

**UNIVERSIDAD DE CHILE**

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACEUTICAS



**“ISOFORMAS DEL RECEPTOR TRKA Y SU RELACIÓN CON  
ADAM17 EN EL CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL”**

**Tesis presentada a la Universidad de Chile  
para optar al grado académico de Magister en Bioquímica, área de  
especialización en Bioquímica Clínica y  
Memoria para optar al título profesional de Bioquímica**

**Por:**

**SILVANNA ANDREA GIRARDI SILVA**

**Directora de Tesis**

**Dra. Carmen Romero Osses**

**SANTIAGO- CHILE  
2011**

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

**INFORME DE APROBACIÓN**  
**TESIS DE MAGISTER**

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

**SILVANNA ANDREA GIRARDI SILVA**

Ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Bioquímica área de especialización Bioquímica Clínica y al título de Bioquímica, en el examen de defensa de Tesis rendido el día **27 de Diciembre** de 2011.

**Directores de Tesis:**

Dra. Carmen Romero Osses \_\_\_\_\_

**Comisión Informante de Tesis:**

Dr. Yedi Israel J. (Presidente) \_\_\_\_\_

Dra. Jenny Fiedler T. \_\_\_\_\_

Dr. Arturo Ferreira V. \_\_\_\_\_

*Dedicada a mi mamá María Cristina, mi hermana Daniella,  
mis tatas Carmen y José, y mis amigas Fernanda, Mariela y Karen,  
por todo su apoyo durante estos años*

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a los profesores miembros de mi comisión de tesis, por sus consejos y apoyo durante el período de realización de ella, en especial a mi directora de tesis, la Dra. Carmen Romero, quien me ha enseñado y permitido aprender y mejorar como profesional y persona. Asimismo, le doy las gracias a la Dra. Margarita Vega por su ayuda y paciencia en la corrección de resúmenes y presentaciones. Muchas gracias a las dos por acogerme y guiarme en estos años de tesis.

También a todos los que forman parte del Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del Hospital Clínico de la Universidad, tanto a los tesisistas como a los profesionales que trabajan en él, por sus consejos y por el ambiente que siempre hubo, haciendo grato el ir a trabajar diariamente. Gracias Karla, Francisca, Carlos, Christopher, Nahum, Andrea, Paulina y Rodrigo. Gracias también a los profesores Jaime, Verónica y Egardo, así como a todo el resto de los que forman parte del laboratorio. Me gustaría agradecer especialmente a Carolina, por su amistad y ayuda durante todo el Magíster, especialmente durante los años de tesis.

Quisiera agradecer también el apoyo incondicional de mi familia, de mi mamá Cristina, de mi hermana Daniella, y de mis tatas queridos, Carmen y José, durante toda mi vida, en especial durante aquellos momentos más difíciles que hemos vivido juntos.

Y, por supuesto, a mis queridas amigas Fernanda, Mariela y Karen, que me han acompañado en tantas cosas. Hemos pasado por mucho, y aprecio enormemente que siempre me hayan escuchado y ayudado a dejar de pensar en tesis, experimentos y reacciones.

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	iv
<b>ABREVIATURAS</b> .....	vii
<b>RESUMEN</b> .....	x
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
Cáncer ovárico .....	13
Neurotrofinas en el ovario .....	16
Relación de TRKA con el cáncer de ovario .....	19
ADAM17/TACE (TNF- $\alpha$ Converting Enzyme) .....	20
ADAM17 en cáncer .....	23
TRKA y ADAM17 .....	25
<b>HIPÓTESIS</b> .....	28
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	29
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	30
<b>METODOLOGIA</b> .....	31
Obtención de muestras .....	31
Líneas celulares .....	32
Análisis estadístico.....	32
Diseño experimental .....	34
Metodología de Experimentos <i>ex vivo</i> .....	34
Metodología de Experimentos <i>in vitro</i> .....	34
Análisis de las Muestras.....	35
Extracción de RNA y RT-PCR para <i>TRKA</i> en tejidos ováricos humanos .....	35
<i>Western blot</i> de TRKA y ADAM17 en tejidos ováricos .....	37
Inmunohistoquímica de ADAM17 en tejidos ováricos .....	39
Líneas Celulares epiteliales .....	40

Inmunocitoquímica de TRKA y ADAM17 en líneas celulares .....	40
Inmunofluorescencia de TRKA y ADAM17 en líneas celulares .....	42
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>44</b>
OBJETIVO 1. ISOFORMAS DEL RECEPTOR TRKA EN OVARIO.....	44
RT- PCR convencional de <i>TRKA</i> en tejidos ováricos y en línea celular de cáncer ovárico epitelial.....	44
<i>Western blot</i> de TRKA en tejidos ováricos.....	46
OBJETIVO 2. NIVELES DE ADAM17 EN OVARIO, Y SU RELACIÓN CON TRKA..	51
OBJETIVO 3. LOCALIZACIÓN CELULAR DE ADAM17 Y TRKA.....	58
OBJETIVO 4. EFECTO SOBRE TRKA DEL USO DE UN INHIBIDOR DE ADAM17 .....	65
<b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b> .....	<b>68</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>74</b>

## ABREVIATURAS

<b>ADAM17</b>	: A-Disintegrin-And-Metalloproteinase 17
<b>ALCAM</b>	: Molécula de adhesión celular activada por leucocitos (del inglés <i>Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i> )
<b>ANOVA</b>	: Análisis de varianza (del inglés <i>Analysis Of Variance</i> )
<b>BDNF</b>	: Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés <i>Brain-Derived Neurotrophic Factor</i> )
<b>BSA</b>	: Albúmina de suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>cDNA</b>	: Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés <i>Complementary Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>COE</b>	: Cáncer ovárico epitelial
<b>COE I</b>	: Cáncer ovárico epitelial con grado de diferenciación I
<b>COE II</b>	: Cáncer ovárico epitelial con grado de diferenciación II
<b>COE III</b>	: Cáncer ovárico epitelial con grado de diferenciación III
<b>DAB</b>	: 3,3'-Diaminobencidina
<b>DAPI</b>	: 4',6-diamidino-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	: Medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>dNTP</b>	: Desoxinucleótidos trifosfato (del inglés <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> )
<b>DTT</b>	: Ditioneitol
<b>EEM</b>	: Error estándar de la media
<b>EGF</b>	: Factor de Crecimiento Epidermal (del inglés <i>Epidermal Growth Factor</i> )
<b>EGFR</b>	: Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
<b>ERK</b>	: Quinasas reguladas por señal extracelular (del inglés <i>Extracellular-signal-Regulated Kinases</i> )
<b>HAM's F12</b>	: Fórmula 12 de Ham
<b>HOSE</b>	: Epitelio de la superficie ovárica humana (del inglés <i>Human Ovarian Surface Epithelium</i> )
<b>HUVEC</b>	: Células endoteliales de la vena de cordón umbilical humano (del inglés <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> )
<b>mRNA</b>	: Ácido ribonucleico mensajero (del inglés <i>Messenger Ribonucleic Acid</i> )

<b>MAPK</b>	: MAP quinasas (del inglés <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> )
<b>MMP</b>	: Metaloproteinasas de Matriz (del inglés <i>Matrix metalloproteinases</i> )
<b>NGF</b>	: Factor de Crecimiento Nervioso (del inglés <i>Nerve Growth Factor</i> )
<b>NT-3</b>	: Neurotrofina 3
<b>NT-4/5</b>	: Neurotrofina 4/5
<b>OI</b>	: Ovario normal Inactivo
<b>P75</b>	: Receptor de neurotrofinas p75 (del inglés <i>p75 Neurotrophin Receptor</i> )
<b>pb</b>	: Pares de bases
<b>PBS</b>	: Solución tampón de fosfato (del inglés <i>Phosphate Buffer Solution</i> )
<b>PCR</b>	: Reacción de polimerasa en cadena (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PFA</b>	: Paraformaldehído
<b>PI3K</b>	: Fosfoinositol 3-quinasa (del inglés <i>Phosphoinositide 3-Kinase</i> )
<b>PKA</b>	: Proteína quinasa A (del inglés <i>Protein Kinase A</i> )
<b>PKC</b>	: Proteína quinasa C (del inglés <i>Protein Kinase C</i> )
<b>PMA</b>	: Acetato de Forbol Miristato (del inglés <i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i> )
<b>PMSF</b>	: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés <i>Phenylmethylsulfonyl Fluoride</i> )
<b>RNA</b>	: Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic Acid</i> )
<b>RT-PCR</b>	: Retrotranscripción acoplada a la reacción de polimerasa en cadena (del inglés <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>TACE</b>	: Enzima convertidora de TNF $\alpha$ (del inglés <i>TNF-<math>\alpha</math> Converting Enzyme</i> )
<b>TAPI-0</b>	: Inhibidor de la actividad de ADAM17 (del inglés <i>TNF-<math>\alpha</math> Protease Inhibitor-0</i> )
<b>TBE</b>	: Tumor Benigno
<b>TBO</b>	: Tumor Borderline
<b>TGF-<math>\alpha</math></b>	: Factor de Crecimiento Transformante $\alpha$ (del inglés <i>Transforming Growth Factor <math>\alpha</math></i> )
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	: Factor de Necrosis Tumoral $\alpha$ (del inglés <i>Tumoral Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> )
<b>TRKA</b>	: Receptor tirosina quinasa A (del inglés <i>Tyrosine Receptor Kinase A</i> )
<b>TRKA-p</b>	: Receptor tirosina quinasa A fosforilado
<b>TRKB</b>	: Receptor tirosina quinasa B (del inglés <i>Tyrosine Receptor Kinase B</i> )

**TRKC** : Receptor tirosina quinasa C (del inglés *Tyrosine Receptor Kinase C*)  
**TTBS** : Solución salina de Tris con Tween (del inglés *Tween Tris-buffered Salt Solution*)  
**UA** : Unidades arbitrarias  
**VEGF** : Factor de crecimiento de endotelio vascular (del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*)

## RESUMEN

El receptor de alta afinidad de la neurotrofina NGF, TRKA, ha sido asociado con distintos tipos de cáncer, pudiendo encontrarse isoformas de este receptor. En el cáncer ovárico no se han descrito isoformas de este receptor, sin embargo, se ha determinado un aumento de la forma activa de TRKA, relacionándolo con una baja supervivencia. En una línea celular de ovario de hámster chino, el ectodominio de TRKA puede ser liberado mediante un corte proteolítico, quedando activado constitutivamente un fragmento del receptor formado por los dominios intracelular y transmembrana. La detección de este fragmento disminuye al expresar una forma inactiva de ADAM17 (una de las proteasas más estudiadas de la familia de proteínas ADAMs).

Estos antecedentes llevaron a postular que en el cáncer ovárico epitelial humano se expresan isoformas del receptor TRKA, siendo una o más de ellas, cortada por ADAM17, resultando en la detección de una forma proteica fosforilada adicional del receptor, constituida sólo por sus dominios intracelular y transmembrana.

Para lograr los objetivos de este trabajo se realizaron experimentos *ex-vivo* en muestras de tejidos ováricos humanos, con el fin de determinar la presencia de transcritos e isoformas del receptor TRKA, además de los niveles proteicos de ADAM17. También, se realizaron experimentos *in-vitro* con líneas celulares de ovario humano, para evaluar las isoformas de TRKA que experimentan un corte por efecto de ADAM17.

Resultados de este trabajo mostraron la presencia de tres transcritos del receptor TRKA en ovario, con mayores niveles en muestras de cáncer más avanzado. Detectamos tres isoformas de este receptor en muestras de ovario y, adicionalmente, una isoforma de TRKA-p de 41kDa, cuyos niveles se encuentran aumentados en muestras de cáncer ovárico. Adicionalmente, encontramos mayores niveles proteicos de ADAM17 en muestras de cáncer ovárico avanzado, en comparación con muestras de tumores borderline. También se encontró una correlación positiva entre los niveles proteicos de ADAM17 y de TRKA en cáncer ovárico e, interesantemente, se observó

una sobreposición (“*merge*”) de las tinciones de ambas proteínas al realizar la Inmunofluorescencia.

Nuestros resultados muestran por primera vez la presencia de tres transcritos e isoformas de TRKA en ovario humano, además de una forma corta de TRKA-p (41 kDa), posiblemente producto de un corte proteolítico por la potencial acción de ADAM17.

La presencia de una isoforma truncada fosforilada del receptor TRKA en cáncer ovárico epitelial tendría gran utilidad clínica, ya que podría servir como marcador pronóstico y como posible blanco terapéutico.

## **SUMMARY**

TRKA is the high affinity receptor for the neurotrophin NGF. There are reports about isoforms of this receptor, but so far none have been detected in ovary. Phosphorylated TRKA receptor (p-TRKA) is highly expressed in epithelial ovarian cancer; nevertheless, it is not known if TRKA is post-translationally processed to smaller molecular forms in ovarian carcinoma. Earlier studies in cell lines have shown that TRKA is proteolytically cleaved by the metalloprotease ADAM17, resulting in an isoform containing the phosphorylated transmembrane and cytosolic domains of the receptor.

Therefore, the aim of this study was the detection of isoforms of TRKA receptor in epithelial ovarian cancer, being one or more of them cleaved by ADAM17, resulting in an additional phosphorylated form of TRKA, containing its transmembrane and cytosolic domains.

We analyzed the TRKA mRNA and protein levels, as well as protein levels of ADAM17, in human tissues. We also studied the cellular localization of these proteins in human cell lines.

Using PCR analysis, we found three transcripts of TRKA in ovary, with higher levels in poorly differentiated epithelial ovarian cancer tissues. On the other hand, we found three isoforms of the receptor, as well as an additional form of 41 kDa by *Western blot*, with higher levels of these isoforms of TRKA in cancer samples.

When ADAM17 was evaluated in ovarian tissues by immunohistochemistry, we found that this protein was mostly seen in epithelial cells, and a progressive increase in protein abundance with the progression of epithelial ovarian cancer. We also found a positive correlation between ADAM17 and TRKA protein levels in ovarian cancer, as well as a merge between both proteins by immunofluorescence.

These results show for the first time the presence of isoforms of TRKA in ovary, as well as an additional form of 41 kDa of the receptor. Besides, ADAM17 and the different isoforms of the TRKA receptor levels were found to be higher in more advanced stages of the disease. Also, a positive correlation was found between ADAM17 and TRKA receptor levels during different stages of ovarian cancer.

This additional phosphorylated form of the TRKA receptor found in ovarian cancer tissues may be of great clinical significance, since it could be used as a new therapeutic target.

## INTRODUCCIÓN

### Cáncer ovárico

El ovario está formado por una corteza externa y una médula interna. Rodeándolo, está el epitelio de superficie del ovario (ESO), que en las mujeres maduras es una monocapa de células mesoteliales de forma plana a cuboidal, que se encuentra separada del estroma ovárico por una membrana basal (Fleming y cols., 2006; Auersperg y cols., 2001). El cáncer ovárico posee la mayor mortalidad de todas las neoplasias ginecológicas en EE.UU., ocupando el quinto lugar en mortalidad de todos los tipos de cáncer que aquejan a las mujeres (Cancer statistics, 2011). En Chile, de acuerdo a datos del Ministerio de Salud, el cáncer de ovario ocupa el noveno lugar entre las principales causas de muerte por cáncer en la mujer, siendo, además, el segundo en mortalidad de neoplasias ginecológicas, según estadísticas del año 2001 (Programa Nacional del Cáncer, Ministerio de Salud).

Dado que los ovarios son un tejido formado por una gran variedad de componentes, el cáncer ovárico es grandemente heterogéneo, tanto a nivel celular como molecular. Este tipo de cáncer se puede desarrollar a partir de células germinales, células de la granulosa o, más comúnmente, en más de un 90% de los casos, a partir de las células epiteliales que forman la superficie ovárica (Bast y cols., 2009). En este caso, a la enfermedad se le denomina cáncer ovárico epitelial o COE. Un factor preponderante en que el carcinoma ovárico epitelial sea el cáncer ginecológico más letal, es que dos tercios de las pacientes son diagnosticadas cuando ya están en estados avanzados de la enfermedad, lo que hace que la supervivencia a los 5 años sea de un 46% (Cancer statistics, 2011). Además, la mayoría son inoperables cuando son descubiertos, y poseen una mala respuesta a la terapia. No sólo ello, si no que los métodos disponibles actualmente para la detección temprana de las pacientes no son lo suficientemente confiables.

Aunque al cáncer ovárico se le considera un asesino silencioso, más del 80% de las

pacientes presentan síntomas, incluso cuando la enfermedad aún está limitada a los ovarios (Goff y cols., 2000). Sólo un 11% de las pacientes que fueron diagnosticadas en estados más tempranos de la enfermedad, no presentaron síntomas antes de que esta fuera detectada (Goff y cols., 2000). En cuanto a las mujeres con estados avanzados de cáncer ovárico, sólo fue un 3%. El inconveniente se encuentra en que los síntomas presentados son comunes a varios problemas gastrointestinales, genitourinarios y ginecológicos, lo cual hace que no sean útiles como forma temprana de diagnóstico (Bast y cols., 2009; Goff y cols., 2000).

Luego de la ruptura de los folículos maduros para liberar los oocitos, ocurre una proliferación de células epiteliales, como forma de reparar el daño que se produjo en la superficie ovárica (Bast y cols., 2009). La ovulación, además, es importante en el desarrollo de quistes de inclusión, a partir de los cuales también se origina una fracción importante de cáncer ovárico. Es por ello, que los factores que aumentan el número de ciclos ovulatorios aumentan también el riesgo de desarrollar cáncer ovárico (Bast y cols., 2009). Ejemplo de esto son una edad temprana de menarquia, una menopausia tardía e infertilidad. Por otra parte, los factores que disminuyen la ocurrencia de ciclos ovulatorios disminuyen el riesgo de desarrollar cáncer ovárico. Entre éstos se encuentran los embarazos múltiples, la lactancia prolongada y el uso de anticonceptivos orales (Bast y cols., 2009).

Existen diversas hipótesis que buscan explicar el desarrollo del cáncer ovárico epitelial. Entre ellas están:

- La ovulación incesante, por los motivos expuestos anteriormente.
- Una elevada exposición a gonadotrofinas. Esto produce un aumento en la producción de estrógenos de parte de las células del epitelio de la superficie ovárica (Fleming y cols., 2006).
  - Un exceso de estimulación androgénica sobre el epitelio de la superficie ovárica (Fleming y cols., 2006).
- Inflamación local en los ovarios, lo que lleva a la producción de moléculas pro-

inflamatorias y citoquinas, que inducen remodelamiento (Fleming y cols., 2006).

- Incapacidad de llevar a cabo la conversión epitelio-mesénquima de células del epitelio de la superficie ovárica, lo cual llevaría a agregación de estas y formación de quistes (Auersperg y cols., 2001).

El cáncer ovárico epitelial se puede clasificar de distintas formas, como según el tipo celular tumoral (Bast y cols., 2009), su progresión (Murdoch y McDonnel, 2002), o según su grado histológico de diferenciación. En este último caso, se tiene la siguiente clasificación:

**Cáncer Ovárico Epitelial de grado I o COE I (bien diferenciado):** se observan estructuras papilares irregulares con malignidad celular, epitelio pseudoestratificado y algunos focos de invasión.

**Cáncer Ovárico Epitelial de grado II o COE II (moderadamente diferenciado):** existe una disminución de estructuras papilares, debido a la presencia de zonas indiferenciadas. Se observan núcleos atípicos, y aumentan los focos de invasión.

**Cáncer Ovárico Epitelial de grado III o COE III (pobrementemente diferenciado):** se encuentra una masa pobrementemente diferenciada, con pleomorfismo celular y nuclear, y con bastantes focos de invasión (Oliva y cols., 2005).

A pesar de los avances en las terapias, el cáncer ovárico sigue siendo el más letal de las malignidades ginecológicas debido, principalmente, a que su diagnóstico es muy tardío. Actualmente, tan sólo el 20% de las pacientes son diagnosticadas cuando su enfermedad aún está limitada a los ovarios. La importancia del desarrollo de un método de *screening* eficaz para la detección del cáncer ovárico, es que en esta etapa hay hasta un 90% de probabilidades de cura utilizando las terapias disponibles. Una vez que ya ha ocurrido la metástasis hacia los órganos pélvicos, abdomen o más allá de la cavidad peritoneal, la probabilidad de cura disminuye significativamente (Bast y cols., 2009).

