



UNIVERSIDAD DE CHILE
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**NIVELES DE RUNX2 EN CÁNCER DE OVARIO EPITELIAL Y
EFECTO *IN VITRO* DE LOS FACTORES PROANGIOGÉNICOS
NGF E HIPOXIA SOBRE SUS NIVELES**

Memoria para optar al título profesional de bioquímico
Paula Andrea García Muñoz

Directores de Tesis:
Dra. Carmen Romero Osses
Dr. Mario Galindo Díaz

SANTIAGO - CHILE
2016

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	
FINANCIAMIENTO	i
DIFUSIÓN CIENTÍFICA	i
ÍNDICE DE TABLAS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS	iii
RESUMEN	v
ABSTRACT	viii
	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
I. 1. Cáncer ovárico	1
I. 1. 1. Clasificación de las neoplasias ováricas.....	1
I. 2. Cáncer ovárico epitelial	1
I.2.1. Epidemiología.....	1
I.2.2. Factores de riesgo y protectores.....	1
I.2.3. Sintomatología.....	2
I.2.4. Diagnóstico.....	2
I.2.5. Tratamiento.....	2
I.2.6. Pronóstico.....	3
I.2.7. Etiología.....	3
I.2.8. Clasificación del cáncer ovárico epitelial.....	3
I. 3. Factor de crecimiento nervioso, NGF	4
I.3.1. Generalidades sobre NGF.....	4
I.3.2. NGF en el ovario normal humano.....	5
I. 3.3. NGF en cáncer ovárico epitelial y su rol como factor pro-angiogénico.....	5
I. 4. Hipoxia	6
I.4.1. Hipoxia como factor pro-angiogénico.....	6
I. 5. Factor transcripcional relacionado a <i>Runt</i>, <i>RUNX2</i>	7
I.5.1. Generalidades sobre <i>RUNX2</i>	7
I.5.2. Regulación de <i>RUNX2</i>	7
I.5.3. Rol de <i>RUNX2</i> en procesos angiogénicos.....	8
I.5.4. <i>RUNX2</i> y su relación con los factores HIF e hipoxia.....	9
I.5.5. <i>RUNX2</i> en cáncer ovárico epitelial.....	10
I. 6. Planteamiento del problema	11
II. HIPÓTESIS	13
III. OBJETIVO GENERAL	13
IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
V. MATERIALES Y MÉTODOS	14
V. 1. Diseño experimental	14
V. 2. Ensayos <i>ex vivo</i>	14
V.2.1. Obtención y clasificación histológica de tejidos ováricos derivados de pacientes	15
V.2.1.a. Muestras de ovario normal inactivo, OVI.....	15

V.2.1.b. Muestras de tumores benignos, TBE.....	15
V.2.1.c. Muestras de tumores borderline, TBO.....	16
V.2.1.d. Muestras de cáncer ovárico epitelial seroso bien diferenciado o de grado I (COE I).....	16
V.2.1.e. Muestras de cáncer ovárico epitelial seroso moderadamente diferenciado o de grado II (COE II).....	16
V.2.1.f. Muestras de cáncer ovárico epitelial seroso pobremente diferenciado o de grado III (COE III).....	16
V.2.2. Grupos de estudio.....	16
V.2.2.a. OVI.....	16
V.2.2.b. TBE-TBO.....	16
V.2.2.c. COE.....	17
V.2.3. Tratamiento y almacenamiento de muestras.....	17
V.2.4. Obtención y cuantificación de proteínas de tejidos ováricos.....	17
V.2.5. Inmunohistoquímica de RUNX2 en tejidos ováricos.....	17
V.2.6. <i>Western blot</i> de RUNX2 en tejidos ováricos.....	20
V. 3. Ensayos <i>in vitro</i>	21
V.3.1. Líneas celulares.....	21
V.3.1.a. Línea celular de epitelio superficial ovárico normal, HOSE.....	21
V.3.1.b. Línea celular de cáncer ovárico epitelial, A2780.....	21
V.3.2. Cultivos celulares.....	22
V.3.3. Inmunocitoquímica de RUNX2 en líneas celulares HOSE y A2780.....	X
V.3.4. Obtención y cuantificación de proteínas totales desde cultivos de las líneas HOSE y A2780.....	23
V.3.5. Obtención de fracciones subcelulares a partir de cultivos de las líneas HOSE y A2780.....	24
V.3.6. Determinación de niveles basales de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780.....	26
V.3.7. Estímulos con NGF en cultivos celulares de las líneas HOSE y A2780....	26
V.3.8. Ensayos de hipoxia en cultivos celulares de las líneas HOSE y A2780....	27
V.3.9. Estímulos con CoCl ₂ en cultivos de las líneas celulares HOSE y A2780...	27
V.3.10. <i>Western Blot</i> de extractos de proteínas de las líneas celulares HOSE y A2780.....	28
V.3.10.a. <i>Western Blot</i> para la inmunodetección de RUNX2 en proteínas obtenidas en condiciones basales y tras estimulación con NGF y CoCl ₂	28
V.3.10.b. <i>Western Blot</i> para la inmunodetección de RUNX2 en proteínas obtenidas por fraccionamiento subcelular.....	28
V.3.10.c. <i>Western Blot</i> para la inmunodetección de RUNX2 y HIF-1α en proteínas obtenidas en ensayos de hipoxia.....	29
V. 4. Análisis estadístico	30
VI. Resultados	31
VI.1. Objetivo 1.....	31
VI.2. Objetivo 2.....	34
VI.3. Objetivo 3.....	36
VI.4. Objetivo 4.....	38
VI.4.1. Ensayos en cámara de hipoxia.....	38
VI.4.2. Estímulos con CoCl ₂	39

VII. DISCUSIÓN.....	45
VIII. CONCLUSIÓN.....	60
IX. BIBLIOGRAFÍA.....	61
X. ANEXOS.....	68
X.1. Autorización del Comité de ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile para el uso de muestras de pacientes en investigación	68
X.2. Consentimiento informado que las pacientes firman autorizando la donación y uso de muestras para su uso en investigación	69

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todo el equipo del laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción del Hospital Clínico de la Universidad de Chile en el cual desarrollé mi memoria de título. A la Dra. Carmen Romero quien dirigió este trabajo aportando trascendentalmente en mi formación como Bioquímica. Igualmente doy gracias a la Dra. Margarita Vega y Verónica Tapia, quienes también guiaron mi investigación.

Muy especialmente agradezco a mis compañeros y personal de laboratorio, Dra. Lorena Oróstica, Dra. Francisca Plaza, Dr. Carlos Rozas, Dra. Karla Kohan, Paula Cuevas, Christofer Vallejos, Silvana Girardi, Carolina Vera, Cristián Poblete, Isis Astorga, Sr. Egardo, Sra. Erminia, Sra. Soledad, Sra. Filomena y Don Carlos. Asimismo, manifiesto mi gratitud a todos quienes conocí en el laboratorio de Programación y Epigenética Perinatal de la Pontificia Universidad Católica de Chile, dirigido por la Dra. Paola Casanello, donde realicé parte de mi tesis.

Gracias a la Dra. Lorena García y el Dr. Alfonso Paredes, miembros de la comisión que revisó mi trabajo escrito. Les agradezco muy sinceramente todos sus comentarios, sugerencias y correcciones, porque permitieron mejorar mi tesis.

Agradezco a mis amigos porque fueron mi segunda familia, Carlos Rivera, Iván Hurtado, Pablo Veloso, Hugo Díaz, Fernanda Cuevas y Ayelén Almendras.

Finalmente, gracias a mis padres Luis y Raquel, mi hermana Rossana, mis sobrinas Francisca, Raquel, Martina y a mi prima Astrid.

FINANCIAMIENTO

Proyecto FONDECYT #1110372 (Dra. Carmen Romero Osses investigador principal)

DIFUSIÓN CIENTÍFICA

García P., Oróstica L., Vera C., Galindo M., Vega M., Romero C. Niveles del factor transcripcional RUNX2 en cáncer ovárico epitelial (Levels of transcriptional factor RUNX2 in epithelial ovarian cancer). XXVI Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. CHILE, Antofagasta, 2015,1.

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1 :Especificaciones de anticuerpos utilizados en <i>Western Blot</i> de proteínas de tejidos ováricos	21
Tabla 2 :Especificaciones de anticuerpos utilizados en Inmunocitoquímicas de líneas celulares	23
Tabla 3 :Especificaciones de anticuerpos utilizados en <i>Western Blot</i> de proteínas de cultivos celulares en condiciones basales y sometidas a estímulos con NGF u CoCl ₂	28
Tabla 4 :Especificaciones de anticuerpos utilizados en <i>Western Blot</i> de proteínas obtenidas por fraccionamiento subcelular de líneas celulares.....	29
Tabla 5 Especificaciones de anticuerpos utilizados en <i>Western Blot</i> de proteínas obtenidas de las líneas celulares sometidas a hipoxia	30

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 :Modelo propuesto.....	12
Figura 2 :Diseño experimental	14
Figura 3 :Presencia nuclear de RUNX2 en tejidos ováricos.....	32
Figura 4 :Niveles proteicos de RUNX2 en tejidos ováricos.....	33
Figura 5 :Presencia y localización subcelular de RUNX2 en línea celulares de epitelio ovárico.....	35
Figura 6 :Niveles proteicos basales de RUNX2 en línea celulares de epitelio ovárico.....	35
Figura 7 :Niveles proteicos nucleares de RUNX2 en líneas celulares de epitelio ovárico.....	36
Figura 8 :Niveles proteicos de RUNX2 en células HOSE estimuladas con NGF.....	37
Figura 9 :Niveles proteicos de RUNX2 en células A2780 estimuladas con NGF.....	38
Figura 10 :Niveles proteicos de RUNX2 en condiciones de normoxia e hipoxia en líneas celulares de epitelio ovárico.....	41
Figura 11 :Niveles proteicos de HIF-1 α en condiciones de normoxia e hipoxia en líneas celulares de epitelio ovárico.....	42
Figura 12 :Niveles proteicos de RUNX2 en células HOSE estimuladas con CoCl ₂	43
Figura 13 :Niveles proteicos de RUNX2 en células A2780 estimuladas con CoCl ₂	44

ABREVIATURAS

ACO	:Anticonceptivos orales
AKT	:Proteína serina/treonina kinasa-RAC (del inglés <i>RAC-serine/theonine-protein kinase</i>)
AMP	:Adenosín monofosfato
AMPK	:Proteína kinasa dependiente de AMP (del inglés <i>AMP-activated protein kinase</i>)
BAX	:Proteína X asociada a Bcl-2 (del inglés <i>Bcl-2-associated X protein</i>)
BCL-2	:Regulador de la apoptosis Bcl-2 (del inglés <i>Apoptosis regulator Bcl-2</i>)
BCA	:Ácido Bicinónico (del inglés <i>Bicinchoninic acid</i>)
BMP	:Proteína morfogénica del hueso (del inglés <i>Bone morphogenetic protein</i>)
BSA	:Albúmina de suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
BSO	:Salpingo-ooforectomía bilateral (del inglés <i>bilateral-oophorectomy salpingo</i>)
CBFα1	:Factor de unión al centro- α 1 (del inglés <i>core binding factor-β</i>)
CaCl₂	:Cloruro de Calcio
CA-125	:Antígeno del cáncer 125
CoCl₂	:Cloruro de cobalto
COE	:Cáncer ovárico epitelial
COE I	:Cáncer ovárico epitelial de grado I o bien diferenciado
COE II	:Cáncer ovárico epitelial de grado II o moderadamente diferenciado
COE III	:Cáncer ovárico epitelial de grado III o pobremente diferenciado
CT	:Tomografía computarizada (del inglés <i>computerized tomography</i>)
DAB	:3,3'-diaminobencidina
DMEM	:Medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)
DMOG	:Dimetil-oxaliglicina
DTT	:Ditiotreitol
EDTA	:Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
ERK	:Kinasa regulada por señales extracelulares (del inglés <i>Extracellular signal-regulated kinases</i>)
FBS	:Suero fetal bovino (del inglés <i>Fetal bovine serum</i>)
FGF	:Factor de crecimiento de fibroblastos (del inglés <i>Fibroblast growth factor</i>)
FIGO	:Federación internacional de ginecología y obstetricia
GAPDH	:Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (del inglés <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>)
HIF	:Factor inducido por hipoxia (del inglés <i>Hypoxia-inducible factor</i>)
HOSE	:Epitelio de la superficie ovárica humana (del inglés <i>Human Ovarian Surface Epithelium</i>)
HRP	:Peroxidasa de rábano picante (del inglés <i>Horseradish peroxidase</i>)
IGF-1	:Factor de crecimiento insulínico tipo 1 (del inglés <i>Insulin-like growth factor-1</i>)
JNK	:Kinasas c-Jun N-terminal (del inglés <i>c-Jun N-terminal kinases</i>)
KCl	:Cloruro de potasio
kDa	:kiloDalton
LMP	:Bajo potencial maligno (del inglés <i>low malignant potential</i>)
MAPK	:Proteínas kinasas activadas por mitógenos (del inglés <i>Mitogen-activated protein kinase</i>)
MgCl₂	:Cloruro de magnesio
miRNA	: Micro Ácido ribonucleico (del inglés <i>micro- Ribonucleic Acid</i>)
MMP	:Metaloproteinasas de matriz (del inglés <i>Matrix metalloproteinases</i>)

MRI	:Imagen por resonancia magnética (del inglés <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
mRNA	:Ácido ribonucleico mensajero (del inglés <i>messenger Ribonucleic Acid</i>)
mTORC1	:Complejo 1 diana de rapamicina en células de mamífero (del inglés <i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>)
NF-κB	:Factor nuclear κB (del inglés <i>Nuclear factor κB</i>)
NGF	:Factor de crecimiento nervioso (del inglés <i>Nerve Growth Factor</i>)
OVI	:Ovario normal inactivo
PBS	:Solución tampón de fosfato (del inglés <i>Phosphate Buffer Solution</i>)
PFA	:Paraformaldehído
PI3K	:Fosfatidil inositol 3 kinasa (del inglés <i>Phosphoinositide 3-kinase</i>)
PLCγ1	:Fosfolipasa C-γ1 (del inglés <i>Phospholipase C-γ1</i>)
PMFS	:Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i>)
pVHL	:Proteína Von Hippel Lindau, E3 ubiquitín ligasa
RUNX	:Factor transcripcional relacionado a <i>Runt</i>
SDS-PAGE	:Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
SMAD	:Del inglés <i>Mothers against decapentaplegic homolog</i> , Factores transcripcionales
TBE	:Tumor benigno
TBO	:Tumor borderline
TGFβ	:Factor de crecimiento transformante β (del inglés <i>Transforming growth factor β</i>)
TNFα	:Factor de necrosis tumoral α (del inglés <i>Tumor necrosis factor α</i>)
TNF-R	:Receptor del factor de necrosis tumoral (del inglés <i>Tumor necrosis factor receptor</i>)
TRKA	:Receptor tirosina quinasa A (del inglés <i>Tyrosine Receptor Kinase A</i>)
TTBS	:Solución salina de Tris con Tween (del inglés <i>Tween Tris- Buffered Salt</i>)
TVS	:Ultrasonografía transvaginal (del inglés <i>Transvaginal ultrasound</i>)
UPR	:Respuesta a proteínas mal plegadas (del inglés <i>unfolded protein response</i>)
VEGF	:Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)

RESUMEN

El cáncer ovárico epitelial (COE) es el cáncer ovárico más común, siendo en Chile la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas.

