



**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

# **EXPRESIÓN DEL FACTOR NEUROTROFICO DERIVADO DE CEREBRO (BDNF) Y SU RECEPTOR TRKB EN CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL Y SU RELACIÓN CON EL FACTOR DE CRECIMIENTO DE ENDOTELIO VASCULAR (VEGF)**

**TESIS PROFESIONAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE TECNÓLOGO MÉDICO CON  
MENCION EN BIOANÁLISIS CLÍNICO, HEMATOLOGÍA Y BANCO DE SANGRE**

**AUTOR: Sylvana Ortega Thomas**

**TUTOR: Dra. Carmen Romero Osses**

**AÑO 2010**

## INDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>3</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>4</b>
<b>Marco teórico</b>	<b>4</b>
-El ovario	4
-Cáncer de ovario	5
-Angiogénesis y Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular	9
-Las Neurotrofinas y sus receptores	12
-BDNF en la fisiología ovárica y COE	14
-Relación entre VEGF y BDNF en COE	16
<b>Importancia del estudio</b>	<b>19</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS</b>	<b>20</b>
<b>METODOLOGÍA</b>	<b>21</b>
-Diseño Experimental	21
-Muestras	23
-Procedimientos para el análisis de muestras	24
-Análisis estadístico	30

<b>RESULTADOS</b>	<b>32</b>
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>40</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>45</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>46</b>
<b>ANEXO I</b>	<b>50</b>

## **RESUMEN**

El cáncer de ovario representa una importante causa de muerte por cáncer de origen ginecológico, y de todas las neoplasias ováricas malignas, la mayoría corresponde a carcinoma ovárico epitelial (COE). Es una patología silente que generalmente es detectada en etapas avanzadas, por lo que es considerado un cáncer de mal pronóstico por su diagnóstico tardío y mala respuesta a las terapias.

Los cánceres ováricos presentan elevada angiogénesis y el componente crítico de ésta es la producción autocrina y paracrina del factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), llegando a ser un regulador autocrino positivo del crecimiento tumoral. En la mayoría de los tejidos, la hipoxia es el gatillador de la síntesis de factores angiogénicos; sin embargo, el proceso en el ovario podría ser distinto, ya que la expresión de estos factores estaría regulada hormonalmente. Por otra parte, se ha descrito la participación de las neurotrofinas y sus receptores en importantes funciones del ovario y éstas además, no serían ajenas al proceso de angiogénesis y podrían tener acción sobre VEGF, fundamentalmente en COE.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la expresión de BDNF, integrante de la familia de las neurotrofinas, y su receptor trkB en las distintas etapas del COE y a la vez establecer una posible relación de estas moléculas con la expresión de VEGF.

Los resultados obtenidos revelaron la expresión de BDNF y trkB en el epitelio ovárico y no se presentaron variaciones significativas de ambas moléculas en su expresión génica y proteica entre los distintos grupos de estudio, además se observó una correlación negativa entre trkB/VEGF.

# **INTRODUCCIÓN**

## **Marco teórico**

### **El ovario**

El ovario es un órgano reproductor femenino, que en su estructura presenta múltiples compartimientos con diferentes propiedades biológicas. Las funciones del ovario se describen como gametogénica, que consta de la formación del oocito, y endocrina, por secreción de hormonas esteroidales, peptídicas y factores de crecimiento. Morfológicamente, el ovario está organizado en una zona central, la médula, que está compuesta por tejido conectivo que contiene vasos sanguíneos, vías linfáticas y fibras nerviosas. A su vez, ésta se encuentra rodeada por una gruesa corteza externa, que consta de estroma de tejido conectivo, cuyas células se encuentran densamente agrupadas en un reticulado de delgadas fibras de colágeno, y más hacia la superficie, el tejido conectivo se torna más fibroso, formando una cápsula muy delgada conocida como túnica albugínea. La cantidad de tejido conectivo de la corteza es variable, mostrando un aumento paulatino durante la edad fértil y dominando completamente el ovario después de la menopausia (Geneser, 2000).

Todas estas estructuras que forman parte del ovario se encuentran recubiertas en su totalidad por una monocapa de células epiteliales, llamada epitelio de superficie ovárica (ESO). Esta monocapa está constituida por células mesoteliales escamosas a cuboidales, que secretan hormonas, factores de crecimiento y citoquinas, y que presentan receptores para las hormonas reproductivas hipotalámicas e hipofisiarias. Su función es el transporte de materiales hacia y desde la cavidad peritoneal, y participan en el ciclo ovulatorio, por su

capacidad proteolítica y de remodelamiento, y en su auto-reparación. Esto depende de hormonas y factores de crecimiento (Auersperg et al, 2001).

### **Cáncer Ovárico Epitelial (COE)**

El cáncer constituye la segunda causa de muerte en Chile, después de las enfermedades cardiovasculares. El cáncer de ovario representa la tercera causa de muerte por cáncer de origen ginecológico, después del cáncer de mama y cervicouterino (Medina et al, 2001). De todas las neoplasias ováricas malignas humanas, aproximadamente entre el 80-90% corresponden a carcinoma ovárico epitelial (COE), el cual se presenta como un grupo heterogéneo que puede ser clasificado en 4 subgrupos: seroso, mucinoso, endometriode y de células claras. Estos tumores presentan propiedades histológicas y secretoras de tejidos epiteliales y estromales de oviductos, cérvix, endometrio y tracto ginecourinario respectivamente (Jordan et al, 2006), siendo el COE seroso el más frecuente, constituyendo el 80% de los casos.

Existen factores que predisponen a desarrollar más tempranamente COE y otros que lo previenen, hablamos entonces de factores de riesgo y factores protectores (Murdoch and McDonel, 2002). Sin embargo, la patogénesis del carcinoma ovárico aún no está totalmente comprendida y han sido propuestos numerosos mecanismos para explicar su etiología. En este contexto se mencionan las hipótesis que se postulan para la etiología del COE:

#### -Hipótesis de la ovulación incesante:

La continua ruptura y reparación del ESO por la ovulación provoca un aumento en la probabilidad de los errores durante la replicación, con un consecuente daño al DNA originando mutaciones en los genes supresores de tumores, lo que llevaría a la transformación

maligna de las células, provocando expansión clonal, proteólisis y angiogénesis, para finalmente llevar a metástasis (Murdoch and McDonel, 2002).

Es por esto que el embarazo, un periodo prolongado de lactancia o el uso de píldoras anticonceptivas disminuirían el riesgo de desarrollar COE, al reducir el número de ovulaciones durante la vida de la mujer (Fleming et al, 2006).

-Hipótesis de las gonadotrofinas:

La excesiva exposición a gonadotrofinas incrementa la estimulación estrogénica del ESO, conduciendo posiblemente a la transformación maligna. Las gonadotrofinas podrían actuar directamente sobre el ESO aumentando la proliferación, promoviendo crecimiento y la transformación de las células del ESO, o indirectamente mediante la estimulación de estrógenos locales. Los niveles de gonadotrofinas aumentan con la edad y son particularmente altos durante la menopausia, período en que se registran las mayores tasas de COE (Fleming et al, 2006; Choi et al 2006).

-Hipótesis hormonal:

Las hormonas tendrían una participación importante en la aparición del COE, ya que la estimulación excesiva de andrógenos sobre el ESO conduce a un riesgo aumentado de cáncer. Los andrógenos estimulan la proliferación celular en quistes de inclusión y ESO. Una de las características claves del síndrome de ovario poliquístico son los niveles elevados de

andrógenos y estos pueden contribuir a un alto riesgo de presentar COE después de la menopausia (Fleming et al, 2006).

- Hipótesis de la Inflamación:

El proceso ovulatorio consta de una reacción inflamatoria e involucra la liberación de colagenasas y proteasas características de reacciones inflamatorias en respuesta al tejido. La persistencia del daño genético causado por factores inflamatorios puede ser un factor importante en la transformación de células del ESO (Fleming et al, 2006).

- Hipótesis de conversión epitelio-mesénquima de células del ESO:

La incorporación de células epiteliales de la superficie ovárica hacia la corteza ovárica, en especial al estroma, aumentan las probabilidades de una transformación neoplásica. Esto puede ocurrir por:

- 1) Fragmentos del ESO que debido a la ruptura folicular en la ovulación pasan al estroma.
- 2) Formación de invaginaciones de la superficie ovárica con el transcurso de los años.

Ambas situaciones llevan a la formación de quistes de inclusión, donde ocurren cambios displásicos y metaplásticos, procesos pre-malignos que pueden llevar finalmente a tumorigénesis, posiblemente por la exposición de estas células a un entorno estromal diferente y concentrado (Auersperg et al, 2001).

La carcinogénesis ovárica presenta cambios en la diferenciación histológica que acompañan a la progresión neoplásica. Basándose en esto, el COE se sub-clasifica en tres grados:

- COE grado I o altamente diferenciado: Se observan estructuras papilares irregulares con malignidad celular, epitelio pseudos-estratificado y algunos focos de invasión. Tienen bajo grado de malignidad.
- COE grado II o moderadamente diferenciado: Existe una disminución de las estructuras papilares por presencia de zonas indiferenciadas, con presencia de núcleos atípicos y mayores focos de invasión.
- COE grado III o mínimamente diferenciado: Se presentan mayoritariamente como una masa sólida indiferenciada, con evidente pleomorfismo nuclear, y con muchos focos de invasión. Tienen alto grado de malignidad. (Scully et al, 1987).

La etiología histopatológica del COE se explica por dos vías:

- Tumores de tipo I o de bajo grado: De desarrollo lento, progresando desde un quiste de inclusión de ESO, a un tumor benigno, luego a un tumor borderline, posteriormente a un carcinoma seroso de bajo grado, y finalmente a un carcinoma seroso de alto grado.
- Tumores tipo II o de alto grado: Presentan un desarrollo espontáneo y agresivo, con infiltración directa desde el ESO, sin una lesión precursora, o bien desde quistes de inclusión de ESO para dar origen a un carcinoma seroso de alto grado. (Auersperg et al, 2001; Fleming et al, 2006; Shih and Kurman, 2004)

## **Angiogénesis y Factor de Crecimiento de Endotelio Vascular (VEGF)**

El término angiogénesis se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de los vasos pre-existentes. Este proceso puede ocurrir por estímulos fisiológicos o patológicos. Fisiológicamente ocurre durante el crecimiento y en la reparación de tejidos y cicatrización de heridas. Por otra parte, el ovario presenta un crecimiento y regresión vascular periódico, en la edad adulta durante la menstruación, que ocurre en cortos períodos de tiempo y está cuidadosamente regulado. Es por esto que el ovario es uno de los pocos tejidos adultos en que la angiogénesis ocurre como un proceso normal, cíclico y fundamental para el crecimiento folicular, la ovulación y el desarrollo del cuerpo lúteo (Kaczmarek et al, 2005).

Patológicamente, la angiogénesis aparece cuando se sobrepasa el umbral entre los factores estimuladores e inhibidores angiogénicos, y puede ocurrir en respuesta a enfermedades crónicas, infecciones, reacciones inmunes y neoplasias. La vascularización tumoral es un proceso vital para la progresión de una neoplasia, ya que un tumor pequeño y localizado, crece rápidamente y se transforma en un tumor de gran tamaño y con capacidad de metástasis (McMahon, 2000).

La angiogénesis es un proceso regulado por una serie de interacciones complejas entre factores de crecimiento, incluyendo estimuladores o pro-angiogénicos, moduladores e inhibidores de la angiogénesis. Uno de estos componentes y que es fundamental en la angiogénesis es el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) o factor de permeabilidad vascular (Ferrara, 2001). Este factor tiene tres receptores tirosina kinasa que están localizados en las células endoteliales: Flt-1 (VEGFR-1), KDR/Flk-1 (VEGFR-2) y Flt-4

(VEGFR-3). Además es un potente mitógeno y quimioattractante, que es estimulado por hipoxia, citoquinas y hormonas (Kaczmarek et al, 2005).

