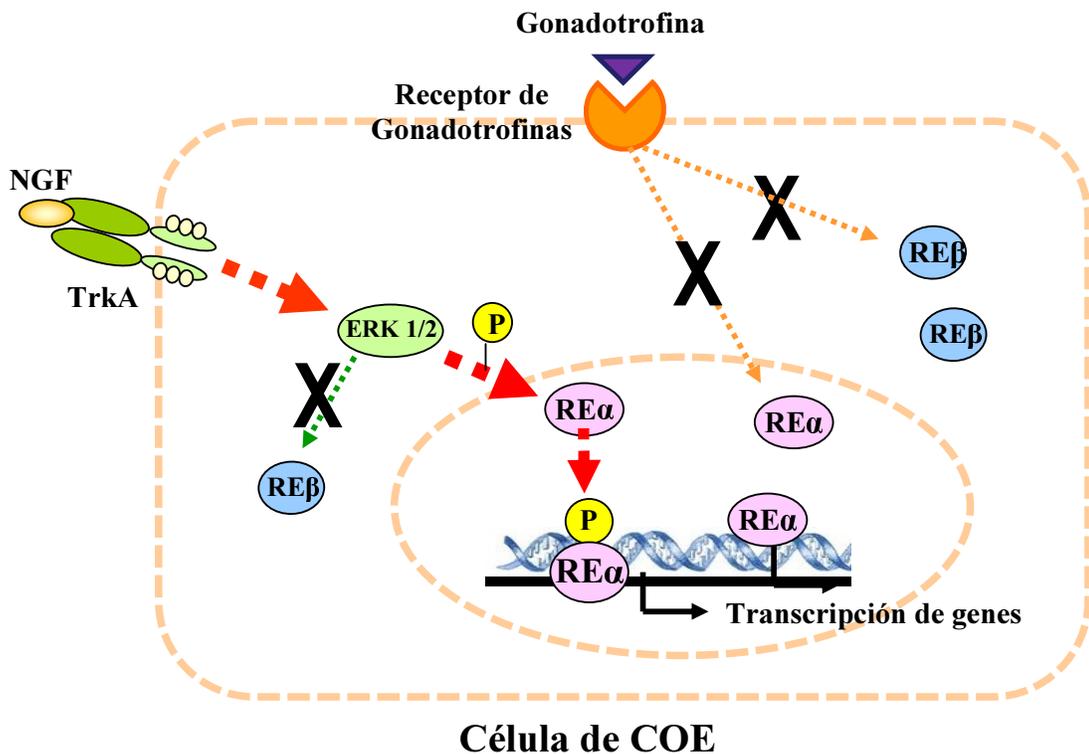
Nuestro laboratorio ha demostrado que TrkA aumenta significativamente su expresión génica y proteica desde COE I hasta COE III (39). Estos datos, junto al aumento de la Inmunodetección de pRE $\alpha$  en estos mismos grados de diferenciación de COE (*estudio ex vivo*), permitieron analizar que existe una correlación positiva entre TrkA y pRE $\alpha$  a medida que COE pierde su diferenciación celular; lo que sugiere que TrkA al ser activado por NGF pudiera activar su vía de señalización MAPK/ERK fosforilando a RE $\alpha$  en ser118.

Este hallazgo fue corroborado en los estudios *in vitro*, donde se obtuvo un aumento de la Inmunodetección de pRE $\alpha$  en los explantes de COE al estimularlos con diversas concentraciones de NGF. Esta fosforilación activaría a RE $\alpha$ , lo que se traduciría en una mayor expresión de genes regulados por RE y que tiene relación con la proliferación, invasión y angiogénesis de COE, tales como c-myc, Ciclina D1, fibulina-1, VEGF y NGF (15, 18, 19). Interesantemente, en adición a estos resultados, cabe destacar que en los tres grados de diferenciación de COE, se produce una pérdida de la Inmunodetección de RE $\beta$ , lo que sugeriría que el aumento relativo de RE $\alpha$  junto a su mayor activación por fosforilación en ser 118, no estaría inhibido por la acción protectora de RE $\beta$ , existiendo un aumento de la expresión de los genes que se transcriben a través de este mecanismo.