De los marcadores séricos existentes para el cáncer de ovario, la glicoproteína de superficie CA125 es uno de los más estudiados, aunque no posee la sensibilidad ni especificidad para ser usado por sí sólo como un test de *screening*, al medirlo una única vez (Bast y cols., 2009). Esto, ya que posee una sensibilidad estimada del 45% y una especificidad del 93%, de 1 a 5 años antes del diagnóstico, para mujeres de más de 50 años (Bjørge y cols., 2004). Aunque estos valores son adecuados, de todas formas se hace necesario encontrar un marcador más propicio para su uso clínico (Palmer y cols., 2008). Hartge, 2010, encontró que los niveles sanguíneos de los marcadores estudiados, entre los cuales estaba CA125, no aumentaban lo suficientemente temprano, presentando una señal fuerte no antes de 1 año antes de la presentación de los síntomas que hacían posible el diagnóstico. Ese tiempo es claramente insuficiente, puesto que para entonces ya muchos carcinomas presentan una alta malignidad. Además, como solamente el 80% de los cáncer ováricos expresan CA125, se necesitan marcadores adicionales para detectar los estados tempranos de la enfermedad (Bast y cols., 2009). Se han hecho varios intentos por encontrar un marcador que permita diagnosticar de forma suficientemente temprana a las pacientes afectadas por cáncer ovárico epitelial. Es así, que en años recientes se han llevado a cabo varios estudios de genómica y proteómica, con el fin de buscar marcadores para varias enfermedades, entre las cuales se encuentra el cáncer ovárico, investigando también el uso de combinaciones de ellos (Palmer y cols., 2008; Mor y cols., 2005). Un problema que se ha encontrado en estas investigaciones, es que los marcadores aumentan de forma importante sólo desde un año antes de que se presentan los síntomas, momento en el cual el cáncer ya ha alcanzado un grado de malignidad importante (Hartge, 2010).

### **Neurotrofinas en el ovario**

En cuanto al tejido ovárico normal, las células del epitelio de la superficie ovárica poseen numerosos receptores (Auersperg y cols., 2001). Además, el ovario expresa las neurotrofinas NGF, BDNF, NT-3 y NT-4/5, así como los receptores para cada una

de ellas (p75, TRKA, TRKB y TRKC) (Dissen y cols., 2002). Tanto NGF como su receptor de alta afinidad TRKA, se encuentran en las células de la granulosa de folículos pre-antrales y secundarios (Abir y cols., 2005; Salas y cols., 2006). NGF es necesario para el desarrollo folicular temprano en los ovarios de mamíferos (Dissen y cols., 2001). En células de la granulosa humanas, se ha visto que NGF induce secreción de estrógenos e inhibe la secreción de progesterona, previniendo así la luteinización temprana. Además, aumenta la expresión de receptores para FSH (Salas y cols., 2006). En células de la teca, NGF estimula la proliferación celular antes de la ruptura ovulatoria (Dissen y cols., 2000).

Aparte del rol de NGF y su receptor TRKA en la foliculogénesis y esteroidogénesis (Salas y cols., 2006), esta neurotrofina también posee un papel importante en la angiogénesis. Se ha visto que el NGF promueve este proceso en diversos tejidos como la piel, músculo esquelético, córnea y sistema nervioso central (Chiaretti y cols., 2002; Emanuelli y cols., 2002; Seo y cols., 2001; Calza y cols., 2001). Además, el NGF produce proliferación de células endoteliales. Se ha mostrado que esta neurotrofina posee un efecto mitogénico directo en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC), lo cual se logra mediante la activación de su receptor TRKA, que es expresado por estas células (Cantarella y cols., 2002).

Por otra parte, el NGF producido por las células de la granulosa ovárica, también mediante activación de TRKA, posee un efecto indirecto sobre la angiogénesis, ya que estimula la síntesis y secreción de VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*) de parte de estas células (Julio-Pieper y cols., 2009), lo cual facilita, a la vez, la vascularización del compartimento tecal de los folículos en crecimiento.

El gen del receptor TRKA humano consta de 17 exones (Greco y cols., 1996), de los cuales el exón 9 sufre *splicing* alternativo (Barker y cols., 1993), generando las isoformas TRKAI y TRKAII del receptor que, luego de unir NGF, se autofosforilan, para producir la transducción de señales vía Ras/MAPK, PI3K y/o PKC (Davidson y cols., 2003). Esto es posible, ya que el receptor TRKA posee un dominio catalítico

intracelular de tipo tirosina quinasa.

El receptor TRKA ha sido asociado con distintos tipos de cáncer, pudiendo sufrir una activación que lo vuelva oncogénico. Esto puede suceder por mutaciones puntuales, deleciones o formación de un nuevo receptor quimérico, mediante rearrreglos cromosómicos. Lo anterior tiene como resultado la activación del receptor de forma independiente de su ligando, llevando, finalmente, a la transformación celular (Tacconelli y cols., 2005).

En pacientes con leucemia mieloide aguda, se ha reportado una deleción de 75 aminoácidos de la región extracelular del receptor (Reuther y cols., 2000), que da como resultado una proteína mutada que posee actividad transformante, fosforilando y activando constitutivamente vías de señalización que se encuentran río abajo. En el carcinoma prostático se ha visto que existe un *loop* autocrino, que involucra tanto a NGF como a TRKA, y que es responsable por la progresión del tumor (Dalal y Djakiew, 1997), ya que aumenta el crecimiento y sobrevivencia de las células malignas. En carcinomas de tiroide papilares, hay rearrreglos cromosómicos, donde el dominio tirosina quinasa del gen TRKA se fusiona con secuencias de otros genes (Pierotti y cols., 1996). Esto causa que se originen oncoproteínas quiméricas, que poseen su dominio tirosina quinasa constitutivamente activo (Alberti y cols., 2003). Otro ejemplo se puede encontrar en el cáncer de mamas, donde también existe un *loop* autocrino NGF/TRKA (Alberti y cols., 2003). Se ha visto que los tumores de mama presentan una expresión elevada, tanto de TRKA como de TRKA-p, en comparación al tejido mamario normal (Lagadec y cols., 2009). Esta sobreexpresión de TRKA promueve el crecimiento celular, la migración y la invasión *in vitro*. En ratones, se ha encontrado que la sobreexpresión de TRKA aumenta el crecimiento de los tumores, la angiogénesis y la metástasis. Finalmente, en neuroblastoma humano, se identificó una variante de *splicing* alternativo de TRKA, TRKAIII, que es inducida por hipoxia, y que actúa como inductor del tumor (Tacconelli y cols., 2004).

Las proteínas TRKA y NGF se encuentran en niveles muy bajos en el epitelio de la

superficie ovárica normal, mientras que los niveles de ambas proteínas son mayores en las células epiteliales en el cáncer ovárico. (Campos y cols., 2007). Se ha visto que hay una co-expresión de NGF con moléculas que están involucradas en la angiogénesis, ya que en tumores de cáncer ovárico tanto NGF como TRKA se asocian con una alta expresión de VEGF (Davidson y cols., 2003). Posteriormente, se demostró que NGF produce un aumento en la expresión de VEGF en el carcinoma ovárico, reafirmando así la idea de que NGF está involucrado en la angiogénesis en ese tipo de cáncer (Campos y cols., 2007). Pero el rol de NGF en la angiogénesis ovárica no es sólo indirecto, mediante la regulación de la expresión de VEGF en la células epiteliales ováricas, sino que también actúa directamente sobre las células endoteliales en el carcinoma ovárico (Davidson y cols., 2003).

### **Relación de TRKA con el cáncer de ovario**

En cuanto al receptor TRKA como tal, existe una sobreexpresión de su mRNA en cáncer ovárico, en comparación con muestras de ovarios normales (Campos y cols., 2007). También se ha visto que la forma activada del receptor, TRKA-p, se expresa de forma importante (80%) en tumores, acompañándose de la expresión de TRKA-p en células endoteliales (Davidson y cols., 2003). No sólo ello, sino que además existe relación entre la expresión y activación de TRKA y una baja supervivencia en estados avanzados de cáncer ovárico epitelial (Davidson y cols., 2003).

Otro estudio posterior, mostró que la forma activa del receptor, TRKA-p, se encuentra sobreexpresada a medida que progresa el carcinoma ovárico, aumentando a partir de Cáncer Ovárico Epitelial de grado I o COE I hasta Cáncer Ovárico Epitelial de grado III o COE III (Ødegaard y cols., 2007; Tesis de Marcela Muñoz). Esta sobreexpresión de TRKA-p que se presenta en carcinomas que poseen capacidad de metástasis, implica que dicha sobreexpresión sería un evento tardío en la progresión del cáncer ovárico. Así, sería específicamente la forma activa del receptor, que está fosforilada, la que estaría relacionada con la progresión del cáncer ovárico epitelial. Por lo tanto, la expresión de NGF y TRKA en el epitelio de la superficie ovárica no solo es

importante en las primeras fases de la angiogénesis, sino que también participan en la progresión del cáncer ovárico epitelial, mediante el aumento en la expresión de VEGF, un conocido factor angiogénico, facilitando la transformación hacia un tumor que se expande rápidamente. Así, tanto NGF como TRKA cumplirían un rol clave en el proceso de transformación maligna en el cáncer ovárico epitelial (Campos y cols., 2007).

En células de neuroblastoma humano, se ha identificado una variante de *splicing* alternativo del receptor TRKA, que es inducida por hipoxia, y a la cual se llamó TRKAIII (Taconelli y cols., 2005). Esta isoforma no posee los exones 6, 7 y 9, resultando en un producto de 570 bp. La falta de estos exones no causa cambios del marco de lectura ni aparición de un nuevo codón de término. Sin embargo, la omisión de los exones 6 y 7 que codifican regiones semejantes a inmunoglobulinas extracelulares (IG-C1), además de varios dominios funcionales de N-glicosilación, produce la pérdida de los aminoácidos 192-284 (Martin-Zanca y cols., 1989). La importancia de estos dominios que se pierden, es que actúan previniendo la dimerización y consecuente activación del receptor de forma independiente del ligando (Watson y cols., 1999, Arevalo y cols., 2000). La variante de *splicing* alternativo TrkAIII, de 100 kDa, también es expresada en el timo humano. Taconelli y cols., 2007 vieron que TRKAIII posee una localización intracelular, y no de superficie. Se mostró que TRKAIII estaba activo constitutivamente, promoviendo un comportamiento tumorigénico *in vitro* e *in vivo*, al estimular la angiogénesis, sobrevida y crecimiento celular. Así, esta isoforma del receptor presenta una función oncogénica (Taconelli y cols., 2004).

### **ADAM17/TACE (TNF- $\alpha$ Converting Enzyme)**

Se ha descrito que algunas proteínas transmembrana pueden liberar su ectodominio, como resultado de la acción de proteasas o secretasas que se encuentran también en la membrana celular (Díaz-Rodríguez y cols., 2002). Algunas de las moléculas que son capaces de realizar esta acción son las proteínas ADAM. Esta familia de metaloproteinasas tiene la capacidad de realizar cuatro funciones

distintas: proteólisis, adhesión celular, fusión y señalización intracelular (Stone y cols., 1999). Como proteasas, sus principales sustratos son proteínas transmembrana, como los precursores de factores de crecimiento (Duffy y cols., 2009).

Una proteína ADAM típica contiene dominios conservados, que incluyen una secuencia señal N-terminal, un pro-péptido, un dominio metaloproteinasa (MMP), un dominio desintegrina, una región rica en cisteína, un dominio similar a EGF (*Epidermal Growth Factor*), una secuencia transmembrana, y una cola citoplasmática (Stone y cols., 1999; Blobel, 2005). De ellos, el dominio MMP está involucrado en el corte de varios ligandos unidos a membrana de importancia biológica, como TNF- $\alpha$  y todos los ligandos de EGFR (Receptor de EGF) (Blobel, 2005). Las consecuencias de la liberación del ectodominio de proteínas ancladas a la membrana varían, dependiendo de la función de la proteína que sea el sustrato.

Una de las primeras ADAMs en ser implicadas en esta acción proteolítica fue ADAM17, que libera la forma activa de TNF- $\alpha$  (*Tumor Necrosis Factor*) a partir de su precursor. Es por ello, que a ADAM17 también se le conoce como TACE (*TNF- $\alpha$  Converting Enzyme*). ADAM17 debe estar anclada a la membrana plasmática en la superficie celular para realizar correctamente su función y, además, actúa sólo sobre sustratos que están ubicados en la misma célula (Reddy y cols., 2000).

Otros factores de crecimiento que también son liberados por ADAM17 son los ligandos de EGFR (*Epidermal Growth Factor-Receptor*), como TGF- $\alpha$  (*Transforming Growth Factor*) y HB-EGF (*Heparin-Binding Epidermal Growth Factor*) (Blobel, 2005).

ADAM17 parece tener un rol importante en el desarrollo embrionario, ya que ratones con actividad deficiente de ADAM17 mueren en estados tardíos de gestación, o a los pocos días de nacer (Peschon y cols., 1998), debido a defectos en la maduración y diferenciación de células epiteliales, llevando a un desarrollo ineficiente de intestinos, paratiroides, glándulas salivales, pulmón y corazón (Shi y cols., 2003, Zhao y cols., 2001).

También se ha visto que ADAM17 es expresada por células endoteliales (Gutiérrez-López y cols., 2011), lo cual llevó a estudios sobre su posible rol en la angiogénesis, tanto *in vitro* como *in vivo*. En el primer caso, al hacer un *knock down* o silenciar ADAM17 en células endoteliales, se vio una inhibición de la proliferación, además de una disminución de la capacidad de invasión celular (Gooz y cols., 2009, Kwak y cols., 2009). En cuanto a estudios *in vivo*, los resultados de Canault y cols., 2010 realizados en fetos de ratones que poseían una mutación en la actividad de ADAM17, sugieren que la actividad de esta proteína no es requisito para la vasculogénesis o angiogénesis temprana, pero sí lo es para el remodelamiento adecuado de vasos preexistentes, así como también para la formación de las redes de capilares.

Aún se desconoce con certeza cómo funciona la regulación de la actividad de ADAM17. Se sabe que su dominio citosólico puede asociarse con distintas proteínas, regulando así su función, tanto positiva como negativamente. Como ejemplo del primer caso, PMA (Acetato de Forbol Miristato) modula la interacción de ADAM17 con FHL2, (Canault y cols., 2006) una proteína intracelular involucrada en interacciones proteína-proteína y en su asociación con el citoesqueleto. Un ejemplo del segundo caso es CD9, que se asocia a la metaloproteínasa, regulando negativamente su actividad (Gutiérrez-López y cols., 2011).

Los ésteres de forbol son activadores de la proteína quinasa C (PKC), y se han utilizado ampliamente para inducir el clivaje de proteínas de la superficie celular (Arribas y Merlos-Suárez, 2003). Esto hizo que se propusiera que PKC participa en el corte activado por ADAM, lo cual fue confirmado luego al tratar células con inhibidores de PKC, observándose un bloqueo del corte de distintos sustratos de ADAM17 (Mullberg y cols., 1992).

Recientemente, se ha postulado que la localización de ADAM17 puede ser un factor importante en la regulación de su actividad. Hay estudios que sugieren que la mayoría de ADAM17 endógeno y maduro puede estar localizado en un compartimento

perinuclear, con sólo un pequeño porcentaje de la proteína presente en la superficie celular (Sinnathamby y cols., 2010). Ya que se ha visto que la actividad de ADAM17 puede ser regulada por su fosforilación en Thr735, por acción de ERK 1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*) (Díaz-Rodríguez y cols., 2002), también se ha estudiado el rol de esta quinasa sobre el tráfico intracelular de ADAM17. Soond y cols., 2005 mostraron que la modificación de ADAM17 en Thr735 por efecto de ERK, es un paso clave para la maduración de la proteasa, y su subsecuente tráfico hacia la superficie celular. Ellos encontraron que ADAM17 se expresaba mayormente en el retículo endoplásmico, lugar desde el cual podría servir como un pool intracelular de ADAM17 inactivo, que puede ser movilizado y activado proteolíticamente de forma rápida, luego de que las células fueran estimuladas (Soond y cols., 2005).

### **ADAM17 en cáncer**

Se demostró primero que las células HOSE (*Human Ovarian Surface Epithelial*) secretan serina proteasas y metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs o *Matrix Metallo Proteinases*) (Kruk y cols., 1994). Posteriormente, se encontró que ADAM17 se expresa *in vivo* en células de la granulosa porcinas (Kawashima y cols., 2008) y que, mediante un mecanismo mediado por PKA, p38 MAPK y ERK1/2, se induce la expresión de esta proteasa en células del cúmulo porcinas (Yamashita y cols., 2009).

Uno de los roles más estudiados de las proteínas ADAMs es la liberación de ligandos importantes biológicamente, como TNF- $\alpha$ , EGF y TGF- $\alpha$ . Puesto que estos ligandos han sido implicados en la formación y progresión de tumores, resulta lógico pensar que ADAMs específicos también estén involucrados en esta enfermedad.

En cáncer humanos, algunas proteínas ADAMs están up-reguladas, con niveles que se correlacionan con parámetros de progresión de tumores y con mala sobrevida (Duffy y cols., 2009).

Se ha medido la expresión de ADAM17, mediante Inmunohistoquímica, en distintos cánceres humanos, encontrándola en carcinomas ováricos, de próstata y mamas (Kirkegaard y cols., 2008, Sinnathamby y cols., 2010). Además, se encontró una asociación entre la expresión de ADAM17 y de la forma citoplasmática, originada por clivaje, de HER4 (Receptor del Factor de crecimiento epidermal humano), en cáncer de mamas. Usando tanto líneas celulares de cáncer de mamas, como tumores de mamas humanos, se vio que de ADAM17, tanto a nivel de mRNA como de proteína, se encuentra aumentado en comparación con tejidos normales (McGowan y cols., 2007). Y no sólo ello, sino que esta sobre-expresión se relacionó con un aumento en la invasión y proliferación. En un estudio posterior, se encontró que los niveles elevados de ADAM17 predicen un mal pronóstico en pacientes con cáncer de mamas, de forma independiente de los factores de pronóstico convencionales para este tipo de cáncer (McGowan y cols., 2008).

ADAM17 está sobre-expresado en la superficie de una variedad de células cancerígenas. Mediante el uso de Citometría de Flujo, con un anticuerpo que reconoce el ectodominio de ADAM17, Sinnathamby y cols., 2010, mostraron que los niveles proteicos de ADAM17 se encuentran aumentados en la superficie celular de líneas celulares de cáncer ovárico (SKOV3-A2 y OVCAR3), mamas (MDA-MB-231 y MCF7), próstata (LNCaP) y colon (Colo205), mientras que en células normales de hígado y riñón, su expresión superficial es bastante baja. Ellos analizaron también los niveles de mRNA de ADAM17, mediante Real Time PCR, en líneas celulares de cáncer ovárico, encontrando un aumento leve en la expresión del mRNA sólo en algunas de ellas. Sin embargo, en estos casos ellos usaron como control RNA de células normales de hígado y riñón. Explican la ausencia de correlación entre los niveles de mRNA y proteína de ADAM17 en cáncer, sugiriendo una regulación post-traducciona l de la proteína, y no a nivel transcripcional.

En células de cáncer ovárico se ha detectado tinción positiva para ADAM17, pero no así en el epitelio normal del ovario (Tanaka y cols., 2005). Por otro lado, en otro estudio de carcinoma ovárico, se detectó ADAM17 en un 18% de las muestras analizadas, aunque no se menciona si había expresión de la proteína en el epitelio de la superficie

ovárica (Kirkegaard y cols., 2008). Además, también hay estudios que han demostrado que ADAM17 es expresada por distintas líneas celulares de cáncer ovárico epitelial, como A2780 (Rosso y cols., 2007).

Se ha descrito que los niveles del transcrito de ADAM17 son mayores que los de otras metaloproteinasas de la familia ADAM, en muestras de cáncer ovárico humano (Tanaka y cols., 2005). Al medir la expresión de ADAM17 en muestras de ovarios normales y de cáncer de ovario, se encontró que la expresión de ADAM17 aumentaba significativamente tanto en cáncer ovárico temprano como avanzado, en comparación con ovarios normales (Tanaka y cols., 2005). Sin embargo, no encontraron diferencias significativas entre los estados temprano y avanzado de cáncer.

### **TRKA y ADAM17**

ADAM17 puede cortar a p75. En neuronas simpáticas, ADAM17 es capaz de cortar a p75, para que posteriormente éste experimente un nuevo corte, por acción de una  $\gamma$ -secretasa (Kenchappa y cols., 2010). Este es un mecanismo de corte de p75 por ADAM17 distinto al encontrado en células PC12, donde la unión de NGF a su receptor TRKA es el estímulo inicial que termina con el clivaje de p75 (Ceni y cols., 2010, Urra y cols., 2007). En neuronas simpáticas, en cambio, no se detectó corte de p75 en respuesta a NGF, si no a BDNF (Kenchappa y cols., 2010). Además, el tratamiento de las células PC12 con NGF lleva a sobrevida y diferenciación, mientras que en neuronas simpáticas, el corte de p75 está asociado a apoptosis (Kenchappa y cols., 2010, Urra y cols., 2007).