Un aspecto importante para la mantención y progresión tumoral es el establecimiento de nueva vasculatura. En COE, NGF y su receptor TRKA son mediadores directos de angiogénesis *in vitro*, e indirectos al inducir la expresión y secreción de VEGF. El factor transcripcional RUNX2 induce procesos oncogénicos como proliferación, migración e invasión celular. Adicionalmente, se cree que RUNX2 puede ser un mediador de angiogénesis tumoral, ya que en varios modelos de cáncer promueve la expresión de VEGF y sus niveles proteicos se incrementan en hipoxia.

En COE, RUNX2 los niveles se relacionan con mal pronóstico y en modelos *in vitro* promueve proliferación, migración e invasión en células de cáncer ovárico, sin embargo, no existen estudios que busquen vincularlo con angiogénesis en este cáncer.

Hipótesis: En cáncer ovárico epitelial se produce un aumento en los niveles de RUNX2, y en la línea celular A2780 de cáncer ovárico sus niveles son incrementados por los factores proangiogénicos NGF e hipoxia cuando se comparan con la línea celular HOSE de epitelio superficial ovárico normal.

Objetivos: Establecer si RUNX2 se expresa en cáncer ovárico epitelial, si sus niveles se incrementan con la progresión de la transformación maligna del epitelio ovárico, y determinar si en el modelo de líneas celulares, RUNX2 es aumentado por las condiciones proangiogénicas de hipoxia y estímulo con NGF.

Metodología: Se evaluaron los niveles proteicos de RUNX2 en tejidos ováricos (OVI, ovario normal inactivo; TBE-TBO, tumores ováricos Benignos y Borderline; y COE) mediante *Western Blot*, y a través de inmunohistoquímica se determinó el % células positivas con RUNX2 nuclear. En las líneas celulares HOSE y A2780 se evaluaron los niveles proteicos de RUNX2 en extractos totales y en fracciones subcelulares mediante *Western Blot*, y su localización subcelular mediante inmunocitoquímica. Adicionalmente, se realizaron estímulos con NGF, CoCl₂ y ensayos de hipoxia en ambas líneas celulares, para posteriormente determinar los niveles proteicos de RUNX2 y HIF-1α por *Western Blot*.

Resultados: Se determinó que los tejidos ováricos correspondientes a TBE-TBO y COE presentaron un mayor porcentaje de células positivas para RUNX2 nuclear respecto a lo observado en OVI. Por otro lado, ambas líneas celulares, HOSE y A2780, presentaron RUNX2 con localización principalmente nuclear, mostrando la línea HOSE niveles más altos respecto a la línea A2780. Los estímulos con NGF y CoCl₂ no modificaron los niveles proteicos de RUNX2 en las líneas celulares en las condiciones analizadas. Por otra parte, se determinó que en la línea celular HOSE los niveles de RUNX2 disminuyen durante hipoxia, manteniéndose constantes los de HIF-1 α . En el caso de las células A2780, no se observaron cambios en los niveles de las proteínas RUNX2 y HIF-1 α en condiciones de hipoxia.

Conclusiones: El presente trabajo permite concluir que los tejidos transformados de epitelio ovárico poseen un alto porcentaje de células con RUNX2 nuclear. Consistente con esto, la línea celular A2780 presenta altos niveles de RUNX2 en el núcleo, sugiriendo estos antecedentes un rol de RUNX2 en COE. Por otro lado, en las condiciones evaluadas, NGF e hipoxia no produjeron cambios en los niveles de RUNX2 en las líneas celulares.

Proyección: Es necesario realizar nuevos ensayos para determinar con certeza si las condiciones proangiogénicas de NGF e hipoxia pueden inducir angiogénesis a través de RUNX2 en COE. En el caso de NGF es necesario evaluar si este puede influenciar la actividad transcripcional de RUNX2, y en el caso de hipoxia, se requiere modificar las condiciones experimentales para determinar con mayor seguridad si la restricción de oxígeno afecta los niveles de RUNX2.

ABSTRACT

RUNX2 levels in epithelial ovary cancer and the effect of NGF and hypoxia proangiogenic factors on their in vitro levels

Epithelial ovarian cancer (COE) is the most common ovarian cancer, being Chile the second cause of death due to gynecological neoplasias.

An important aspect for tumor maintenance and progression is the establishment of new vasculature. In COE, NGF and its TRKA receptor are direct mediators of in vitro angiogenesis, and indirectly by inducing VEGF expression and secretion. RUNX2 transcriptional factor induces oncogenic processes such as cell proliferation, migration and invasion. In addition, it is believed that RUNX2 may be a mediator of tumor angiogenesis, since in several cancer models it promotes the expression of VEGF and its protein levels increase in hypoxia.

In COE, RUNX2 levels are related to poor prognosis and in vitro models promote proliferation, migration and invasion in ovarian cancer cells, however, there are no studies that seek to link it with angiogenesis in this cancer.

Hypothesis: In epithelial ovarian cancer there is an increase in RUNX2 levels, and in the A2780 cell line of ovarian cancer their levels are increased by the proangiogenic factors NGF and hypoxia when compared to the HOSE cell line of normal ovarian surface epithelium.

Objective: To establish whether RUNX2 is expressed in epithelial ovarian cancer, if its levels increase with the progression of malignant transformation of ovarian epithelium, and to determine if RUNX2 is increased in the cell lines model by the proangiogenic conditions of hypoxia and stimulation with NGF.

Methods: RUNX2 protein levels in ovarian tissues (OVI, normal ovary, TBE-TBO, Benign ovarian tumors and Borderline, and COE) were evaluated by Western Blot, and by means of immunohistochemistry the percentage of RUNX2 nuclear positive cells was determined. In the HOSE and A2780 cell lines the protein levels of RUNX2 in total extracts and subcellular fractions were evaluated by Western Blot, and its subcellular localization by immunocytochemistry. Additionally, stimuli were performed with NGF, CoCl₂ and hypoxia

assays in both cell lines, to later determine the protein levels of RUNX2 and HIF-1 α by Western Blot.

Results: It was determined that the ovarian tissues corresponding to TBE-TBO and COE presented a higher percentage of RUNX2 nuclear positive cells than observed in OVI. On the other hand, both cell lines, HOSE and A2780, presented RUNX2 with mainly nuclear localization, showing the line HOSE levels higher than the line A2780. The stimuli with NGF and CoCl₂ did not modify the protein levels of RUNX2 in the cell lines in the conditions analyzed. On the other hand, it was determined that in the HOSE cell line the levels of RUNX2 decrease during hypoxia, keeping those of HIF-1 α constant. In the case of A2780 cells, no changes were observed in the levels of the RUNX2 and HIF-1 α proteins under conditions of hypoxia.

Conclusions: The present work concludes that the transformed tissues of ovarian epithelium possess a high percentage of cells with nuclear RUNX2. Consistent with this, the A2780 cell line presents high levels of RUNX2 in the nucleus, suggesting this background a RUNX2 role in COE. On the other hand, under the conditions evaluated, NGF and hypoxia did not produce changes in the RUNX2 levels in the cell lines.

Projection: Further testing is required to determine with certainty whether the proangiogenic conditions of NGF and hypoxia may induce angiogenesis through RUNX2 in COE. In the case of NGF it is necessary to evaluate if this can influence the transcriptional activity of RUNX2, and in the case of hypoxia, it is necessary to modify the experimental conditions to determine more safely if the oxygen restriction affects RUNX2 levels.

I. INTRODUCCIÓN

I. 1. CÁNCER OVÁRICO

I. 1. 1. Clasificación de las neoplasias ováricas humanas

Las neoplasias ováricas humanas corresponden a un grupo heterogéneo de tumores clasificados en 3 categorías de acuerdo a su origen histológico; (1) *Tumores principales* (derivados del epitelio superficial ovárico, estroma y células germinales del ovario), (2) *Tumores minoritarios* (tumores de origen histológico incierto, con componentes celulares de orígenes diversos y tumores no específicos del ovario) y, (3) *Tumores no neoplásicos* (Scully R., 1987). Son particularmente relevantes los tumores derivados del epitelio superficial ovárico, denominados cáncer de ovario epitelial (COE), ya que constituyen cerca del 90% de las neoplasias malignas y son el cáncer ovárico más letal (Auersperg N. *et al.*, 2001 Crosbie E. J. & Menon U., 2005; Fleming J. *et al.*, 2006).

I. 2. CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL

I. 2. 1. Epidemiología

El cáncer ovárico epitelial es la primera causa de muerte por neoplasias ginecológicas en EE.UU (Centers for disease Control and Prevention, CDC, 2015; Siegel R.L. *et al.*, 2015). En Chile, por su parte, el cáncer ovárico constituye la segunda causa de muerte por tumores ginecológicos, precedido por el cáncer cervicouterino y seguido por el cáncer del cuerpo uterino (Instituto Nacional de Estadísticas, 2015).

I. 2. 2. Factores protectores y de riesgo

Los factores de riesgo asociados al desarrollo de cáncer ovárico son; (1) historia familiar de cáncer de ovario, (2) nuliparidad, (3) tratamientos de hiperovulación, (4) menarquia temprana, (5) menopausia tardía, (6) aumento en la edad, (7) factores ambientales y (8) enfermedades de *ovario poliquístico* e *inflamatoria pélvica*. Condiciones geográficas, raciales y sociales parecen ser relevantes, ya que poblaciones de mujeres blancas e hispanas tienen una mayor incidencia de cáncer ovárico respecto a poblaciones de mujeres afroamericanas, asiáticas, originarias de islas del Pacífico, indoamericanas y originarias de

Alaska (Centers for Disease Control and Prevention, 2015). Por otro lado, entre los factores protectores se pueden señalar; (1) tratamiento con anticonceptivos orales (ACO), (2) embarazo/multiparidad, (3) primer embarazo a una edad temprana, (4) lactancia, (5) ligamiento de trompas e (6) histerectomía (Prasad U., 2004; Guppy A.E. *et al.*, 2005).

I. 2. 3. Sintomatología

Aunque el COE se describe como una patología asintomática, estudios detallados muestran que sólo un 5 % de las pacientes carecen de síntomas. Las manifestaciones clínicas son inespecíficas, e incluyen dolor abdominal (36 % de los casos), aumento de volumen e hinchazón abdominal (61 y 57 % de los casos respectivamente), fatiga (47 % de los casos), alteraciones alimentarias, pélvicas, gastrointestinales y genitourinarias (Goff B.A. *et al.*, 2000; Hennessy B., *et al.*, 2009.).

I. 2. 4. Diagnóstico

Las manifestaciones físicas relevantes en el diagnóstico del COE incluyen; una masa ovárica palpable, ascitis, efusiones pleurales y una masa umbilical denominada nódulo de Mary Joseph. Habitualmente se realiza una ultrasonografía transvaginal (TVS) donde la detección de una masa ovárica con componentes sólidos y quísticos sugiere la presencia de cáncer ovárico (Prasad U. 2004). Estudios de imagenología como resonancia magnética (MRI) y tomografía computarizada (CT) (National Library of Medicine, 2014), y la medición plasmática del marcador tumoral CA-125 pueden contribuir al diagnóstico. Generalmente la biopsia es necesaria para el diagnóstico definitivo (Prasad U., 2004; Guppy A.E. *et al.*, 2005; Hennessy B. *et al.*, 2009).

I. 2. 5. Tratamiento

El tratamiento para el COE contempla cirugía con histerectomía y salpingo-ooforectomía uni/bilateral (BSO), examinación de las superficies peritoneales, omentectomía, biopsias de nodos linfáticos (para-aórticos y pélvicos) y de los lavados peritoneales. Cuando hay compromiso del peritoneo se administra quimioterapia intravenosa (basada en carboplatino y un taxano) posterior a la cirugía (Hennessy B. *et al.*, 2009).