## 6. CONCLUSION

La Inmunodetección de RE $\alpha$  no se modifica durante la progresión neoplásica de COE, mientras que RE $\beta$  disminuye desde tumor ovárico benigno hasta COE II; aumentando así la relación RE $\alpha$ /RE $\beta$ . La Inmunodetección de pRE $\alpha$  aumenta significativamente desde COE I hasta COE III; sugiriendo una activación de RE por vía no clásica ligando independiente a través de la transducción vía MAPK/ERK desencadenada por la unión de NGF a TrkA.

La pérdida de RE $\beta$  en COE permite la transcripción de genes regulados por RE $\alpha$  sin oposición de la acción protectora de RE $\beta$ ; transcripción que es mantenida por la fosforilación de RE $\alpha$  a través de mecanismos no clásicos. Estos eventos sugieren que RE $\alpha$  está involucrado en la proliferación, invasión y angiogénesis de COE, junto a otras moléculas, tales como NGF y TrkA, activando a RE $\alpha$ .



## 7. ESTUDIOS FUTUROS

Para continuar y completar este estudio, se podría estudiar la vía de señalización MAPK/ERK en línea celular o explantes de COE en presencia de  $E_2$  y NGF y medir la expresión de RE $\alpha$  total, RE $\beta$  y pRE $\alpha$  (tanto génica como proteica), con el fin de comprobar que RE es regulado por esta vía en ausencia de  $E_2$ .

También sería interesante comprobar el estudio *ex - vivo* con análisis de expresión proteica, tales como Western Blot. Para esto, la muestra a analizar debería de ser adquirida por microdissección por láser, para evitar la interferencia del estroma ovárico.

Para completar este estudio, se podría estudiar la metilación del gen de RE $\beta$  en COE de distintos grados de diferenciación; y así conocer una posible causa de la pérdida de esta isoforma de RE en COE.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- 1) Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Mol Cell Endocrinol.* 2006, 247(1-2):4-21.
- 2) Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol.* 2004, 164(5):1511-8.
- 3) Murdoch WJ, McDonnell AC. Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. *Reproduction.* 2002, 123(6):743-50.
- 4) Jordan S, Green A, Webb P. Benign epithelial ovarian tumours-cancer precursors or markers for ovarian cancer risk? *Cancer Causes Control.* 2006, 17(5):623-32.
- 5) Auersperg N, Woo M: Development and Differentiation of Ovarian Surface Epithelium; Cues for the basis of its malignant potential. En Leung P and Adashi E: "The Ovary"; 2<sup>da</sup> Edición. Pag. 579-602. Elsevier. 2004.
- 6) Scully RE. Classification of human ovarian tumors. *Environ Health Perspect.* 1987, 73:15-24.
- 7) Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev.* 2001, 22(2):255-88.
- 8) Ozols R, Schwartz P, Eifel P: Cáncer de Ovario, carcinoma de trompa de falopio y carcinoma de peritoneo. En DeVita V, Hellman S, Rosenberg S: "Cáncer: Principios y práctica de Oncología"; 5<sup>a</sup> Edición. Pag. 1502-1505. Editorial médica Panamericana SA y ARAN ediciones SA. 1997.
- 9) Choi JH, Wong AS, Huang HF, Leung PC. Gonadotropins and ovarian cancer. *Endocr Rev.* 2007, 28(4):440-61.
- 10) Zheng W, Lu JJ, Luo F, Zheng Y, Feng Y, Felix JC, Lauchlan SC, Pike MC. Ovarian epithelial tumor growth promotion by follicle-stimulating hormone and inhibition of the effect by luteinizing hormone. *Gynecol Oncol.* 2000, 76(1):80-8.
- 11) Parrott JA, Doraiswamy V, Kim G, Mosher R, Skinner MK. Expression and actions of both the follicle stimulating hormone receptor and the luteinizing hormone receptor in normal ovarian surface epithelium and ovarian cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2001, 172(1-2):213-22.
- 12) Hsueh AJ, Adashi EY, Jones PB, Welsh TH Jr. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev.* 1984, 5(1):76-127.