El receptor TRKA es sensible a sufrir un corte proteolítico, lo cual da como resultado 2 fragmentos (Cabrera y cols., 1996). Uno de ellos es p100, que corresponde al ectodominio del receptor. El segundo fragmento es p41, que está fosforilado en tirosina y consta de los dominios transmembrana y citosólico y que, por tanto, permanece asociado a la membrana. El estudio se realizó en células CHO (Chinese Hamster Ovary) que fueron transfectadas con cDNA codificante para la forma humana del

receptor TRKA. Estas células poseían una forma glicosilada del receptor de 140 kDa, gp140<sup>TrkA</sup>, que era la forma predominante encontrada en la superficie celular, y que responde a NGF. También encontraron el polipéptido de 41 kDa en células tratadas con PMA (Acetato de Forbol Miristato), que es un activador de PKC, viendo que correspondía al fragmento intracelular y transmembrana de TRKA. Así, se demostró que el clivaje de TRKA puede ser inducido mediante la activación de sistemas de segundos mensajeros, como es la activación de PKC. Sin embargo, al usar inhibidores de PKC, el bloqueo del clivaje era sólo parcial, por lo que se dedujo que PKC regulaba el corte de TRKA de forma tanto dependiente como independiente de ERK1/2.

También, la delección del ectodominio de TRKA genera fragmentos que son activos, ya que se encuentran fosforilados constitutivamente en tirosina, junto con asociarse con moléculas que participan en la vía de transducción de señales de TRKA (Díaz-Rodríguez y cols., 1999). Además, las vías MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*) están involucradas en la regulación del clivaje de TRKA inducido por stress y mediado por PKC (Díaz-Rodríguez y cols., 2002). Este corte que experimenta TRKA estaba mediado por la vía MAPK ERK cuando el estímulo era la activación de PKC. Esta activación de ERK (*Extracellular signal-regulated kinase*) facilita la interacción de la quinasa con ADAM17, provocando la fosforilación de la proteasa en Thr735, y siendo esta fosforilación requisito para el clivaje eficiente de TRKA por acción de ADAM17 (Díaz-Rodríguez y cols., 2002). Asimismo, en células que expresaban una forma inactiva de ADAM17, el corte de TRKA también era defectuoso. Sin embargo, no se descartó que hubiesen otras rutas que también terminaran en el corte de TRKA, ya que en células que expresaban la forma inactiva de ADAM17, el stress osmótico fue capaz de estimular el corte del receptor, mediante la vía MAPK p38.

Receptores TRKA quiméricos que no poseen el dominio extracelular producen un efecto tan proliferativo como aquellos que no poseen el segundo dominio similar a Inmunoglobulina, que juega un rol crítico en la prevención de la activación espontánea de TRKA (Arévalo y cols., 2000). Así, se mostró que el dominio extracelular de TRKA posee efectos reguladores sobre el dominio catalítico intracelular del receptor, inhibiendo la dimerización y fosforilación espontánea de éste.

Si se considera que una de las funciones principales de las metaloproteinasas es el corte de proteínas ancladas a la membrana, puede ser factible que un aumento en los niveles proteicos de ADAM17 en el cáncer ovárico, pudiese facilitar el corte de moléculas que están involucradas en la progresión de la enfermedad.

Así, es probable esperar que, si en el cáncer ovárico se tienen niveles proteicos aumentados de ADAM17, uno de sus posibles blancos pueda ser también el receptor TRKA, lo cual tendría como resultado la liberación de su ectodominio. Como se ha demostrado que el dominio extracelular de los receptores de tipo tirosina quinasa actúa como un regulador negativo de la actividad intracelular del receptor, (Cabrera y cols., 1996; Arévalo y cols., 2000) esto podría ocasionar, además, la activación constitutiva de TRKA que se observa en el cáncer ovárico epitelial.

## **HIPÓTESIS**

Los datos expuestos llevan así a proponer la siguiente hipótesis:

**“En el cáncer ovárico epitelial humano se expresan isoformas del receptor TRKA, siendo algunas de ellas procesadas por ADAM17, generando una forma proteica fosforilada adicional del receptor, de menor peso molecular, constituida sólo por sus dominios intracelular y transmembrana”**

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la expresión de las isoformas del receptor TRKA en tejidos ováricos (ovario normal inactivo, tumores benignos, tumores borderline, cáncer ovárico epitelial de grado I o COE I, cáncer ovárico epitelial de grado II o COE II y cáncer ovárico epitelial de grado III o COE III), y relacionar los niveles de la forma activa del receptor, TRKA-p, con los niveles de la proteína ADAM17.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1.- Determinar los niveles de las isoformas del receptor TRKA en distintos grados de diferenciación del cáncer ovárico epitelial (COE), y en ovarios normales inactivos, tumores benignos y tumores borderline.

2.- Examinar la relación entre el receptor TRKA total y la forma activada del receptor TRKA (TRKA-p), con la expresión proteica de ADAM17 en tejidos ováricos (ovario normal inactivo, tumores benignos, tumores borderline, cáncer ovárico epitelial de grado I o COE I, cáncer ovárico epitelial de grado II o COE II y cáncer ovárico epitelial de grado III o COE III).

3.- Estudiar la localización celular de ADAM17 y TRKA-p en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial, A2780, y de epitelio de la superficie ovárica humana, HOSE.

4.- Analizar el efecto de un inhibidor de ADAM17 sobre la detección de la forma activa de TRKA (dominio intracelular y transmembrana), en una línea celular de cáncer ovárico epitelial, A2780.

## METODOLOGIA

### Obtención de muestras

Las muestras de tejidos de ovarios humanos fueron obtenidas de pacientes que asistieron al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Previo a la obtención de estas muestras, las pacientes firmaron un Consentimiento Informado, que fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Para la realización de este estudio se consideraron los siguientes grupos de muestras:

**1.- Ovario Normal Inactivo (OI):** corresponden a muestras de ovarios normales de pacientes que ya no se encuentran produciendo folículos.

**2.- Tumor Benigno (TBE):** quistes de inclusión de diámetro mayor a 1 cm, que se encuentran rodeados por una monocapa de células epiteliales.

**3.- Tumor Borderline (TBO):** monocapa de células epiteliales que han proliferado. Se observa como un epitelio pseudoestratificado, con atipia celular leve a moderada.

**4.- Cáncer Ovárico Epitelial (COE) I o Bien Diferenciado:** presenta estructuras papilares irregulares, con malignidad celular, epitelio pseudoestratificado, y focos de invasión de más de 3 mm.

**5.- Cáncer Ovárico Epitelial (COE) II o Moderadamente Diferenciado:** se observa una disminución de las estructuras papilares, por presencia de zonas indiferenciadas. Presenta mucha atipia nuclear, además de mayores focos de invasión.

**6.- Cáncer Ovárico Epitelial (COE) III o Pobrementemente Diferenciado:** corresponde a una masa sólida indiferenciada, con un evidente polimorfismo tanto celular como nuclear, además de muchos focos de invasión.

Las muestras de ovarios normales corresponden a tejidos provenientes de mujeres sometidas a histerectomía con ooforectomía por patologías no ováricas. El resto de los grupos se obtuvo mediante histerectomía con ooforectomía o por histerectomía radical, de pacientes a las cuales se les diagnosticó un tumor ovárico o cáncer de ovario.

### **Líneas celulares**

Para la realización de estudios *in vitro* se utilizaron líneas celulares de Epitelio de la Superficie Ovárica Humana (HOSE) y de Cáncer Ovárico Epitelial (A2780).

**Línea celular de Epitelio de la Superficie Ovárica Humana (HOSE):** Células epiteliales normales de la superficie ovárica humana, obtenidas desde una paciente post-menopáusica con cáncer endometrial.

**Línea celular de Cáncer Ovárico Epitelial (A2780):** Línea celular de cáncer ovárico, con morfología epitelial, sensible a fármaco. Fue establecida a partir de tejido tumoral de una paciente, previo al tratamiento.

### **Análisis estadístico**

El cálculo del n muestral para este estudio se realizó utilizando la fórmula de comparación de medias:  $n = 2 (Z\alpha + Z\beta)^2 S^2 / d^2$ , asumiendo un  $\alpha$  de 0,05, un  $\beta$  de 0,20, una desviación estándar de 0,16 y una diferencia entre las medias de un 25 %. Con estos valores se obtiene un número de muestras igual a 7 para cada grupo a

estudiar. En todos los ensayos, los resultados han sido expresados como promedio  $\pm$  error estándar del promedio. Además, todos los grupos fueron comparados con el de ovario normal inactivo.

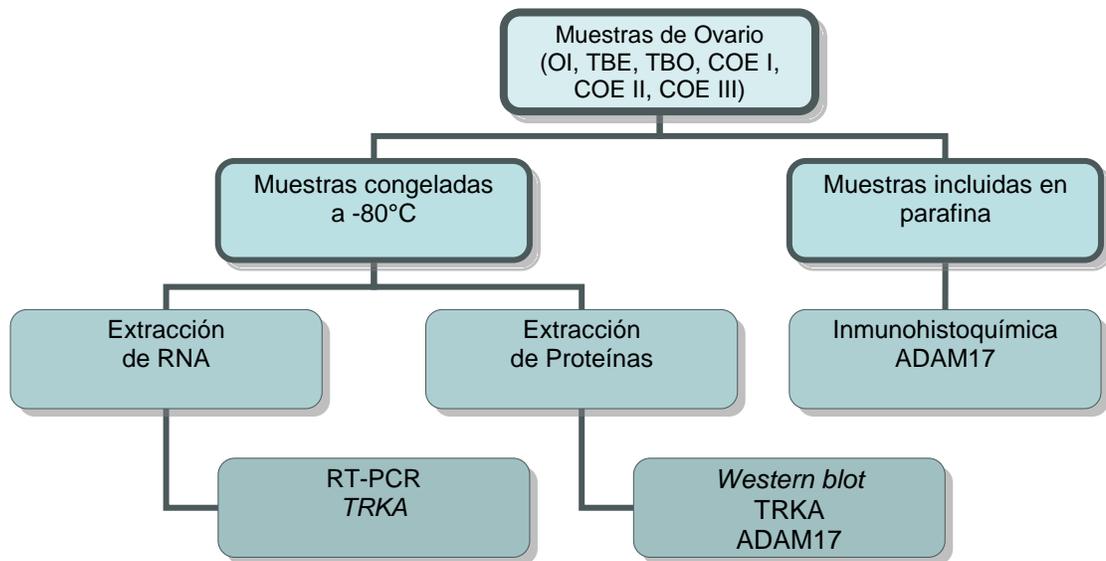
Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graph Pad Prism 5.0. En cada análisis se realizó un test de normalidad (Kolmogorov–Smirnov), con el objetivo de conocer la distribución de los datos. Posteriormente, para datos paramétricos, el análisis se realizó mediante Análisis de Varianza (ANOVA), para conocer así la existencia de diferencias significativas. Seguido a esto, se usó el post test de Bonferroni para identificar diferencias significativas entre los grupos. Para datos no paramétricos, se utilizó el test de Kruskal-Wallis, seguido de un pos test de Dunn. Como criterio de significancia se consideró  $p \leq 0,05$ .

En el caso del último objetivo, el estudio se hizo en triplicado, y los datos se analizaron con un test *t* de Student para datos no pareados.

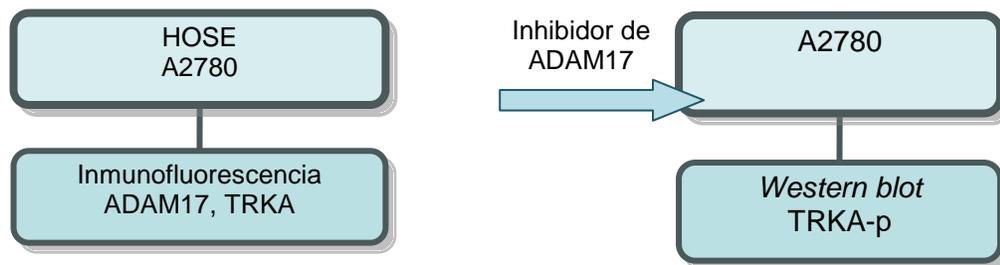
## Diseño experimental

A continuación, se presenta un resumen del diseño experimental utilizado en este estudio:

### Metodología de Experimentos *ex vivo*



### Metodología de Experimentos *in vitro*



De acuerdo al cálculo del n muestral (n=7), y considerando los 7 grupos de estudios utilizados, se usó un total de 49 muestras para los estudios de RT-PCR, *Western blot* e

Inmunohistoquímica.

Una parte de las muestras de ovario fueron almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$ , para luego realizar la extracción tanto de mRNA como de proteínas. Otra parte de ellas fueron incluidas en parafina, para hacer los cortes de  $5\mu\text{m}$  de espesor que permitieron la realización de las Inmunohistoquímicas.

### **Análisis de las Muestras**

- **Extracción de RNA y RT-PCR para *TRKA* en tejidos ováricos humanos**

Este estudio se realizó con el objetivo de caracterizar los niveles de mRNA de las distintas isoformas del receptor TRKA que se expresan en ovario, y cómo estos niveles se alteran durante la progresión del cáncer ovárico.

Para realizar la extracción de RNA del tejido, se utiliza TRIZOL (Invitrogen). Se comienza homogenizando con TRIZOL 100 mg del tejido congelado, agregando luego cloroformo. Después de 15 min de incubación, se centrifuga a 13200 rpm durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . A continuación, se extrae la fase acuosa, agregando luego isopropanol frío. Después de incubar toda la noche a  $-30^{\circ}\text{C}$ , se centrifuga a 13200 rpm por 20 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , para posteriormente lavar el pellet resultante con etanol 75%. Se vuelve a centrifugar a 13200 rpm, por 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ , para después dejar secando el pellet, y resuspenderlo en  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ . Luego, se procede a calcular la concentración y pureza del RNA extraído, mediante lectura en NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.).

A continuación, se sintetiza el cDNA, utilizando 5  $\mu\text{g}$  de RNA total, Random Primers, dNTP 10 mM (ambos de Promega), y un volumen de  $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$  necesario para completar 10,5  $\mu\text{l}$ . Esta mezcla se incubó a  $70^{\circ}\text{C}$  por 5 min, dejándola enfriar luego en hielo otros 5 min. Posteriormente, se agrega Buffer 5X, DTT 0,1M, RNAsa OUT 40 U/ $\mu\text{l}$

y transcriptasa reversa M-MLV (200 U/μl) (todos productos de Invitrogen). Esta mezcla se incubó a 42°C durante 1 hora.

Posteriormente, el cDNA fue amplificado en una mezcla de reacción de 25μl, utilizando 10x High Fidelity PCR Buffer, Magnesium Sulfate 50mM y la enzima Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (todos productos de Invitrogen), dNTP 10mM, partidores sense (10μM) y antisense (10μM), y un volumen de H<sub>2</sub>O necesario para completar 23μl, agregando luego 2μl de cDNA. Los partidores utilizados, con su respectivo programa de PCR se muestran en las Tabla 1 y 2, respectivamente. Como control interno (gen constitutivo), se utilizó β-actina. Como control positivo de la reacción, se usó cDNA de la línea celular A2780, y como control negativo, agua estéril. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1%, usando un estándar de peso molecular para validar el tamaño predicho de las bandas del amplificado. Los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta, fotografiados y analizados con un programa de densitometría UV Transluminator UVP, con Doc-it Software Image Acquisition and D Analysis (UVP, Inc. Laboratory Products, Upland, CA, USA).

**Tabla 1.** Partidores utilizados para la amplificación del cDNA de *TRKA*

<b>Primer par de Partidores para <i>TRKA</i></b>	
Primer Sense (5'-3')	AACCTCACCATCGTGAAGAGTGGT
Primer Antisense (5'-3')	GGTTGAACTCGAAAGGGTTGTCCA

<b>Segundo par de Partidores para <i>TRKA</i></b>	
Primer Sense (5'-3')	ACCCTCTGCACTGTTCTTGT
Primer Antisense (5'-3')	ACTCGAAAGGGTTGTCCATG

<b>Partidores para <math>\beta</math>-actina</b>	
Primer Sense (5'-3')	TGACCGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA
Primer Antisense (5'-3')	CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG

**Tabla 2.** Programas de PCR usados para la amplificación del cDNA de *TRKA*

<b>Programa</b>	<b>TRKA</b>
<b>Primer Set de Partidores</b>	
Desnaturación	94°C, 30 seg
Alineamiento	55°C, 30 seg
Extensión	68°C, 1 min
Número de ciclos	40

<b>Programa</b>	<b>TRKA</b>
<b>Segundo Set de Partidores</b>	
Desnaturación	94°C, 1 min
Alineamiento	62°C, 1 min
Extensión	72°C, 2 min
Número de ciclos	35

- **Western blot de TRKA y ADAM17 en tejidos ováricos**

Este estudio se realizó con el fin de analizar la expresión proteica de las isoformas de TRKA, además de la presencia de la fracción citosólica, unida a membrana, del receptor.

Se usaron 100 mg de tejido congelado para extraer proteínas, usando PARIS™ Kit

(Ambion, Inc.), PMSF (Fluoruro de fenilmetilsulfonilo) 1 mM, ortovanadato de sodio (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>) 1mM y un cocktail inhibidor de proteasas y fosfatasa (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific Inc). Se separaron 50 µg de proteínas de cada muestra por SDS-PAGE 8%, para luego ser transferidas a una membrana de nitrocelulosa. Para evitar la unión no específica, se incubaron las membranas con una solución de leche 5% en buffer TTBS (*Tween-Tris Buffered Saline*) para TRKA-p, TRKA total y ADAM17. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario toda la noche, para incubarlas al día siguiente con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano durante 1 hora. Las condiciones de cada anticuerpo utilizado se muestran en la Tabla 3. Las membranas se revelaron usando el kit de detección de quimioluminiscencia Western Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA) y Kodak BioMax light films (Sigma-Aldrich). Los films fueron escaneados y analizados con el programa UN-SCAN-IT gel 4.1 (Silk Scientific Corporation, Orem, UT).

**Tabla 3.** Anticuerpos utilizados para la detección de TRKA y de ADAM17, por *Western blot*

Anticuerpos primarios			Anticuerpos secundarios		
<b>TRKA-p</b>	1:1000 (en TTBS)	Abcam TrkA (phospho Y490) antibody (ab1445)	<b>Anti-rabbit</b> Peroxidase-labeled Affinity Purified Antibody to Rabbit IgG	1:10000 (en TTBS)	KPL
<b>TRKA total</b>	1:1000 (en TTBS)	Santa Cruz Trk A (H-190): sc- 14024	<b>Anti-rabbit</b> Peroxidase-labeled Affinity Purified Antibody to Rabbit IgG	1:10000 (en TTBS)	KPL
<b>ADAM17</b>	1:1000 (en leche 5%)	Abcam ADAM17 antibody (ab57484)	<b>Anti-mouse</b> Peroxidase-labeled Affinity Purified Antibody to Mouse IgG	1:10000 (en leche 5%)	KPL

- **Inmunohistoquímica de ADAM17 en tejidos ováricos**

Este estudio se realizó con el objetivo de identificar la localización y semi-cuantificación de la proteína ADAM17 durante la progresión del cáncer ovárico. Para ello, se utilizan cortes de ovarios incluidos en parafina, de espesor de 4 a 6  $\mu\text{m}$ , que son desparafinados en xilol e hidratados en concentraciones seriadas de alcohol. Posteriormente, se procede a la recuperación antigénica en Buffer Citrato 10mM, pH 6, durante 40 min a 95-98°C, para luego bloquear las peroxidasas endógenas con  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 3%. Para evitar la unión inespecífica, se incuban con un bloqueador específico del kit Histostain SP (Zymed Laboratorios Inc, San Francisco, California, USA). A continuación, los cortes son incubados con anticuerpo primario diluido en PBS-BSA al 2%, a 4°C, durante 20 horas, en las condiciones indicadas en la Tabla 4. Transcurrido este tiempo, los cortes se incuban con anticuerpo secundario biotinilado durante 20 min y, posteriormente, con estreptavidina marcada con peroxidasa por 20 min (ambos reactivos son parte del kit Histostain SP (Zymed Laboratorios Inc, San Francisco, California, USA)). Como sustrato final de esta reacción, se utiliza el cromógeno Diaminobencidina (DAB) (DakoCytomation, Inc, CA, USA), resultando en una tinción positiva de color café. Los tejidos son luego contrateñidos usando Hematoxilina en dilución 1:5 (Harris), con el fin de evidenciar los núcleos de color azul claro. Finalmente, las placas son deshidratadas en concentraciones seriadas de alcohol, y luego en xilol, para montarlas con un cubreobjetos, usando Entellán.

Como control negativo, las placas son incubadas sólo con PBS-BSA al 2%, sin agregar el anticuerpo primario.

En la evaluación de las muestras, participaron 3 observadores independientes y ciegos a la clasificación de cada una de ellas. Cada sección de tejido fue dividida en 4 cuadrantes, contando 250 células epiteliales en cada uno de ellos, para lograr un total de 1000 células epiteliales por placa. A cada célula se le asignó una intensidad de tinción: 0 – sin tinción, 1 – tinción leve, 2 – tinción moderada, 3 – tinción intensa. Con estos resultados, se calculó el porcentaje de células con tinción positiva, sumando las intensidades 2 y 3. Además, se calculó el H-Score (HS), para calcular la intensidad de

tinción, de acuerdo a la fórmula  $HS = \% \text{ células teñidas} * (i+1) / 100$

Las placas fueron fotografiadas utilizando el microscopio Olympus modelo DX51TF, y el programa computacional Image-ProPlus 6.2.