El gen de VEGF presenta splicing alternativo y codifica 5 isoformas diferentes de proteínas: VEGF 121, VEGF 145, VEGF 165, VEGF 189 y VEGF 206. El RNA mensajero que da origen a esta proteína comienza a expresarse en las capas tecales y de la granulosa en folículos secundarios tardíos. Luego se observa un aumento en la expresión de este mensajero en las células de la granulosa de folículos atrésicos, la expresión de VEGF disminuye en la granulosa y ya no se puede detectar en la teca. En cambio, los receptores de este factor Flt-1 (VEGFR-1) y KDR/Flk-1 (VEGFR-2) se encuentran en las células endoteliales de la teca de folículos secundarios, aumentando su expresión en la teca de folículos terciarios y disminuyendo en folículos atrésicos. El hecho de que la expresión de VEGF esté elevada en la granulosa y su receptor Flt-1 esté expresado en células endoteliales en la capa tecal de folículos terciarios, sugiere que VEGF actúa principalmente en una forma paracrina, permitiendo la vascularización de la teca. El aumento de VEGF y su receptor en folículos terciarios posiblemente es requerido para el crecimiento rápido que experimenta el folículo a esa altura de su desarrollo y para la formación del antro (Danforth et al, 2003; Mattioli et al, 2001). Después de la ovulación el RNA mensajero para VEGF lo producen las células de la granulosa luteinizadas en el cuerpo lúteo y sus receptores siguen expresándose en las células endoteliales (Fraser and Wuff, 2001; Shibuya, 2001; Barboni et al, 2000).

El proceso angiogénico tiene una importancia teórica en el contexto del cáncer ovárico por dos razones. Primero, este proceso ocurre de manera muy controlada como parte de la función ovárica normal, sugiriendo que al menos, algunas células ováricas están presentes para entregar el estímulo paracrino necesario para el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos y que,

en una transformación de célula normal a célula tumoral, esta capacidad está presente tempranamente en el tumor. Los cánceres ováricos son altamente angiogénicos y el componente crítico de la angiogénesis es la producción autocrina y paracrina del factor de crecimiento vascular endotelial (Brown et al, 2000; Masood et al, 2001), llegando a ser un regulador autocrino positivo del crecimiento tumoral (Masood et al, 2001). Trabajos con líneas celulares de cáncer ovárico indican que la expresión de VEGF ayuda a la invasividad (Price et al, 2001) y migración de estas células por estimulación en la producción y actividad funcional en una metaloproteinasa (MMP-2) (Zhang et al, 2006) con una regulación mediada por la secreción del receptor de VEGF (Wang et al, 2006).

En el año 2008 se realizó un estudio en el laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del Hospital Clínico de la Universidad de Chile Dr. José Joaquín Aguirre (lugar donde también se realizó este estudio) en el cual se determinaron los niveles de mRNA y la expresión proteica de VEGF en ovarios inactivos, tumores benignos, borderline y en los distintos grados de diferenciación de COE, utilizando las técnicas de RT-PCR e Inmunohistoquímica respectivamente. Los resultados de este estudio revelaron altos niveles de mRNA y proteína de VEGF desde COE I en adelante. Los niveles de mRNA de VEGF variaron de acuerdo a las isoformas estudiadas. En cuanto a las isoformas secretadas total y parcialmente, la isoforma 121 aumentó significativamente en COE II y III, y la isoforma 165 desde COE I en adelante, por lo tanto estas dos isoformas actuarían en forma paracrina en las células endoteliales y entregarían la señal de proliferación y migración (Muñoz, 2008). Además esta función se complementaría con la isoforma 189 que experimenta mayores cambios y cuyo aumento ocurre en etapas más temprana, desde tumor borderline en adelante (Muñoz, 2008).

En la mayoría de los tejidos, la hipoxia es el mejor gatillador de la síntesis de factores angiogénicos. Sin embargo, el proceso en el ovario pareciera ser distinto ya que la expresión de estos factores estaría regulada hormonalmente, predominantemente por LH y FSH, durante el período de desarrollo folicular y la formación del cuerpo lúteo (Schiffenbauer et al, 1997).

### **El Factor Neurotrófico derivado de Cerebro y su receptor de alta afinidad trkB**

Las neurotrofinas representan una familia de proteínas homodiméricas estructural y funcionalmente relacionadas que incluye: el factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina 3 (NT-3), neurotrofina 4/5 (NT 4/5) y neurotrofina 6 (NT 6). Las neurotrofinas median su señal a través de la unión a dos clases distintas de receptores de superficie celular: el receptor de alta afinidad trk y el de baja afinidad p75 (Pahlman and Hoehner, 1997; Wiesmann and De Vos, 2001).

Se conocen tres receptores trk diferentes, los cuales presentan una alta afinidad por sus ligandos. Los receptores trkA, de alta afinidad cuyo ligando es NGF, los receptores trkB que unen con alta afinidad a BDNF y NT-4/5 y los receptores trkC que unen con alta afinidad a NT-3 (Wiesmann and De Vos, 2001).

El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), miembro de la familia de las neurotrofinas, es fisiológicamente un importante factor de crecimiento nervioso. Esta proteína es conocida por activar el receptor de alta afinidad trkB y el receptor de baja afinidad, p75 (Au et al, 2009). Su unión y posterior activación del receptor de tropomiosina relacionado a kinasa B (trkB), miembro de la familia de los receptores tirosina kinasa, es importante para el desarrollo del sistema nervioso. El receptor trkB tiene dos variantes selectivas empalmadas:

trkB de cuerpo entero (con dominio extracelular, dominio transmembrana y dominio intracelular) y trkB truncado, que corresponde a un receptor sin el dominio intracelular. La variante de cuerpo entero corresponde a una proteína transmembrana de 145-kDa que es activada por BDNF de preferencia. Tras la unión del ligando, trkB forma homodímeros que resultan en la autofosforilación de los residuos de tirosina, requerida para su función catalizadora y las actividades de señalización y que crea múltiples sitios de unión específicos para proteínas diana intracelulares que se unen al receptor activado a través de dominios SH2. Estos incluyen PLC- $\gamma$ 1 (fosfolipasa C), p85 (la subunidad no catalítica de PI-3 kinasa) y SHC (que contiene la secuencia SH2). La activación de estas proteínas diana puede conducir a una variedad de cascadas de señalización intracelular, como la cascada Ras-MAP kinasa (proteínas activadas por mitógenos) y la fosforilación de AMP cíclico en respuesta a la unión de la proteína (Binder and Scharfman, 2004).

El gen de BDNF está localizado en el brazo largo del cromosoma 11 y tiene cuatro exones 5' (los exones I-IV) que se asocian con promotores distintos, y un exón 3' (exón V) que codifica la proteína madura para BDNF. Esta neurotrofina comparte alrededor del 50% de la identidad aminoacídica con NGF, NT-3 y NT-4/5 (Binder and Scharfman, 2004).

La mayoría de las funciones atribuidas a BDNF son asociadas con el receptor trkB de cuerpo entero, sin embargo existen varios roles relacionados con el receptor trkB truncado, incluyendo crecimiento y desarrollo, además de una modulación negativa de la expresión y función del mismo (Binder and Scharfman, 2004).

La primera indicación de que el complejo BDNF-TrkB podría desempeñar un papel en los tumores humanos proviene de estudios sobre la expresión de los

patrones de trkA y trkB en neuroblastoma, lo que demuestra que trkA se asocia con neuroblastomas de resultado favorable, mientras que trkB se expresa en los neuroblastomas agresivos con resultados desfavorables (Yu et al, 2008).

### **BDNF en la fisiología ovárica y COE**

Se ha visto que el ovario de rata fetal y en etapa neonatal expresa 4 de las 5 neurotrofinas conocidas (NGF, BDNF, NT-3 y NT 4/5), y sus receptores de alta afinidad (trkA, trkB y trkC) que están presentes en células no neuronales de ovario. (Dissen et al, 2002)

Estudios en ovarios de ratas neonatas han descrito la expresión de mRNA que codifica para BDNF y su receptor trkB, lo que ha sugerido la participación de esta neurotrofina y su receptor en la actividad ovárica. Se ha descrito que ambas variantes del receptor, generadas por el pre-mRNA de trkB, participan en la señalización y que las formas truncadas son capaces de iniciar la señalización intracelular, lo que sugiere que están presentes en el ovario en desarrollo, y pueden contribuir a la regulación de las funciones específicas del ovario (Dissen,1995).

Con respecto a BDNF, en el ovario normal, se ha encontrado que es esencial para el desarrollo temprano de los folículos, ya que proporciona señales de proliferación a las células de la granulosa (Paredes et al, 2004). Además podría desempeñar un rol importante en las etapas finales de la maduración del folículo. Por otra parte, en cultivos celulares de oocitos tratados con BDNF se ha demostrado un rol importante de esta neurotrofina en la promoción de la primera exclusión del cuerpo polar y que prepara el desarrollo de los cigotos en los

embriones de preimplantación (Dissen, 1995). BDNF actúa sobre los receptores trkB y aunque estudios revelan que los receptores trkB que contienen el dominio kinasa completo sólo se expresan en niveles bajos, en todas las fases de desarrollo folicular, en los oocitos y células de la granulosa de folículos primordiales (Kawamura et al , 2005). BDNF ejercería parte de sus efectos facilitadores en la proliferación de células de la granulosa a través de funciones paracrina y autocrina que afectan a las células de la granulosa, tanto directamente como a través de mediación de los oocitos (Au et al, 2009). El notable desarrollo de los patrones de expresión celular observado tanto para los receptores trkB y su ligando BDNF sugiere que la señalización trkB dependiente en el ovario requiere de la interacción de las células de la granulosa y de los oocitos (Au et al, 2009)

Otros estudios han demostrado que la expresión del receptor trkB podría ser inducida por la hormona folículo estimulante (FSH) (Kawamura et al , 2005).

En análisis de microarreglos del DNA de los genes ováricos durante el período preovulatorio, se han encontrado importantes aumentos en la expresión de BDNF después de la estimulación con LH y Gonadotropina Coriónica humana (Kawamura et al, 2005).

Se ha postulado que en el ovario, BDNF es secretado constitutivamente por las células normales del ESO y activa al receptor trkB en las células del estroma (células que expresan los receptores trkB). Sin embargo, BDNF generalmente no afecta a las células del ESO debido a la ausencia de receptores trkB en las células del ESO normal. Sin embargo se ha encontrado expresión de BDNF y trkB en las células de COE. Es posible que el BDNF, que es secretado

constitutivamente tanto por células del ESO normal y patológico pueda activar el receptor trkB en el COE y así contribuir a la progresión del cáncer (Seifer et al, 2006).

### **Relación entre el factor de crecimiento de endotelio vascular y BDNF en cáncer de ovario epitelial**

Las células cancerosas se caracterizan por presentar un crecimiento celular alterado, en parte por el uso de señales de crecimiento generadas por una variedad de receptores de factores de crecimiento, tales como los receptores tirosina kinasa. En la mayoría de las células, la sobreexpresión de estos receptores o vías de transducción de señales río abajo, están involucradas en la transformación maligna de la célula.

Con respecto a BDNF, mediante inmunohistoquímica, se ha detectado la expresión de proteínas trkB localizadas en el citoplasma y en la membrana celular de las células epiteliales, sin embargo, en un estudio, entre los diferentes grupos de diagnóstico de COE, todos los tumores benignos de ovario no expresaron trkB, mientras que la mayoría de los tumores borderline, todos los cánceres invasivos y los focos metastásicos fueron positivos en la expresión. El receptor trkB puede desempeñar un papel en la carcinogénesis ovárica temprana. No se ha descrito diferencia significativa en la expresión de trkB entre los diferentes tipos histológicos de cáncer de ovario, incluyendo seroso, mucinoso, endometrial y carcinoma de células claras. En líneas celulares de ESO se muestra una expresión muy baja de trkB, en comparación con las líneas celulares de COE (Au et al, 2009).

El receptor trkB y su ligando de alta afinidad BDNF se sobre-expresan en el COE, incluyendo las lesiones del epitelio mayor metastásico, esferoides multicelulares en la ascitis,

cistoadenocarcinomas papilar, los carcinomas de células claras, carcinoma de endometrioides, y cistoadenocarcinoma mucinoso (Au et al, 2009).

En un estudio realizado el año 2009 en China se evaluó el papel de la vía de señalización BDNF/trkB en la carcinogénesis de ovario: se determinó la expresión de BDNF por PCR semi-cuantitativo, y éste resultó ser altamente expresado tanto en muestras clínicas en condiciones normales y patológicas y en líneas de células cancerosas ováricas (Au et al, 2009). También se ha demostrado la expresión de trkB diferencial en líneas celulares de cáncer de ovario. Estos hallazgos sugieren que los cambios en la expresión del receptor trkB son importantes en la carcinogénesis ovárica temprana. Más importante aún, una alta expresión de trkB se ha asociado con resultados de pacientes de mal pronóstico y también se ha considerado un factor pronóstico independiente (Au et al, 2009).