I. 2. 6. Pronóstico

La inespecificidad de los síntomas y la falta de buenos marcadores diagnósticos conducen a la detección tardía del COE, lo que se relaciona con su elevada mortalidad. Entre las pacientes que fueron diagnosticadas en estados tempranos de la enfermedad (estado I FIGO), la supervivencia luego de 5 años de realizado el diagnóstico es cercana al 90 %. Sin embargo, en estados avanzados la supervivencia se reduce y oscila entre 30/50 % (estado III FIGO) y el 13 % (estado IV FIGO) (Hennessy B. *et al.*, 2009).

I. 2. 7. Etiología

Se ha sugerido que el COE surge de lesiones en epitelios extraováricos que se depositan sobre el ovario dando origen a neoplasias (Kurman R. & Shih IM., 2010; Kurman R. & Shih IM., 2011). Sin embargo, la idea más aceptada indica que el COE surge a partir de la transformación de las células epiteliales que recubren la superficie ovárica y que constituyen una monocapa (Auersperg N. *et al.*, 2001; Murdoch W.J. & McDonnell A. C., 2002; Fleming J. *et al.*, 2006). Las células de epitelio superficial ovárico también recubren internamente los quistes de inclusión (presentes en el interior del estroma ovárico) y las invaginaciones de la superficie ovárica que son sitios favorecidos para la conversión neoplásica (Auersperg N. *et al.*, 2001; Fleming J. *et al.*, 2006).

I. 2. 8. Clasificación del cáncer ovárico epitelial

El COE se clasifica en 5 categorías según el fenotipo que sus células adquieren con la transformación neoplásica; (1) *COE seroso* (células similares al epitelio de las trompas de Falopio), (2) *COE mucinoso* (células parecidas al epitelio del endocérvix), (3) *COE endometriode* (células similares al epitelio endometrial), (4) *COE de células claras* (células semejantes al epitelio del mesonefro) y (5) *COE Brenner* (células parecidas al epitelio urotelial) (Scully R., 1987; Auersperg N. *et al.*, 2001).

Recientemente se ha clasificado el COE en 2 categorías según sus características moleculares y la agresividad en la presentación de la enfermedad; (1) *COE tipo I*, corresponden adenomas o cystoadenomas de bajo potencial maligno (LMP), que surgen lentamente a partir de quistes de inclusión. Esta categoría también incluye el *carcinoma seroso de bajo grado*, el *carcinoma endometriode de bajo grado*, el *carcinoma mucinoso*, el

carcinoma de células claras y el *carcinoma de Brenner*. A nivel genómico son relativamente estables y se caracterizan por mutaciones en *KRAS*, *BRAF*, *ERBB2*, *CTNNB1*, *PTEN*, *PIK3CA*, *ARIDIA* y *PPP2R1A* (Fleming J. *et al.*, 2006; Bast R. *et al.*, 2009; Kurman R. & Shih IM., 2011); (2) *COE tipo II*, este tipo de cáncer surge de forma espontánea, sin lesiones precursoras y con presentación agresiva. En esta categoría se encuentran los *carcinomas seroso* y *endometriode de alto grado*. Frecuentemente presentan mutaciones en *TP53* y disfunción en la expresión de *BRCA1* y *BRCA2*, genes supresores de tumores (Fleming J. *et al.*, 2006; Bast R. *et al.*, 2009; Kurman R. & Shih IM., 2011).

I. 3. FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO, NGF

I. 3. 1. Generalidades sobre NGF

El factor de crecimiento nervioso (NGF) pertenece a una familia de proteínas homólogas denominadas neurotrofinas, las cuales median crecimiento, supervivencia y diferenciación neuronal. NGF regula estos procesos en neuronas colinérgicas del sistema nervioso central, y neuronas motoras como sensoriales del sistema nervioso periférico (Chao M.V. *et al.*, 2006; Skaper S.D., 2012). NGF ejerce sus efectos celulares al activar 2 receptores, denominados Receptor Tirosina Kinasa A (TRKA) y p75. El primero es un receptor con actividad tirosina kinasa que presenta alta afinidad por NGF, mientras que el segundo es un receptor sin actividad catalítica, de la familia de los Receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF-R), que une todas las neurotrofinas con baja afinidad. El receptor TRKA, como otros con actividad tirosina kinasa, promueve las vías de señalización de Fosfatidil inositol 3 kinasa/Proteína serina/treonina kinasa-RAC (PI3K/AKT), Proteínas kinasas activadas por mitógenos/Kinasa regulada por señales extracelulares (MAPK/ERK) y Fosfolipasa C- γ 1 (PLC γ 1), relacionadas con proliferación, supervivencia, diferenciación celular y actividad transcripcional diversa. Por su parte, la activación del receptor p75 promueve la vías de las Kinasas c-Jun N-terminal (JNK) y del Factor nuclear κ B (NF- κ B), con efectos pro-apoptóticos y de supervivencia respectivamente (Reichardt L.F., 2006).

I. 3. 2. NGF en el ovario normal humano

NGF y TRKA son expresados en folículos del ovario fetal y adulto (Anderson R.A. *et al.*, 2002; Abir R. *et al.*, 2005; Salas C. *et al.*, 2006; Seifer D.B., 2006). En contraste, los niveles de NGF y TRKA son muy bajos en el epitelio superficial ovárico y la forma activa del receptor, p-TRKA, es prácticamente indetectable en este tejido (Tapia V. *et al.*, 2011). Por otro lado, el receptor P75 es expresado durante el ensamble folicular en las células que constituyen la pregranulosa (Anderson R.A. *et al.*, 2002; Abir R. *et al.*, 2005). En fases gestacionales avanzadas y en niñas de hasta 10 meses, P75 se ha observado en estructuras neurales de la corteza y la médula ovárica, así como en células de la teca (Streiter S. *et al.*, 2016).

Un rol importante de NGF y TRKA en el ovario normal, sería promover la angiogénesis ovárica que precede a la ovulación (Vera C. *et al.*, 2014). Esta idea surge de estudios que muestran que NGF estimula la producción del Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) en células de la granulosa humana (Julio-Pieper. *et al.*, 2009).

I. 3. 3. NGF en cáncer ovárico epitelial y su rol como factor proangiogénico

NGF y TRKA se encuentran sobreexpresados en COE, tanto en el epitelio como en el endotelio del carcinoma ovárico, y la forma activa del receptor, p-TRKA, sólo es detectable en los tejidos con transformación maligna y no en el epitelio normal o en neoplasias benignas (Tapia V. *et al.*, 2011). Concordantemente, la línea celular A2780 correspondiente a carcinoma ovárico, expresa NGF y TRKA, este último, en niveles más altos que células de epitelio superficial ovárico normal, células HOSE (Girardi S., 2011). Adicionalmente, NGF favorecería la proliferación celular e inhibiría la apoptosis en COE al incrementar los niveles de AKT fosforilado y la relación entre el Regulador de apoptosis Bcl-2 y la Proteína X asociada a Bcl-2 (BCL-2/BAX), entre otros mecanismos (Urzúa U. *et al.*, 2012).

Especialmente relevante es la relación de NGF con la angiogénesis en el cáncer ovárico epitelial. En explantes de carcinoma ovárico NGF induce un incremento significativo de los transcritos 121, 165 y 189 de VEGF respecto a sus efectos en el tejido normal. Concomitantemente, NGF aumenta los niveles secretados de VEGF en los tejidos transformados comparados a los tejidos normales (Campos X. *et al.*, 2007). La línea celular A2780 también responde a NGF con la secreción de VEGF, el cual actúa sobre células

endoteliales humanas, EA.hy926, induciendo angiogénesis *in vitro*. Más aún, además de promover la expresión y secreción de VEGF en células tumorales, NGF actúa directamente sobre el endotelio, induciendo su proliferación, migración y diferenciación *in vitro*. En estos casos, NGF media sus efectos a través de su receptor TRKA (Tapia V. *et al.*, 2011). Estos antecedentes muestran que NGF es un factor que induce la angiogénesis de manera directa, al actuar sobre el endotelio, y de forma indirecta, al estimular la expresión y secreción de VEGF por las células tumorales (Campos X. *et al.*, 2007; Tapia V. *et al.*, 2011).

I. 4. HIPOXIA

I. 4. 1. Hipoxia como factor pro-angiogénico

La hipoxia, definida como un nivel de oxígeno inferior al 20 %, es una condición conocida por ser uno de los estímulos más importantes en la inducción de angiogénesis. En cáncer, la vascularización del tumor inducida por hipoxia es fundamental, porque permite su crecimiento, mantención, y posibilita la metástasis (Pugh C. & Ratcliffe P., 2003).

El mecanismo principal a través del cual la hipoxia promueve fenómenos angiogénicos, es la estabilización de los Factores transcripcionales inducidos por hipoxia (HIF-1 α y HIF-2 α), que controlan la expresión genes involucrados en diversos procesos, entre ellos la formación de vasos. Durante condiciones normóxicas los factores HIF son hidroxilados por asparragil y prolil-hidroxilasas, las cuales inhiben su unión a co-activadores y posibilitan su ubiquitinación para la degradación proteosomal respectivamente. Durante la hipoxia las hidroxilasas se mantienen inactivas al carecer de oxígeno, un sustrato para la modificación de HIF-1/2 α , con lo cual estas proteínas se incrementan favoreciéndose su actividad transcripcional (Pugh C. & Ratcliffe P., 2003).

Los genes inducidos a través de las proteínas HIF-1/2 α median diversos aspectos de la angiogénesis, como vasodilatación, aumento en la permeabilidad vascular, extravasación de proteínas plasmáticas, degradación de matriz extracelular, liberación de factores de crecimiento, proliferación, migración y estabilización de las células endoteliales, reclutamiento de pericitos, células de músculo liso, células angiogénicas circulantes y progenitoras endoteliales, además de la maduración, mantención, remodelamiento y

diferenciación de los vasos (Krock B. *et al.*, 2011). Uno de los factores angiogénicos más importante y conocido, cuya expresión es aumentada HIF-1 α durante la hipoxia, es VEGF. Esta relación fue sugerida en la década de los 90', cuando Shweiki D. *et al.*, mostraron que en tejidos de glioblastoma multiforme, el desarrollo de vasos sanguíneos estaba espacialmente asociado con células que expresaban y secretaban VEGF, y que adicionalmente esta vascularización era próxima a regiones necróticas del tejido, probablemente como consecuencia de un ambiente hipóxico (Shweiki D. *et al.*, 1992). Aunque la expresión de VEGF es ampliamente controlada por HIF-1 α durante la hipoxia, también se ha mostrado que en modelos murinos, y bajo ciertas condiciones, algunos tejidos *knock-out* para HIF-1 α pueden expresar altos niveles de *Vegf*. Así, este y otros antecedentes indican la existencia de otros factores que modulan la expresión de *Vegf/VEGF* (Kotch L. *et al.*, 1999).

I. 5. FACTOR TRANSCRIPCIONAL RELACIONADO A RUNT-2, RUNX2

I. 5. 1. Generalidades sobre RUNX2

El factor transcripcional 2 relacionado a *Runt* (RUNX2) es miembro de la familia de factores transcripcionales RUNX. Estas proteínas pueden actuar como activadores o represores de la transcripción y median procesos esenciales durante el desarrollo embrionario (Schoeder T.M. *et al.*, 2005). Particularmente, RUNX2 es clave en la osteogénesis (Kobayachi T. & Kronenberg H., 2005) y en la morfogénesis dental (D' Souza R.N. *et al.*, 1999). Adicionalmente, estos factores fueron vinculados a fenómenos carcinogénicos, siendo RUNX1 y RUNX2 considerados preferentemente como proteínas oncogénicas, y RUNX3 usualmente considerado como un supresor tumoral (Blyth K. *et al.*, 2005).

I. 5. 2. Regulación de RUNX2

A nivel transcripcional RUNX2 es regulado por 2 promotores, que dan origen respectivamente a las 2 isoformas principales de RUNX2, Isoforma II (larga) e Isoforma I (corta) (Stock M. & Otto F., 2005). Varios factores transcripcionales regulan la expresión de RUNX2. Además, ensayos *in vitro* indican que RUNX2 es capaz de autorregularse transcripcionalmente (Stock M. & Otto F., 2005). La expresión de RUNX2 también es

controlada a nivel post-transcripcional por varios miRNA, entre ellos miRNA-23b y miR-338-3p (Li W. *et al.*, 2014).

En un nivel post-traducciona, el factor RUNX2 es sujeto de fosforilaciones, acetilaciones y ubiquitinación. Estas modificaciones pueden promover o inhibir su actividad transcripcional al modular interacciones con otras proteínas, al influir en su capacidad de unir DNA o al regular su degradación proteosoma, entre otros mecanismos (Schoeder T.M. *et al.*, 2005; Jonason J.H. *et al.*, 2009; Chuang L.S.H. *et al.*, 2013).

Múltiples ligandos están involucrados en la regulación transcripcional y post-traducciona de RUNX2. Entre estas señales se pueden mencionar, el contacto con la matriz extracelular, (Tsuji K. *et al.*, 1998; Lee K.S. *et al.*, 2000; Alliston T. *et al.*, 2001; Banerjee C. *et al.*, 2001; Drissi H. *et al.*, 2002; Franceschi R.T. & Xiao G., 2003; Otto F. *et al.*, 2003; Jonason J.H. *et al.*, 2009; Chuang L.S.H. *et al.*, 2013). Concomitantemente, estas señales vinculan a RUNX2 con variadas vías de transducción intracelular, entre ellas las vías de las MAPK y PI3K/AKT (Otto F. *et al.*, 2003; Chuang L.S.H. *et al.*, 2013).