**Tabla 4.** Anticuerpos primarios para Inmunohistoquímica

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Tiempo de revelado con DAB</b>	<b>Procedencia</b>
<b>ADAM17</b>	1:6000	1 min 30seg	Abcam: ab57484, (mouse)

- **Líneas Celulares epiteliales**

Las líneas celulares epiteliales de la superficie normal del ovario (HOSE) y de cáncer de ovario (A2780), son cultivadas en medio Dulbecco's minimal essential medium/Ham F-12 (DMEM/Ham F-12) suplementado con suero de bovino fetal 10% y con una solución de antibióticos (penicilina-estreptomicina) y antimicóticos (fungizona). Las células son cultivadas en estufa a 37°C, en atmósfera húmeda, con una concentración de O<sub>2</sub> 95% y CO<sub>2</sub> 5%. Al alcanzar confluencia, las células son tripsinizadas con una solución de Tripsina-EDTA 0,25%.

Para realizar las Inmunocitoquímicas, una vez que las células son tripsinizadas, se centrifugan y resuspenden en DMEM/Ham F-12, para luego contarlas en un hemocitómetro (cámara de Neubauer), con un colorante para evaluar viabilidad celular. Finalmente, se siembran 200000 células por placa, en portaobjetos silanizados.

- **Inmunocitoquímica de TRKA y ADAM17 en líneas celulares**

Este estudio se llevó a cabo para examinar la localización celular, tanto de ADAM17 como de TRKA, en líneas celulares de cáncer ovárico epitelial, A2780, y de epitelio de

la superficie ovárica humana, HOSE.

Las células son fijadas en los portaobjetos. Primero se realiza un pre-fijado con Paraformaldehído (PFA) al 4%, pH 7,4, durante 2 min. A continuación, se remueve el medio de cultivo, para fijar las células con PFA 4%, pH 7,4 durante 15 min a temperatura ambiente. Luego de este tiempo, se bloquean las peroxidasas endógenas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% por 15 min. Después, se bloquea la unión inespecífica con una solución de leche descremada durante 10 min, para posteriormente incubar las células con el anticuerpo primario disuelto en PBS-BSA 2% toda la noche, a 4°C. Al día siguiente, las células se incuban con anticuerpo secundario durante 30 min. Las condiciones utilizadas para cada anticuerpo se resumen en la Tabla 5. Luego, se agrega la solución de revelado DAB (DakoCytomation, Inc, CA, USA), resultando en una tinción positiva de color café. Para realizar la contra-tinción, se usa Hematoxilina en dilución 1:5 (Harris), con el fin de evidenciar los núcleos de color azul. Finalmente, las placas con células se deshidratan en concentraciones seriadas de alcohol, y luego en xilol, para montarlas con un cubreobjetos, usando Entellán.

Como control negativo, las placas son incubadas sólo con PBS-BSA al 2%, sin agregar el anticuerpo primario.

Las placas se fotografiaron usando el microscopio Olympus modelo DX51TF y el programa computacional Image-ProPlus 6.2, utilizando el mismo programa para su análisis, cuantificando, en Unidades Arbitrarias, el promedio de saturación de color de 100 células, tanto para la línea A2780 como para HOSE. Esto se realizó efectuando 3 experimentos independientes para cada uno de los anticuerpos.

**Tabla 5.** Anticuerpos utilizados en la Inmunocitoquímica

Anticuerpos Primarios	Dilución	Tiempo de revelado con DAB	Procedencia	Anticuerpos Secundarios	Dilución
<b>ADAM17</b>	1:4000 (A2780 y HOSE)	4 min (A2780 y HOSE)	Abcam: ab57484, mouse monoclonal	<b>Anti-mouse</b> Peroxidase-labeled Affinity Purified Antibody to Mouse IgG (KPL)	1:300 (A2780 y HOSE)
<b>TRKA total</b>	1:300 (A2780 y HOSE)	2 min (A2780 y HOSE)	Santa Cruz Trk A (H-190): sc-14024	<b>Anti-rabbit</b> Peroxidase-labeled Affinity Purified Antibody to Rabbit IgG (KPL)	1:300 (A2780 y HOSE)

- **Inmunofluorescencia de TRKA y ADAM17 en líneas celulares**

Este estudio se realizó para analizar si existe co-localización entre ADAM17 y TRKA en las líneas celulares de cáncer ovárico epitelial, A2780, y de epitelio de la superficie ovárica humana, HOSE. El protocolo para el primer día de la inmunofluorescencia es igual al que se utiliza para la realización de la Inmunocitoquímica, y fue descrito en el punto anterior, con la diferencia de que los anticuerpos primarios se agregan en conjunto a cada placa, y no por separado, como en la Inmunocitoquímica. En el segundo día, luego de la incubación con los anticuerpos primarios, se incuban las células con anticuerpo secundario durante 1 hora, en oscuridad, para finalizar con la tinción nuclear y montaje con Prolong Gold Anti Fade Reagent with DAPI (Invitrogen). Las condiciones utilizadas para cada anticuerpo se resumen en la Tabla 6.

Como control negativo, las placas son incubadas sólo con PBS-BSA al 2%, sin

agregar el anticuerpo primario.

Las placas fueron fotografiadas utilizando el microscopio Olympus modelo DX51TF y el programa computacional Image-ProPlus 6.2. Se realizaron 3 experimentos independientes.

**Tabla 6.** Anticuerpos utilizados en la Inmunofluorescencia

<b>Anticuerpos Primarios</b>	<b>Dilución</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Anticuerpos Secundarios</b>	<b>Dilución</b>
<b>ADAM17</b>	1:4000 (A2780 y HOSE)	Abcam: ab57484, mouse monoclonal	<b>Anti-mouse</b> Alexa Fluor 488 goat anti—mouse IgG (Invitrogen)	1:300 (A2780 y HOSE)
<b>TRKA total</b>	1:300 (A2780 y HOSE)	Santa Cruz Trk A (H-190): sc-14024	<b>Anti-rabbit</b> Alexa Fluor 594 goat anti—rabbit IgG (Invitrogen)	1:300 (A2780 y HOSE)

Para realizar el análisis en microscopio confocal, las placas fueron fotografiadas utilizando el microscopio FLUOVIEW FV1000.

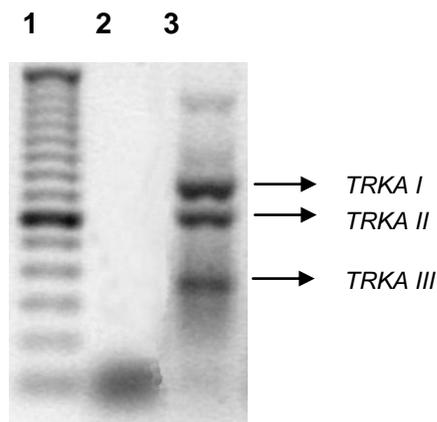
## RESULTADOS

### OBJETIVO 1. ISOFORMAS DEL RECEPTOR TRKA EN OVARIO

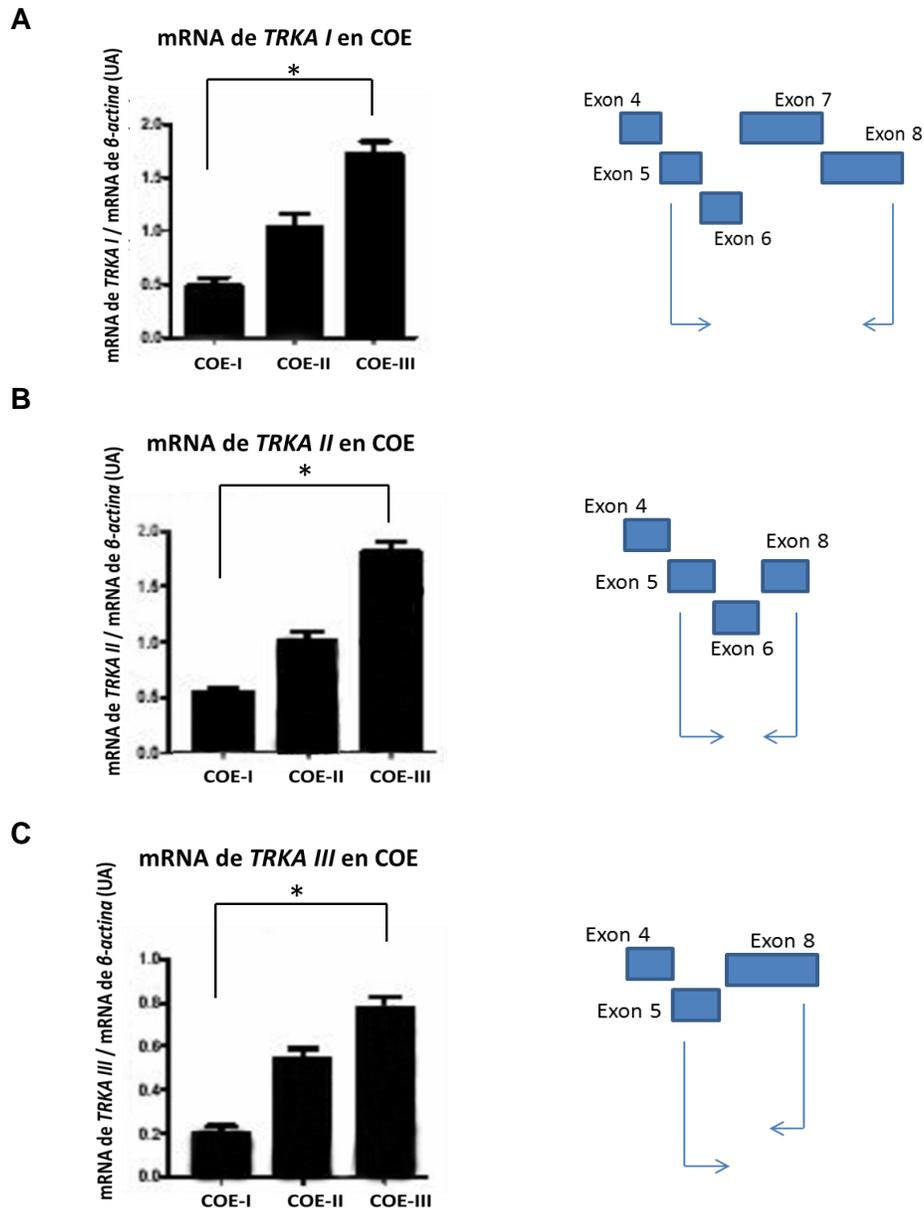
#### RT- PCR convencional de *TRKA* en tejidos ováricos y en línea celular de cáncer ovárico epitelial

Utilizando muestras de tejidos ováricos humanos congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ , fue posible detectar por RT-PCR convencional transcritos de distintas isoformas de *TRKA* en ovario. También analizamos la presencia de los transcritos de *TRKA* en la línea celular A2780. Pudimos detectar tres amplicones de *TRKA*, de 710 pb (*TRKA I*), 600 pb (*TRKA II*) y 440 pb (*TRKA III*).

Cada amplicón fue secuenciado, para confirmar que son producto de *splicing* alternativo del receptor.



**Figura 1.- Amplicones obtenidos a partir de cDNA de *TRKA* en una línea celular de cáncer ovárico epitelial.** Gel de agarosa del RT-PCR convencional que muestra la expresión de transcritos de *TRKA* en la línea celular A2780. El carril 1 muestra el marcador de peso molecular para PCR; el carril 2 muestra el control negativo (C-), para lo que se usó agua estéril; en el carril 3 se usó cDNA de células A2780 (línea celular de cáncer ovárico). Las bandas detectadas corresponden a 710 pb, 600 pb y 440 pb.



**Figura 2.- Mayores niveles de los transcritos de *TRKA* en cáncer ovárico epitelial menos diferenciado.** Cuantificación de los amplicones *TRKA I* (A), *TRKA II* (B) y *TRKA III* (C) en muestras de Cáncer Ovárico Epitelial de grado 1 (COE I), Cáncer Ovárico Epitelial de grado 2 (COE II) y Cáncer Ovárico Epitelial de grado 3 (COE III). Además, junto a cada figura, se muestran los exones amplificados.

La Figura 2 muestra los niveles de los amplicones obtenidos por PCR para los tres transcritos de *TRKA*, donde el segundo par de partidores utilizado se une a los extremos de los exones 5 (*sense*) y 8 (*antisense*). El amplificado de *TRKA I* posee los exones 5, 6, 7 y 8 (710 pb); el amplificado de *TRKA II* posee los exones 5, 6 y parte del 8 (600 pb); el amplificado de *TRKA III* posee sólo los exones 5 y 8 (440 pb).

### **Western blot de TRKA en tejidos ováricos**

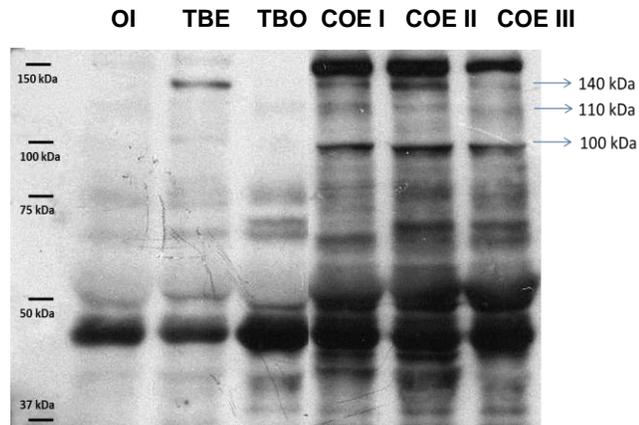
Se identificaron isoformas de TRKA en muestras de ovario, mediante *Western blot*, como se observa en la Figura 3, detectándose 3 bandas de 140 (TRKA I), 110 (TRKA II) y 100 kDa (TRKA III) tanto en el análisis de TRKA total, como de TRKA-p. En este último caso, también es posible detectar en algunas muestras una banda de menor peso molecular (41 kDa).

La banda de 41 kDa sería resultado de la eliminación del ectodominio del receptor, que abarca de los aminoácidos 33 a 423, de 100 kDa. Así, quedaría un fragmento del receptor formado por los dominios transmembrana y citosólico, que comprende del aminoácido 424 al 796, de 41 kDa de peso molecular.

En estos experimentos sólo fue posible completar un n=6 para el grupo COE I (cáncer ovárico epitelial de grado 1), debido a que no existe un mayor número de muestras disponibles de esta clasificación.

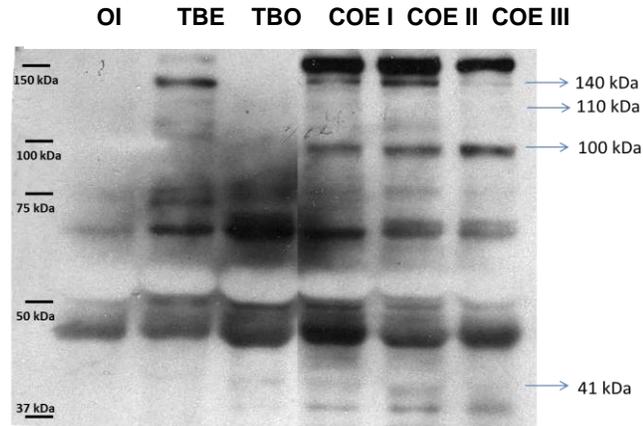
**A**

**TRKA total**



**B**

**TRKA-p**



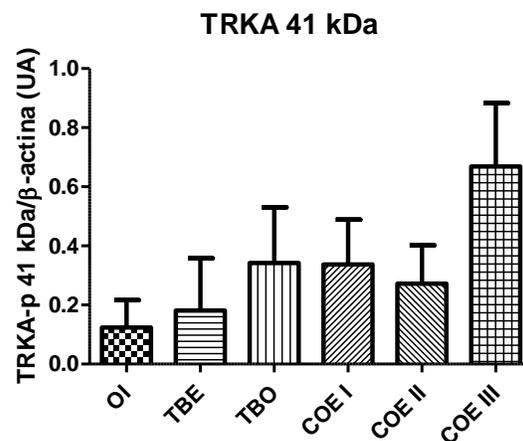
**C**

**$\beta$ -actina**



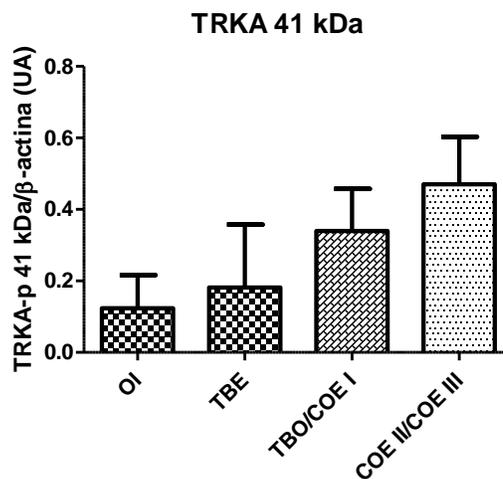
**Figura 3.- Isoformas de TRKA en muestras de ovario.** Geles de acrilamida del *Western blot* de TRKA en ovario. La figura muestra un gel para la detección de TRKA total (A), TRKA fosforilado (TRKA-p) (B), y  $\beta$ -actina (C), en muestras de ovario inactivo (OI), tumor benigno (TBE), tumor borderline (TBO), cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II) y cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III) (n=7). Las bandas detectadas son de 140 (TRKA I), 110 (TRKA II) y 100 kDa (TRKA III). Además, el análisis de TRKA-p muestra una banda adicional de 41 kDa, presente sólo en algunas de las muestras.

De un total de 7 muestras analizadas para cada grupo de estudio, la banda de TRKA-p de 41 kDa fue detectada en 3 muestras de ovario inactivo (OI), en 2 muestras de tumor benigno (TBE), en 4 muestras de tumor borderline (TBO), en 5 de 6 muestras de cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), en 4 muestras de cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II) y en 6 muestras de cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III). Expresando estos resultados como porcentaje, vemos que la banda de 41kDa fue detectada en un 43% de las muestras de ovario inactivo; en un 29% de tumores benignos; en un 57% de tumores borderline; en un 83% de muestras de cáncer ovárico epitelial de grado 1; en un 57% de muestras de cáncer ovárico epitelial de grado 2; y en un 86% de muestras de cáncer ovárico epitelial de grado 3. Si consideramos todas las muestras de cáncer ovárico, vemos que la banda de 41 kDa fue detectada en un 75% de ellas.



**Figura 4.- Niveles de TRKA de 41 kDa en muestras de cáncer ovárico.** Niveles de la isoforma de TRKA-p de 41 kDa, expresados como unidades arbitrarias (UA), con respecto a β-actina, en muestras de ovario inactivo (OI), tumor benigno (TBE), tumor borderline (TBO), cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II) y cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III). Los resultados están expresados como el promedio ± el error estándar de la media (n=7).

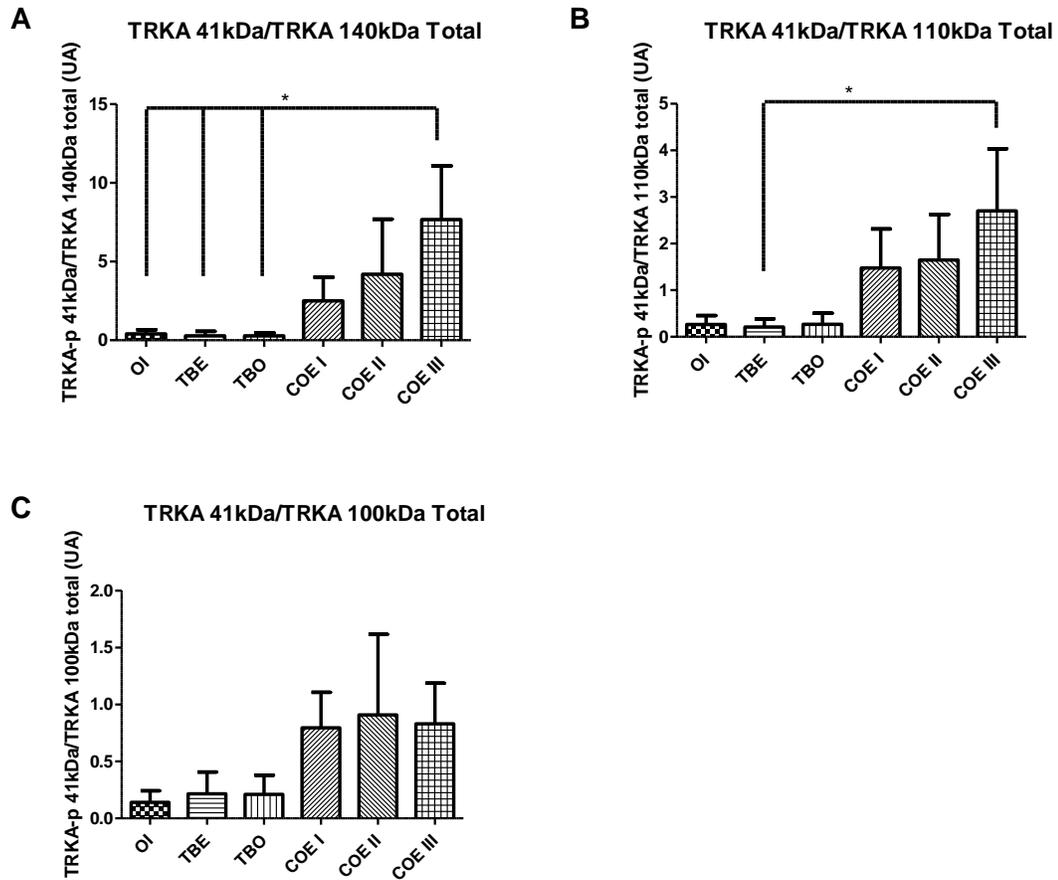
Expresamos también estos resultados agrupando las clasificaciones de tumores borderline (TBO) y cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), y de cáncer ovárico epitelial de grados 2 y 3 (COE II y COE III, respectivamente). Se hizo esto debido al bajo número de muestras en las cuales se detectó la banda de 41 kDa, y a que la diferencia histológica entre las clasificaciones agrupadas es baja, pudiendo incluso a veces llevar a ser clasificadas indistintamente en cualquiera de ellas. El hacer esto nos permite, además, apreciar de forma más clara el comportamiento de la banda de 41 kDa en las muestras de ovario, con un leve aumento en sus niveles a medida que progresa la enfermedad, aunque no haya sido posible encontrar diferencias significativas entre estos grupos.