A diferencia del receptor trkB, no se ha observado una marcada diferencia en la expresión de mRNA de BDNF entre células normales y cancerosas. Se ha documentado que existiría una acción autocrina entre trkB y BDNF en tumores malignos tales como el neuroblastoma y el mieloma. En la acción autocrina, una alta expresión de BDNF induciría la expresión de trkB. Por el contrario, cuando trkB es activado por BDNF exógeno, la migración de células de cáncer y la invasión aumentarían (Au et al, 2009; Yu et al, 2008).

Por otra parte, se ha visto que los efectos de BDNF/trkB pueden estar involucrados en la angiogénesis. Se ha comprobado que el VEGF y VEGFRs se sobre-expresan en el carcinoma de ovario en comparación con los tumores benignos de ovario y de las células normales del ESO. Además, se ha demostrado que la activación de BDNF/trkB induce la

expresión de VEGF en neuroblastoma. Se ha investigado la expresión de VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 después del silenciamiento de trkB en línea celulares de COE por PCR en tiempo real y se encontró una disminución significativa en VEGFR-2 a nivel de la expresión de mRNA después del silenciamiento de trkB. El hallazgo de que el silenciamiento de trkB podría regular en VEGFR-2 implica un posible papel de la vía de señalización BDNF / trkB en la angiogénesis del cáncer de ovario a través de la regulación de los receptores de VEGF. Por lo tanto, es posible que mediante la inducción de la expresión y la fosforilación de receptores trkB, por acción de su ligando BDNF, este complejo participe en la promoción de la migración de células de cáncer y la invasión (Yu et al, 2008).

Además de actuar a nivel de la angiogénesis, se ha investigado que la variante del receptor trkB de cuerpo completo es un potente supresor específico de Anoikis (apoptosis por pérdida de la interacción célula- matriz), mediante la activación de la vía PI3K-AKT. Se ha sugerido que esto actuaría como una barrera fisiológica a la metástasis y que la supresión de anoikis es el primer paso dado por las células metastásicas. (Yu et al, 2008) La resistencia a anoikis puede permitir la supervivencia de las células cancerosas en la circulación sistémica, lo que facilita la formación secundaria (metástasis) en órganos distantes, y se piensa que son críticos para la progresión de la enfermedad. Entonces se cree que cuanto mayor sea la expresión de trkB más agresivo es el comportamiento de las células cancerosas. (Yu et al, 2008)

## **Importancia del estudio**

La tasa de mortalidad de cáncer de ovario es la más alta entre todos los tumores malignos ginecológicos. El COE presenta un desafío complejo en clínica, por su diagnóstico y su tratamiento, debido a la dificultad de la detección temprana y a una mala respuesta a las terapias existentes. La resistencia a la quimioterapia y la metástasis son los principales factores responsables del fracaso del tratamiento. Ya que esta patología es altamente angiogénica, cuyo factor angiogénico más importante es el VEGF, motivo por el cual, actualmente se están evaluando las quimioterapias convencionales en conjunto con terapias anti-angiogénicas con anticuerpos anti-VEGF. La importancia de este estudio radica en determinar la participación del receptor trkB y su ligando BDNF en el cáncer de ovario epitelial y su relación con la expresión de VEGF, para comprender aún mejor el desarrollo de esta patología y poder generar terapias contra nuevos blancos terapéuticos.

## **HIPÓTESIS**

El factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF) y su receptor trkB se expresan en el epitelio superficial de ovarios normales, en tejido tumoral ovárico y en cáncer ovárico epitelial, y esta expresión es mayor en cáncer ovárico epitelial.

## **OBJETIVOS**

### **- Objetivo General**

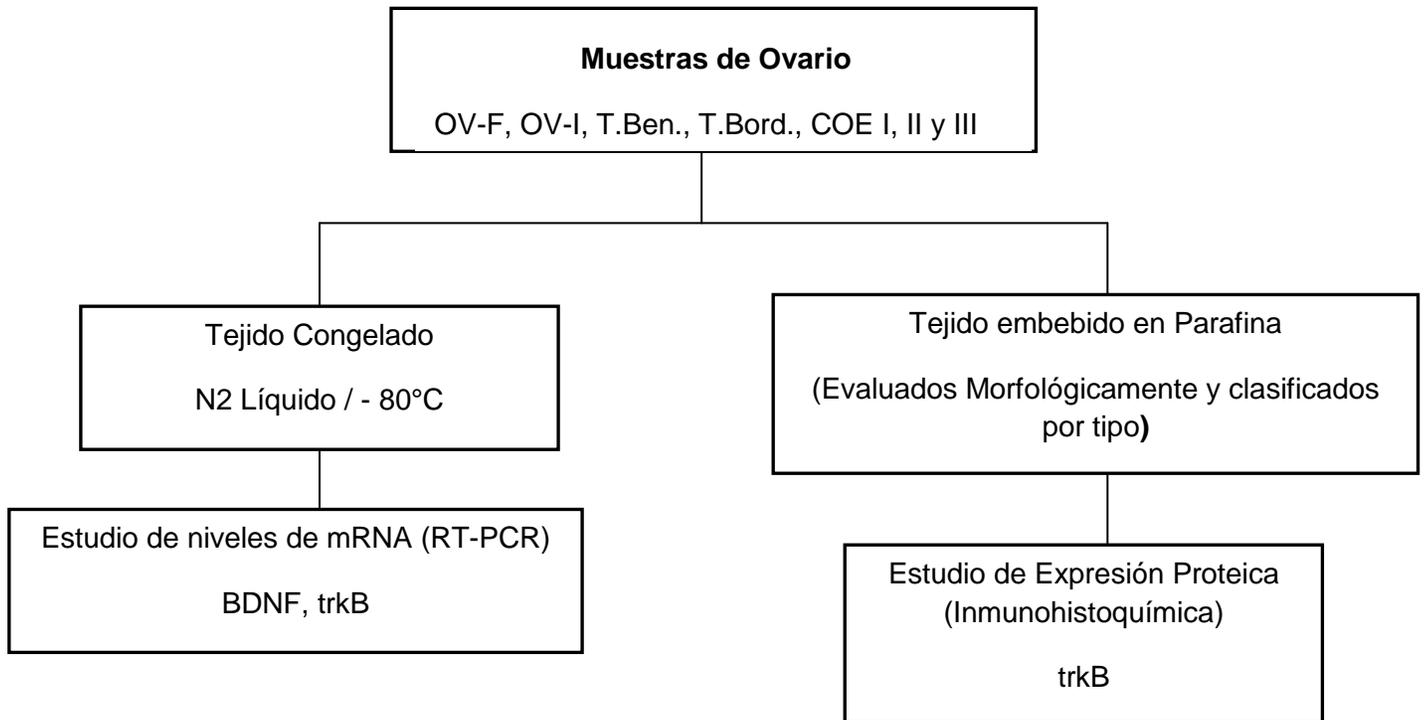
Evaluar la expresión del Factor Neurotrófico Derivado de Cerebro (BDNF) y de su receptor trkB en las distintas etapas de transición del epitelio ovárico, desde un tejido ovárico normal al cáncer ovárico epitelial pobremente diferenciado, y su relación con la expresión de VEGF.

### **- Objetivos Específicos**

- 1.- Determinar los niveles del mRNA de BDNF y el receptor trkB desde Ovario Normal Funcional a cáncer ovárico epitelial pobremente diferenciado (COE III).
- 2.- Determinar la localización y semicuantificar la expresión proteica de trkB en los distintos tejidos ováricos, desde Ovario Funcional Normal hasta COE III.
- 3.- Correlacionar los resultados obtenidos en el objetivo específico 1 y 2 con resultados obtenidos en investigaciones previamente realizadas en el laboratorio sobre la expresión proteica de VEGF, para las mismas muestras.

## DISEÑO EXPERIMENTAL Y METODOLOGÍA

Este estudio corresponde a una investigación básica-clínica que se realizó en forma retrospectiva. Trozos de tejido previamente clasificados por un patólogo se destinaron para los siguientes fines: tejidos congelados se utilizaron para realizar estudio de expresión génica de BDNF y trkB mediante RT-PCR convencional, y tejidos incluidos en parafina se utilizaron para la evaluación de la expresión proteica del receptor trkB por inmunohistoquímica, todos los estudios realizados en los diferentes estadios de progresión del cáncer ovárico epitelial.



## **Muestras**

Las muestras de tejido ovárico humano fueron obtenidas de mujeres que acudieron al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile (HCUCH) y Clínica Las Condes (CLC). Como este corresponde a un estudio retrospectivo, en el momento que se obtuvieron las muestras, las pacientes debieron firmar un Consentimiento Informado, aprobado por el Comité de Ética del HCUCH y de la CLC. (ANEXO 1)

Para este estudio se consideraron 7 tipos de muestras:

- Ovario Funcional (OV-F): Muestras de ovarios de mujeres pre-menopáusicas, que por indicaciones médicas han debido realizarse una histerectomía con ooforectomía y cuyos ovarios fueron evaluados por los patólogos como ovarios normales.
- Ovario Inactivo (OV-I): Ovarios de mujeres menopáusicas o post menopáusicas, con uno o más quistes de inclusión rodeados de una monocapa de células epiteliales.
- Tumor Benigno (T. BEN): Ovarios con quiste de inclusión con un diámetro mayor a 1cm, y rodeado por una monocapa de células epiteliales.
- Tumor Borderline (T.BORD): Ovarios con monocapa de células epiteliales que ha proliferado y se observa como un epitelio pseudoestratificado con atipia celular leve a moderada.
- Cáncer ovárico epitelial bien diferenciado (COE I): El ovario presenta estructuras papilares irregulares con malignidad celular, epitelio pseudoestratificado y algunos focos de invasión de más de 3 mm.

- Cáncer ovárico epitelial moderadamente diferenciado (COEII): El tejido ovárico presenta una disminución de las estructuras papilares por presencia de zonas indiferenciadas, con mucha atipia nuclear y mayores focos de invasión.
- Cáncer ovárico epitelial pobremente diferenciado (COE III): El ovario se observa como una masa sólida indiferenciada, con evidente pleomorfismo celular y nuclear, y con muchos focos de invasión.

Las muestras de ovarios funcionales e inactivos corresponden a tejidos provenientes de ovarios de mujeres voluntarias que acudieron al Servicio de Obstetricia y Ginecología del HCUCH y CLC, para ser sometidas a histerectomía con ooforectomía por patología no ovárica.

Los otros grupos del estudio se obtuvieron mediante histerectomía con ooforectomía o por histerectomía radical, en mujeres que acudieron al Servicio de Obstetricia y Ginecología del HCUCH y CLC a quienes se les diagnosticó un tumor ovárico o cáncer ovárico.

Como criterio de inclusión se considero a todas las pacientes menopáusicas o postmenopáusicas, que hayan firmado el consentimiento informado, y como criterio de exclusión, se excluyeron de este estudio aquellas muestras de pacientes que inicialmente fueron consideradas como una muestra de Cáncer Ovárico Epitelial pero que después del estudio de anatomía patológica, se determinó que el tejido no correspondía a dicha patología.

Para calcular el número de muestras requerido para este trabajo y que los resultados de éstas sean representativas con el objeto de obtener un 25% de diferencia entre los grupos de estudio, se realizó el siguiente cálculo, según la fórmula de comparación de medias:

$$n = \frac{2 (Z\alpha + Z\beta)^2 S^2}{d^2} \quad \rightarrow \quad n = \frac{2 (1.96 + 0.84)^2 0.166^2}{0.25^2}$$

Donde  $\alpha$  corresponde a 0.05 (1.96);  $\beta$  es 0.20 (0.84); la desviación estándar (S) toma un valor de 0.166; y d el valor de 0.25 (25%). Esto da como resultado que se debe considerar un **n** igual a 7.

- **Procedimientos para el análisis de muestras**

1. **Análisis cuantitativos y semicuantitativos**

- a) **Inmunohistoquímica para determinar la localización y expresión del receptor TrkB.**

Este estudio se realizó con el objetivo de identificar la localización y semi-cuantificación de trkB, en los tejidos pertenecientes a los 7 grupos de estudio.