- 13) Wright JW, Stouffer RL, Rodland KD. High-dose estrogen and clinical selective estrogen receptor modulators induce growth arrest, p21, and p53 in primate ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005, 90(6):3688-95.
- 14) Bardin A, Hoffmann P, Boulle N, Katsaros D, Vignon F, Pujol P, Lazennec G. Involvement of estrogen receptor beta in ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.* 2004, 64(16):5861-9.
- 15) Cunat S, Hoffmann P, Pujol P. Estrogens and epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2004, 94(1):25-32.
- 16) Lazennec G. Estrogen receptor beta, a possible tumor suppressor involved in ovarian carcinogenesis. *Cancer Lett.* 2006, 231(2):151-7
- 17) Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson J.A. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiol. Rev.* 2001, 81(4):1535-1565.
- 18) Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel GM. Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* 2000, 60(12):3183-90.
- 19) O'Donnell AJ, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP. Estrogen receptor-alpha mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocr Relat Cancer.* 2005, 12(4):851-66.
- 20) Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Ström A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA., Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 2007, 87(3): 905-31.
- 21) Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA., Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2000, 74(5): 279-85.
- 22) Gao X, Loggie B, Nawaz Z. The roles of sex steroid receptor coregulators in cancer. *Mol Cancer.* 2002, 1:1-7.
- 23) Lannigan DA. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids.* 2003, 68(1):1-9.
- 24) Murphy L, Cherlet T, Adeyinka A, Niu Y, Snell L, Watson P. Phospho-serine-118 estrogen receptor-alpha detection in human breast tumors in vivo. *Clin Cancer Res.* 2004, 10(4):1354-9.

- 25) Pelletier G, El-Alfy M. Immunocytochemical localization of estrogen receptors alpha and beta in the human reproductive organs. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000, 85(12): 4835-40.
- 26) Brandenberger AW, Tee MK, Jaffe RB. Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998, 83(3):1025-8.
- 27) Pujol P, Rey JM, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, Rochefort H, Maudelonde T. Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Res.* 1998, 58(23):5367-73.
- 28) Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol.* 1996, 148(6):1807-18.
- 29) Davidson B, Lazarovici P, Ezersky A, Nesland JM, Berner A, Risberg B, Tropé CG, Kristensen GB, Goscinski M, Van de Putte G, Reich R. Expression levels of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 in effusions and solid tumors of serous ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2001, 7(11): 3457-3464.
- 30) Koizumi H, Morita M, Mikami S, Shibayama E, Uchikoshi T. Immunohistochemical analysis of TrkA neurotrophin receptor expression in human non-neuronal carcinomas. *Pathol. Int.* 1998, 48(2):93-101.
- 31) Campos X, Muñoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheimer C, Lara HE, Romero C. Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 2007, 104(1):168-75.
- 32) Blum R, Konnerth A. Neurotrophin-mediated rapid signaling in the central nervous system: mechanisms and functions. *Physiology (Bethesda).* 2005, 20:70-8.
- 33) Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC., Anatomy of the estrogen response element, *Trends Endocrinol Metab.* 2004, 15(2): 73-78.
- 34) Singh M, Sétáló G Jr, Guan X, Warren M, Toran-Allerand CD. Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase in cerebral cortical explants: convergence of estrogen and neurotrophin signaling pathways. *J Neurosci.* 1999, 19(4):1179-88.
- 35) Shi Z, Arai KY, Jin W, Weng Q, Watanabe G, Suzuki AK, Taya K. Expression of nerve growth factor and its receptors NTRK1 and TNFRSF1B is regulated by