**Figura 5.- Niveles de TRKA de 41 kDa en muestras de ovario.** Niveles de la isoforma de TRKA-p de 41 kDa, expresados como unidades arbitrarias (UA), con respecto a  $\beta$ -actina, en muestras de ovario inactivo (OI); tumor benigno (TBE); tumor borderline (TBO) y cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I); y cáncer ovárico epitelial de grados 2 (COE II) y 3 (COE III). Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (n=7).

Además, como se ve en la Figura 6, calculamos la relación de la banda de 41 kDa de TRKA con los niveles totales de las 3 isoformas del receptor, con el fin de averiguar cuál de estas 3 isoformas de alto peso molecular de TRKA es la que es cortada por ADAM17, para originar la forma de menor peso molecular detectada. Este análisis dio

como resultado un aumento en muestras de cáncer ovárico epitelial poco diferenciado, con respecto a muestras de tumores benignos, para las relaciones entre la banda de 41 kDa y las bandas de 140 (TRKA I) y 110 (TRKA II) kDa de TRKA total. No encontramos diferencias significativas al analizar la banda de 100 kDa de TRKA total (TRKA III).

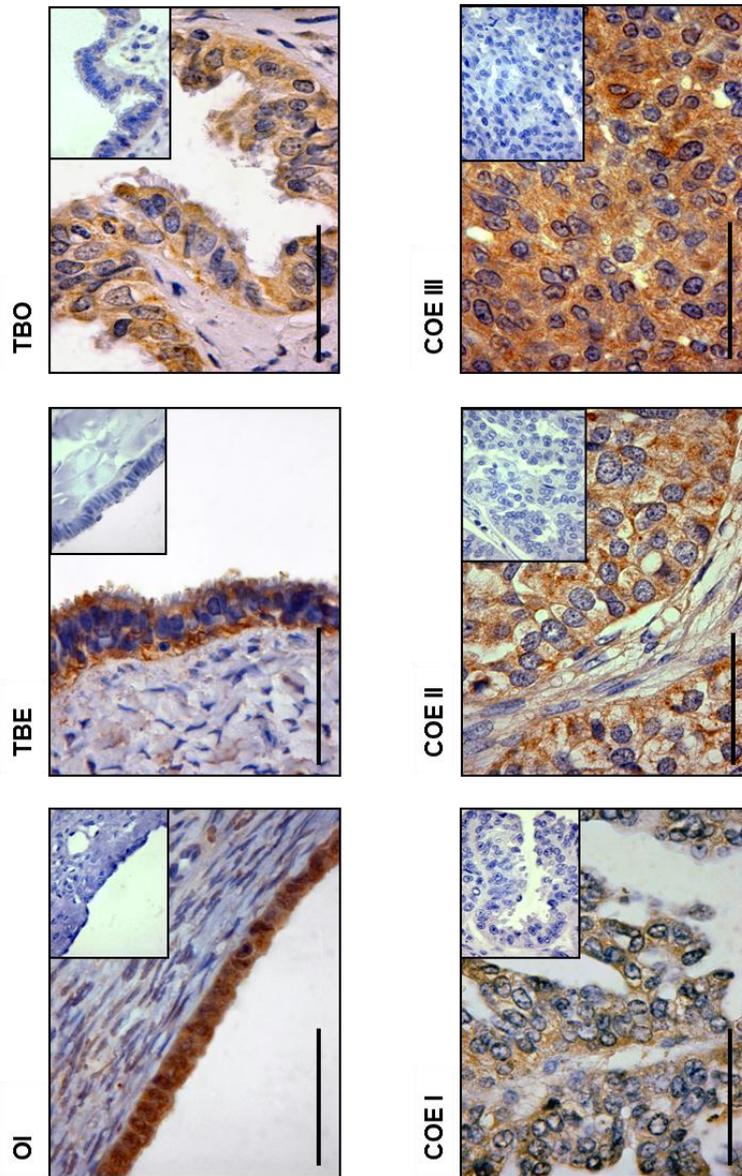


**Figura 6.- Aumento de la relación entre las bandas de 41 kDa y TRKA de 140 y 110 kDa Total en muestras de cáncer ovárico pobremente diferenciado.** Relación entre TRKA 41 kDa/TRKA I Total (A), TRKA 41 kDa/TRKA II Total (B) y TRKA 41 kDa/TRKA III Total (C), expresado como unidades arbitrarias (UA), en muestras de ovario inactivo (OI), tumor benigno (TBE), tumor borderline (TBO), cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II) y cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III) ( $p < 0,05$ ). Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media ( $n=7$ ).

## **OBJETIVO 2. NIVELES DE ADAM17 EN OVARIO, Y SU RELACIÓN CON TRKA**

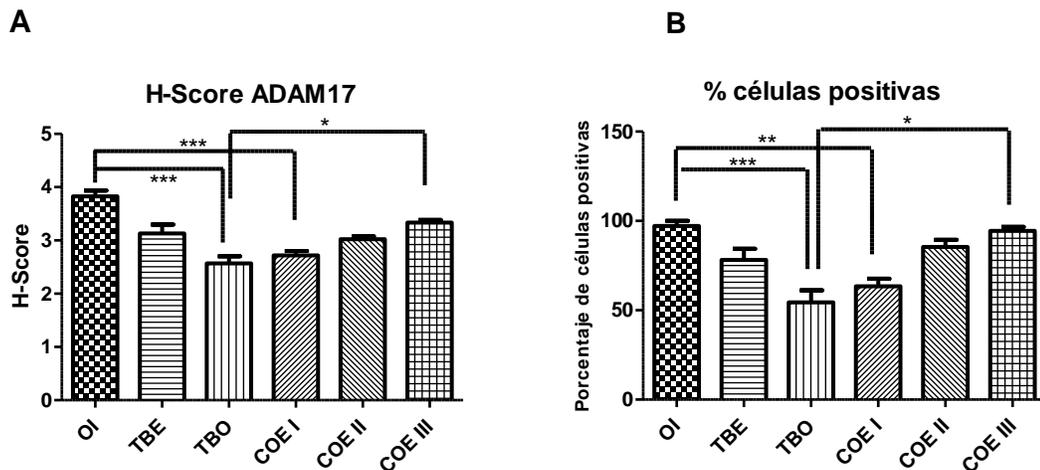
Al estudiar la proteína ADAM17 por Inmunohistoquímica en muestras de ovario incluidas en parafina, vemos que esta metaloproteinasa se localiza principalmente en las células epiteliales, con una tinción débil en el estroma. La tinción encontrada es citoplasmática, observándose un patrón granular, con una intensidad de la inmunodetección mayor en las muestras de cáncer pobremente diferenciado (COE III).

Para la realización de la Inmunohistoquímica para ADAM17, el anticuerpo utilizado reconoce tanto la pro-forma como la forma activa de la proteína.



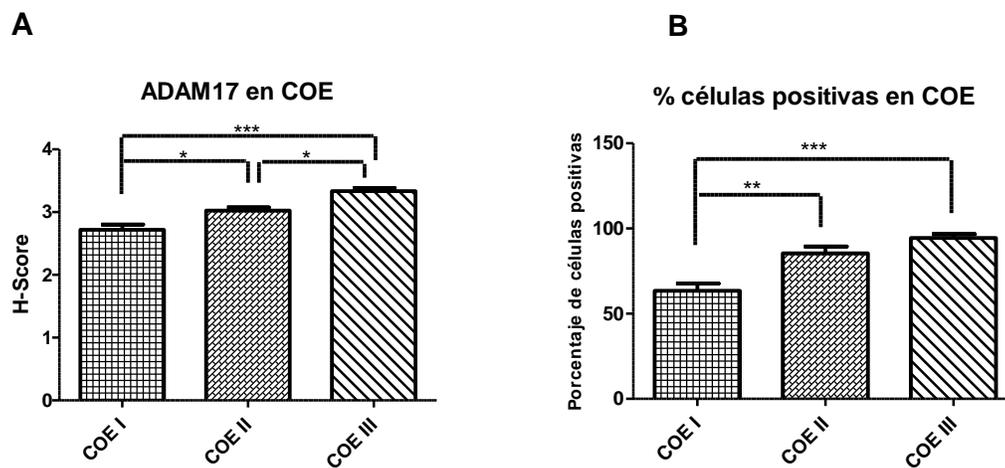
**Figura 7.- Inmunodetección de ADAM17 en células epiteliales de ovario.** Las microfotografías muestran la inmunodetección citoplasmática de ADAM17 en tejidos de Ovario Inactivo (OI), Tumor Benigno (TBE), Tumor Borderline (TBO), Cáncer Ovárico Epitelial de grado 1 (COE I), Cáncer Ovárico Epitelial de grado 2 (COE II) y Cáncer Ovárico Epitelial de grado 3 (COE III). Los controles negativos se presentan en el inserto de cada microfotografía. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ , con un aumento de 1000x (n=7).

El análisis de la expresión de ADAM17, tanto mediante la intensidad de tinción, por H-Score, como por el porcentaje de células positivas para esta proteína, presentó un aumento significativo desde las muestras de tumor borderline (TBO) hasta cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III) ( $p < 0,05$ ). Las muestras de ovario inactivo (OI) y tumor benigno (TBE) también presentaron una alta inmunodetección de ADAM17, observándose una disminución significativa ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ ), en comparación con las muestras de TBO y COE I, punto en el cual comienzan a aumentar los niveles de la proteína.



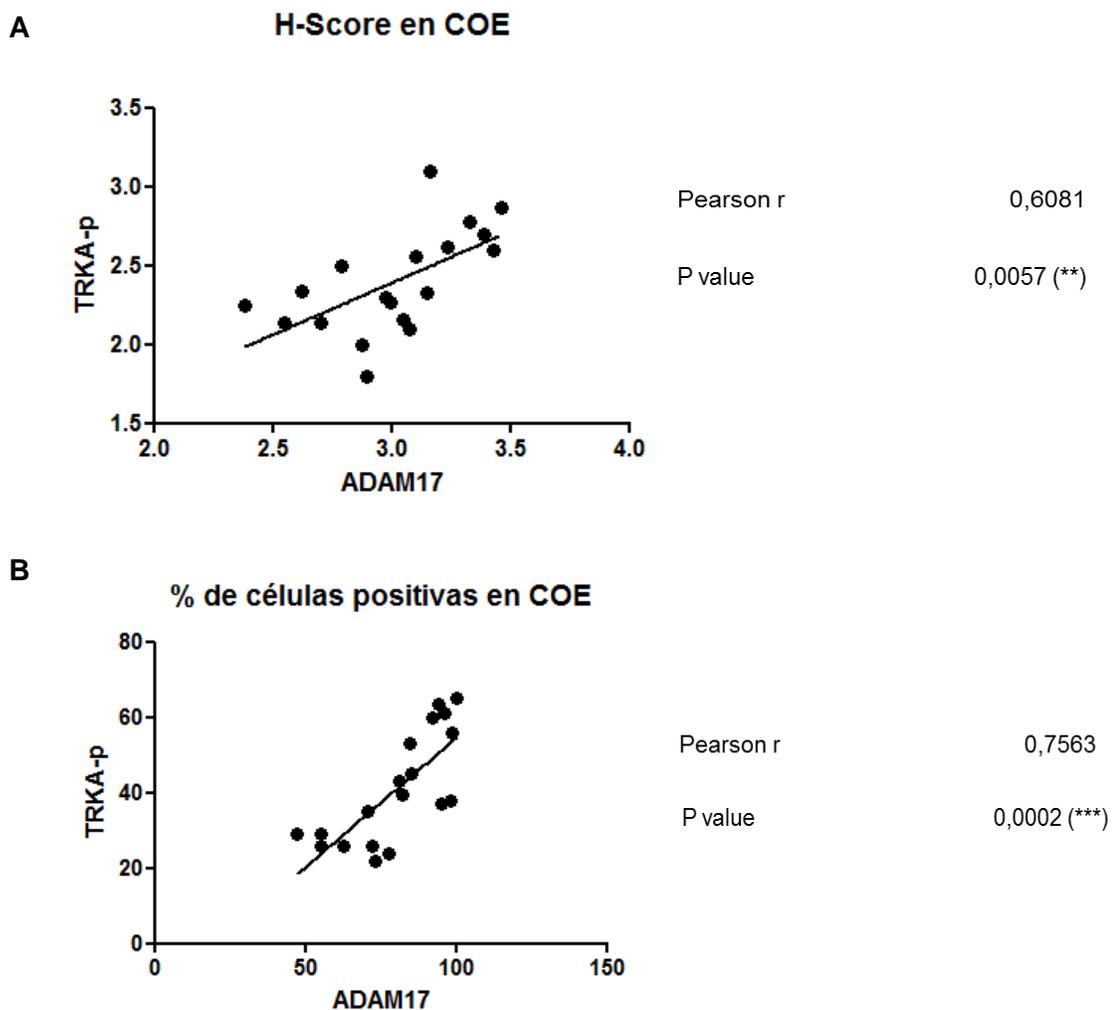
**Figura 8.- Alta inmunodetección de ADAM17 en muestras de cáncer ovárico epitelial de grado 3.** Semi-cuantificación de la intensidad de tinción de ADAM17 como H-Score (A) y como porcentaje de células con tinción Positiva (B), en muestras de ovario inactivo (OI), tumor benigno (TBE), tumor borderline (TBO), cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II) y cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III). (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media ( $n=7$ ).

También se realizó un análisis considerando sólo las muestras de cáncer ovárico, como se presenta en la Figura 7. Estos resultados muestran diferencias significativas, semi-cuantificado como H-Score y como porcentaje de células positivas, entre las muestras de cáncer bien diferenciado (COE I) y cáncer pobremente diferenciado (COE III) (\*\* $p < 0,001$ ).



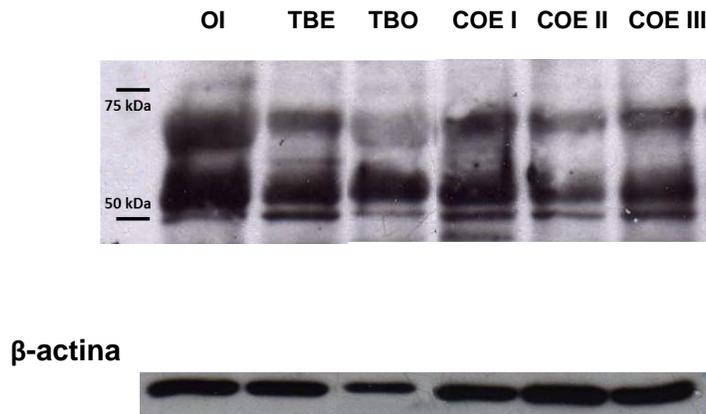
**Figura 9.- Mayor inmunodetección de ADAM17 en muestras de Cáncer Ovárico Epitelial pobremente diferenciado.** Semi-cuantificación de la intensidad de tinción de ADAM17 por H-Score (A) y por porcentaje de células con tinción positiva (B), en muestras de cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II) y cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III). (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ). Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (n=7).

Al hacer un estudio de la correlación de los resultados obtenidos para la Inmunohistoquímica de ADAM17, tanto por H-Score como por porcentaje de células positivas, con los datos obtenidos para TRKA-p (Tesis de Marcela Muñoz) mediante la misma metodología, encontramos una correlación positiva significativa entre ambas proteínas, al comparar los grupos de cáncer ovárico.



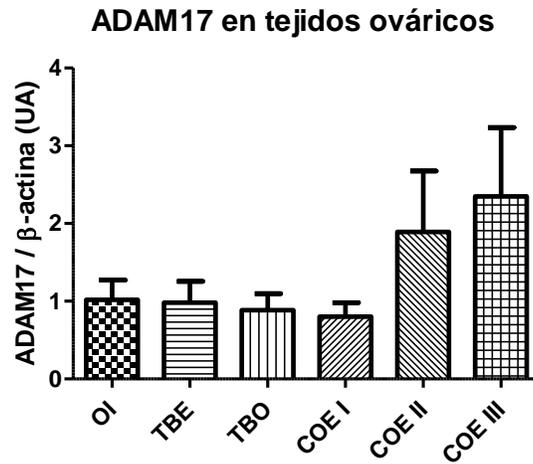
**Figura 10.- Correlación positiva entre las proteínas TRKA-p y ADAM17 en Cáncer Ovárico Epitelial.** Correlación de los valores de H-Score (A) y porcentaje de células positivas (B) entre TRKA-p y ADAM17 en muestras de cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II) y cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III) (\*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Además de los estudios de Inmunohistoquímica, se analizó ADAM17 mediante *Western blot*, utilizando el mismo anticuerpo. Aunque éste detecta tanto la pro-forma como la proteína activa, los análisis de *Western blot* permiten identificar una de estas formas de forma preferente sobre la otra. Así, es posible analizar principalmente la banda que corresponde a la forma activa de la proteasa ( $\approx 75$  kDa). Sin embargo, al realizar los *Western blot* vimos la aparición de una banda muy intensa de  $\approx 50$  kDa. Al buscar en la literatura encontramos que, al no usar un inhibidor de metaloproteinasas durante la extracción de proteínas, se cortaría la forma activa de ADAM17, apareciendo una banda intensa en la región de los 50 kDa (Schlondorff y cols., 2000).



**Figura 11.- ADAM17 en muestras de ovario.** Geles de acrilamida del *Western blot* de ADAM17 en ovario. La figura muestra un gel para la detección de ADAM17 en muestras de ovario inactivo (OI), tumor benigno (TBE), tumor borderline (TBO), cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II) y cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III). Las bandas detectadas son de 75 y 50 kDa (n=7).

En los resultados obtenidos con este anticuerpo en tejidos ováricos, para un n=7 (excepto en la clasificación COE I, donde sólo se contó con 5 muestras), se observa un aumento aparente de ADAM17 en muestras de cáncer ovárico de grados 2 y 3, aunque no fue posible encontrar diferencias significativas entre los grupos analizados.



**Figura 12.- Niveles de la forma activa de ADAM17 en muestras de ovario.** Semi-cuantificación de la forma activa de ADAM17 con respecto a  $\beta$ -actina, expresado en unidades arbitrarias (UA), en muestras de ovario inactivo (OI), tumor benigno (TBE), tumor borderline (TBO), cáncer ovárico epitelial de grado 1 (COE I), cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II) y cáncer ovárico epitelial de grado 3 (COE III). Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (n=7).

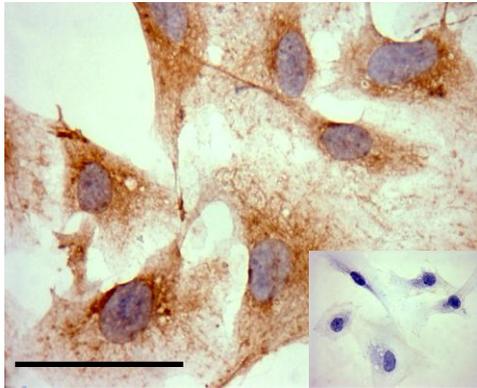
### **OBJETIVO 3. LOCALIZACIÓN CELULAR DE ADAM17 Y TRKA**

El primer paso en el análisis de la localización celular de las proteínas TRKA y ADAM17, fue la estandarización de los anticuerpos utilizados en las líneas celulares, mediante la realización de Inmunocitoquímicas. Una vez que se obtuvieron las condiciones ideales para cada una de las proteínas, se procedió a efectuar la Inmunofluorescencia para TRKA y ADAM17, para el posterior análisis mediante Microscopio Confocal.