La técnica se realizó según el siguiente protocolo: Se cuenta con un corte de tejido embebido en parafina fijado en un portaobjetos. Para comenzar, se debe rehidratar el tejido en xilol, dos veces por 10 minutos, y 3 minutos en etanol 100%, 100%, 95% y 70%, para terminar con un lavado en agua destilada por 20 minutos. Posteriormente, para la recuperación antigénica, mantener la muestra en buffer citrato por 40 minutos a 90°C y dejar enfriar por otros 20 minutos, luego lavar 2 veces con agua destilada y 3 veces con PBS1X durante 3 minutos cada lavado. Posteriormente, con el objetivo de bloquear de las peroxidasa

endógenas, tratar el tejido con cantidad suficiente de peróxido de hidrógeno al 3%, y luego lavar 3 veces con PBS1X durante 3 minutos cada uno. Para evitar las uniones inespecíficas, las muestras serán tratadas con 2 a 3 gotas de la solución bloqueadora del kit Histostain SP (ZYMED Laboratorios Inc., San Francisco, California, USA). Luego, se retira la solución bloqueadora, y se incuba la muestra a 4°C por 18 a 20 horas con el anticuerpo primario, cuya dilución se señala en la Tabla 1. Además se contó con un control negativo de cada muestra, que fue incubado sólo con PBS-BSA 2%

**Tabla 1.** Dilución del anticuerpo primario:

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Dilución</b>
Control negativo	-	PBS-BSA 2%
trkB	Santa Cruz TrkB (794): sc-12	1:1000

Al día siguiente se continuó según el protocolo: eliminar el anticuerpo primario por aspiración, seguido de 3 lavados con PSB1X de 3 minutos cada uno. Luego, incubar las muestras a temperatura ambiente por 20 minutos con 2 a 3 gotas del anticuerpo secundario unido a biotina. El anticuerpo secundario, corresponde a kit que contiene una mezcla de anticuerpos secundarios que permite la detección de anticuerpos primarios originados en ratón, conejo, Guinea pig y rata (Histostain LAB-SA Detection System, Invitrogen Corporation 1600, Faraday Avenue, Carlsbad, CA 92008 USA). Enseguida aplicar 2 a 3 gotas de la solución de estreptavidina-HRP (Histostain SP, ZYMED) e incubar a temperatura ambiente por 20 minutos. Posterior a este procedimiento lavar 3 veces con PSB1X por 3 minutos cada uno, y aplicar la solución de revelado diaminobenzidina por 55 segundos (DAB, DAKO Cytomation Inc., CA, EE.UU.), cuya composición se describe en el Cuadro 1.

Para terminar, realizar un lavado de 2 minutos con agua destilada y una contra-tinción con hematoxilina de Harris concentrada y filtrada por 45 segundos. Para remover el exceso de contra-tinción realizar 1 lavado con agua destilada y uno con agua corriente, de 5 minutos de duración cada uno. Para desmarcar, deshidratar las muestras con la batería de alcoholes 70%, 70%, 95%, 100%, 100% por 5 minutos en cada uno, y xilol por 10 minutos. Finalmente montar con Entellan (MERCK).

**Cuadro 1.** Composición de la solución de revelado Diaminobenzidina.

<p><u>Preparación solución de revelado DAB:</u> Cromógeno 20 µl. Buffer 1 ml.</p>
---

Las imágenes de inmunohistoquímica se obtuvieron mediante la utilización de un microscopio Olympus BX51. Para realizar la semi-cuantificación, las imágenes obtenidas fueron analizadas con el programa Image Pro Plus versión 6.2.

#### b) **Extracción de RNA y reacción de transcripción reversa**

Para determinar la expresión de BDNF y su receptor en los distintos tejidos se realizó la técnica de reacción de polimerasa en cadena, pero previo a esto se extrajo el RNA total y se realizó la reacción de transcripción reversa. Es importante destacar que la muestra de la cual se obtuvo el RNA, para cualquiera de los estadios del cáncer ovárico epitelial, corresponde al tejido ovárico en su totalidad, incluyendo estroma ovárico, tejido fibroso, vasos sanguíneos y

epitelio de la superficie ovárica, ya que se toma un trozo de tejido y se extrae el RNA mediante la técnica de fenol-cloroformo.

Para realizar todos estos estudios lo primero fue preparar la campana de extracción y sacar las muestras del freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  y mantenerlas en un termo con nitrógeno líquido.

El procedimiento de extracción del RNA sigue este protocolo de trabajo: Colocar la muestra en un tubo para extracción estéril y mantenerlo en una cubeta con hielo. Agregar a este tubo estéril 800  $\mu\text{l}$ . de Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EE.UU.) y homogeneizar en el ultraturax 3 veces durante 10 segundos cada uno. Luego traspasar este homogeneizado a un tubo eppendorf de 1,5 y rotular. Agregar 160  $\mu\text{l}$  de cloroformo para eliminar las trazas de fenol, mezclar en vortex y dejar 15 minutos en hielo. Pasado este tiempo centrifugar a 13200 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente transferir 400  $\mu\text{l}$ . del sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1,5 y agregar el mismo volumen de isopropanol frío y dejar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Al día siguiente centrifugar por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  a 13200 rpm y eliminar el sobrenadante, que corresponde al isopropanol. Lavar el pellet con 1 ml. de etanol al 75% y centrifugar a 13200 rpm por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Eliminar el sobrenadante y dejar secar el pellet, para luego resuspenderlo 10  $\mu\text{l}$ . de buffer TE 1X.

Para calcular la calidad y cantidad de RNA extraído se realizó una lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm de un tubo con 2  $\mu\text{l}$ . de RNA + 1ml. de agua destilada. El tubo blanco corresponde a 1ml. de agua destilada, al cual se le midió absorbancia a las mismas longitudes de onda. Luego se restó la absorbancia de la muestra a 280 nm con la absorbancia

del blanco a 280 nm y se calculó la calidad y cantidad de RNA extraído mediante las siguientes fórmulas:

Calidad: 
$$\frac{\text{Absorbancia a 260 nm.}}{\text{Absorbancia a 280 nm.}}$$

Cantidad ( $\mu\text{g./} \mu\text{l.}$ ): 
$$\text{Absorbancia a 260 nm} \times 42/2$$

### **c) Reacción de Transcripción Reversa:**

Una vez extraído el RNA y calculada su cantidad y calidad, se sintetizó el DNA complementario (cDNA) mediante una reacción de transcripción reversa según el siguiente protocolo: preparar el Mix N°1, el cual corresponde a una mezcla de reacción que contendrá 20  $\mu\text{l.}$  de volumen final, utilizando 5 $\mu\text{g.}$  del RNA total. Agregar agua destilada estéril hasta completar un volumen de 10, 5  $\mu\text{l.}$ , añadir 1 $\mu\text{l.}$  de dNTPs 10mM y 0,5  $\mu\text{l.}$  de los partidores 500  $\mu\text{g/ml}$  ( Random Primers, Madison, WI., USA.). Calentar a 65°C por 5 minutos y luego enfriar en hielo por 5 minutos.

Preparar un Mix N°2 en un tubo eppendorf nuevo de 1,5, de acuerdo al N° de muestras a procesar con los siguientes reactivos: 4 $\mu\text{l.}$  de buffer 5X first strand, 2  $\mu\text{l.}$  de DTT 0,1M y 1  $\mu\text{l.}$  de RNAsa OUT (40U/  $\mu\text{l.}$ ). Mezclar los reactivos e incubar a 25°C por 2 minutos y luego traspasar el mix 2 (7  $\mu\text{l.}$  aproximadamente) al tubo eppendorf que tiene el mix 1. Agregar 1  $\mu\text{l.}$  de enzima Superscript II (Invitrogen, 200 U/  $\mu\text{l.}$ ) y mezclar. Posteriormente incubar a 25°C por 10 minutos, luego a 42°C por 50 minutos y para finalizar poner en una cubeta con hielo durante 10 minutos y luego guardar los tubos rotulados a -20°C.

#### d) Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Una vez sintetizado el cDNA, éste fue amplificado mediante PCR, para lo cual en un tubo de 600 µl. se preparó una mezcla de reacción, que contenía los siguientes reactivos, según el número de muestras: 2,5 µl. de buffer 10X, 1 µl. de MgCl<sub>2</sub> 50mM, 0,5 µl. de dNTPs 10mM, 0,25 µl. de los partidores sense y antisense 10mM para cada uno de los genes estudiados, para tener una concentración final de 2,5 pmol , cuya secuencia se describe en la tabla 3; 0,15 µl. de DNA Polimerasa ( Biotools, 5U/ µl.) y completar con 24 µl. de agua destilada estéril.

**Tabla 3.** Secuencia de los partidores utilizados para cada gen estudiado

<b>Partidor</b>	<b>Producto (Pb)</b>	<b>Sense</b>	<b>Antisense</b>
BDNF	559	5'- GGT AAC GGC GGC AGA CAA AAA GAC- 3'	5'- GCA ACG GCA ACA AAC CAC AAC ATT- 3'
trkB	550	5'- GCA AAT CTG GCC GCA CCT AAC CT -3'	5'- GCC AGC CCA TGA AGT GAG CAG AA -3'
β- actina	661	5'- TGA CCG GGT CAC CCA CAC TGT GCC CAT CTA- 3'	5'- CTA GAA GCA TTG CGG TGG ACG ATG GAG GG- 3'

Posteriormente se alicuotó 24 µl. de la mezcla de reacción a cada uno de los tubos para PCR (200 µl.) y se agregó 2 µl. de la muestra (cDNA) respectivo a cada tubo. Finalmente se colocaron los tubos en el termociclador, de acuerdo a los ciclos, tiempos y temperaturas para cada gen, establecidos en la tabla 4.

**Tabla 4.** Programa de PCR para BDNF y trkB con 32 ciclos

<b>Proceso</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tiempo</b>
Denaturación inicial	94°C	3 min.
Denaturación	94°C	1min.
Alineamiento	60°C	1 min.
Extensión	72°C	1 min.
Extensión final	72°C	10 min.
Mantención	4°C	infinito.

Para determinar el producto del PCR de ambos genes, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2%, y el gel de agarosa se colocó en un transiluminador. A las bandas producto del PCR se les tomó fotografías con la cámara Olympus C-4000 (Olympus America Inc. USA) y se utilizó el programa UN-SCAN-IT (USI) Automated digitizing system versión 4.1 (Silk Cientific Corporation) para semicuantificar los resultados obtenidos.

#### **Análisis estadístico**

Los resultados fueron expresados en todos los ensayos como promedio  $\pm$  error estándar del promedio (EEM) y todos los grupos estudiados se compararon entre si.

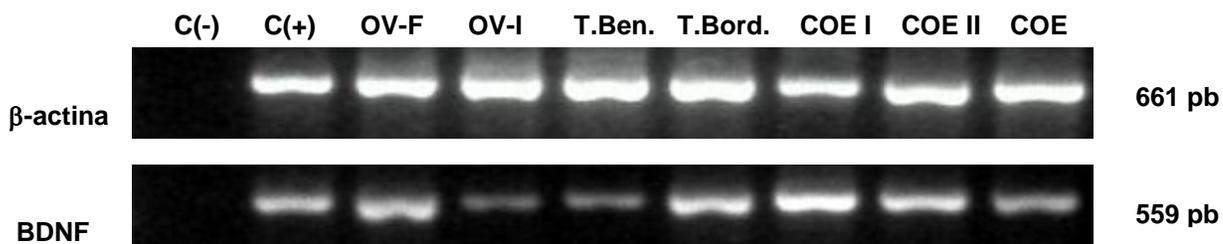
Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graph Pad 5.0. En cada análisis, se realizó un test de normalidad (Kolmogorov-Smirnov)) con el objetivo de conocer la distribución de los datos. Dado que los datos obtenidos en el presente estudio fueron paramétricos, para la expresión génica y proteica de trkB, se realizó el test ANOVA, para conocer la existencia de diferencias significativas, y finalmente se utilizó el post test Bonferroni para identificar entre cuales grupos están las diferencias significativas. Como criterio de significancia se consideró

un  $p < 0,05$ . Los datos obtenidos en este estudio fueron no paramétricos para la expresión génica de BDNF y se realizó el test de Kruskal- Wallis, para conocer la existencia de diferencias significativas, y finalmente se utilizó el post test Dunn's para identificar entre cuales grupos están las diferencias significativas.