I. 5. 3. Rol de RUNX2 en procesos angiogénicos

Ensayos en la línea celular MSS31, de endotelio murino, indican que Runx1 y 2 modulan la expresión de proteínas proangiogénicas y que promueven proliferación, migración y formación estructuras tubulares que asemejan vasos sanguíneos *in vitro*. Adicionalmente, en este modelo tanto los niveles de las proteínas Runx1/2, así como su capacidad de unir a DNA, se incrementan en respuesta a VEGF y al Factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2), también conocidos por su importancia en la vascularización (Namba K. *et al.*, 2000). Por otro lado, en la línea celular de endotelio humano, HBME-1, RUNX2 se incrementa en respuesta al Factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1), favoreciendo migración, invasión, cambios morfológicos asociados a diferenciación y al arresto del ciclo celular (Sun L. *et al.*, 2001). Más aún, ensayos de reportero en células HEK293 muestran que la expresión de RUNX2 incrementa significativamente la actividad del promotor de *VEGF* (Lee S.H. *et al.*, 2012).

In vivo, embriones de ratón *knock-out* para Runx2 carecen de vascularización en las zonas hipertróficas del hueso en desarrollo, y presentan una reducción significativa en los niveles

de Vegf y sus receptores 1 y 2 en esas regiones. Ensayos complementarios *in vitro*, establecieron que Runx2 modula directamente la transcripción de *Vegf* al unirse y activar su promotor (Zelzer E. *et al.*, 2001).

En un contexto patológico, también parece existir una asociación de RUNX2 y angiogénesis. En la línea celular de cáncer de próstata humano C4-2B PCa /RX2^{DOX} (derivada de C4-2B), RUNX2 se asocia a un incremento en la expresión de moléculas proangiogénicas como VEGF (Baniwal S. *et al.*, 2010). En las células PC3 (línea celular de cáncer prostático humano con alto potencial metastásico), RUNX2 se encuentra incrementado, y modula positivamente los niveles de VEGF y Metaloproteinasa 9 (MMP-9), así como la capacidad de invasión de estas células (Akech J. *et al.*, 2010). De forma semejante, en la línea celular de cáncer mamario humano, SUM159, RUNX2 induce la expresión de *MMP-9*, *MMP-13* y *VEGF* (Pande S. *et al.*, 2013). Como en otros casos, RUNX2 promueve la expresión de *VEGF* en líneas celulares de cáncer tiroideo (WRO, TPC-1 y 8305C) y de condrosarcoma humano (CS-1 y JJ) (Sun X. *et al.*, 2009; Niu D.F. *et al.*, 2012).

I. 5. 4. RUNX2 y su relación con los factores HIF e Hipoxia

Ensayos en líneas celulares murinas (fibroblastos multipotenciales, preosteoblastos, células condrogénicas) y humanas (HEK293, células de riñón embrionario humano) indican que RUNX2 potencia la actividad transcripcional de HIF-1 α en normoxia, al disminuir su degradación proteosomal, facilitar su unión al DNA al heterodimerizar con este factor y al aumentar su translocación nuclear. También se ha determinado que RUNX2 favorece la actividad transcripcional de HIF-1 α en hipoxia, pero en este caso no se conocen los mecanismos (Kwon T.G. *et al.*, 2011; Lee S.H. *et al.*, 2012).

Estudios *in vitro* han sugerido que los niveles de RUNX2, transcrito y proteína, pueden ser incrementados en hipoxia (Kwon T.G. *et al.*, 2011; Lee S.H. *et al.*, 2012). Más aún, se ha reportado que procesos asociados a HIF-1/2 α e hipoxia, modulan los niveles de RUNX2. Así por ejemplo, la inhibición de prolil-hidroxilasas, las cuales permanecen inactivas durante hipoxia permitiendo la estabilización de los factores HIF, media un aumento en los niveles proteicos de RUNX2 al disminuir su degradación proteosomal (Rahman S.U. *et al.*, 2014). Sumado a lo anterior, se ha mostrado que el promotor P1 de RUNX2 tiene un sitio de unión

a HIF-2 α , el cual es funcional *in vitro*, pudiendo promover un aumento en los niveles de transcrito y proteína de RUNX2 (Tamiya H. *et al.*, 2008).

Otros estudios relacionan RUNX2 e hipoxia en modelos de cáncer. Los primeros antecedentes provienen de la sub-línea celular de cáncer de próstata humano, LNCaP-H1, desarrollada a partir de la línea LNCaP (línea celular de metástasis de cáncer de próstata humano) sometida a varios ciclos de hipoxia. El análisis del transcriptoma después del tratamiento muestra la sobreexpresión de varios de genes, entre ellos *RUNX2*, determinándose además que este factor media, al menos en parte, el incremento en el potencial invasivo que experimentaron estas células (Butterworth K.T. *et al.*, 2008). Por otra parte, roedores que han desarrollado tumores por implantación de xenógrafos de células LNCaP, y que posteriormente fueron sometidos a terapia hormonal con Bicalutamida, indican que este fármaco conduce a una condición de hipoxia que se agudiza en el tiempo asociándose con una reducción de la irrigación sanguínea y disminución en la expresión de genes como *VEGF* y *BCL-2*. No obstante, transcurridos varios días se produce un incremento de los niveles de transcrito de *RUNX2*, que antecede un aumento en la expresión de *VEGF* y la recuperación de la irrigación tumoral, indicando que RUNX2 es inducido por hipoxia. Ensayos *in vitro* con células LNCaP confirman que Bicalutamida, que actúa como un inductor de hipoxia, así como la reducción directa de los niveles de oxígeno, inducen un incremento en la expresión de *RUNX2* (Browne G. *et al.*, 2012; Ming L. *et al.*, 2013).

En múltiples otros contextos se ha observado que la hipoxia promueve la expresión de *RUNX2*. Así por ejemplo, se ha determinado que los hematomas formados luego de fracturas óseas que se caracterizan por presentar un ambiente hipóxico, experimentan un aumento en la expresión de genes pro-inflamatorios, asociados al metabolismo aeróbico y genes relacionados con angiogénesis como *HIF-1 α* , *RUNX2* y *VEGF* (Kolar P. *et al.*, 2011).

I. 5. 5. RUNX2 en cáncer ovárico epitelial

Existen pocos estudios sobre la relación de RUNX2 con cáncer ovárico epitelial. Estos muestran que los carcinomas ováricos con bajo potencial maligno, aquellos con alto grado y los implantes de carcinoma en el omentum, tienen niveles proteicos de RUNX2 significativamente más altos comparados con tejidos normales (Wang Z.Q. *et al.*, 2013).

Adicionalmente, se ha observado que pacientes con cáncer ovárico de etapas avanzadas presentan niveles mayores de RUNX2 comparados con aquellas pacientes que se encuentran en fases más tempranas de la patología. Estudios clínicos también indican que una elevada expresión de RUNX2 se relaciona con una menor supervivencia total y libre de progresión (Li W. *et al.*, 2012).

Por otro lado, estudios *in vitro* realizados en líneas celulares de cáncer ovárico, SCOV3 y A2780s, indican que RUNX2 promueve la proliferación e incrementa la capacidad de migración e invasión de estas células. La evaluación de los perfiles de expresión génica tras el *knock-down* de RUNX2, señala que este factor transcripcional favorecería la expresión de genes asociados a metabolismo energético, crecimiento, proliferación y motilidad celular, e inhibiría la expresión de genes relacionados con la morfología celular y apoptosis en las líneas celulares mencionadas (Wang Z.Q. *et al.*, 2013).

Uno de los mecanismos que conducirían a la sobreexpresión de RUNX2 en el carcinoma ovárico, sería la reducción significativa de miR-23b que se ha observado en estos tejidos. Los ensayos *in vitro* muestran que miR-23b se comporta como un supresor tumoral al reducir los niveles de RUNX2 e inhibir sus efectos sobre la proliferación, migración e invasión en las líneas celulares SCOV3 y OVCAR3 (Li W. *et al.*, 2014). Hallazgos de nuestro laboratorio concuerdan con lo anteriormente señalado, ya que muestran que miR-23b se encuentra disminuido significativamente en los tejidos de cáncer ovárico y en la línea celular A2780 (Cuevas P. 2014).

I. 6. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La angiogénesis es un proceso fundamental en cáncer, posibilita el suministro de nutrientes y oxígeno necesarios para la mantención del tumor, y permite la migración de las células malignas hacia sitios distantes donde pueden generar metástasis. Así, resulta muy importante conocer los factores y mecanismos involucrados en la generación de vasculatura tumoral. Los antecedentes presentados muestran que el factor NGF posibilita varios procesos en cáncer ovárico epitelial, entre ellos, la angiogénesis tumoral. Adicionalmente, se ha mostrado que la activación de su receptor tirosina kinasa TRKA, es

esencial en estos eventos. Por otro lado, la privación de oxígeno, hipoxia, es un evento que ocurre tempranamente en el desarrollo tumoral, y que actúa como estímulo para inducción de varios tipos de genes, muchos de los cuales están asociados con angiogénesis.

El factor transcripcional RUNX2 ha sido relacionado con muchos tipos de cáncer, donde se ha descrito como una proteína con funciones oncogénicas. Recientemente se ha vinculado RUNX2 con cáncer ovárico epitelial, considerándose como un factor de mal pronóstico. Los estudios disponibles indican que RUNX2 es un mediador que permite procesos de proliferación, migración y metástasis tumoral, sin embargo, muchos estudios también relacionan a RUNX2 con la estimulación de angiogénesis en contextos fisiológicos y patológicos. Como se ha mencionado, RUNX2 es una proteína altamente regulada tanto a nivel transcripcional como post-traduccional. Entre los mecanismos descritos que contribuyen al aumento de su expresión, aparecen la activación de receptores tirosina kinasa y la privación de oxígeno.

Así, considerando todas las relaciones presentadas puede sugerirse un vínculo entre NGF, hipoxia y RUNX2 en cáncer de ovario epitelial, proponiéndose el siguiente modelo;

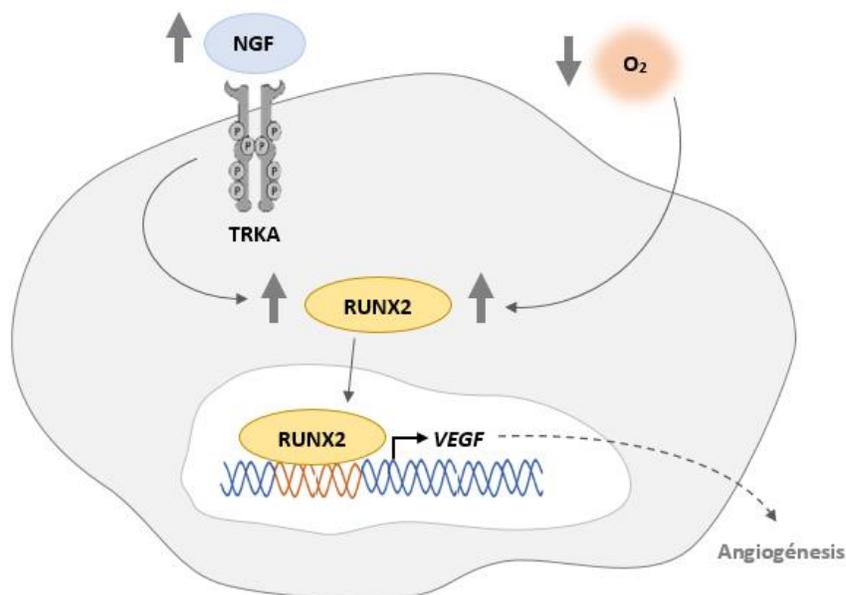


Figura 1. Modelo propuesto. En este modelo las células de cáncer ovárico epitelial expresan RUNX2 y sus niveles proteicos son incrementados por las condiciones proangiogénicas de hipoxia y estímulo de NGF. NGF: Nerve growth factor, TRKA: Tyrosine receptor kinase A, O₂: Oxígeno, RUNX2: Runt related factor-2, VEGF: Vascular endothelial growth factor.

II. HIPÓTESIS

En cáncer ovárico epitelial se produce un aumento en los niveles de RUNX2, y en la línea celular A2780 de cáncer ovárico sus niveles son incrementados por los factores proangiogénicos NGF e hipoxia cuando se comparan con la línea celular HOSE de epitelio superficial ovárico normal.