- estrogen and progesterone in the uteri of golden hamsters. *Biol Reprod.* 2006, 74(5):850-6.
- 36) Teng J, Wang ZY, Bjorling DE. Estrogen-induced proliferation of urothelial cells is modulated by nerve growth factor. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2002, 282(6):1075-83.
- 37) Hazelton DA, Hamilton TC. Vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Curr Oncol Rep.* 1999, 1(1):59-63.
- 38) Davidson B, Lazarovici P, Ezersky A, Nesland JM, Berner A, Risberg B, Tropé CG, Kristensen GB, Goscinski M, Van de Putte G, Reich R. Expression levels of the nerve growth factor receptors TrkA and p75 in effusions and solid tumors of serous ovarian carcinoma patients. *Clin Cancer Res.* 2001, 7(11): 3457-3464.
- 39) Muñoz Marcela, Tesis de Magíster, Detección del receptor trkA como un posible marcador pronóstico y de progresión en Cáncer de Ovario Epitelial, 2008, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- 40) Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappala G, Pafumi C, Bernardini R. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB J.* 2002, 16(10):1307-9.
- 41) Calza L, Giardino L, Giuliani A, Aloe L, and Levi-Montalcini R; Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenic and vasoactive factors, *PNAS.* 2001, 98: 4160-4165.
- 42) Park M., Kwak H, Lee H., Yoo D., Park I., Kim M., Lee S., Rhee C. and Hong S., Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol-3 kinase/akt signaling pathway and ap-2 transcription factor, *The journal of biological chemistry,* 2007, 282:30485-30496.
- 43) Dollé JP, Rezvan A, Allen FD, Lazarovici P, Lelkes PI. Nerve growth factor-induced migration of endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005, 315(3):1220-7.
- 44) Higgins KJ, Liu S, Abdelrahim M, Yoon K, Vanderlaag K, Porter W, Metz RP, Safe S. Vascular endothelial growth factor receptor-2 expression is induced by 17beta-estradiol in ZR-75 breast cancer cells by estrogen receptor alpha/Sp proteins. *Endocrinology.* 2006, 147(7):3285-95.

- 45) Mohle J, Whittemore A, Pike M, Darby S. Gonadotrophins and ovarian cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* 1985, 75(1):178-80.
- 46) Ozols RF, Rubin SC, Thomas G, Robby S: Epithelial Ovarian Cancer. En Hoskins WJ, Perez CA, Young RC: "Principles and Practice of Gynecologic Oncology"; 2<sup>da</sup> Edición. Pag. 919-986. Lippincott-Raven. Philadelphia. 1997.
- 47) Konishi I. Gonadotropins and ovarian carcinogenesis: a new era of basic research and its clinical implications. *Int J Gynecol Cancer.* 2006, 16(1):16-22.
- 48) Ximena Campos F, Tesis Doctoral, Participación de trkA y gonadotrofinas en la expresión de VEGF en Cáncer de Ovario Epitelial, 2007, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.
- 49) Choi KC, Kang SK, Tai CJ, Auersperg N, Leung PC. Follicle-stimulating hormone activates mitogen-activated protein kinase in preneoplastic and neoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002, 87(5):2245-53.
- 50) Ji Q, Liu PI, Chen PK, Aoyama C. Follicle stimulating hormone-induced growth promotion and gene expression profiles on ovarian surface epithelial cells. *Int J Cancer.* 2004, 112(5):803-14.
- 51) Choi JH, Choi KC, Auersperg N, Leung PC. Overexpression of follicle-stimulating hormone receptor activates oncogenic pathways in preneoplastic ovarian surface epithelial cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004, 89(11):5508-16.
- 52) Choi JH, Choi KC, Auersperg N, Leung PC. Gonadotropins upregulate the epidermal growth factor receptor through activation of mitogen-activated protein kinases and phosphatidylinositol-3-kinase in human ovarian surface epithelial cells. *Endocr Relat Cancer.* 2005, 12(2):407-21.
- 53) Kraemer S, Jaeger WH, Lang N. Growth regulation effects of gonadotropin induced steroidogenic response in human ovarian cancer. *Anticancer Res.* 2001, 21(3B):2005-10.
- 54) Richards JS, Russell DL, Ochsner S, Hsieh M, Doyle KH, Falender AE, Lo YK, Sharma SC. Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res.* 2002, 57:195-220.
- 55) Schiffenbauer YS, Abramovitch R, Meir G, Nevo N, Holzinger M, Itin A, Keshet E, Neeman M. Loss of ovarian function promotes angiogenesis in human ovarian carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997, 94(24):13203-8.