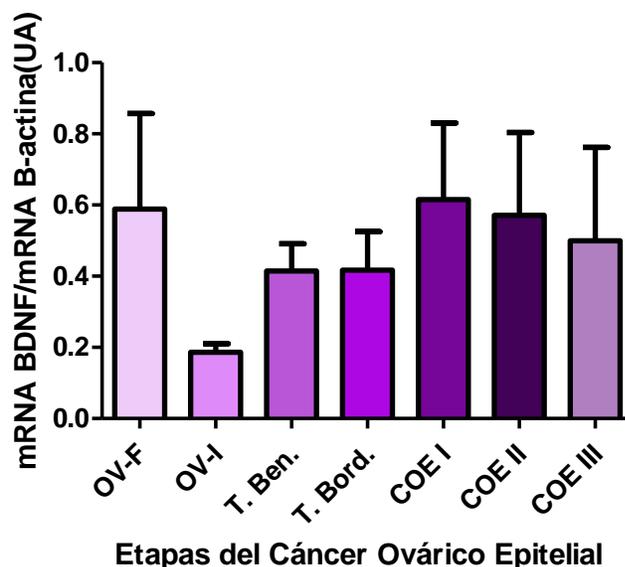
## RESULTADOS

### a. Niveles de mRNA de BDNF en las muestras de ovarios normales, tumores ováricos y cáncer ovárico epitelial.

Al evaluar los niveles de mRNA para BDNF, se encontró un leve aumento en las muestras de COE I, II y III con respecto a ovario normal inactivo, tumor benigno y borderline; sin embargo, este aumento no fue significativo ( $p > 0,05$ ). Al comparar los niveles de mRNA de BDNF en las muestras de cáncer ovárico se observó una leve disminución entre el COE I (altamente diferenciado) con respecto al COE III (pobrementemente diferenciado). Además, se encontró una disminución en los niveles de mRNA de BDNF en ovario normal inactivo respecto al ovario normal funcional como se observa en la Figura 1 y 2.



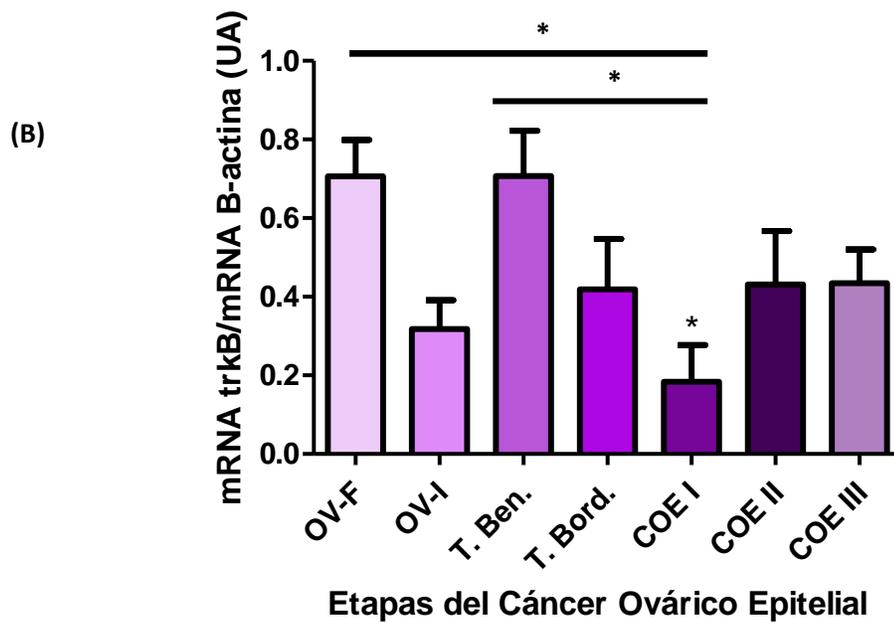
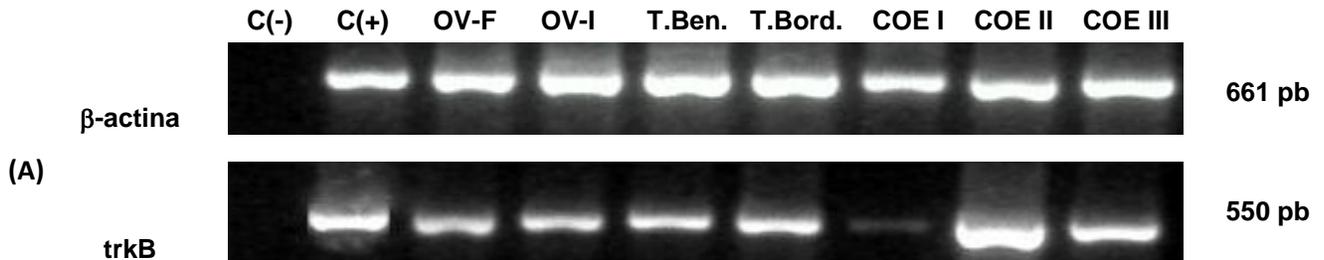
**Figura 1: Fotografía de un gel de agarosa de los productos de PCR para  $\beta$ -actina y BDNF.** Este gel es representativo de seis muestras por cada grupo de muestras (ovarios normales funcionales, ovarios normales inactivos, tumores benignos, tumores borderlines, COE I, COE II y COE III) Se observan las bandas de los productos de PCR para  $\beta$ -actina de 661pb y para BDNF de 559pb.



**Figura 2: Niveles de mRNA de BDNF en las distintas etapas de la progresión carcinogénica mediante RT-PCR.** Los productos de PCR fueron semi-cuantificados y expresados en un gráfico, que representa los resultados de 6 muestras de cada grupo de estudio, expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar medio, en unidades arbitrarias mRNA BDNF/mRNA  $\beta$ -actina.

**b. Niveles de mRNA de trkB en las distintas etapas de la progresión carcinogénica ovárica**

Al evaluar los niveles de mRNA para trkB, se encontró una disminución significativa entre ovario funcional y COE I ( $p < 0,05$ ), y entre Tumor Benigno y COE I ( $p < 0,05$ ). Las muestras tumorales presentan diferencias en sus niveles de expresión génica, y las muestras de COE I, II y III presentaron un leve aumento desde COE I hasta COE III, sin embargo todas estas variaciones no son significativas. Además se encontró la expresión de niveles elevados de mRNA en ovario funcional. Los niveles de mRNA de trkB fueron normalizados con los niveles de mRNA de  $\beta$ -actina. (Figura 3)

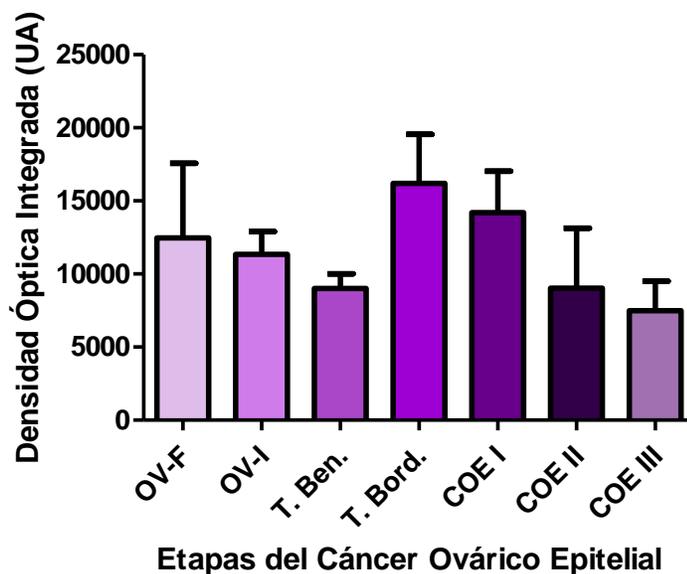


**Figura 3: Panel A: Fotografía del gel de agarosa de los productos de PCR para  $\beta$ -actina y trkB.** Se observan las bandas de los productos de PCR para b-actina de 661pb y para trkB de 550pb representativo de seis muestras por grupo. **Panel B: Niveles de mRNA de trkB en las distintas etapas de la progresión carcinogénica mediante RT-PCR.** El gráfico representa los resultados de 6 muestras de cada grupo de estudio, expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar medio, en unidades arbitrarias mRNA trkB/ mRNA  $\beta$ -actina. \*  $p < 0,05$  OV-F vs. COE I,  $p < 0,05$  T.Ben. vs. COE I.

**c. Localización y semicuantificación de la proteína trkB en el epitelio de las distintas etapas de la progresión carcinogénica ovárica.**

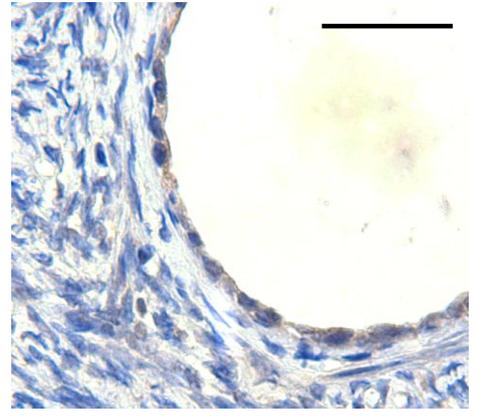
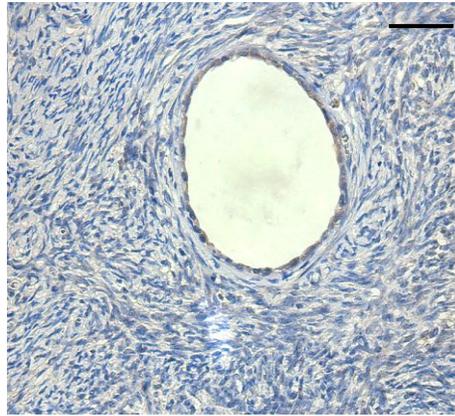
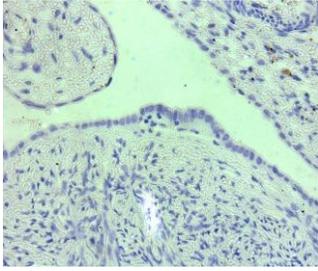
La inmunodetección de trkB se observó en todos los grupos estudiados, con tinción positiva en epitelio y estroma. La tinción se distribuye en forma homogénea y granular sólo en el citoplasma, como se observa en la figura 4. Se semicuantificó la tinción midiendo la Densidad Óptica Integrada de la fotografía completa capturada después de procesar la muestra. Se capturaron 8 fotos por cada muestra y se evaluaron 6 muestras por cada grupo en estudio.

Se observó un aumento de los niveles de trkB en tumor borderline, que va disminuyendo hacia COE III. No se observan variaciones significativas entre los grupos de estudio.

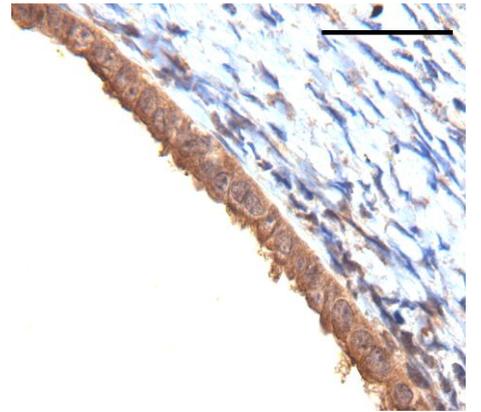
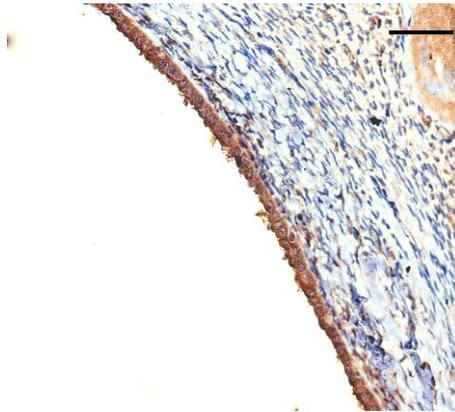
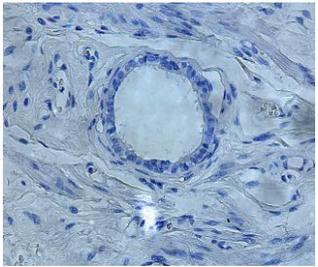


**Figura 3: Semicuantificación de la proteína trkB en epitelio normal y transformado por inmunohistoquímica en las distintas etapas de la progresión carcinogénica.** Las barras del gráfico representan el promedio + el error estándar del promedio, de 6 muestras en cada grupo de estudio, expresado como densidad óptica integrada o intensidad de la marca del anticuerpo.