III. OBJETIVO GENERAL

Establecer si RUNX2 se expresa en cáncer ovárico epitelial, si sus niveles se incrementan con la progresión de la transformación maligna del epitelio ovárico, y determinar si en el modelo de líneas celulares, RUNX2 es aumentado por las condiciones proangiogénicas de hipoxia y estímulo con NGF.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar si el factor transcripcional RUNX2 se expresa en tejidos de epitelio ovárico, y si sus niveles se incrementan con la progresión del cáncer ovárico epitelial.
2. Establecer si RUNX2 se expresa en líneas celulares de ovario, y determinar si sus niveles se encuentran incrementados en la línea celular de cáncer ovárico, A2780, respecto a la línea celular epitelio superficial ovárico normal, HOSE.
3. Determinar si NGF induce un aumento en los niveles de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780.
4. Establecer si la condición de hipoxia produce un incremento en los niveles de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

V. 1. DISEÑO EXPERIMENTAL

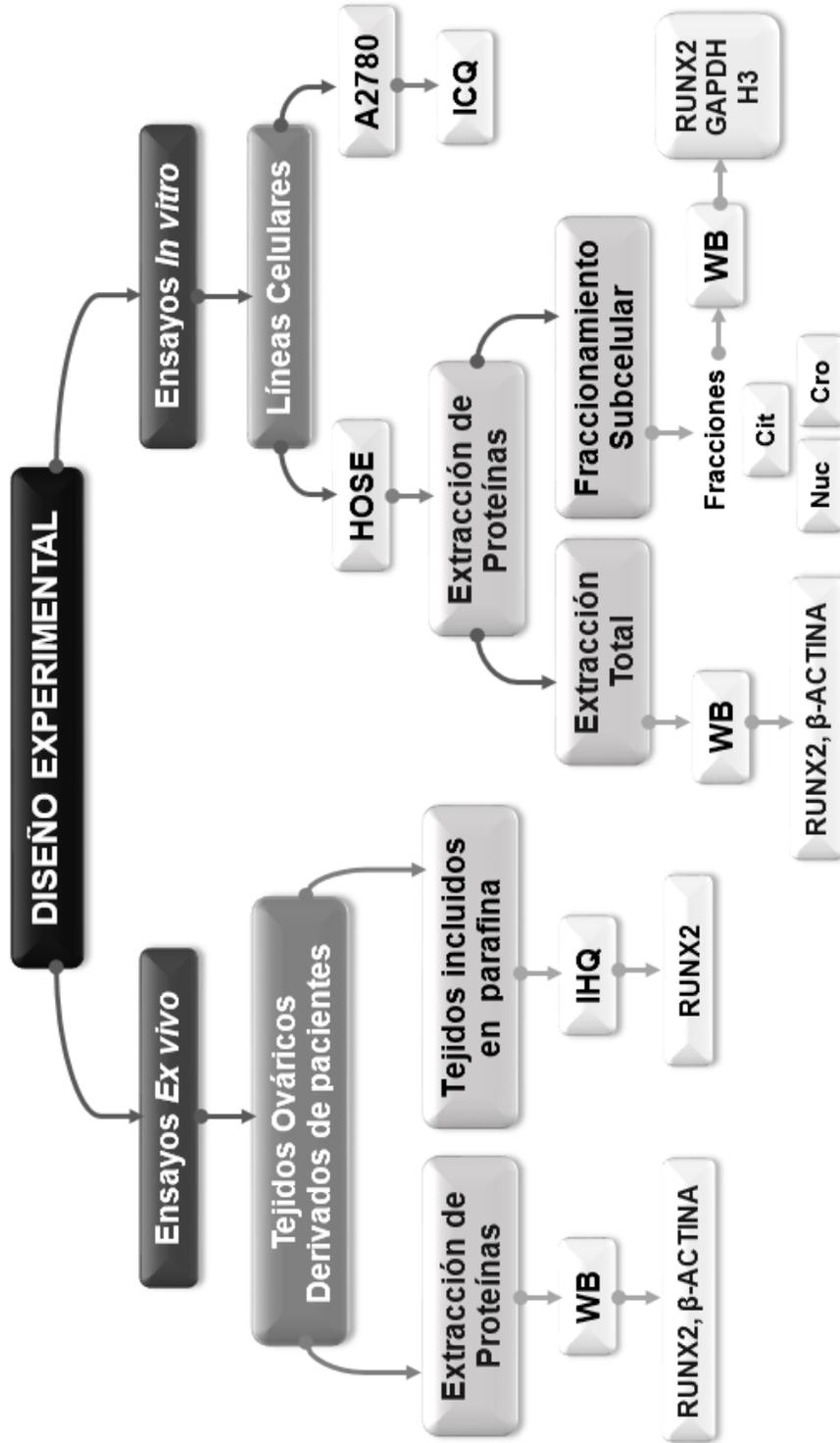


Figura 2. Diseño experimental. OVI: Ovario inactivo normal, TBE: Tumor Benigno, TBO: Tumor Borderline, COE: Cáncer ovárico epitelial, HOSE: Línea celular de epitelio ovárico normal, A2780: Línea celular de cáncer ovárico epitelial, CIT: Citosol, NUC: Nucleoplasma, CRO: Cromatina, WB: Western Blot, IHQ: Inmunohistoquímica, ICQ: Inmunocitoquímica.

V. 2. Ensayos *ex vivo*

V. 2. 1. Obtención y clasificación histológica de muestras de tejidos ováricos derivados de pacientes;

Las muestras de tejidos ováricos fueron obtenidas de pacientes con una edad promedio de 53 años que fueron sometidas a histerectomía con ooforectomía (uni o bilateral) u histerectomía radical. Las muestras fueron proporcionadas por el Instituto Nacional del Cáncer, INC, el Instituto de Investigaciones Materno Infantil, IDIMI, el Hospital de la FACH, la Clínica las Condes, CLC, y el Hospital Clínico de la Universidad de Chile, HCUCH.

Previo a la cirugía las pacientes leyeron, comprendieron y firmaron un consentimiento informado, el cual permite la obtención y la posterior utilización de las muestras de tejido. Dicho consentimiento informado ha sido autorizado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Para la clasificación histológica de las muestras de ovario, éstas fueron examinadas en el Hospital San Borja Arriarán por el Anatómo-Patólogo Dr. Fernando Gabler Neale. Según su análisis, las muestras de tejido ovárico, fueron clasificadas en 6 categorías;

V. 2. 1. a. Muestras de Ovario Normal Inactivo, OVI; corresponden a fragmentos de ovarios normales, en los cuales ha cesado el proceso ovulatorio como consecuencia de la menopausia, es decir, son inactivos. Como se mencionó, el ovario normal está cubierto por una monocapa de células epiteliales de morfología plana (susceptibles a transformaciones benignas y malignas), y puede presentar quistes de inclusión con un diámetro inferior a 1 cm. Dichos quistes están definidos por una monocapa de células epiteliales normales derivadas de la superficie ovárica. Estas muestras se obtuvieron de pacientes que no padecen enfermedades ováricas.

V. 2. 1. b. Muestras de Tumor Benigno, TBE; corresponden a fragmentos de ovarios cuya monocapa de células epiteliales de la superficie, y que recubren los quistes de inclusión, presentan un grado de transformación. Se ha modificado su forma plana, observándose ahora una morfología que rememora un epitelio columnar. En estos tumores se pueden identificar quistes de inclusión con un diámetro superior a 1 cm.

V. 2. 1. c. Muestras de Tumores Borderline, TBO; también denominados *Tumores de Bajo Potencial Maligno*, LMP, corresponden a fragmentos de tumores ováricos cuyas células del epitelio superficial se han modificado, constituyendo ahora un epitelio pseudoestratificado. Por otro lado, estos tumores exhiben grandes quistes de inclusión, los cuales presentan prominentes proyecciones papilares, asociadas en algunos casos, a una mínima invasión del epitelio transformado hacia el estroma.

V. 2. 1. d. Muestras de Cáncer Ovárico Epitelial Seroso bien diferenciado o de grado I, COE I; estos tumores muestran una estructura papilar irregular. En este caso la transformación del epitelio superficial es más evidente, observándose un epitelio pseudoestratificado con invasión hacia el estroma mayor a 3 cm.

V. 2. 1. e. Muestras de Cáncer Ovárico Epitelial Seroso moderadamente diferenciado o de grado II, (COE II); estos tejidos presentan un mayor grado de dediferenciación, observándose más atipia tanto de la morfología celular como nuclear. En este caso, la invasión hacia el estroma presenta mayor extensión y se observan más focos de transformación.

V. 2. 1. f. Muestras de Cáncer Ovárico Epitelial Seroso pobremente diferenciado o de grado III, (COE III); a diferencia de los anteriores, estos tumores son compactos. La atipia celular es mucho mayor y es posible observar un alto número de células en división. Adicionalmente, en estos tumores se observa una invasión de gran magnitud del epitelio hacia el estroma.

V. 2. 2. Grupos de estudio;

En este trabajo de investigación las muestras fueron distribuidas en 3 grupos experimentales;

V. 2. 2. a. OVI; este grupo considera muestras de ovarios inactivos normales, cuyas células superficiales epiteliales no han experimentado ningún tipo de transformación. Por lo tanto, este será considerado el grupo control.

V. 2. 2. b. TBE-TBO; este grupo contempla muestras correspondientes a tumores ováricos Benignos y Borderline los cuales pueden considerarse como no malignos.

V. 2. 2. c. COE; este grupo reúne todas las muestras de cáncer ovárico epitelial seroso, incluyendo por lo tanto, los cánceres con alto, moderado y pobre grado de diferenciación, es decir, COE I, COE II y COE III.

V. 2. 3. Tratamiento y almacenamiento de muestras;

Después de su recepción, cada una de las muestras de tejidos ováricos fue dividida en al menos 3 fragmentos. Uno de ellos fue incluido en parafina y posteriormente seccionado con un micrótopo para preparar placas con cortes histológicos de la muestra. Este procedimiento fue realizado en el Hospital San Borja Arriarán por el Tecnólogo Médico Sr. Jorge Argandoña. Posteriormente, estos cortes fueron utilizados para la clasificación histológica de los tejidos, por el Anatómo-Patólogo, Dr. Fernando Gabler N., y para la realización de Inmunohistoquímicas, IHQ. Las fracciones de tejido restantes son almacenadas a - 80 °C, para posteriormente ser utilizadas en la obtención de RNA y proteínas.

V. 2. 4. Obtención y cuantificación de proteínas de tejidos ováricos;

Trozos de tejido fueron reservados en Buffer de Lisis, RIPA (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.5 % Desoxicolato de Sodio, 1 % Tritón, 1 % SDS) con el inhibidor de proteasas y fosfatasa *Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail* (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Dichos trozos fueron disgregados con un homogenizador *Polytron* (Kinematica CH 6010, Kriens/Luzer, Switzerland) obteniéndose un lisado que fue centrifugado a 1000g durante 20 minutos a 4 °C. Luego se rescató el sobrenadante el cual fue centrifugado a 10000 g durante 20 min a 4 °C. Finalmente, se recuperó el sobrenadante que contiene las proteínas, y estas fueron cuantificadas utilizando el kit *BCA Protein Assay* (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

V. 2. 5. Inmunohistoquímica de RUNX2 en tejidos ováricos;

Como se ha descrito, parte de las muestras de los tejidos ováricos fueron incluidas en parafina, y luego, seccionadas para la obtención de placas con cortes histológicos. Dichos cortes se utilizaron para realización de Inmunohistoquímicas, IHQ. En este caso, los ensayos

fueron desarrollados para evaluar la presencia y localización subcelular de RUNX2 en los distintos tipos de tejidos ováricos que se han mencionado. Adicionalmente, esta inmunodetección permitió determinar la proporción de células que poseen RUNX2 nuclear en estos tejidos. Las Inmunohistoquímicas fueron efectuadas con el kit *UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen* (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA). Primeramente, las placas fueron incubadas a 37 °C durante 15 min. A continuación, los tejidos fueron desparafinados al ser sumergidos en Xilol durante 10 min. Este paso fue repetido en un segundo Xilol. Luego procedió la hidratación de los tejidos, los que fueron sumergidos en una serie de alcoholes con concentraciones decrecientes (100, 100, 95 y 70 %) y finalmente en agua destilada, H₂O_d, en todos los casos durante 5 min. Posteriormente, se efectuó la recuperación antigénica. Para ello, las placas fueron incubadas en Buffer Citrato (Citrato de Sodio 10 mM, pH 6.0) en una vaporera a 95-98 °C durante 30 min. Transcurrido este periodo, las placas fueron mantenidas a temperatura ambiente para reducir su temperatura, sumergidas en agua destilada y lavadas con PBS. Luego, se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena manteniendo los cortes en peróxido de hidrógeno, H₂O₂, al 3 %, durante 15 min a temperatura ambiente y oscuridad. Consecutivamente, las placas fueron lavadas con PBS e incubadas con *Ultra V Block* (kit *UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen*, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) durante 5 min a temperatura ambiente, para bloquear los sitios de unión inespecífica. Ulteriormente, los tejidos fueron incubados *durante la noche* a 4 °C con el anticuerpo primario *anti-RUNX2 [1D8] (ab115899)* (Abcam, Cambridge, UK) diluido en PBS-BSA 2 % en una proporción de 1:20. Concluida esta etapa, las placas fueron lavadas con PBS y expuestas a *Primary Antibody Enhancer* (kit *UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen*, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) durante 10 min a temperatura ambiente. Esta etapa aumenta la sensibilidad de la inmunodetección. Nuevamente, las placas fueron lavadas con PBS, y luego incubadas con *HRP Polymer* (kit *UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen*, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) durante 15 min a temperatura ambiente. Este polímero está asociado a anticuerpos

secundarios *anti-ratón* y *anti-conejo* acoplados a peroxidasa de rábano picante (*HRP*, *Horseradish peroxidase*). A continuación, los tejidos fueron expuestos a una mezcla de *DAB Plus Chromogen* y *DAB Plus Substrate* (kit *UltraVision LP Detection System HRP Polymer & DAB Plus Chromogen*, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) durante 45 segundos a temperatura ambiente y oscuridad. Aquí se proporciona 3,3'-diaminobenzidine, DAB, y Peróxido de Hidrógeno, H₂O₂, cuya conversión por HRP (asociada al anticuerpo secundario) permite la detección colorimétrica del antígeno de interés. La aparición de un color marrón en los tejidos indicó la presencia de RUNX2. Después del revelado, las placas fueron lavadas con agua destilada, H₂O_d, durante 5 min. Para una mejor visualización de la localización subcelular de la inmunotinción, los cortes fueron teñidos con Hematoxilina de Harris concentrada (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) durante 5 seg, lo que posteriormente permitió la identificación del núcleo celular. Luego de la contratinción, las placas fueron lavadas con agua corriente y agua destilada, H₂O_d, durante 5 min en cada caso. Los cortes fueron deshidratados sumergiendo las placas en una batería de alcoholes con concentraciones crecientes (70, 95, 100, 100 %), durante 5 min en cada caso, y consecutivamente en Xilol durante 10 min (paso que se repitió en un segundo Xilol). Por último, cada placa fue sellada con un cubreobjeto utilizando *Entellan* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) como medio de montaje. Transcurridas 24 h, las placas fueron observadas en el Microscopio Óptico Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japon). La adquisición de fotografías se realizó con aumentos de 400 y 1000x, utilizándose la Cámara 3.3 RTV (Q Imaging, Surrey, Columbia Británica, Canadá). El análisis de las fotografías consistió en el conteo de células con inmunotinción nuclear positiva y negativa para RUNX2, expresándose el valor obtenido como un porcentaje de células positivas, respecto al total de células observadas (fotografías capturadas con aumento de 400x). Considerando todos los grupos de estudio, se analizó un total de 26 placas (OVI, n = 4, TBE-TBO, n = 9, COE, n = 13), capturándose al menos 4 fotografías por cada una de ellas (de acuerdo a la extensión del tejido evaluado) y observándose un promedio de 3.792 células por placa. Todos los ensayos realizados incluyeron los correspondientes controles negativos.