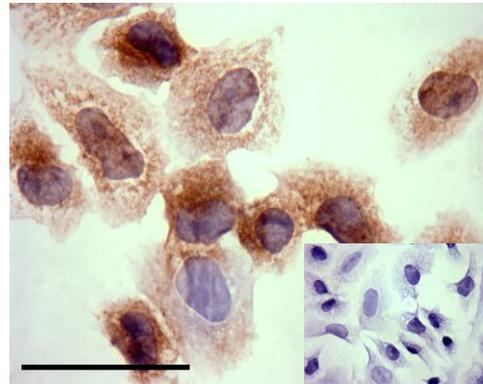
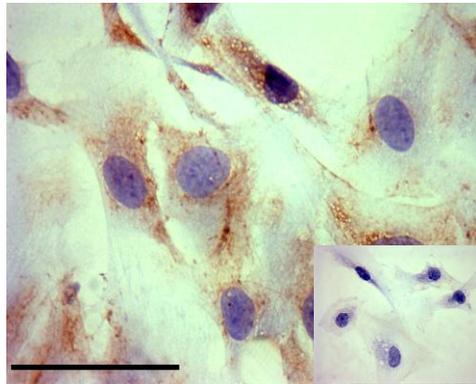
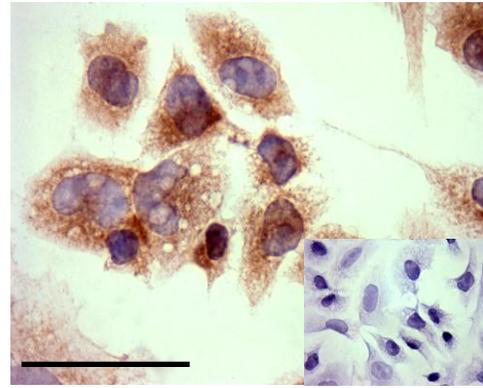
Los resultados de las Inmunocitoquímicas para TRKA y ADAM17 en las líneas celulares de epitelio de la superficie ovárica humana (HOSE) y de cáncer ovárico epitelial (A2780), muestran una inmunodetección a nivel citoplasmática, de patrón granular, para ambas proteínas, apreciándose un aumento en la intensidad de la tinción café en la línea celular de cáncer ovárico.

## TRKA

### HOSE



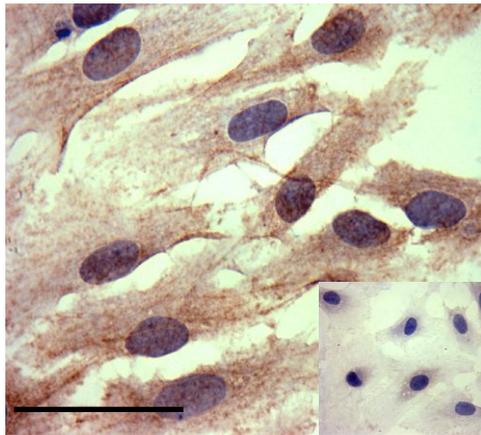
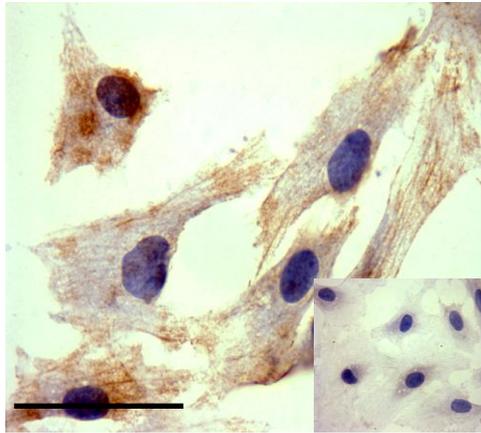
### A2780



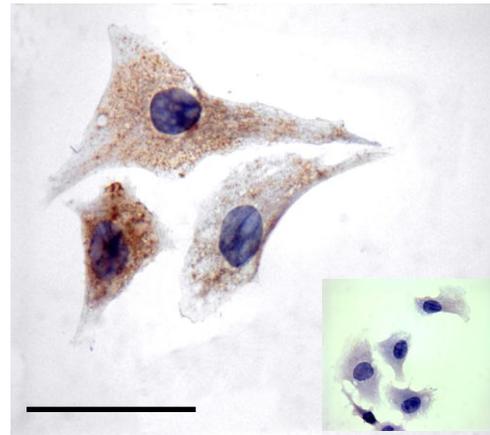
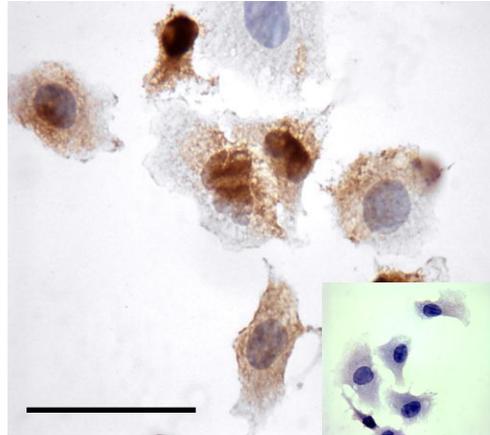
**Figura 13.- Inmunodetección de TRKA en líneas celulares.** Las microfotografías muestran la inmunodetección de TRKA en líneas celulares de epitelio de la superficie ovárica humana (HOSE) y de cáncer ovárico epitelial (A2780). Los controles negativos se muestran en el inserto de cada microfotografía. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ , con un aumento de 1000x (n=3).

## ADAM17

HOSE



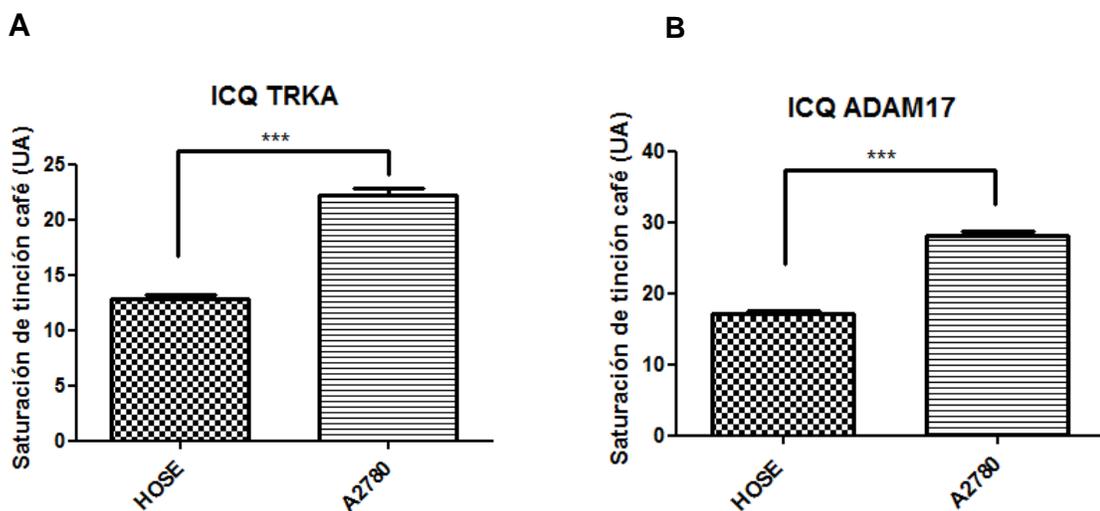
A2780



**Figura 14.- Inmunodetección de ADAM17 en líneas celulares.** Las microfotografías muestran la inmunodetección de ADAM17 en líneas celulares de epitelio de la superficie ovárica humana (HOSE) y de cáncer ovárico epitelial (A2780). Los controles negativos se muestran en el inserto de cada microfotografía. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ , con un aumento de 1000x (n=3).

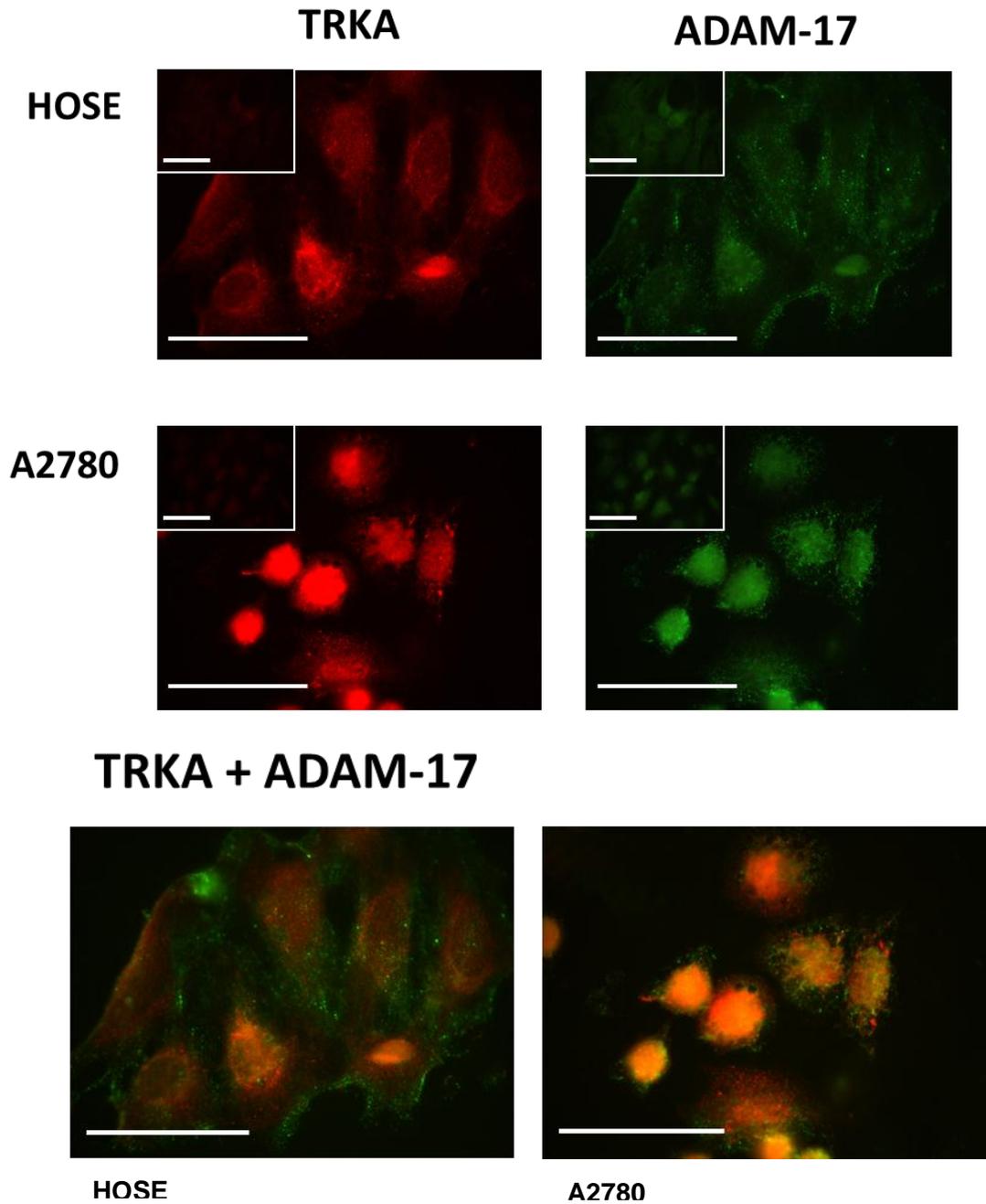
El análisis de la inmunodetección de TRKA y ADAM17 en las líneas celulares HOSE y A2780 muestra un aumento significativo de ambas proteínas en la línea celular de cáncer ovárico epitelial ( $p < 0,001$ ).

Además, al comparar los niveles de inmunodetección de TRKA y ADAM17 en las líneas celulares HOSE y A2780, se encuentra una mayor inmunodetección de ADAM17 que de TRKA en ambas líneas.



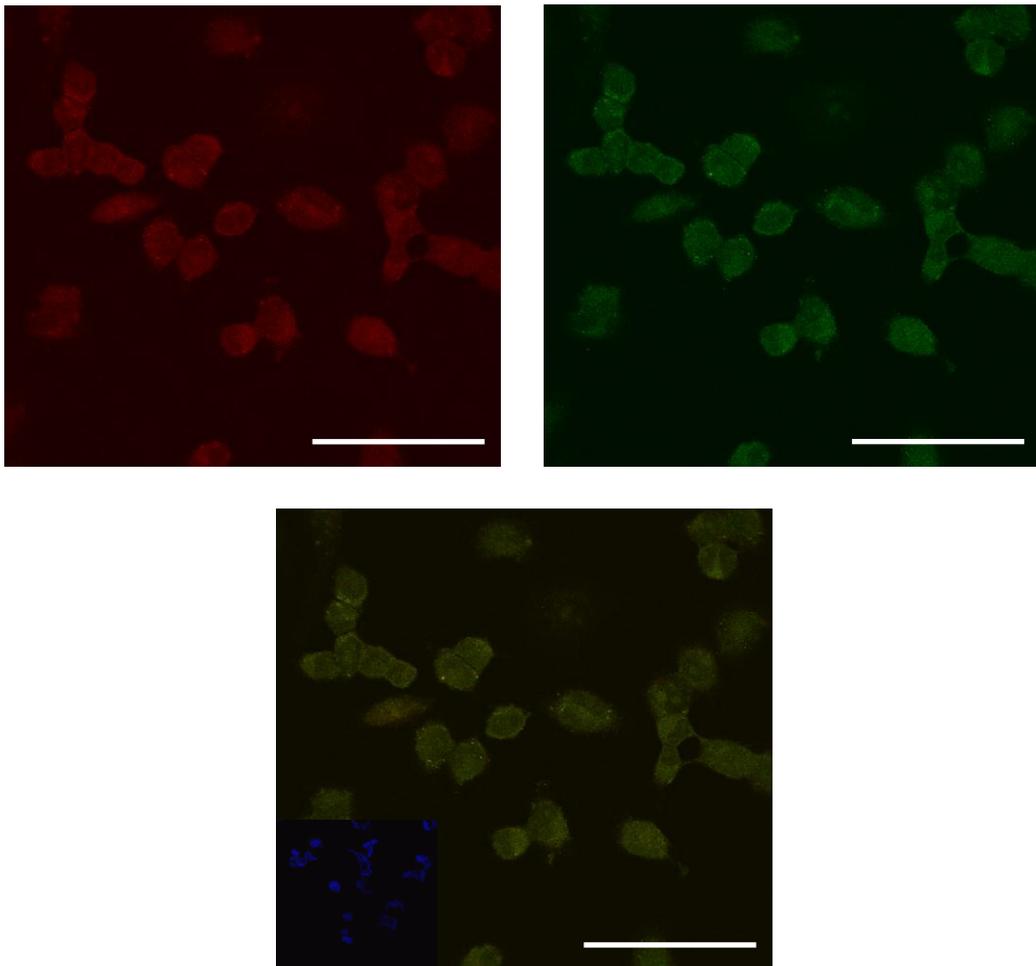
**Figura 15.- Mayores niveles de TRKA y de ADAM17 en la línea celular de cáncer ovárico epitelial.** Semi-cuantificación de la inmunodetección de TRKA (A) y ADAM17 (B) en células de las líneas de epitelio de la superficie ovárica humana (HOSE) y de cáncer ovárico epitelial (A2780), expresada como la saturación de color, en Unidades Arbitrarias (UA). Las barras representan el promedio  $\pm$  el error estándar de la media de tres experimentos (\*\*\*)  $p < 0,001$ ).

Posteriormente, la realización de las Inmunofluorescencias para TRKA y ADAM17 en estas líneas celulares muestra una fluorescencia de membrana tanto para ADAM17 como para TRKA.

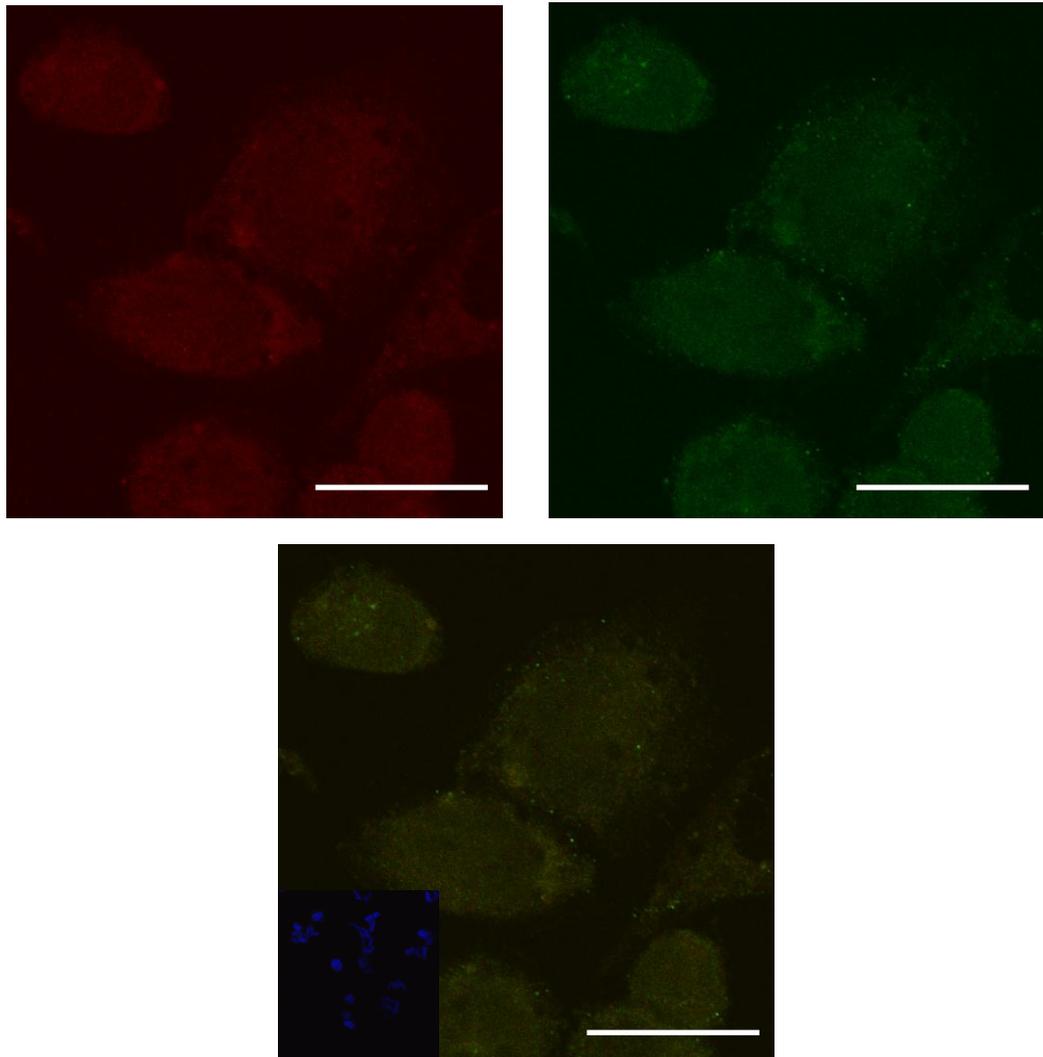


**Figura 16.-** Inmunofluorescencia de TRKA y ADAM17 en las líneas celulares HOSE y A2780. La inmunofluorescencia roja representa a TRKA y la verde, a ADAM17. Se muestra también la sobreposición de ambas imágenes. Los controles negativos se muestran en el inserto superior izquierdo. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ , con un aumento de 1000x (n=3).

Luego de haber estandarizado las condiciones más apropiadas para ambos anticuerpos, se realizó un análisis en microscopio confocal de ambas proteínas. A continuación se muestran microfotografías representativas de experimentos en la línea celular A2780. No se presentan resultados en la línea celular HOSE, ya que al momento de analizar estas células, vimos que se habían despegado de los portaobjetos.



**Figura 17.-** Microfotografías representativas analizadas con microscopio confocal, de TRKA y ADAM17 en la línea celular A2780. La inmunofluorescencia roja representa a TRKA y la verde, a ADAM17. Se muestra también la sobreposición de ambas imágenes. El control negativo se muestra en el inserto inferior izquierdo de la última microfotografía. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ , con un aumento de 600x (n=1).