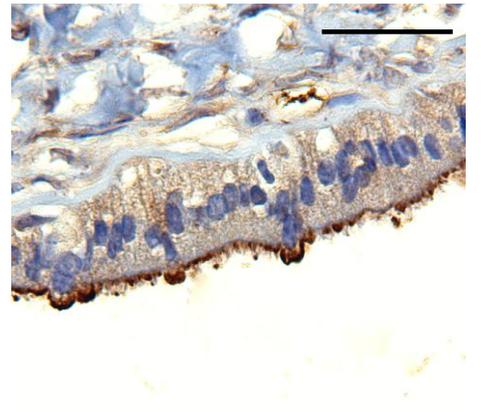
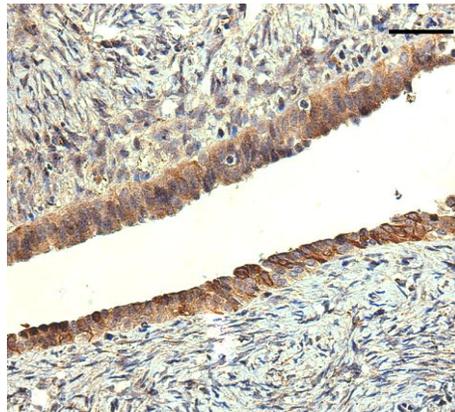
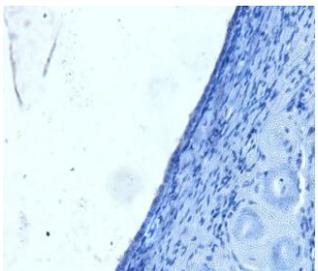
(A)



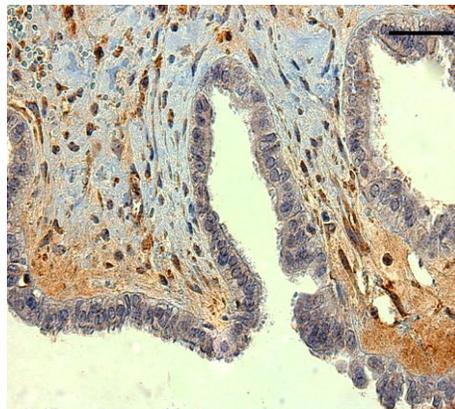
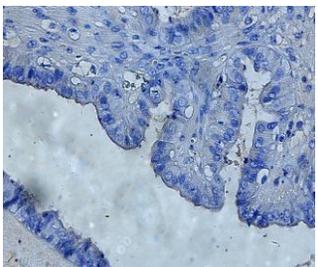
(B)

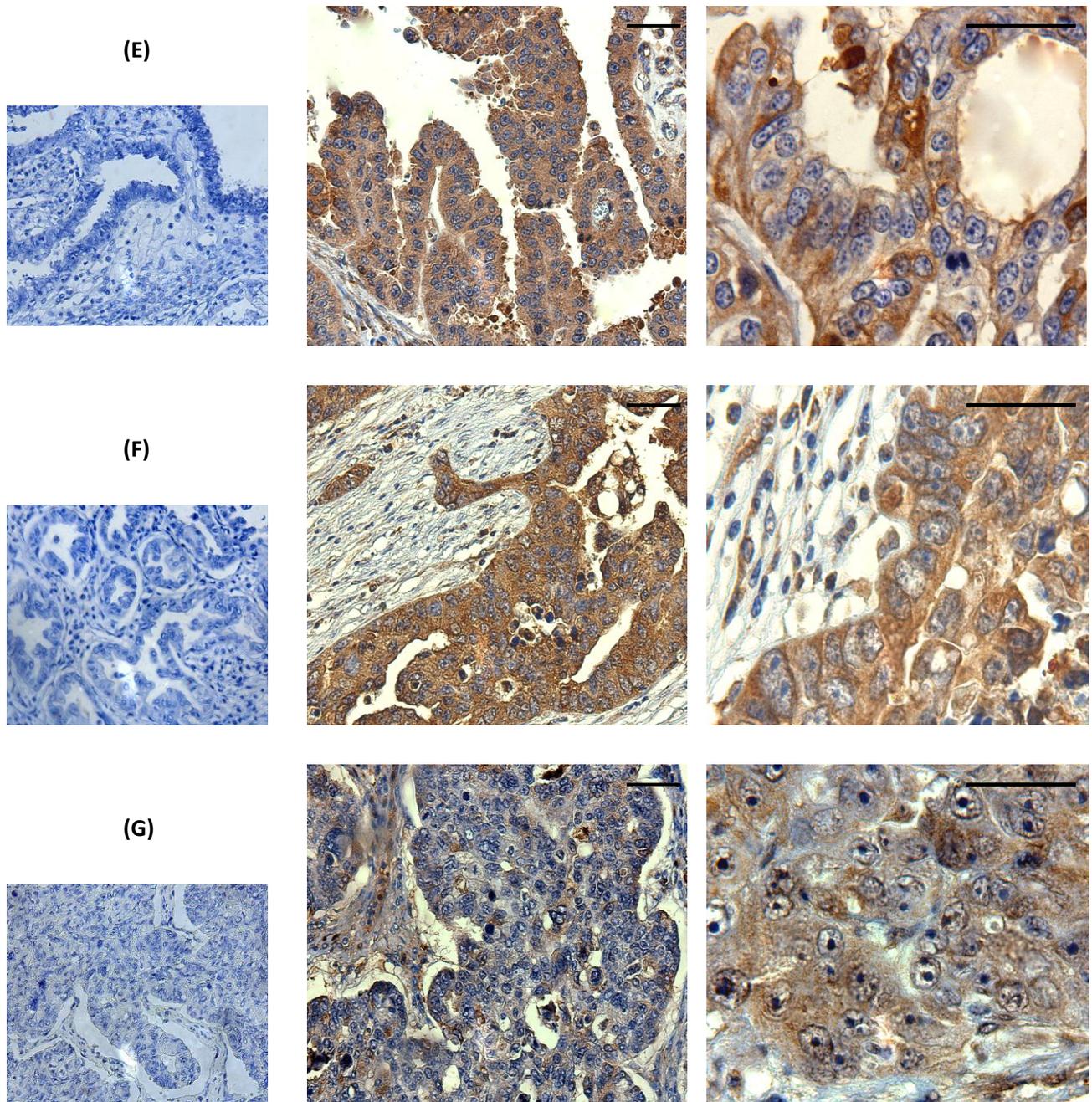


(C)



(D)

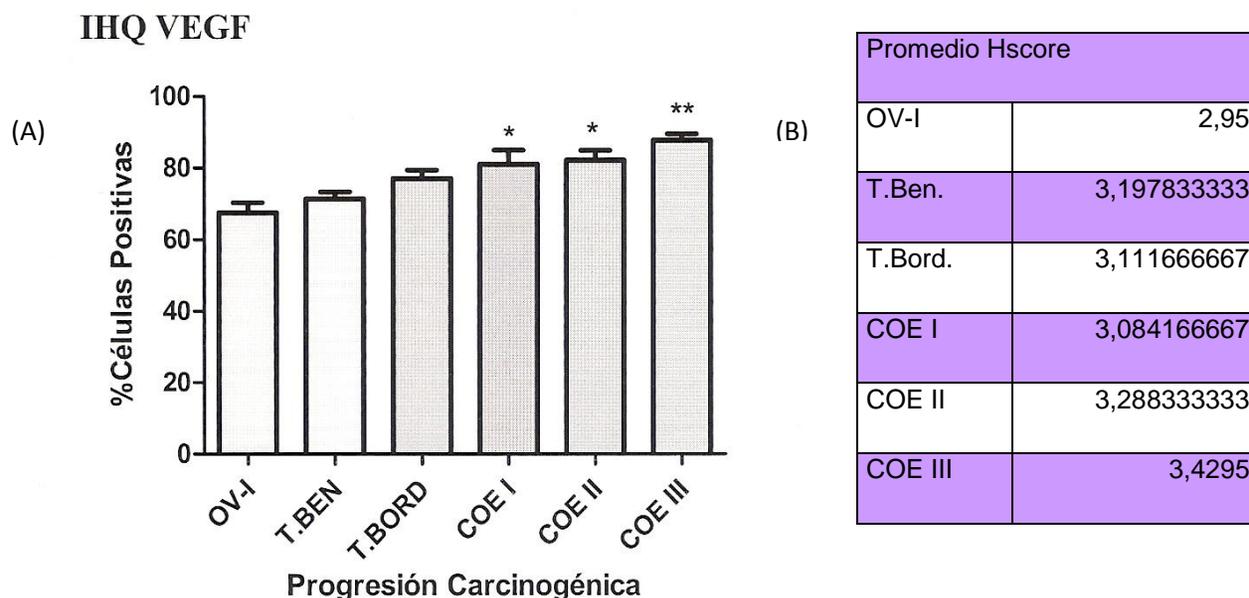




**Figura 4: Microfotografías representativas de la inmunodetección de la proteína trkB en las distintas etapas de la progresión carcinogénica.** (A) Ovario Funcional Normal, (B) Ovario Inactivo, (C) Tumor Benigno, (D) Tumor Borderline, (E)(F)(G) Cáncer Ovárico Epitelial I, II y III. A la izquierda se encuentra el control negativo (aumento 400x), al centro se observa el tejido con un aumento 400x y a la derecha con un aumento 1000x. La barra presente en las microfotografías del centro y de la derecha (aumento 400x y 1000x) equivale a 50 $\mu$ m.

**d. Resultados obtenidos en estudio previo realizado en el laboratorio, para proteína VEGF en las etapas de la progresión carcinogénica.**

En un estudio realizado el año 2008 en este laboratorio se realizó la inmunodetección y semicuantificación de la proteína VEGF en ovarios inactivos, tumores benignos, tumores borderlines, COE I, COE II y COE III, que representan las distintas etapas de la progresión carcinogénica. La evaluación de la inmunodetección fue realizada como porcentaje de células positivas. Se encontró un leve aumento en la inmunodetección de VEGF a medida que progresa la transformación del epitelio, desde ovario inactivo hasta el tumor borderline, y variaciones significativas que se traducen en un aumento entre ovario inactivo y COE I, COE II y COE III (Muñoz, 2008) (Figura 5)

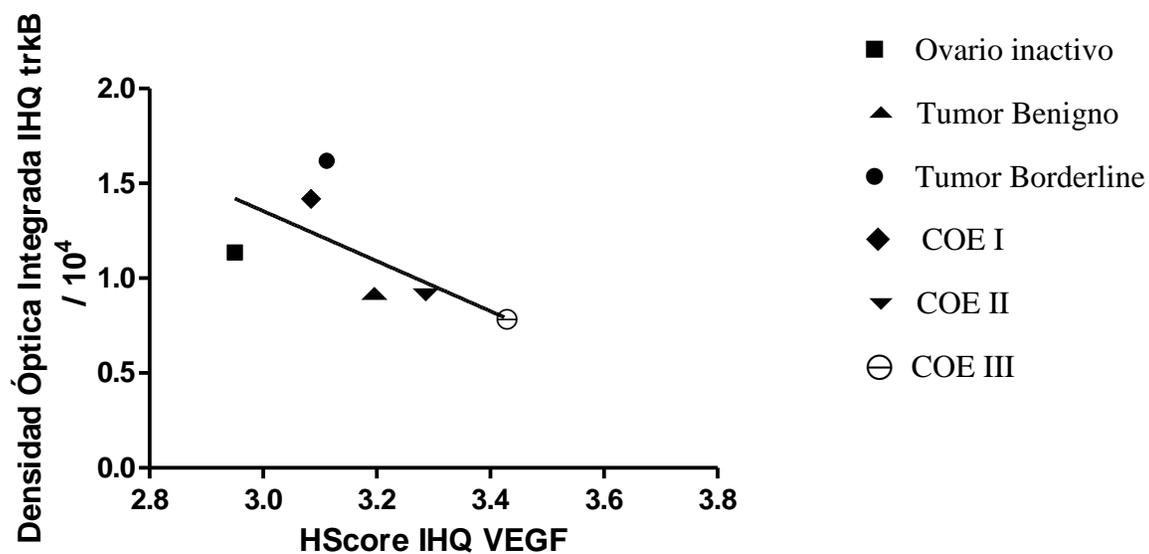


**Figura 5: Panel A: Semicuantificación de la proteína VEGF por inmunohistoquímica durante la progresión carcinogénica. Panel B: HScore calculado para la inmunodetección de cada grupo.** La tabla presenta el promedio de los HScore calculados sólo para las placas que se trabajaron mediante inmunohistoquímica en este estudio. Este valor será utilizado al hacer la correlación con los resultados de la expresión proteica de trkB.