V. 2. 6. Western Blot de RUNX2 en tejidos ováricos;

Primeramente se realizó la preparación de muestras, cuya concentración de proteínas fue previamente determinada. Para ello, se obtuvo un volumen con un total de 40 µg de proteínas por muestra, al cual se agregó Buffer de Carga. Esta preparación fue denaturada a 95 °C durante 5 min. Posteriormente, las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 8 % y se realizó la electroforesis (SDS-PAGE, *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) durante 4 h a 90 V. En cada uno de los ensayos efectuados, se incluyó además de las muestras el estándar de pesos moleculares *Precision Plus Protein™ Standards* (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, California, USA). Concluida la electroforesis, se realizó la electrotransferencia (en medio semi húmedo) de proteínas a una membrana de nitrocelulosa (Maine Manufacturing LLC, Maryland, USA), en hielo durante 70 min a 300 mA. A continuación, para bloquear las uniones inespecíficas a la membrana, estas fueron incubadas en TTBS-BSA 5 %, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente, las membranas fueron incubadas toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario *anti-RUNX2 [D1L7F]* (Cell Signaling Technology, Danvers, Massachusetts, USA), diluido en TTBS-BSA 5 % en una proporción de 1:500. Ulteriormente, las membranas fueron incubadas 1 h a temperatura ambiente y agitación, con el anticuerpo secundario *anti-conejo* conjugado a HRP (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) diluido en TTBS-BSA 5 % en una proporción de 1:5000. Entre las fases de bloqueo y las subsecuentes incubaciones con anticuerpos, las membranas fueron lavadas 3 veces con TTBS, durante 5 min a temperatura ambiente y agitación cada lavado. Finalmente, las membranas fueron reveladas mediante un método quimioluminiscente utilizando el kit *ECL Western blotting detection reagents and analysis system* (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK), adquiriendo las imágenes con el equipo ImageQuant LAS500 (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK). Las señales obtenidas fueron semicuantificadas por densitometría en el programa UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific Corporation, Orem, Utah, USA).

En todos los casos se usó β-actina como control de carga. Las etapas de bloqueo e incubación con anticuerpos fueron efectuadas en TTBS-Leche 5 %, durante 1 h a

temperatura ambiente y agitación. Se usó el anticuerpo primario *anti-β-actina CLON AC-15* (Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA) en una dilución de 1: 30000 y el anticuerpo secundario *anti-ratón* conjugado a HRP (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) en una dilución 1: 10000. Las etapas de revelado, captura de imágenes y análisis de las señales se desarrollaron como ya se ha indicado.

Para la identificación de RUNX2 en las membranas luego del revelado, en uno de los pocillos del gel se cargan aproximadamente 40 µg de proteínas de líneas celulares de osteosarcoma humano, como HOS y SaOS, las cuales expresan altos niveles endógenos de RUNX2.

El tamaño muestral para cada grupo de estudio fue, OVI n = 3, TBE-TBO n = 8 y COE n = 12.

Anticuerpos	Dilución	Tipo	Proveedor	N° de catálogo
Anti-RUNX2 (D1L7F)	1:500	Conejo Monoclonal	Cell Signalling	# 12556
Anti β-actina	1:30000	Ratón Monoclonal	Sigma-Aldrich	# A5441
Anti-conejo HRP	1:5000	Cabra Policlonal	KPL	# 074-1516
Anti-ratón HRP	1:5000	Cabra Policlonal	KPL	# 074-1806

V. 3. Ensayos *in vitro*

V. 3. 1. Líneas Celulares;

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron las siguientes líneas celulares,

V. 3. 1. a. Línea celular de Epitelio Superficial Ovárico Humano, HOSE; esta línea celular corresponde a células epiteliales normales de la superficie ovárica, las cuales fueron obtenidas de una paciente post-menopáusica con cáncer endometrial.

V. 3. 1. b. Línea celular de Cáncer Ovárico Epitelial Humano, A2780; esta línea celular ha sido generada a partir de tejido de carcinoma ovárico obtenido de una paciente sin tratamiento. Por lo mismo, estas células son sensibles a fármacos.

Las células de ambas líneas presentan morfología epitelial y crecen adheridas a la superficie de cultivo formando monocapas.

V. 3. 2. Cultivos Celulares;

Las líneas celulares HOSE y A2780 fueron cultivadas en medio Dulbecco's minimal essential medium/Ham F-12, DMEM/Ham F-12 (Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA) carente de rojo fenol y suplementado con 1,2 gr/ml de bicarbonato de sodio, 10 % de suero fetal bovino (FBS) penicilina – estreptomycin (Mediatech, Inc., Manassas, Virginia, USA) y 3 µg/ml de Voriconazol (Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA). Las células fueron mantenidas en un incubador *Shell Lab 2424-2* (Sheldon Manufacturing, Inc., Cornelius, Oregon, USA) a 37 °C, atmósfera húmeda y 5 % de CO₂. Cuando los cultivos alcanzaron un 80 % de confluencia, fueron tripsinizados con una solución Tripsina – EDTA al 0,25 % (Mediatech, Inc. A. Corning, Manassas, Virginia, USA). Posteriormente, las células fueron sembradas en cantidades variables en placas de 6 pocillos, labtek, y placas 35, 60 y 1000 mm de diámetro, de acuerdo al ensayo a realizar.

V. 3. 3. Inmunocitoquímica de RUNX2 en líneas celulares de tejido ovárico;

Mediante Inmunocitoquímica se evaluó cualitativamente la presencia y localización de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780. Para estos ensayos las células fueron sembradas en labtek con medio completo, con 50.000 células por pocillo, y fueron cultivadas 24 h en medio húmedo con 5% de CO₂. A continuación, se removió el medio de cultivo y las células fueron lavadas en PBS, para, posteriormente ser prefijadas en paraformaldehído 2% (PFA) en PBS pH 7.4 durante 2 min a temperatura ambiente. Luego, las células fueron fijadas reemplazando la solución de PFA 2% por PFA 4% en PBS pH 7.4, por 15 min a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo, se efectuaron lavados con PBS y las células fueron permeabilizadas con Tritón 0.3% durante 10 min a temperatura ambiente. Consecutivamente, para el bloqueo de la peroxidasa endógena las células fueron lavadas e incubadas en peróxido de hidrógeno, H₂O₂, al 3 % durante 15 min a temperatura ambiente y oscuridad. Para el bloqueo de uniones inespecíficas, las células fueron lavadas y reservadas en PBS-BSA 2 % durante 15 min a temperatura ambiente. A continuación, se procedió a incubar toda la noche a 4 °C con el anticuerpo primario *anti-RUNX2 [1D8] (ab115899)* (Abcam, Cambridge, UK) diluido en PBS-BSA 2 % en una proporción de 1:50.

Ulteriormente, las células lavadas fueron incubadas 30 min a 37 °C con el anticuerpo secundario *anti-ratón* conjugado a HRP (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) diluido en PBS-BSA 2% en una proporción de 1:300. Luego de ser lavadas, las células fueron expuestas al cromógeno *Liquid DAB+Substrate Chromogen System* (Dako, Inc., California, USA) durante 4 min a temperatura ambiente y oscuridad. Durante este intervalo de tiempo aparece la inmunotinción de color marrón que evidencia la presencia de RUNX2. Posterior al revelado, las placas fueron lavadas 3 veces durante 2 min con agua destilada, H₂O_d. Para la identificación del núcleo celular, se efectuó la contratinción de las células aplicando Hematoxilina de Harris (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) diluida 1:5, durante 1 min 40 seg, luego de lo cual las placas fueron lavadas en agua corriente durante 3 min. Se efectuó la deshidratación de las células sumergiendo las placas en agua destilada y una serie de diluciones de etanol con concentraciones crecientes (70, 95, 100 y 100 %) durante 3 min en todos los casos. Luego, las placas fueron reservadas en Xilol durante 10 min, paso que se repitió en un segundo Xilol. Por último, las placas fueron selladas con un cubreobjeto utilizando *Entellan* (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) como medio de montaje. Luego de 24 h las placas fueron observadas en el Microscopio Óptico Olympus BX51 (Olympus Corporation, Tokio, Japón). Se obtuvieron fotografías en aumento de 400x utilizando la Cámara 3.3 RTV (Q Imaging, Surrey, Columbia Británica, Canadá). Las imágenes fueron analizadas cualitativamente, identificándose la presencia y localización de RUNX2 en las líneas celulares. Todos los ensayos fueron realizados con los correspondientes controles negativos

TABLA 2. Especificaciones de los anticuerpos utilizados en las inmunocitoquímicas de tejidos				
Anticuerpo	Dilución	Tipo	Proveedor	N° de catálogo
Anti-RUNX2 [1D8]	1:50	Ratón Monoclonal	Abcam	# ab115899
Anti-conejo HRP	1:300	Cabra Policlonal	KPL	# 074-1516

V. 3. 4. Obtención y cuantificación de proteínas totales de cultivos de las líneas celulares HOSE y A2780;

Las células fueron cultivadas en las condiciones que se han descrito (sección V. 3. 2), y fueron sembradas en distinto número y tipo de placas de acuerdo a los requerimientos de

los ensayos. Para la extracción de proteínas, las placas fueron reservadas en hielo, se removió el medio de cultivo y se realizaron lavados con PBS frío. A continuación, se agregó a las placas una solución de PBS e inhibidor de proteasas y fosfatasa (*Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, Massachusetts, USA) y se procedió a raspar la superficie de las mismas para remover las células adheridas. El contenido de cada placa fue recolectado en un tubo *Eppendorf* y centrifugado a 10000g durante 15 min a 4 °C. El sobrenadante fue descartado y el *pellet* obtenido fue resuspendido en Buffer de Lisis (40 mM Tris-HCl pH 6.8, 1.5 % SDS, 15 % Glicerol, 1.5 M Urea) e incubado en hielo durante 30 min. Para completar la lisis celular, las muestras fueron homogenizadas con un *Sonicador XL-2000-010* (QSonica. LLC, Newtown, Connecticut, USA) aplicando muy breves pulsos de 22.5 KHz. Las muestras fueron reposadas en hielo y ulteriormente, para aumentar la concentración de proteínas estas fueron centrifugadas al vacío (*Concentrator 5301*, Eppendorf AG., Hamburgo, Alemania) a 240g durante 2 h aproximadamente. Finalmente, se cuantificó la concentración de proteínas con el kit *BCA Protein Assay* (Pierce, Rockford, Illinois, USA). En todos los casos, las proteínas fueron extraídas luego de haber mantenido los cultivos 24 hs en medio sin suero, estando en una confluencia menor o igual a un 80 %.

V. 3. 5. Obtención de fracciones subcelulares a partir de cultivos de las líneas celulares HOSE y A2780:

Para estos ensayos las células fueron cultivadas en las condiciones mencionadas anteriormente (sección V. 3. 2). Cuando los cultivos alcanzaron un máximo de 80 % de confluencia se procedió a desarrollar el fraccionamiento subcelular de acuerdo al procedimiento desarrollado por *Dignam J. et al.*, 1983 para la purificación de RNA polimerasas en mamíferos.