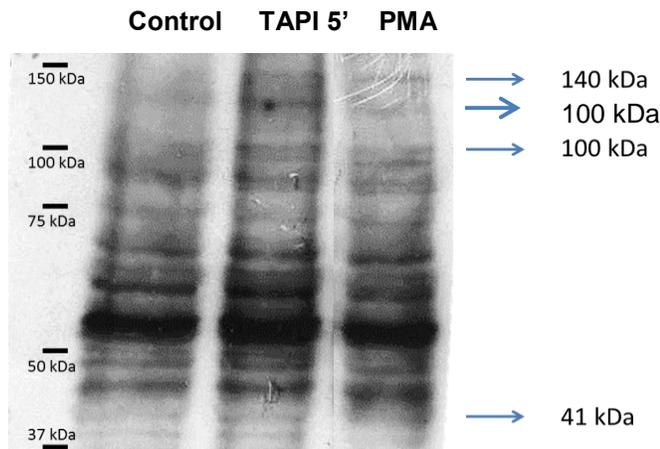


**Figura 18.-** Microfotografías representativas analizadas con microscopio confocal, de TRKA y ADAM17 en la línea celular A2780. La inmunofluorescencia roja representa a TRKA y la verde, a ADAM17. Se muestra también la sobreposición de ambas imágenes. El control negativo se muestra en el inserto inferior izquierdo de la última microfotografía. La barra representa 50  $\mu\text{m}$ , con un aumento de 1800x (n=1).

#### OBJETIVO 4. EFECTO SOBRE TRKA DEL USO DE UN INHIBIDOR DE ADAM17

Con el fin de analizar el efecto de la inhibición de la actividad de la proteasa sobre la isoforma de 41kDa de TRKA fosforilado, se utilizó un inhibidor específico de ADAM17 (TAPI-0). En los resultados además se muestran las bandas de 140, 110 y 100 kDa de TRKA.

En los experimentos en los cuales se utilizó el inhibidor de ADAM17, TAPI-0, se probaron tres tiempos distintos de incubación (5, 10 y 15 min), encontrándose la máxima inhibición a los 5 minutos. Es por esto, que los resultados presentados consideran solamente dicho tiempo.

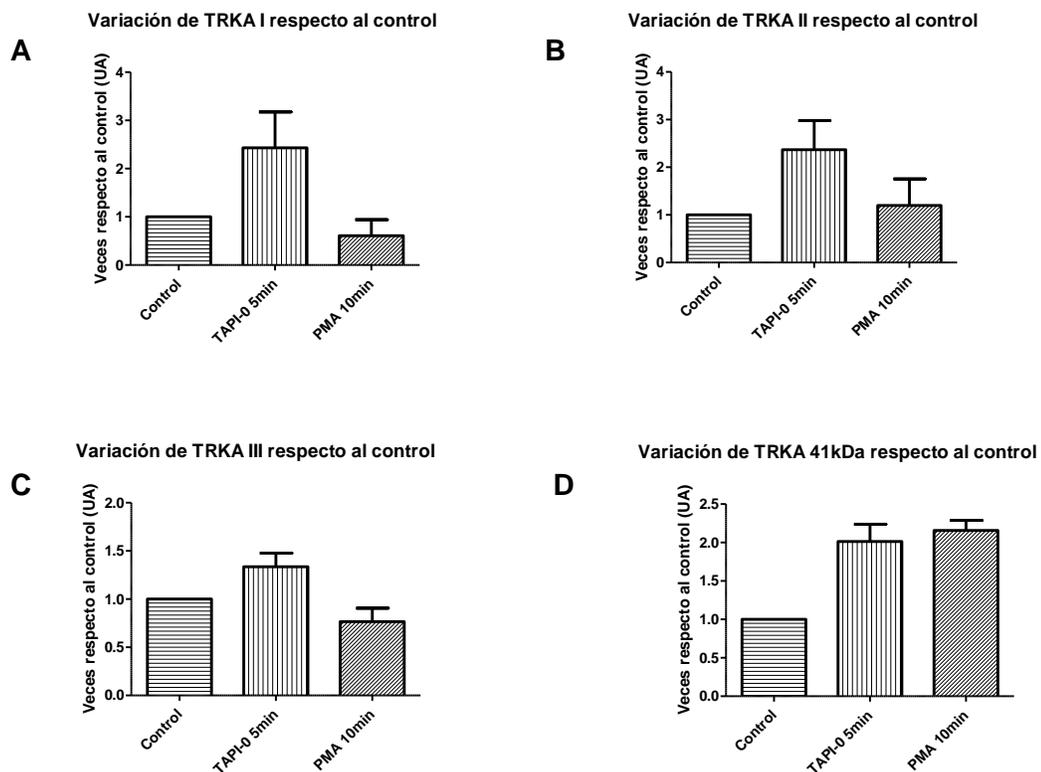


**Figura 19.- Isoformas de TRKA en la línea celular A2780, al usar un inhibidor y un estimulador de la actividad de ADAM17.** La figura muestra un gel para la detección de TRKA fosforilado (TRKA-p) en la línea celular de cáncer ovárico epitelial (A2780), al usar un inhibidor de ADAM17 (TAPI-0) y un estimulador de la actividad de ADAM17 (PMA). Las bandas detectadas son de 140, 100 y 41 kDa.

Al expresar los resultados como la variación de cada banda de TRKA-p con respecto a la condición control, encontramos un leve aumento esperado en las bandas

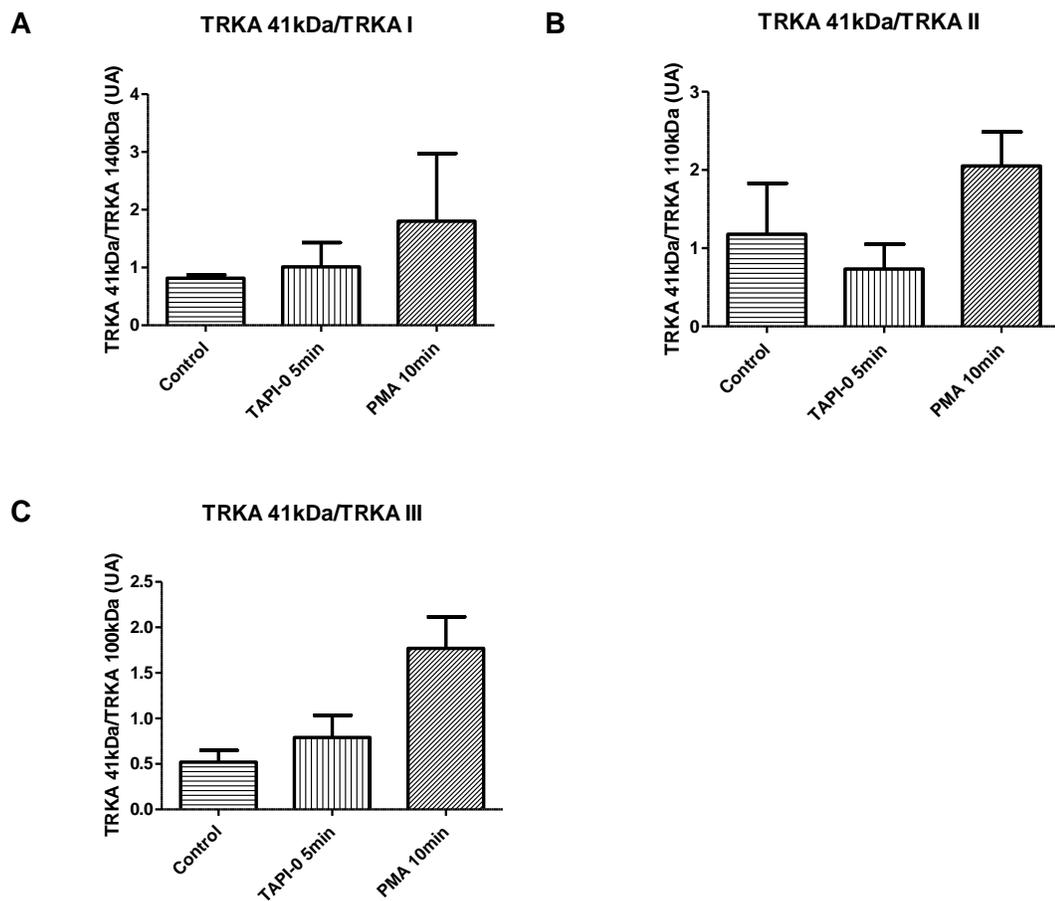
de mayor peso molecular del receptor, aunque dicho aumento no fue significativo. Sin embargo, no fue posible apreciar el efecto esperado en la banda de 41 kDa, donde, al inhibir la actividad de ADAM17, se esperaba ver una disminución de sus niveles.

En cuanto al uso de PMA, con el fin de estimular la actividad de ADAM17, encontramos una leve disminución en los niveles de las isoformas de TRKA de 140 y 100 kDa, aunque los resultados no fueron significativos. También observamos un aumento en los niveles de la banda de 41 kDa, aunque tampoco fue significativo.



**Figura 20.- Variación de los niveles de TRKA con respecto a la condición control, al usar un inhibidor y un estimulador de la actividad de ADAM17.** Relación entre los niveles proteicos de TRKA I fosforilado (TRKA I-p) (A), TRKA II fosforilado (TRKA II-p) (B), TRKA III fosforilado (TRKA III-p) (C) y TRKA fosforilado de 41 kDa (TRKA-p 41kDa) (D), con respecto a la condición control, expresado en unidades arbitrarias (UA), al usar un inhibidor de ADAM17 (TAPI-0) y un estimulador de ADAM17 (PMA) (n=3).

Si analizamos la relación entre la banda de 41 kDa con respecto al resto de las isoformas del receptor, tampoco pudimos encontrar diferencias significativas, aunque vemos mayores niveles en dichas relaciones al usar el estimulador de la actividad de ADAM17. Al utilizar TAPI-0, en cambio, no vimos una disminución clara en la relación de la banda de 41 kDa respecto al resto de las isoformas.



**Figura 21.- Relación entre las isoformas de TRKA en la línea celular A2780, al usar un inhibidor y un estimulador de la actividad de ADAM17.** Relación entre la banda de 41 kDa y las bandas de TRKA I (A), TRKA II (B) y TRKA III (C), expresado en unidades arbitrarias (UA), al usar un inhibidor de ADAM17 (TAPI-0) y un estimulador de ADAM17 (PMA) (n=3).

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Nuestro grupo había mostrado previamente que el receptor TRKA podría ser considerado un marcador de mal pronóstico en cáncer ovárico epitelial, debido a que tanto el receptor total como el fosforilado o activo, aumentan con la progresión del cáncer ovárico epitelial.

Resultados de esta tesis muestran la presencia de tres transcritos del receptor TRKA, obtenidos por PCR convencional, tanto en muestras de ovario como en una línea celular de cáncer ovárico epitelial. En las muestras de cáncer ovárico epitelial pobremente diferenciado (COE III), se encontraron mayores niveles del mRNA de los tres transcritos, lo cual sugiere un rol importante del receptor TRKA en la progresión de esta malignidad.

Mediante *Western blot*, fue posible detectar bandas de 140, 110 y 100 kDa, tanto para TRKA total como para TRKA-p, que corresponde a la forma activa del receptor. Las bandas de 140 y 110 kDa del receptor TRKA han sido descritas en la literatura (Cabrera y cols., 1996), siendo la de 140 kDa la banda que clásicamente se describe como TRKA. En algunos casos también se detecta una banda de 110 kDa, que ha sido referida como una banda del receptor que no se encuentra totalmente glicosilado (Cabrera y cols., 1996).

En cuanto a la expresión de una isoforma de TRKA de 100 kDa detectada por *Western blot*, este resultado es de especial interés, ya que estudios en neuroblastoma (Tacconelli y cols., 2004) y en timo (Tacconelli y cols., 2007), muestran la existencia de una isoforma de TRKA, a la cual denominaron TRKA III, de 100 kDa, que no se une ni responde a NGF (Tacconelli y cols., 2004), encontrándose activada de forma constitutiva, independientemente del ligando. Además, ellos vieron que la expresión de este transcrito del receptor era regulada por hipoxia. Es por ello que resulta interesante

el aparente aumento de la isoforma TRKA III en las muestras de cáncer ovárico epitelial, ya que si se comprueba que esta isoforma de TRKA también actúa como oncogen, su presencia y aumento en estas muestras podría explicar en parte el aumento de actividad de TRKA observado en el cáncer ovárico (Davidson y cols., 2003; Campos y cols., 2007; Tapia y cols., 2011).

La presencia del receptor TRKA-p correspondiente a la banda 41 kDa que se ha encontrado en los tejidos de ovario humano, y según los antecedentes bibliográficos al respecto, indicaría que puede ser producto de un corte de uno o más de los receptores de mayor peso molecular, y que correspondería a un producto constituido por el dominio transmembrana y el dominio intra-citoplasmático. Sin embargo, no sabemos si este receptor se comportan como un encogen. Aunque no fue posible encontrar diferencias significativas en la banda de 41 kDa en los distintos tipos de tejidos ováricos, el análisis de esta banda del receptor parece aumentar progresivamente a medida que progresa el cáncer ovárico, encontrándose con bajos niveles en las muestras de ovarios normales inactivos. Esto nos indicaría que esta banda de menor peso molecular podría estar cumpliendo un papel en la progresión de la enfermedad. El no haber encontrado diferencias significativas en los niveles de la banda de 41 kDa podría deberse a que esta banda no fue detectada en todas las muestras analizadas, particularmente en aquellas correspondientes a los estados tempranos de la progresión de la enfermedad. Sin embargo, esta misma situación resulta interesante, si se considera que esta forma de TRKA-p fue detectada en un 75% de las muestras de cáncer ovárico analizadas, lo cual nos sugiere que esta banda de menor peso molecular podría estar cumpliendo un papel importante en la progresión de la enfermedad, y posiblemente sea un oncogen.

Por otra parte, al relacionar los niveles de la banda de 41 kDa con aquellos del resto de las isoformas del receptor, encontramos un aumento en dicha relación en las muestras de cáncer ovárico epitelial pobremente diferenciado (COE III), en comparación con muestras de tumores benignos. Este aumento fue significativo para la relación con las bandas de 140 (TRKA I) y 110 kDa (TRKA II) del receptor, lo cual nos sugiere que son estas isoformas de TRKA las que podrían ser blanco de ADAM17,

para dar origen a la banda de 41 kDa encontrada.

También hemos encontrado expresión de la metaloproteinasa ADAM17 en ovario, con una tinción citoplasmática en las células epiteliales. Los resultados de la Inmunohistoquímica muestran un aumento en su inmunodetección en muestras de cáncer ovárico de grado 3 (COE III), en comparación a muestras de tumores borderline (TBO). También se encontraron diferencias significativas entre los distintos grados de diferenciación del cáncer ovárico, al analizar sólo las muestras de COE I, COE II y COE III (cáncer ovárico epitelial de grados 1, 2 y 3, respectivamente), encontrándose una mayor inmunodetección en las muestras de cáncer ovárico menos diferenciado o COE III, en comparación a las muestras de cáncer bien diferenciado o COE I. Estos resultados sugieren que ADAM17 puede ser importante en la progresión de la enfermedad.

Además, encontramos una correlación positiva, dada por el coeficiente de correlación de Pearson, entre las proteínas ADAM17 y TRKA-p. Tanto para las mediciones de H-Score como de porcentaje de células positivas, se obtuvo una relación positiva significativa entre ambas proteínas en las muestras de cáncer ovárico epitelial de todos los grados de diferenciación. Esto nos indica que los niveles de ambas proteínas se encuentran relacionados de forma tal, que si una de ellas aumenta, también lo hace la otra. Así, estos resultados nos estarían dando una primera aproximación sobre la relación que existe entre el receptor TRKA y la metaloproteinasa ADAM17 en el cáncer ovárico epitelial.

Resultados no publicados de nuestro laboratorio, muestran un aumento significativo en los niveles del transcrito de ADAM17 en muestras de ovario, entre las muestras de ovario inactivo y tumores benignos, en comparación con cáncer ovárico epitelial de grado 2 (COE II). Sin embargo, el análisis de las muestras de cáncer no muestra diferencias significativas entre ellas. Esto nos indicaría que las diferencias significativas que encontramos entre las 3 clasificaciones de cáncer ovárico epitelial mediante Inmunohistoquímica, podrían ser resultado de variaciones en los niveles proteicos de

ADAM17, por efecto de cambios post-traduccionales, como son el paso de la pro-forma de la proteína a su forma activa.

Con el propósito de esclarecer este último punto, es que analizamos los niveles de ADAM17 en ovario mediante *Western blot*. Aunque encontramos niveles levemente más elevados de la proteasa en muestras de cáncer ovárico epitelial de grados 2 y 3, éstos cambios no fueron significativos. Sin embargo, el aparente aumento de la forma activa de ADAM17 en el cáncer ovárico epitelial más avanzado, además de los altos niveles encontrados mediante la semi-cuantificación de las Inmunohistoquímicas, nos sugiere que esta metaloproteinasas podría estar participando en la metástasis de este tipo de cáncer. Hay trabajos que muestran tal rol de ADAM17, como el de Rosso y cols., 2007, quienes encontraron que ADAM17 aumenta la liberación *in vitro* de la forma soluble de ALCAM (*Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule*), molécula que podría estar involucrada en la metástasis en el cáncer ovárico.

Al realizar tanto las Inmunocitoquímicas como las Inmunofluorescencias, para analizar la localización celular de TRKA y de ADAM17, vimos que la inmunodetección de ambas proteínas parecía no ser exclusiva de la membrana plasmática. A pesar de que las células no fueron permeabilizadas, la fijación con paraformaldehído al 4% durante 15 minutos de igual forma parece haber permeabilizado un poco la membrana plasmática, ya que observamos tinción intensa en la zona perinuclear de las células. Al realizar la Inmunofluorescencia, no fue posible observar fluorescencia sólo en la membrana citoplasmática, sino que también parece observarse en el citoplasma y la región perinuclear. Estos resultados están de acuerdo a lo reportado en la literatura, donde se describe una localización perinuclear y de membrana para ambas proteínas (Díaz-Rodríguez y cols., 2002).

En cuanto a la semi-cuantificación de la inmunodetección de ADAM17 y TRKA en las líneas celulares, encontramos mayores niveles de ambas proteínas en la línea celular de cáncer ovárico epitelial (A2780), en comparación con la línea celular de epitelio de la superficie normal del ovario (HOSE).

El análisis de la localización celular de ADAM17 y TRKA realizado en un microscopio confocal, muestra una cercanía entre ambas proteínas en la membrana celular, observada al sobreponer las microfotografías de las fluorescencias roja (para TRKA) y verde (para ADAM17). Este resultado confirma así lo observado al analizar las Inmunofluorescencias.

En los experimentos realizados con un inhibidor de la actividad de ADAM17 (TAPI-0), se esperaba ver un efecto sobre la banda de TRKA-p de 41 kDa, ya que si esta forma es resultado de la eliminación del ectodominio del receptor, por efecto de la metaloproteínasa, al inhibir ADAM17 se esperaba encontrar una consecuente disminución en los niveles de la banda de TRKA-p de 41 kDa.

Al analizar el efecto de un inhibidor y un activador o estimulador de ADAM17 en la línea de cáncer ovárico epitelial, no se encontraron cambios según lo esperado. El uso del inhibidor TAPI-0 durante 5 minutos no nos permitió ver la disminución esperada en los niveles de la banda de 41 kDa del receptor TRKA. Además, se observan mayores niveles de las bandas de 140, 110 y 100 kDa a los 5 min de incubación con TAPI-0, sin embargo, estos no son significativos. Ya que no se observó disminución en los niveles de la banda de 41 kDa de TRKA al usar TAPI-0, pensamos que la concentración de TAPI-0 que se utilizó no fue suficiente para inhibir la actividad de ADAM17. Además, un problema recurrente en el uso de inhibidores de proteínas ADAMs, es la baja especificidad que poseen (Tape y cols., 2011). Esto se debe a que la mayoría de ellos se encuentran diseñados contra el sitio activo, resultando en la inhibición preferencial de una proteína ADAM sobre las otras.

Por otra parte, el uso de PMA para estimular la actividad de ADAM17 mostró un aumento en los niveles de TRKA-p de 41 kDa, acompañado por una disminución de los niveles de las bandas de 140 y 100 kDa. Sin embargo, al igual que los resultados con TAPI-0, en este caso tampoco fue posible encontrar diferencias significativas.

Los resultados encontrados luego de la realización de esta tesis, muestran por primera vez la presencia de isoformas del receptor TRKA en ovario, encontrándose mayor expresión de los tres transcritos detectados del receptor en muestras de cáncer ovárico epitelial menos diferenciado.

Los mayores niveles encontrados en la relación de la banda de 41 kDa del receptor TRKA, con respecto a las isoformas del receptor TRKA I y TRKAII, en las muestras de cáncer ovárico epitelial pobremente diferenciado, nos sugieren que esta isoforma de menor peso molecular podría estar cumpliendo un papel importante en esta enfermedad, tal vez favoreciendo la mantención del cáncer ovárico. Es por ello que resulta interesante también la relación que se detectó entre los niveles de ADAM17 y del receptor TRKA en las muestras de cáncer ovárico.