**e. Correlación proteica entre los resultados obtenidos para *trkB* y los resultados existentes para VEGF.**

Se evaluó la correlación proteica entre *trkB* y los resultados obtenidos para la expresión proteica de VEGF. Se obtuvo una correlación negativa y no significativa,  $p > 0,05$  y  $r = 0,492$ .

(Figura 6)



**Figura 6:** Correlación entre los niveles proteicos de *trkB* y VEGF en las distintas etapas de la progresión carcinogénica ovárica.

## DISCUSIÓN

Se ha convertido en la inquietud de diversos investigadores comprender un posible rol de la familia de las neurotrofinas y sus receptores en la fisiología normal humana y en diversos estados patológicos, y es por ello que se ha estudiado y evaluado la presencia de los receptores *trk* en tejidos no neuronales, encontrándose *trkB*, una de las moléculas de interés en este estudio, en su forma truncada en corazón, bazo y ovario (Shelton et al 1995).

Por otra parte, estudios en ovarios de rata y humanos han descrito la importancia de las neurotrofinas en el desarrollo de este órgano. Se ha descrito que el factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor de alta afinidad *trkA* estarían involucrados en el desarrollo folicular temprano y tendrían un rol importante en el desarrollo de la función ovárica humana (Abir et al, 2005; Anderson et al, 2002). También participarían en la progresión del cáncer ovárico epitelial, observándose altos niveles de esta neurotrofina y su receptor en muestras de COE (Muñoz, 2008) y actuando a nivel de la angiogénesis, de forma directa e indirecta (Cantarella et al, 2002; Calzá et al, 2001), lo cual, también ha sido encontrado por nuestro grupo en COE (resultados no publicados aún). Es por esto que surge la inquietud de estudiar la participación de otras neurotrofinas en el tejido ovárico, ya que se ha descrito la participación de BDNF y su receptor *trkB* en el desarrollo folicular temprano, proporcionando señales de proliferación a las células de la granulosa (Paredes et al, 2004), además de señalización intracelular, para regular funciones específicas ováricas (Dissen, 1995).

Cuando se produce el cese de la función ovárica al inicio de la menopausia, el ovario deja de ciclar, entonces este ovario es considerado un ovario inactivo y se observan con mayor frecuencia invaginaciones de la pared ovárica hacia el estroma, las cuales se cierran

dando origen a quistes de inclusión, que se encuentran rodeados por una monocapa de células epiteliales de la superficie ovárica. Es en esta etapa que se pueden gestar cambios displásicos y metaplásico en las células epiteliales (Auersperg et al, 2001), que pueden originar un carcinoma, principal hipótesis de la etiología del cáncer ovárico epitelial, cuyas mayores tasas de incidencia se registran en mujeres postmenopáusicas. Es por ello que en este estudio se consideran 7 grupos de estudio que corresponden a todas las etapas de la progresión del COE, para ver las variaciones que se presentan en la expresión génica y proteica de BDNF y trkB, y su participación en esta patología, de lo cual poco se conoce a la fecha.

En este estudio se determinó la expresión génica de BDNF y trkB, y la expresión proteica de trkB. Los niveles de mRNA de BDNF presentaron un aumento en COE I, II y III, en comparación con los niveles expresados por ovario inactivo, tumor benigno y borderline, aunque estas variaciones no son significativas. Además, se observó una leve disminución en los niveles de mRNA de BDNF desde COE I hasta COE III.

Paralelamente se evaluó los niveles de mRNA del receptor trkB y se observaron elevados niveles de expresión en tumor benigno, que disminuyeron en tumor borderline y COE I, II y III, y especialmente COE I en el que se observó niveles muy bajos de mRNA de trkB. Además, se observa entre los 3 grupos de estudio de COE, un leve aumento de la expresión génica del receptor, que va desde COE I a COE III. Sin embargo, ninguna de estas variaciones fue significativa.

Con respecto al ovario funcional normal, en este grupo de estudio se detectaron niveles elevados de mRNA para BDNF y trkB, lo que tendría relación con la presencia de folículos y células de la granulosa, que como se mencionó antes, ya que expresan altos niveles de estas

moléculas. Este hecho se explicaría principalmente por la naturaleza de la muestra, ya que en muchas ocasiones puede ocurrir que un pequeño trozo al cual se le extrae RNA corresponda a estroma ovárico o tejido fibroso ovárico y no solamente al epitelio de la superficie ovárica, y el ovario funcional se caracteriza por pertenecer a mujeres pre-menopáusicas, cuyo estroma ovárico aún posee folículos. Todo esto explicaría por que se observó la disminución en la expresión génica de ambas moléculas en ovario inactivo, que también constituye un estado normal, pero menopáusico y carente de folículos.

Al evaluar los niveles proteicos de trkB se encontraron niveles elevados en tumor Borderline y estos disminuyeron hacia COE III. Se observan niveles elevados de proteína trkB en tumor Borderline, COE I y COE II en comparación con ovario inactivo y tumor benigno, sin embargo estas diferencias no son significativas.

Se observan diferencias entre los niveles de mRNA y proteína encontrados para el receptor trkB, ya que los niveles de mRNA de trkB aumentan a medida que el cáncer de ovario pierde la diferenciación celular y la expresión de la proteína disminuye hacia COE III; lo cual podría significar que la transcripción es mayor que la traducción para trkB, o bien que podría haber una mayor ubiquitinación de esta proteína.

En un estudio realizado por Au et al, se encontró expresión proteica de trkB mediante inmunohistoquímica en el citoplasma y membrana de las células epiteliales, y al hacer la comparación entre los distintos grupos diagnóstico se observó que eran positivos en la expresión desde Tumor Borderline hasta COEIII, sin variaciones significativas entre ellos, pero si se observaron variaciones significativas entre los niveles de expresión proteica de trkB entre estos grupos vs. tumor benigno, que expresaría bajos niveles de trkB (Au et al, 2009). En

el mismo estudio también se determinó la expresión génica de BDNF y el patrón de expresión observado no demostró variaciones significativas entre los grupos de estudio (Au et al, 2009).

Con respecto a la angiogénesis, se ha demostrado que BDNF jugaría un rol importante en el desarrollo vascular y la respuesta a la injuria. Células endoteliales de arterias y capilares del corazón y células de músculo esquelético expresan BDNF y *trkB*, y estudios en ratas con deficientes niveles de BDNF (BDNF(-/-)) muestran una reducción en el contacto entre las células endoteliales y apoptosis de éstas. Por el contrario, al existir una sobre-expresión de BDNF se produce un incremento en la densidad capilar (Kermani and Hempstead, 2007). De lo anteriormente descrito se puede inferir que BDNF tendría un rol en la angiogénesis por su acción en las células endoteliales y el desarrollo vascular. Además, se ha demostrado la participación de su receptor *trkB* en la angiogénesis, con especial énfasis en distintos tipos de cáncer. Se ha visto que pacientes con neuroblastoma expresan altos niveles del receptor *trkB* y su ligando, y que esta sobre-expresión estaría relacionada con la génesis tumoral, angiogénesis y resistencia a la quimioterapia, contribuyendo significativamente en la metástasis y a un fenotipo agresivo de estos tumores de mal pronóstico (Nakamura et al, 2006). Situación similar se ha descrito en tumores de tipo no neuronal, como en cáncer de páncreas, hepatocarcinoma, linfoma de Hodgkin y Mieloma Múltiple, por lo que se ha sugerido que *trkB* puede ser un marcador de carcinogénesis y metástasis, y sería muy valioso en el tratamiento de cáncer de mal pronóstico (Han et al, 2006).

Con respecto al cáncer de ovario se ha revelado que la expresión de BDNF y el receptor *trkB* tendrían efecto sobre la migración celular, invasión celular por inhibición de apoptosis, angiogénesis y supresión de anoikis. Además la expresión de este complejo estaría asociada a pacientes con mal pronóstico de la enfermedad (Au et al, 2009; Yu et al 2008).

Por todo lo anteriormente descrito, se esperaba que los niveles de *trkB* aumentaran a medida que el cáncer ovárico va perdiendo la diferenciación celular, ya que la angiogénesis y los niveles de VEGF aumentan. Sin embargo, los resultados obtenidos revelan que la expresión génica aumenta leve y no significativamente a partir de COE I, y que este aumento no es mayor que los niveles de mRNA de *trkB* de un ovario funcional o de un tumor benigno. Por otra parte la expresión proteica de *trkB* evaluada semi-cuantitativamente por inmunohistoquímica, muestra una disminución de la proteína a partir del Tumor Borderline hasta COE III, por lo que al utilizar estos resultados para hacer una correlación con resultados obtenidos previamente para la proteína VEGF, la correlación es negativa. Esto se debe probablemente a que la relación del complejo BDNF/ *trkB* con la angiogénesis estaría basada en una regulación a nivel de los receptores de VEGF, VEGFR-1 y VEGFR-2 (Au et al, 2009), y no tendría acción a nivel de VEGF, como es el caso de NGF, que participa en la angiogénesis de forma directa e indirecta (Cantarella et al, 2002).

Considerando lo que se ha descrito en la literatura con respecto a *trkB* y su ligando; la incipiente investigación que relaciona estas moléculas en el cáncer de ovario epitelial y los datos obtenidos en este estudio, han demostrado la presencia de BDNF y su receptor de alta afinidad sería interesante extender este estudio y realizar investigaciones posteriores que incluyeran evaluación de la expresión proteica de BDNF, relacionar el complejo BDNF/*trkB* con la regulación de VEGFR-1 y VEGFR-2, o evaluar efectos del silenciamiento del receptor *trkB*, con el fin de evaluar y diseñar nuevas o más eficientes alternativas terapéuticas contra el COE, debido a su alta prevalencia en la población, su tardío diagnóstico y su mal pronóstico.

## CONCLUSIONES

En este estudio se demuestra la expresión génica y proteica del factor neurotrófico derivado de cerebro y de su receptor trkB en el epitelio de la superficie ovárica, en tejido tumoral ovárico y en cáncer ovárico epitelial, sin embargo la expresión de éstas moléculas no es mayor en cáncer ovárico epitelial, por lo que la hipótesis no se cumple.

La expresión génica de BDNF se mantiene sin variaciones significativas entre las etapas de la progresión carcinogénica. Sin embargo, su receptor trkB presenta una disminución significativa en los niveles de mRNA entre un ovario funcional normal y el cáncer ovárico epitelial bien diferenciado (COE I), sin presentar variaciones significativas entre los demás grupos.

Con respecto a una posible relación entre el receptor trkB y VEGF, al comparar la expresión proteica de ambos no se observa una correlación positiva entre los resultados obtenidos para los distintos grupos de estudio.

## REFERENCIAS

1. Abir R., Fisch B., Jin S., Darnenet M., Ben- Haroush A., Felz C., Kessler- Ickson G., Feldberg D., Nitke S., and Ao A., Presence of NGF and its receptors in ovaries form human fetuses and adults, *Molecular Human reproduction*, 11:229-236, 2005.
2. Anderson R., Robinson L., Brooks J., and Spears N., Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary, *J Clin Endocrinol Metab.*, 87: 890- 897, 2002.
3. Au C., Siu M., Liao X., Wong E., Ngan H., Tam K., Chan D., Chan Q., and Cheung A., Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in ovarian cancers – Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome, *Cancer Letters* 281:151–161, 2009.
4. Auersperg N, Wong A., Choi K-C., Kang S K., and Leung P., Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology and Pathology, *Endocrine Reviews*, 22:255-288, 2001.
5. Barboni B., Turriani M., Galiati G., Spinaci M., Bacci M., Forni., and Mattioli M., Vascular endothelial growth factor production in growing pig antral follicles, *Biol Reprod*, 63: 858-864.
6. Binder D., and Sharfman H., Brain -derived Neurotrophic Factor, *Growth Factors*, 22(3): 123–131, 2004.
7. Brown m R., Blanchette J O., ans Kohn E C., Angiogenesis in ovarian cancer, *Best Practice and Research- Clin Obst and Gynecol*, 14(6): 901-918, 2000.
8. Calzá L., Giardino I., Giuliani A., Aloe L., and Levi- Montalcini R., Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors, *PNAS*, 98: 4160- 4165, 2001.
9. Campos X., Participación de TrkA y gonadotropinas en la expresión de VEGF en cáncer ovárico epitelial, Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al Grado Académico de Doctor en Bioquímica, 2007.
10. Cantarella G., Lempereur L., Presta M., Ribatti D., Lombardo G., Lazarovici P., Zappala G., Pafumi C., and Bernardini R., Nerve growth factor endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo, *FASEB*, 16:1307-1309, 2002.
11. Choi J., Wong A., Huang H., and Leung P., Gonadotropins and Ovarian Cancer, *Endocrine Reviews*, 28(4):440–461, 2006.
12. Danforth D R., Arbogast L K., Ghosh S., Dickerman A., Rofagha R., and Friedman CI., Vascular endothelial growth factor stimulated preantral follicle growth in the rat ovary, *Biol Reprod*, 68: 1736-1741, 2003.
13. Dissen, G.A., Newman Hirshfield, A., Malamed, S., Ojeda, S.R., Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis, *Endocrinology*, 136: 4681– 4692, 1995.