- 56) Wang J, Luo F, Lu JJ, Chen PK, Liu P, Zheng W. VEGF expression and enhanced production by gonadotropins in ovarian epithelial tumors. *Int J Cancer*. 2002, 97(2):163-7.
- 57) Lindgren P, Cajander S, Bäckström T, Gustafsson JA, Mäkelä S and Olofsson J., Estrogen and progesterone receptors in ovarian epithelial tumors, *Mol Cell Endocrinol*. 2004, 221: 97-104.
- 58) Matthews J, Gustafsson JA., Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta, *Mol Interv*. 2003, 3(5): 281-92.
- 59) Cheung E, Schwabish MA, Kraus WL., Chromatin exposes intrinsic differences in the transcriptional activities of estrogen receptors alpha and beta. *EMBO J*. 2003, 22(3): 600-11.
- 60) Suzuki F, Akahira J, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi S, Sasano H, Yaegashi N., Loss of estrogen receptor beta isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Sci*. 2008, 99(12): 2365-72.
- 61) Heinonen PK, Koivula T, Rajaniemi H, Pystynen P., Peripheral and ovarian venous concentrations of steroid and gonadotropin hormones in postmenopausal women with epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol*. 1986, 25(1): 1-10.
- 62) Taube M, Höckenström T, Isaksson M, Lindgren PR, Bäckström T., Low sex steroid environment affects survival and steroid secretion of ovarian tumour cells in primary cultures. *Int J Oncol*. 2002 20(3): 589-94.
- 63) Cunat S, Rabenoelina F, Daurès JP, Katsaros D, Sasano H, Miller WR, Maudelonde T, Pujol P., Aromatase expression in ovarian epithelial cancers. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2005, 93(1): 15-24.
- 64) Chura JC, Blomquist CH, Ryu HS, Argenta PA. Estrone sulfatase activity in patients with advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2009, 112(1): 205-9.
- 65) Kimura A, Ohmichi M, Kawagoe J, Kyo S, Mabuchi S, Takahashi T, Ohshima C, Arimoto-Ishida E, Nishio Y, Inoue M, Kurachi H, Tasaka K, Murata Y., Induction of hTERT expression and phosphorylation by estrogen via Akt cascade in human ovarian cancer cell lines. *Oncogene*. 2004, 23(26): 4505-15.
- 66) Gao N, Nester RA, Sarkar MA., 4-Hydroxy estradiol but not 2-hydroxy estradiol induces expression of hypoxia-inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor A through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/FRAP pathway in

- OVCAR-3 and A2780-CP70 human ovarian carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2004, 196(1): 124-35.
- 67) Bourguignon LY, Gilad E, Rothman K, Peyrolier K., Hyaluronan-CD44 interaction with IQGAP1 promotes Cdc42 and ERK signaling, leading to actin binding, Elk-1/estrogen receptor transcriptional activation, and ovarian cancer progression. *J Biol Chem.* 2005, 280(12):11961-72.
- 68) Dehari R, Kurman RJ, Logani S, Shih IeM., The development of high-grade serous carcinoma from atypical proliferative (borderline) serous tumors and low-grade micropapillary serous carcinoma: a morphologic and molecular genetic analysis. *Am J Surg Pathol.* 2007, 31(7):1007-12.
- 69) Halperin R, Zehavi S, Dar P, Habler L, Hadas E, Bukovsky I, Schneider D., Clinical and molecular comparison between borderline serous ovarian tumors and advanced serous papillary ovarian carcinomas. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2001, 22(4): 292-6.
- 70) Lindgren PR, Bäckström T, Cajander S, Damber MG, Mählele CG, Zhu D, Olofsson JI., The pattern of estradiol and progesterone differs in serum and tissue of benign and malignant ovarian tumors. *Int J Oncol.* 2002, 21(3): 583-9.
- 71) Gavrilova-Jordan LP, Price TM., Actions of steroids in mitochondria. *Semin Reprod Med.* 2007, 25(3): 154-64.
- 72) Solakidi S, Psarra AM, Sekeris CE., Differential subcellular distribution of estrogen receptor isoforms: localization of ERalpha in the nucleoli and ERbeta in the mitochondria of human osteosarcoma SaOS-2 and hepatocarcinoma HepG2 cell lines. *Biochim Biophys Acta.* 2005, 1745(3): 382-92.
- 73) Simpkins JW, Yang SH, Sarkar SN, Pearce V., Estrogen actions on mitochondria--physiological and pathological implications. *Mol Cell Endocrinol.* 2008, 290(1-2): 51-9.
- 74) Treeck O, Pfeiler G, Mitter D, Lattrich C, Piendl G, Ortmann O. Estrogen receptor {beta}1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *J Endocrinol.* 2007, 193(3): 421-33.