Primeramente las células fueron lavadas con PBS e incubadas con tripsina a 37 °C durante 5 min. A continuación, se agregó medio completo para inhibir la tripsina y se procedió a remover las células adheridas con un *scraper*. El contenido de las placas fue recolectado en un tubo *Falcon* y centrifugado a 1400g durante 3 min a 4 °C. El sobrenadante fue

descartado, el *pellet* resuspendido en 1 ml de PBS y centrifugado a 1400g durante 3 min a 4 °C. Se realizó una tercera centrifugación en las mismas condiciones y se obtuvo un *pellet* lavado (con un volumen variable de acuerdo al ensayo, no superior a 50 µL, que denominaremos volumen **V**). Este *pellet* fue resuspendido en un volumen de Buffer A (10 mM Tris pH 7.9, 1,5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) equivalente a 5V. Las células fueron incubadas en este buffer hipotónico durante 10 min a 4 °C. Posteriormente, se efectuó una centrifugación a 9500g durante 10 min a 4 °C, luego de la cual se recuperó el *pellet* para ser resuspendido nuevamente en Buffer A (volumen de buffer equivalente a 2V). Esta suspensión fue disgregada mecánicamente con un *homogeneizador de vidrio con pistilo*. El homogeneizado obtenido fue centrifugado a 9500g durante 10 min a 4 °C, tras lo cual se obtuvo un sobrenadante corresponde a un extracto citosólico, S100, y un *pellet* que corresponde a la fracción nuclear. Se agregó Buffer B al extracto citosólico (se agrega Buffer B 10 X hasta obtener una concentración de 1X; 30 mM Tris pH 7.9, 3 mM MgCl₂, 140 mM KCl), el cual fue centrifugado a 17000g (la máxima fuerza posible con la centrífuga disponible) durante 1 h a 4 °C, para luego recuperar el sobrenadante que corresponde al citosol clarificado. Por otro lado, se añadió Buffer C (20mM Tris pH 7.9, 25% Glicerol, 420 M NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 0.5 mM PMSF) a la fracción nuclear (en un volumen equivalente a 2V), agitándose 30 min a 4 °C, para luego ser centrifugada a 9500g durante 30 min a 4 °C. Se rescató el sobrenadante correspondiente a la fracción nuclear soluble, nucleoplasma, y el *pellet* correspondiente a cromatina. Esta última fracción fue resuspendida en Buffer E (50 mM Tris pH 7.9, 25% glicerol, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM EDTA, 5 mM DTT, 0.2 mM PMSF) en un volumen equivalente a V, e incubada en hielo durante 45 min para su total homogenización. Finalmente se obtuvieron 3 fracciones subcelulares, enriquecidas en citosol, nucleoplasma y cromatina, cuya concentración de proteínas fue posteriormente determinada usando el kit *BCA Protein Assay* (Pierce, Rockford, Illinois, USA).

Las proteínas obtenidas fueron utilizadas para la evaluación, mediante *Western Blot*, de los niveles de RUNX2 en las fracciones, con la finalidad de determinar y comparar su distribución subcelular en las líneas celulares HOSE y A2780.

Cada experimento fue efectuado con un mínimo de 6×10^6 células. Debido este elevado número, cada n muestral fue realizado en uniplicado. Sin embargo, se extendió el número de ensayos a un $n = 5$.

V. 3. 6. Determinación de niveles basales de RUNX2;

Para estas determinaciones las células fueron cultivadas en las condiciones descritas (sección V.3.2). Cuando los cultivos presentaron una confluencia igual o menor al 80 %, se procedió a cambiar el medio con 10 % de FBS a medio sin suero. Las células fueron mantenidas en dicho medio durante 24 h. Posteriormente se extrajeron proteínas totales de estos cultivos según lo mencionado con anterioridad (sección V. 3. 4). Los extractos de proteínas fueron utilizados para la determinación de los niveles basales de RUNX2 mediante *Western Blot*. Como en el caso de los tejidos, se utilizan proteínas de líneas celulares de osteosarcoma humano para la identificación de RUNX2 en las membranas luego del revelado. Estos ensayos fueron efectuados en ambas líneas celulares, en duplicado y con un $n = 3$.

V. 3. 7. Estímulos con NGF en cultivos de las líneas celulares HOSE y A2780;

Los cultivos celulares fueron mantenidos en las condiciones normales (sección V. 3. 2) hasta alcanzar un 70 % de confluencia, momento en el cual se reemplazó el medio completo por medio sin suero. Luego de 24 h en este medio, se realizaron los estímulos con NGF (*NGF- β Recombinant Human*, Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA). Antes de cada ensayo se preparó una solución *stock* de 75 ng/ μ L de NGF en medio sin suero. Se administró a los cultivos un volumen de la solución *stock* para obtener una concentración final de NGF de 50 ng/ml. Las células fueron estimuladas con esta concentración durante 0.5, 2, 6 y 24 h. En experimentos independientes también se realizaron estímulos con 100 y 150 ng/ml, durante 0.5, 2, 6 y 24 h. Para cada tiempo de estimulación se desarrollaron los correspondientes controles negativos, es decir, en ausencia de NGF. Transcurrido el tiempo de estimulación las células fueron empleadas para la obtención proteínas y ulterior evaluación de RUNX2 mediante *Western Blot*.

Estos ensayos fueron efectuados en ambas líneas celulares, en duplicado y con un n = 3.

V. 3. 8. Ensayos de hipoxia en cultivos de las líneas celulares HOSE y A2780;

Las células fueron cultivadas en medio completo, a 37 °C, 5 % de CO₂ y 20 % de O₂. Cuando los cultivos alcanzaron un 60 % de confluencia se sustituyó el medio completo por medio suplementado con 2% FBS, manteniendo las condiciones de temperatura y atmósfera. Luego de 24 h, los cultivos fueron transferidos una la cámara de hipoxia *C-Chamber C274* (BioShrperix Ltd., New York, USA) con 2 % de O₂, conservando el medio con 2 % FBS. Las células fueron mantenidas en estas condiciones durante 24 y 48 h. Se realizaron los correspondientes controles cultivando las células en normoxia, 20 % de O₂. Concluidas las 24 o 48 h de ensayo, las células fueron utilizadas para la extracción de proteínas totales según lo que hemos descrito (sección V. 3. 4). Las proteínas fueron cuantificadas y posteriormente empleadas para la evaluación, mediante *Western Blot*, de RUNX2 y HIF-1 α en condiciones de hipoxia.

Estos ensayos fueron efectuados en ambas líneas celulares, en duplicado y con un n = 3.

V. 3. 9. Estímulos con CoCl₂ en cultivos de las líneas celulares HOSE y A2780;

Las células fueron cultivadas en las condiciones habituales (sección V. 3. 2). Cuando los cultivos alcanzaron un 70 % de confluencia se reemplazó el medio completo por medio sin suero. Luego de 24 h en estas condiciones, se procedió a realizar los estímulos con CoCl₂, un compuesto conocido y utilizado por su propiedad de inducir cambios celulares similares a los observados en hipoxia. Para la realización de estos ensayos se preparó una solución *stock* de CoCl₂ 2,5 mM (Merck Millipore, Darmstadt, Alemania) utilizando como solvente medio sin suero.

A continuación, se administró el estímulo a los cultivos para obtener concentraciones finales de 25, 50 y 100 μ M de CoCl₂, con el correspondiente control de 0 μ M. Las células fueron mantenidas en las condiciones normales de atmósfera y temperatura hasta concluir el tiempo de estimulación. Dichos tiempos fueron 3, 6, 12 y 18 h. Finalmente las células

fueron utilizadas para la extracción de proteínas totales y posterior evaluación de los niveles de RUNX2 mediante *Western Blot*.

Estos ensayos fueron efectuados en ambas líneas celulares, en duplicado y con un n = 3.

La solución *stock* de CoCl₂ fue preparada el mismo día de la estimulación y fue filtrada.

V. 3. 10. *Western Blot* de extractos de proteínas de las líneas celulares HOSE y A2780;

V. 3. 10. a. *Western Blot* para inmunodetección de RUNX2 en proteínas obtenidas en condiciones basales y tras estimulación con NGF y CoCl₂;

Estos ensayos fueron realizados en las condiciones descritas para los *Western Blot* de RUNX2 en tejidos ováricos (sección V. 2. 6).

TABLA 3. Especificaciones de los anticuerpos utilizados en <i>Western Blot</i> de proteínas obtenidas de las líneas celulares HOSE y A2780 en condiciones basales y sometidas a estímulos con NGF u CoCl ₂				
Anticuerpo	Dilución	Tipo	Proveedor	N° de catálogo
Anti-RUNX2 (D1L7F)	1:500	Conejo Monoclonal	Cell Signalling Technology	# 12556
Anti-conejo HRP	1:5000	Cabra Policlonal	KPL	# 074-1516
Anti β-actina	1:30000	Ratón Monoclonal	Sigma-Aldrich	# A5441
Anti-ratón HRP	1:5000	Cabra Policlonal	KPL	# 074-1806

V. 3. 10. b. *Western Blot* para inmunodetección de RUNX2 en proteínas obtenidas por fraccionamiento subcelular,

Las condiciones generales de estos ensayos son iguales a las especificadas para los *Western Blot* de tejidos ováricos (sección V. 2. 6). En estos casos, sin embargo, se utilizó un total de 20 µg de proteína por muestra para la inmunodetección y se empleó un gel con un 12 % de poliacrilamida. Además de evaluar RUNX2, se incluyó la detección de GAPDH e histona 3, como controles del enriquecimiento citosólico y nuclear, respectivamente, de las fracciones. Para la detección de GAPDH se realizó un bloqueo en TTBS-Leche 5 % durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Posteriormente, se incubó con el anticuerpo *anti-GAPDH* (Sigma-Aldrich Co., St Louis, Missouri, USA) diluido en TTBS-Leche 5 % en una relación 1:20000, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Finalmente, se incubó

con el anticuerpo secundario *anti-conejo* conjugado a HRP (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) diluido en TTBS-Leche 5 % en una proporción 1:5000, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Para la determinación de histona 3 se efectuó un bloqueo en TTBS-BSA 5 % durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Se incubó toda la noche a 4 °C con el anticuerpo *anti-Histona H3 (ab 1791)* (Abcam, Cambridge, UK) diluido en TTBS-BSA 5 % en una proporción 1:50000. Posteriormente, se realizó la incubación con el anticuerpo secundario *anti-conejo* conjugado a HRP (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) diluido 1:5000 en TTBS-BSA 5 %, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación.

TABLA 4. Especificaciones de los anticuerpos utilizados en <i>Western Blot</i> de proteínas obtenidas por fraccionamiento subcelular de líneas celulares				
Anticuerpo	Dilución	Tipo	Proveedor	N° de catálogo
Anti-RUNX2 (D1L7F)	1:500	Conejo Monoclonal	Cell Signalling Technology	#12556
Anti-GAPDH	1:20000	Conejo Policlonal	Sigma Aldrich	# G9545
Anti-Histona H3	1:50000	Conejo Policlonal	Abcam	# ab1791
Anti-conejo HRP	1:5000	Cabra Policlonal	KPL	# 074-1516

V. 3. 10. c. *Western Blot* para la inmunodetección de RUNX2 y HIF-1 α en proteínas obtenidas tras ensayos de hipoxia;

Estos ensayos fueron realizados de forma muy similar a lo mencionado para los *Western Blot* de tejidos ováricos (sección V. 2. 6). En este caso se modificó el tiempo de transferencia aumentándose a 4 h para optimizar la visualización de HIF-1 α , una proteína de alto peso molecular. Las condiciones generales para la determinación de HIF-1 α son idénticas a las descritas para RUNX2. Se realizó un bloqueo en TTBS-BSA 5 % durante 1 h a temperatura ambiente y agitación. Se incubó *overnight* a 4 °C con el anticuerpo *anti-HIF-1 α (28b) sc-13515* (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA) diluido en TTBS-BSA 5 % en una proporción de 1:100. A continuación, se incubó con el anticuerpo secundario *anti-ratón* conjugado a HRP (KPL, Kirkegaard & Perry Laboratories Inc., Gaithersburg, Maryland, USA) diluido en TTBS-BSA 5 % en una relación 1: 5000, durante 1 h a temperatura ambiente y agitación.

TABLA 5. Especificaciones de los anticuerpos utilizados en <i>Western Blot</i> de proteínas obtenidas de las líneas HOSE y A2780 sometidas a hipoxia				
Anticuerpo	Dilución	Tipo	Proveedor	N° de catálogo
Anti-RUNX2 [D1L7F]	1:500	Conejo Monoclonal	Cell Signalling Technology	#12556
Anti-HIF-1 α (28b)	1:100	Ratón Monoclonal	Santa Cruz Biotechnology	# sc13515
Anti- β -actina	1:30000	Ratón Monoclonal	Sigma Aldrich	# A5441
Anti-conejo HRP	1:5000	Cabra Policlonal	KPL	# 074-1516
Anti-ratón HRP	1:5000	Cabra Policlonal	KPL	# 074-1806

V. 4. Análisis estadístico

El cálculo del tamaño muestral (n) para los experimentos *ex vivo* se realizó utilizando la fórmula de comparación de medias: $n = (2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2)/d^2$, considerando un α de 0,05 ($Z\alpha = 1,96$), un β de 0,20 ($Z\beta = 0,842$), una desviación estándar (S^2) de 0,09 (*ex vivo*) o 0.06 (*in vitro*), y una diferencia entre las medias (d^2) de un 25%. Con estos datos se determinó un $n = 6$ para cada grupo experimental de los ensayos *ex vivo*. Los ensayos *in vitro* se realizaron con un $n=3$.

Sin embargo, en algunos casos de los ensayos *ex vivo* la disponibilidad de muestras fue insuficiente para completar este n muestral.

Los resultados obtenidos fueron expresados como promedio \pm error estándar medio, SEM. Para la presentación gráfica y el estudio estadístico de los datos se utilizó el programa *Graphpad Prism 5* (Graphpad Software, Inc., San Diego, California, USA).

Considerando las características de los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico no paramétrico. De acuerdo al ensayo analizado se efectuó un *test Kruskal-Wallis*, con un *post test de Dunn*, o un *test Mann-Whitney*, utilizándose en todos los casos un $p \leq 0,05$ como criterio de significancia.

VI. RESULTADOS

VI.1. Objetivo 1. Evaluar si el factor transcripcional RUNX2 se expresa en tejidos de epitelio ovárico, y si sus niveles se incrementan con la progresión del cáncer ovárico epitelial.