La alta expresión proteica de ADAM17 encontrada tanto en los tejidos de cáncer ovárico, como en la línea celular de cáncer ovárico, podría indicar que esta metaloproteínasa estaría cumpliendo un papel importante en esta malignidad, tal vez ayudando a la remodelación del tejido, o cortando ectodominios de receptores y factores de crecimiento, promoviendo su actividad.

El que el receptor TRKA pueda ser uno de los posibles blancos de ADAM17, podría servir para el estudio y desarrollo de terapias que inhiban la actividad de ADAM17. Además, si se elimina el ectodominio del receptor TRKA a la circulación, su detección podría servir como un marcador tumoral diagnóstico en el cáncer ovárico epitelial.

## REFERENCIAS

ABIR R, FISCH B, JIN S, BARNNET M, BEN-HAROUSH A Y FELZ C. (2005) Presence of NGF and its receptors in ovaries from human fetuses and adults. Mol Hum Reprod. Vol 11 (4): 229–236.

ALBERTI L, CARNITI C, MIRANDA C, ROCCATO E Y PIEROTTI MA. (2003) RET and NTRK1 Proto-Oncogenes in Human Diseases. J Cell Physiol. Vol 195: 168–186.

AREVALO JC, CONDE B, HEMPSTEAD BL, CHAO MV, MARTIN-ZANCA D Y PEREZ P. (2000) TrkA immunoglobulin-like ligand binding domains inhibit spontaneous activation of the receptor. Mol. Cell. Biol. Vol 20: 5908–5916.

ARRIBAS, J Y MERLOS-SUAREZ A. (2003) Shedding of plasma membrane proteins. Curr Top Dev Biol. Vol 54: 125-144.

AUERSPERG N, WONG A, CHOI K-C, KANG SK Y LEUNG P. (2001) Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology, and Pathology. Endocr Rev. Vol 22 (2): 255–288.

BARKER PA, LOMEN-HOERTH C, GENSCH EM, MEAKIN SO, GLASS DJ Y SHOOTER EM. (1993) Tissue-specific alternative splicing generates two isoforms of the TRKA receptor. J Biol Chem. Vol 268 (20): 15150-15157.

BAST RC JR, HENNESSY B Y MILLS GB. (2009) The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. Nat Rev Cancer. Vol 6: 415-428.

BJØRGE T, LIE AK, HOVIG E, GISLEFOSS RE Y HANSEN S. (2004) BRCA1 mutations in ovarian cancer and borderline tumours in Norway: a nested case control study. Br J Cancer. Vol 91: 1829–1834.

BLOBEL CP. (2005) ADAMs: key components in EGFR signalling and development. Nat Rev Mol Cell Biol. Vol 6: 32–43.

CABRERA N, DIAZ-RODRIGUEZ E, BECKER E, MARTIN-ZANCA D Y PANDIELLA A. (1996) TrkA Receptor Ectodomain Cleavage Generates a Tyrosine-phosphorylated Cell-associated Fragment. J Cell Biol. Vol 132 (3): 427-436.

CALZA L, GIARDINO L, GIULIANI A, ALOE L Y LEVI-MONTALCINI R. (2001) Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors.

Proc Natl Acad Sci. Vol 98: 4160–4165.

CAMPOS X, MUÑOZ Y, SELMAN A, YAZIGI R, MOYANO L, WEINSTEIN-OPPENHEIMER C, LARA HE Y ROMERO C. (2007) 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. Vol 104 (1):168-175.

CANAULT M, TELLIER E, BONARDO B, MAS E, AUMAILLEY M, JUHAN-VAGUE I, NALBONE G Y PEIRETTI F. (2006) FHL2 interacts with both ADAM-17 and the cytoskeleton and regulates ADAM-17 localization and activity. J Cell Physiol. Vol 208 (2): 363–372.

CANAULT M, CERTEL K, SCHATZBERG D, WAGNER DD Y HYNES RO (2010) The Lack of ADAM17 Activity during Embryonic Development Causes Hemorrhage and Impairs Vessel Formation. PLoS ONE Vol 5 (10): e13433. doi:10.1371/journal.pone.0013433.

Cancer statistics, 2011. SIEGEL R, WARD E, BRAWLEY O Y JEMAL A. (2011) CA Cancer J Clin. Vol 61 (4): 212-236.

CANTARELLA G, LEMPEREUR L, PRESTA M, RIBATTI D, LOMBARDO G, LAZAROVICI P, ZAPPALÀ G, PAFUMI C Y BERNARDINI R. (2002) Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. FASEB J. Vol 16: 1307–1309.

CENI C, KOMMADDI RP, THOMAS R, VEREKER E, LIU X, MCPHERSON PS, RITTER B Y BARKER PA. (2010) The p75NTR intracellular domain generated by neurotrophin-induced receptor cleavage potentiates Trk signaling. J Cell Sci. Vol 123 (Pt 13):2299-2307.

CHIARETTI A, PIASTRA M, CARESTA E, NANNI Y ALOE L. (2002) Improving ischaemic skin revascularization by nerve growth factor in a child with crush syndrome. Arch Dis Child Vol 87: 446–448.

DALAL R Y DJAKIEW D. (1997) Molecular characterization of neurotrophin expression and the corresponding tropomyosin receptor kinases (trks) in epithelial and stromal cells of the human prostate. Mol Cell Endocrinol. Vol 134: 15–22.

DAVIDSON B, REICH R, LAZAROVICI P, NESLAND JM, SKREDE M, RISBERG B, TROPÉ CG Y FLØRENES VA. (2003) Expression and Activation of the Nerve Growth

Factor Receptor TrkA in Serous Ovarian Carcinoma. Clin Cancer Res. Vol 9: 2248–2259.

DÍAZ-RODRÍGUEZ E, CABRERA N, ESPARÍS-OGANDO A, MONTERO JC Y PANDIELLA A. (1999) Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. Eur J Neurosci. Vol. 11: 1421–1430.

DIAZ-RODRIGUEZ E, MONTERO JC, ESPARIS-OGANDO A, YUSTE L Y PANDIELLA A. (2002) Extracellular signal-regulated kinase phosphorylates tumor necrosis factor alpha-converting enzyme at threonine 735: a potential role in regulated shedding. Mol Biol Cell. Vol 13 (6): 2031-2044.

DISSEN GA, PARROTT JA, SKINNER MK, HILL DF, COSTA ME Y OJEDA SR. (2000) Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. Endocrinology. Vol 141 (12): 4736-4750.

DISSEN GA, ROMERO C, NEWMAN-HIRSHFIELD A Y OJEDA SR. (2001) Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. Endocrinology. Vol 142: 2078–2086.

DISSEN GA, ROMERO C, PAREDES A Y OJEDA SR. (2002) Neurotrophic Control of Ovarian Development. Microsc Res Tech. Vol 59 (6): 509-515.

DUFFY MJ, MCKIERNAN E, O'DONOVAN N Y MCGOWAN PM. (2009) Role of ADAMs in Cancer Formation and Progression. Clin Cancer Res. Vol 15 (4): 1140-1144.

EMANUELI C, SALIS MB, PINNA A, GRAIANI G, MANNI L Y MADEDDU P. (2002) Nerve growth factor promotes angiogenesis and arteriogenesis in ischemic hindlimbs. Circulation. Vol 106: 2257–2262.

FLEMING JS, BEAUGIÉ CR, HAVIV I, CHENEVIX-TRENCH G Y TAN OL. (2006) At the Cutting Edge. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. Mol Cell Endocrinol. Vol 247: 4–21.

GRECO A, VILLA R Y PIEROTTI MA. (1996) Genomic organization of the human NTRK1 gene. Oncogene. Vol 13 (11): 2463-2466.

GOFF BA, MANDEL L, MUNTZ HG Y MELANCON CH. (2000) Ovarian Carcinoma Diagnosis. Results of a National Ovarian Cancer Survey. Cancer. Vol 89: 2068–2075.

GOOZ P, GOOZ M, BALDYS A Y HOFFMAN S (2009) ADAM-17 regulates

endothelial cell morphology, proliferation, and in vitro angiogenesis. Biochem Biophys Res Commun. Vol 380: 33–38.

GRANT-TSCHUDY KS Y WIRA CR. (2004) Effect of estradiol on mouse uterine epithelial cell transepithelial resistance (TER). AJRI. Vol 52: 252–262.

GUTIÉRREZ-LÓPEZ MD, GILSANZ A, YAÑEZ-MÓ M, OVALLE S, LAFUENTE EM, DOMÍNGUEZ C, MONK PN, GONZÁLEZ-ALVARO I, SÁNCHEZ-MADRID F Y CABAÑAS C. (2011) The sheddase activity of ADAM17/TACE is regulated by the tetraspanin CD9. Cell Mol Life Sci. DOI 10.1007/s00018-011-0639-0.

HARTGE, P. (2010) Designing Early Detection Programs for Ovarian Cancer. J Natl Cancer Inst. Vol 102 (1): 3-4.

JULIO-PIEPER M, LOZADA P, TAPIA V, VEGA M, MIRANDA C, VANTMAN D, OJEDA SR Y ROMERO C. (2009) Nerve Growth Factor Induces Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Granulosa Cells via a TRKA Receptor/Mitogen-Activated Protein Kinase-Extracellularly Regulated Kinase 2-Dependent Pathway. J Clin Endocrinol Metab. Vol 94(8): 3065–3071.

KAWASHIMA I, OKAZAKI T, NOMA N, NISHIBORI M, YAMASHITA Y Y SHIMADA M. (2008) Sequential exposure of porcine cumulus cells to FSH and/or LH is critical for appropriate expression of steroidogenic and ovulation-related genes that impact oocyte maturation in vivo and in vitro. Reproduction. Vol 136 (1): 9-12.

KENCHAPPA RS, TEP C, KORADE Z, URRRA S, BRONFMAN FC, YOON SO Y CARTER BD. (2010) p75 neurotrophin receptor-mediated apoptosis in sympathetic neurons involves a biphasic activation of JNK and up-regulation of tumor necrosis factor- $\alpha$ -converting enzyme/ADAM17. J Biol Chem. Vol 285 (26):20358-20368.

KIRKEGAARD T, NARESH A, SABINE VS, TOVEY SM, EDWARDS J, DUNNE B, COOKE TG, JONES FEY Y BARTLETT JMS. (2008) Expression of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Converting Enzyme in Endocrine Cancers. Am J Clin Pathol. Vol 129: 735-743.

KRUK PA, UITTO V-J, FIRTH JD, DEDHAR S Y AUERSPERG N. (1994) Reciprocal interaction between human ovarian surface epithelial cells and adjacent extracellular matrix. Exp. Cell Res. Vol 215 (1): 97–108.

KWAK HI, MENDOZA EA Y BAYLESS KJ (2009) ADAM17 co-purifies with TIMP-3

and modulates endothelial invasion responses in three-dimensional collagen matrices. Matrix Biol. Vol 28: 470–479.

LAGADEC C, MEIGNAN S, ADRIAENSSENS E, FOVEAU E, VANHECKE E, ROMON R, TOILLON R-A, OXOMBRE B, HONDERMARCK H Y LE BOURHIS X. (2009) TrkA overexpression enhances growth and metastasis of breast cancer cells. Oncogene. Vol 28:1960–1970.

MARTIN-ZANCA D, HUGHES SH Y BARBACID M. (1986) A human oncogene formed by the fusion of truncated tropomyosin and protein tyrosine kinase sequences. Nature. Vol 319: 743–748.

MCGOWAN PM, RYAN BM Y HILL ADK. (2007) ADAM-17 expression in breast cancer correlates with variables of tumor progression. Clin Cancer Res. Vol 13 (8): 2235–2243.

MCGOWAN PM, MCKIERNAN E, BOLSTER F, RYAN BM, HILL ADK, MCDERMOTT EW, EVOY D, O’HIGGINS N, CROWN J Y DUFFY MJ. (2008) ADAM-17 predicts adverse outcome in patients with breast cancer. Ann Oncol. Vol 19: 1075–1081.

MOR G, VISINTIN I, LAI Y, ZHAO H, SCHWARTZ P, RUTHERFORD T, YUE L, BRAY-WARD P Y WARD DC. (2005) Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci U S A. Vol 102 (21) :7677-7682.

MULLBERG J, SCHOOLTINK H, STOYAN T, HEINRICH PC Y ROSE-JOHN S. (1992) Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. Biochem Biophys Res Commun. Vol 189 (2): 794-800.

MURDOCH WJ Y MCDONNELL AC. (2002) Roles of the ovarian surface epithelium in ovulation and carcinogenesis. Reproduction. Vol 123: 743–750.

MUÑOZ, M. Detección del Receptor TrkA como un posible marcador pronóstico y de progresión en Cáncer Ovárico Epitelial (COE). Tesis de Magíster en Bioquímica. Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción. Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

ØDEGAARD E, STAFF AC, ABELER VM, KOPOLOVIC J, ONSRUD M, LAZAROVICI P Y DAVIDSON B. (2007) The activated nerve growth factor receptor p-TrkA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. Hum Pathol. Vol

38: 140– 146.

OLIVA E, BRANTON P Y SCULLY R. (2005) Ovary: Protocol applies to all primary borderline and malignant surface epithelial tumors, germ cell tumors, and sex cord-stromal tumors.

[http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer\\_protocols/2005/ovary05\\_ckw.pdf](http://www.cap.org/apps/docs/committees/cancer/cancer_protocols/2005/ovary05_ckw.pdf)

Documento descargado de la página del College of American Pathologists, al 11/06/2010.

PALMER C, DUAN X, HAWLEY S, SCHOLLER N, THORPE JD, SAHOTA RA, WONG MQ, WRAY A, BERGAN LA, DRESCHER CW, MC INTOSH MW, BROWN PO, NELSON BH Y URBAN N. (2008) Systematic Evaluation of Candidate Blood Markers for Detecting Ovarian Cancer. PLoS ONE. Vol 3 (7): e2633.doi:10.1371/journal.pone.0002633.

PESCHON JJ, SLACK JL, REDDY P, STOCKING KL, SUNNARBORG SW, LEE DC, RUSSELL WE, CASTNER BJ, JOHNSON RS, FITZNER JN, BOYCE RW, NELSON N, KOZLOSKY CJ, WOLFSON MF, RAUCH CT, CERRETTI DP, PAXTON RJ, MARCH CJ Y BLACK RA. (1998) An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. Science. Vol 282:1281–1284.

PIEROTTI MA, BONGARZONE I, BORRELLO MG, GRECO A, PILOTTI S Y SOZZI G. (1996) Cytogenetics and molecular genetics of the carcinomas arising from the thyroid epithelial follicular cells. Genes Chromosome Cancer. Vol 16 (1):1–14.

Programa Nacional del Cáncer. 2004. Ministerio de Salud del Gobierno de Chile.

Documento descargado desde

<http://www.redsalud.gov.cl/archivos/cancer/prcancernino.pdf>, al 10-05-2010.

REDDY P, SLACK JL, DAVIS R, CERRETTI DP, KOZLOSKY CJ, BLANTON RA, SHOWS D, PESCHON JJ Y BLACK RA. (2000) Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. J Biol Chem. Vol 275 (19): 14608-14614.

REUTHER GW, LAMBERT QT, CALIGIURI MA Y DER CJ. (2000) Identification and characterization of an activating TrkA deletion mutation in acute myeloid leukemia. Mol Cell Biol. Vol 20: 8655- 8666.

ROSSO O, PIAZZA T, BONGARZONE I, ROSSELLO A, MEZZANZANICA D, CANEVARI S, ORENGO AM, PUPPO A, FERRINI S Y FABBI M. (2007) The ALCAM shedding by the metalloprotease ADAM17/TACE is involved in motility of ovarian carcinoma cells. Mol Cancer Res. Vol 5 (12): 1246-1253.

SALAS C, JULIO-PIEPER M, VALLADARES M, POMMER R, VEGA M Y MASTRONARDI C. (2006) Nerve growth factor-dependent activation of TRKA receptors in the human ovary results in synthesis of FSH receptors and estrogen secretion. J Clin Endocrinol Metab. Vol 91: 2396–2403.

SEO K, CHOI J, PARK M Y RHEE C. (2001) Angiogenesis effects of nerve growth factor (NGF) on rat corneas. J Vet Sci. Vol 2 82): 125–130.

SHI W, CHEN H, SUN J, BUCKLEY S, ZHAO J, ANDERSON KD, WILLIAMS RG Y WARBURTON D. (2003) TACE is required for fetal murine cardiac development and modeling. Dev Biol. Vol 261: 371–380.

SCHLONDORFF J, BECHERER J.D. Y BLOBEL C.P. (2000) Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor  $\alpha$  convertase (TACE). Biochem. J. Vol 347: 131-138.

SINNATHAMBY G, ZERFASS J, HAFNER J, BLOCK P, NICKENS Z, HOBEIKA A, SECORD AA, LYERLY HK Y MORSE MA, PHILIP R. (2011) ADAM metallopeptidase domain 17 (ADAM17) is naturally processed through major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and is a potential immunotherapeutic target in breast, ovarian and prostate cancers. Clin Exp Immunol. Vol 163 (3):324-332.

SOOND, S. M., EVERSON, B., RICHES, D. W. Y MURPHY, G. (2005). ERK-mediated phosphorylation of Thr735 in TNF $\alpha$ -converting enzyme and its potential role in TACE protein trafficking. J. Cell Sci. Vol 118: 2371-2380.

STONE AL, KROEGER M Y SANG QXA. (1999) Structure-Function Analysis of the ADAM Family of Disintegrin-Like and Metalloproteinase-Containing Proteins (Review). J Protein Chem. Vol 18 (4): 447-465.

TACCONELLI A, FARINA AR, CAPPABIANCA L, DESANTIS G, TESSITORE A, VETUSCHI A, SFERRA R, RUCCI N, ARGENTI B, SCREPANTI I, GULINO A Y MACKAY AR. (2004) TrkA alternative splicing: a regulated tumor-promoting switch in human neuroblastoma. Cancer Cell. Vol 6: 347–360.

TACCONELLI A, FARINA AR, CAPPABIANCA L, GULINO A Y MACKAY AR. (2005) TrkAIII A Novel Hypoxia-Regulated Alternative TrkA Splice Variant of Potential Physiological and Pathological Importance. Cell Cycle. Vol 4 (1): 8-9.

TACCONELLI A, FARINA AR, CAPPABIANCA L, CEA G, PANELLA S, CHIODA A, GALLO R, CINQUE B, SFERRA R, VETUSCHI A, CAMPESE AF, SCREPANTI I, GULINO A Y MACKAY AR. (2007) TrkAIII expression in the thymus. J Neuroimmunol. Vol 183 (1-2):151-161.

TANAKA Y, MIYAMOTO S, SUZUKI SO, OKI E, YAGI H, SONODA K, YAMAZAKI A, MIZUSHIMA H, MAEHARA Y, MEKADA E Y NAKANO H. (2005) Clinical Significance of Heparin-Binding Epidermal Growth Factor - Like Growth Factor and A Disintegrin and Metalloprotease 17 Expression in Human Ovarian Cancer. Clin Cancer Res. Vol 11 (13): 4783-4792.

TAPE CJ, WILLEMS SH, DOMBERNOWSKY SL, STANLEY PL, FOGARASI M, OUWEHAND W, MCCAFFERTY J Y MURPHY G. (2011) Cross-domain Inhibition of TACE Ectodomain. PNAS. Vol 108 (14): 5578-5583.

TAPIA V, GABLER F, MUÑOZ M, YAZIGI R, PAREDES A, SELMAN A, VEGA M Y ROMERO C. (2011). Tyrosine kinase A receptor (trkA): a potential marker in epithelial ovarian cancer. Gynecol Oncol. Vol 121 (1): 13-23.

URRA S, ESCUDERO CA, RAMOS P, LISBONA F, ALLENDE E, COVARRUBIAS P, PARRAGUEZ JI, ZAMPIERI N, CHAO MV, ANNAERT W, BRONFMAN FC. (2007) TrkA receptor activation by nerve growth factor induces shedding of the p75 neurotrophin receptor followed by endosomal gamma-secretase-mediated release of the p75 intracellular domain. J Biol Chem. Vol 282 (10):7606-7615.

WATSON FL, PORCIONATTO MA, BHATTACHARYYA A, STILES CD Y SEGAL RA. (1999) TrkA glycosylation regulates receptor localisation and activity. J. Neurobiol. Vol 39: 323–336.

YAMASHITA Y, HISHINUMA M Y SHIMADA M. (2009) Activation of PKA, p38 MAPK and ERK1/2 by gonadotropins in cumulus cells is critical for induction of EGF-like factor and TACE/ADAM17 gene expression during in vitro maturation of porcine COCs. J Ovarian Res. Vol 24: 2:20.

ZHAO J, CHEN H, PESCHON JJ, SHI W, ZHANG Y, FRANK SJ Y WARBURTON

D. (2001) Pulmonary hypoplasia in mice lacking tumor necrosis factor-alpha converting enzyme indicates an indispensable role for cell surface protein shedding during embryonic lung branching morphogenesis. Dev Biol. Vol 232: 204–218.