14. Dissen G., Romero C., Paredes A., and Ojeda S., Neurotrophic control of ovarian development, *Microsc. Res Tech*, 59: 509-515, 2002.
15. Ferrara N., Role of vascular endothelial growth factor in regulation of physiological angiogenesis, *Am J Physiol Cell Physiol*, 280: C1358-C1366, 2001.
16. Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, and Tan OL, Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses, *MCE*, 247: 4-21, 2006.
17. Fraser H M., and Wuff CH., angiogenesis in the primate ovary, *Reprod Fertil Dev*, 13: 557-566, 2001.
18. Geneser F., 2000, Órganos de la Reproducción, "Histología" 3ª Edición, Editorial Médica Panamericana, p. 615.
19. Han L., Zhang Z., Qin W., and Sun W., Neurotrophic Receptor TrkB: Is it a predictor of poor prognosis for carcinoma patients?
20. Jordan S, Green A and Webb P, Benign Epithelial Ovarian Tumours- Cancer Precursors or Markers for Ovarian Cancer Risks?, *Cancer Causes Control*, 17:623-632, 2006.
21. Kaczmarek M., Schams D., and Ziecik A., Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology - an overview, *Reproductive Biology*, vol. 5, No. 2: 111-136, 2005.
22. Kawamura K., Kawamura N., Mulders S., Sollewjin M., and Hsueh A., Ovarian brain-derived neurotrophic factor (BDNF) promotes the development of oocytes into preimplantation embryos, *PNAS*, vol. 102, 26: 9206-9211, 2005.
23. Kermani P., and Hempstead B., BDNF: A Newly Described Mediator of Angiogenesis. *Trends Cardiovasc Med*. 17(4):140-143; 2007
24. Masood R., Cai J., Zheng T., Smith D L., Hinton D R., and Parkash S G., Vascular endothelial growth factor (VEGF) is an autocrine growth factor for VEGF receptor positive human tumors, *Blood*, 98: 1904-1913, 2001.
25. Mattioli M., Barboni B., Turriani M., Galeati G., Zannoni A., Castellani G., Berardinelli p., and Scapolo P A., Follicle activation involves vascular endothelial growth factor production and increased blood vessel extension, *Biol Reprod*, 695: 1014-1019, 2001.
26. McMahon G., VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis, *The Oncologist*, 5: 3-10, 2000.
27. Medina L., Ernesto y Kaempffer R., Ana M., Mortalidad por cáncer en Chile: consideraciones epidemiológicas. *Rev. Méd. Chile [online]*. 2001, vol 129, n.10, pp. 1195-1202.

28. Muñoz M., Detección del Receptor trkA como posible marcador pronóstico y de progresión en Cáncer Ovárico Epitelial (COE), Tesis para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Año 2008.
29. Murdoch W. and McDonnell A., Roles of the Ovarian Surface Epithelium in Ovulation and Carcinogenesis, *Reproducción*, 123: 743-750, 2002.
30. Nakagawara A., Trk Receptor Tyrosine Kinases: A Bridge Between Cancer and Neural Development, *Cancer Letters*, 169: 107-114, 2001.
31. Nakamura K., Martin K., Jackson J., Beppu K., Woo C. and Thiele C., Brain- Derived Neurotrophic Factor Activation of TrkB Induces Vascular Endothelial Growth Factor Expression via Hypoxia- Inducible Factor- 1 $\alpha$  in Neuroblastoma Cells.
32. Pahlman S. and Hoehner J., Neurotrophin Receptors, Tumor Progression and Tumor Maturation, *Molecular Medicine Today*, 432-438, 1996.
33. Price DJ., Miralem T., Jiang Sh., Steinberg R., and Avraham H., Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells, *Cell Growth and Differentiation*, 12: 129-135, 2001.
34. Scully R., Classification of Human Ovarian Tumors, *Environmental Health Perspectives*, 73: 15-24, 1987.
35. Seifer D. B., Feng, B., Shelden, R., Immunocytochemical evidence for the presence and location of the neurotrophin-Trk receptor family in adult human preovulatory ovarian follicles *J. Clin. Endocrinol. metab.* 87: 655-659, 2002.
36. Shelton D., Sutherland J., Gripp J., Camerato T., Armanini M., Phillips H., Carroll K., Spencer S., and Levinson A., Human trks: Molecular Cloning, Tissue Distribution, and Expression of Extracellular Domain Immunoadhesins, *The Journal of Neuroscience*, 15(1): 477-491, 1995.
37. Shibuya M., Structure and function of VEGF/ VEGF receptor system involved in angiogenesis, *Cell Structure and Function*, 26: 25-35, 2001.
38. Shiffenbauer Y., Abramovitch R., Meir G., Nevo N., Holzinger M., Itin A., Keshet E., and Neeman M., Loss of ovarian function promotes angiogenesis in human ovarian carcinoma, *PNAS*, 94: 13203-13208, 1997.
39. Shih I. and Kurman R., Ovarian Tumorigenesis: A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis, *Am J Pathol*, 164(5):1511- 1518, 2004.
40. Wang FQ., So J., Reierstad S., Fishman DA., Vascular endothelial growth factor- regulated ovarian cancer invasion and migration involves expression and activation of metalloproteinases, *Int J Cancer*, 118 (4): 879-888, 2006.

41. Wiesmann C. and De Vos A., Nerve Growth Factor: Structure and Function, *Cell Mol. Life Sci.*, 58:748-759, 2001.
42. Yu X., Liu L., Cai B., He Y., and Wan X., Suppression of anoikis by the neurotrophic receptor TrkB in human ovarian cancer, *Cancer Sci* , vol. 99, no. 3: 543–552, 2008.
43. Zhang A., Meng L., Wang Q., Xi L., Chen G., Wang S., Zhou J., Lu Y., and Ma D., Enhanced in vitro invasiveness of ovarian cancer cells through up- regulation of VEGF and induction of MMP-2, *Oncol Rep*, 15(4): 831-836, 2006.

## ANEXO 1

**Consentimiento informado para obtención de muestras de ovario normal, tumores benignos y cáncer ovárico epitelial embebidos en parafina** (Tacos) del Servicio de Anatomía Patológica.

Nombre del Proyecto: **Participación del receptor trka y su ligando, el factor de crecimiento nervioso (NGF), en la génesis y progresión del cáncer ovárico epitelial**

Investigador Responsable: Carmen Romero Osses  
Profesor Asociado Depto. Obstetricia y Ginecología  
Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva  
Hospital Clínico Universidad de Chile

Se me ha explicado que durante la cirugía ginecológica que me realizaron, procedimiento que fue parte de mi tratamiento, se obtuvo tejido ovárico, el cual fue enviado al Servicio de Anatomía Patológica para su estudio histológico. Se me ha solicitado donar una parte de este tejido que está en parafina después del informe histopatológico, para un proyecto de investigación donde se está estudiando el mecanismo de la angiogénesis en el ovario normal y cáncer ovárico epitelial. También se me explicó que este material biológico si no es utilizado para esa investigación queda en forma permanente en el Servicio de Anatomía Patológica. Estoy de acuerdo en participar en este estudio y doy mi consentimiento para que utilicen este material, ya que de esta manera ayudo en el conocimiento científico, lo que a su vez en el futuro, puede ser de gran ayuda para las mujeres con cáncer ovárico.

Yo entiendo que:

- a) Cuando me practicaron la cirugía ginecológica, procedimiento que realizó mi médico tratante, como parte de mi tratamiento, se obtuvo tejido ovárico para el estudio histológico (biopsia). Una vez que la biopsia se haya realizado, parte de este tejido, se utilizará para los análisis de este estudio, lo que no interferirá en mi tratamiento. El que se utilice este material biológico para este estudio, no implica ningún riesgo para mí.
- b) Cualquier pregunta que yo quiera hacer en relación en mi participación en este estudio deberá ser contestada por la investigadora responsable del proyecto o por mi médico tratante.
- c) Yo podré negarme a participar de este estudio en cualquier momento sin ser obligada a dar razones y sin que esto me perjudique en mi calidad de paciente o usuaria del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.
- d) Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelado y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial, a menos que mi identidad se solicitada por ley.
- e) El tejido ovárico se utilizará única y exclusivamente en los estudios que estoy autorizando a través de este documento.
- f) Mi consentimiento está dado voluntariamente, sin que haya sido forzada u obligada.

---

Firma del Investigador Principal o

Médico tratante

---

Firma de la Paciente

Representante Legal

**Consentimiento informado para obtención de tejido ovárico de pacientes con cáncer de ovario o de pacientes que deben realizarse histerectomía con ooforectomía por indicación médica**

Nombre del Proyecto: **Participación del receptor trka y su ligando, el factor de crecimiento nervioso (NGF), en la génesis y progresión del cáncer ovárico epitelial**

Investigador Responsable: Dra. Carmen Romero Osses  
Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva  
Hospital Clínico Universidad de Chile

Mi médico tratante me ha explicado que, como parte del tratamiento de mi enfermedad, debo someterme a una operación para extirpar uno o mis dos ovarios. Se me ha solicitado donar parte del tejido ovárico para un proyecto de investigación donde se está estudiando los mecanismos moleculares del cáncer ovárico epitelial, es decir como se regula la expresión de factores angiogénicos en estos tejidos. Estoy de acuerdo en participar en este estudio, y doy mi consentimiento para que utilicen parte de mi tejido ovárico, ya que de esta manera ayudo en el conocimiento científico, lo que a su vez en el futuro, puede ser de gran ayuda para las mujeres con cáncer ovárico.

Yo entiendo que:

- g) Cuando me practiquen la biopsia, procedimiento que ha indicado el médico, como parte de mi tratamiento, se obtendrá una muestra de mi tejido ovárico. De esa muestra se utilizará para los análisis de este estudio, lo que no interfiere en nada con los otros análisis que requiere mi médico tratante.
- h) El que se utilice parte del tejido en este estudio, no implica ningún riesgo para mí.
- i) Cualquier pregunta que yo quiera hacer en relación en mi participación en este estudio deberá ser contestada por la Dra. Carmen Romero Osses, que es la Investigadora Responsable del Proyecto o por los Doctores Alberto Selman y/o Rodrigo Yazigi, co-investigadores del proyecto.
- j) Yo podré negarme a participar de este estudio en cualquier momento sin ser obligada a dar razones y sin que esto me perjudique en mi calidad de paciente o usuaria del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.
- k) Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelado y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial, a menos que mi identidad se solicitada por ley.
- l) Mi tejido ovárico se utilizará única y exclusivamente en los estudios que estoy autorizando a través de este documento.
- m) Mi consentimiento está dado voluntariamente, sin que haya sido forzada u obligada.
- n) Cualquier pregunta que yo quiera hacer con relación a mi participación en este estudio deberá ser contestada por la Dra. Carmen Romero Osses que es la investigadora Responsable del Proyecto o por los Doctores Alberto Selman y/o el Dr. Roberto Yasigi, co-investigadores del proyecto.

Si usted desea hacer alguna consulta acerca de este estudio, puede llamar a la Dra. BQ. Carmen Romero O ., al teléfono 6788304

---

Firma del Investigador Principal o Médico tratante

---

Firma de la Paciente o Representante Legal