Los resultados obtenidos mediante Inmunohistoquímica muestran que todos los tejidos ováricos evaluados presentan RUNX2. Adicionalmente, se observa que esta proteína se ubica a nivel citoplasmático y nuclear, siendo predominante en este último compartimiento subcelular. Cuando se evaluó el porcentaje de células que presentan RUNX2 nuclear respecto al total de células observadas, se determinó que el tejido epitelial normal de la superficie ovárica (grupo OVI) presenta, en promedio, un 53 % de células positivas para RUNX2 nuclear. Por otro lado, se estableció que los tejidos ováricos con transformaciones no malignas (grupo TBE-TBO) y malignas (COE) presentan en promedio, un 67 y 71 % respectivamente de células con RUNX2 nuclear. El análisis estadístico de estos resultados indica que, cuando se compara el grupo OVI con los grupos TBE-TBO y COE, estos últimos muestran un aumento significativo en el número de células que evidencian RUNX2 nuclear respecto al total de células. Particularmente, este aumento se asocia a un valor $p < 0.01$ en el grupo TBE-TBO y a un valor $p < 0.001$ para el grupo COE. No se encontró una diferencia significativa en el porcentaje de RUNX2 nuclear entre los grupos TBE-TBO y COE (Figura 2). Por otro lado, la evaluación de RUNX2 mediante *Western Blot* muestra que todos los tejidos ováricos analizados expresan RUNX2, consistente con la determinación por inmunohistoquímica. Sin embargo, la semicuantificación de los *Western Blot* muestra que los grupos TBE-TBO y COE experimentan una reducción en la expresión de RUNX2 respecto al grupo OVI, no obstante, esta disminución no es estadísticamente significativa (Figura 3). Consistente con lo observado en las inmunohistoquímicas, no se encontró una diferencia significativa en los niveles de RUNX2 entre los grupos TBE-TBO y COE.

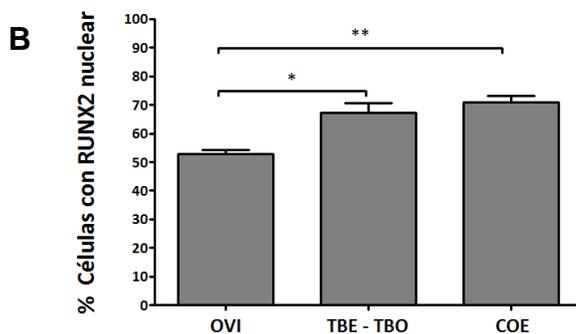
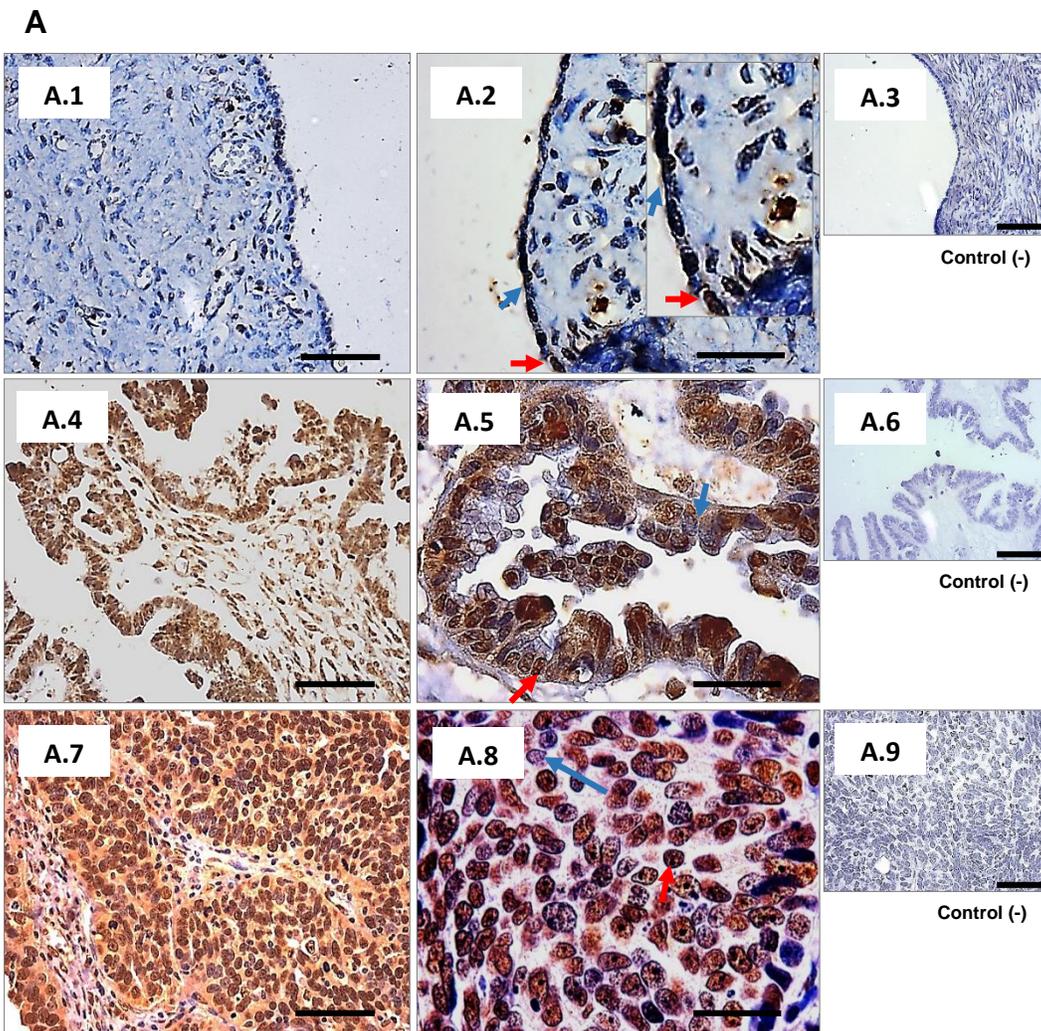


Figura 3. Presencia nuclear de RUNX2 en tejidos ováricos. Análisis cuantitativo de *Inmunohistoquímicas* realizadas para la evaluación de presencia nuclear de RUNX2 en tejidos ováricos. **A.** Imágenes representativas de los tejidos ováricos analizados. OVI fotografía obtenida en **A.1** 400x y **A.2** 1000x (se incluye un inserto con una zona ampliada de la imagen). TBE-TBO fotografía obtenida en **A.4** 400x y **A.5** 1000x. COE fotografía obtenida en **A.7** 400x y **A.8** 1000x. En las imágenes capturadas con aumento de 1000x se muestran células con presencia (→) y ausencia de RUNX2 nuclear (↔). Las imágenes **A.3**, **A.6** y **A.9** corresponden a los controles negativos de cada grupo (fotografías obtenidas con aumento de 400x). Se considera inmunotinción positiva la detección de color marrón. Las barras corresponden a 25 μ m y 10 μ m para las fotografías obtenidas con aumento de 400x y 1000x respectivamente. **B.** Cuantificación de células de epitelio ovárico con inmunotinción nuclear positiva para RUNX2 en tejidos (OVI, ovario inactivo, TBE-TBO, tumores borderline y benigno, COE, cáncer ovárico epitelial). Los resultados son presentados como el porcentaje de células con tinción nuclear positiva para RUNX2, respecto al total de células observadas. OVI, n = 4, 3.370 células observadas. TBE-TBO, n = 9, 22.380 células observadas. COE, n = 13, 72.840 células observadas. p < 0.01

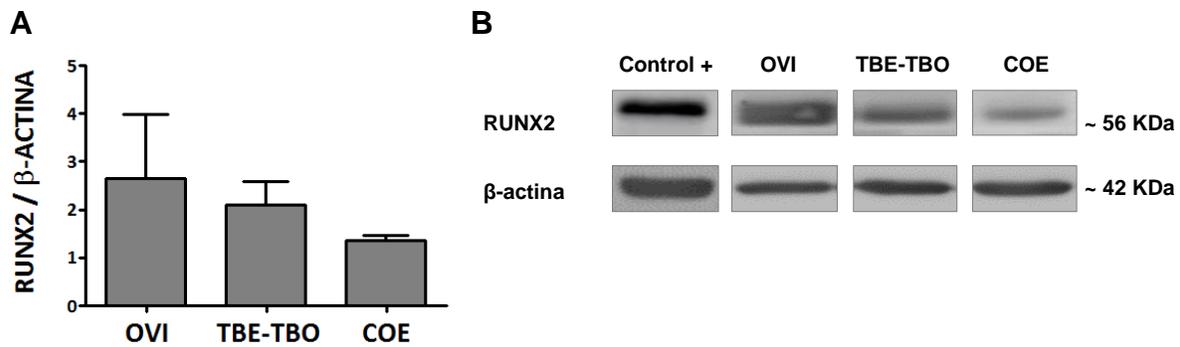


Figura 4. Niveles proteicos de RUNX2 en tejidos ováricos. **A.** Análisis semicuantitativo de *Western Blot* realizados para la evaluación de RUNX2 en tejido de ovario normal inactivo, OVI, tumores ováricos benignos y borderline, TBE-TBO, y cáncer ovárico epitelial, COE. Los niveles proteicos de RUNX2 son expresados en unidades arbitrarias en relación al contenido de β-actina, como promedio ± error estándar medio, SEM. **B.** Imagen representativa de los *Western Blot* evaluados. Para la identificación de RUNX2 en los tejidos ováricos se utilizan proteínas de líneas celulares de osteosarcoma humano, las cuales expresan altos niveles endógenos de esta proteína. En este caso se usaron proteínas de la línea celular HOS. OVI n = 3, TBE-TBO n = 8, COE n = 12.

En conjunto, estos resultados muestran que el tejido ovárico epitelial expresa RUNX2, particularmente con un predominio en el núcleo celular. Los resultados de los ensayos de inmunohistoquímica revelan que los grupos TBE-TBO y COE experimentan un aumento de RUNX2 respecto al grupo control OVI, cuando se evalúa el número de células con RUNX2 nuclear. A pesar que el análisis mediante *Western Blot* no muestra resultados homólogos con lo obtenido mediante inmunohistoquímica - y contrariamente parecen indicar un comportamiento opuesto respecto a los niveles de RUNX2 en la progresión del cáncer ovárico epitelial – hay que considerar que hay una gran dispersión en los datos de nuestro grupo control, OVI, en parte debido a un *n* muestral muy bajo, lo que dificulta su comparación con los grupos TBE-TBO y COE. Considerando esto último, los resultados obtenidos mediante *Western Blot* no permiten establecer diferencias significativas en los niveles de RUNX2 entre los grupos estudiados.

En síntesis, los resultados obtenidos a través de las 2 metodologías utilizadas no permiten establecer que RUNX2 aumenta progresivamente desde los tejidos OVI a los tejidos COE. A pesar de esto, parece factible que los grupos TBE-TBO y COE no presentan variaciones significativas de RUNX2 entre sí.

VI.2. Objetivo 2. Establecer si RUNX2 se expresa en nuestro modelo celular *in vitro* y determinar si sus niveles se encuentran incrementados en la línea celular de cáncer ovárico, A2780, respecto a la línea celular epitelio superficial ovárico normal, HOSE.

La presencia de RUNX2 en nuestras líneas celulares de epitelio ovárico fue evaluada cualitativamente mediante inmunocitoquímica. Concordante con los resultados obtenidos en los tejidos ováricos, que muestran RUNX2 en todos los epitelios analizados, estos ensayos evidencian la expresión de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780, observándose en ambos casos su presencia citoplasmática aunque preponderantemente nuclear (Figura 4). Adicionalmente se analizó semicuantitativamente, mediante *Western Blot*, el nivel basal de RUNX2 en cada una de nuestras líneas celulares. Este estudio mostró que, consistente con los resultados obtenidos por inmunocitoquímica, ambas líneas celulares presentan RUNX2. Sin embargo, contrariamente a la hipótesis, este análisis evidencia que la línea HOSE, correspondiente a epitelio superficial ovárico normal, exhibe un mayor contenido proteico de RUNX2 cuando se compara con los niveles de la línea A2780, correspondiente a epitelio ovárico transformado, siendo esta una diferencia significativa con un valor $p < 0.01$ (Figura 5). Debido a que este resultado difiere del supuesto inicial, se consideró la posibilidad que la línea celular A2780 presentase un mayor contenido nuclear de RUNX2 respecto a la línea HOSE. Esto podría sugerir que, a pesar de encontrarse en menor cantidad, RUNX2 podría ser más activo en la línea celular de cáncer ovárico epitelial. Para evaluar esta posibilidad se realizó un fraccionamiento subcelular en las líneas HOSE y A2780, obteniéndose extractos proteicos correspondientes a citosol, nucleoplasma y cromatina. El análisis semicuantitativo de estas fracciones, mediante *Western Blot*, muestra que cuando se analiza el contenido nuclear respecto al total de RUNX2, estas líneas celulares no presentan una diferencia en la distribución de RUNX2, siendo este fundamentalmente nuclear (Figura 6).

En síntesis, los resultados descritos permiten establecer que ambas líneas celulares expresan RUNX2, presentando la línea HOSE un contenido significativamente mayor al observado en la línea A2780 contrariamente a lo esperado. Por otro lado, se pudo determinar que en estos tipos celulares la localización de RUNX2 es fundamentalmente

nuclear, no existiendo en estas líneas celulares diferencias en la relación del contenido nuclear respecto al contenido total de RUNX2.

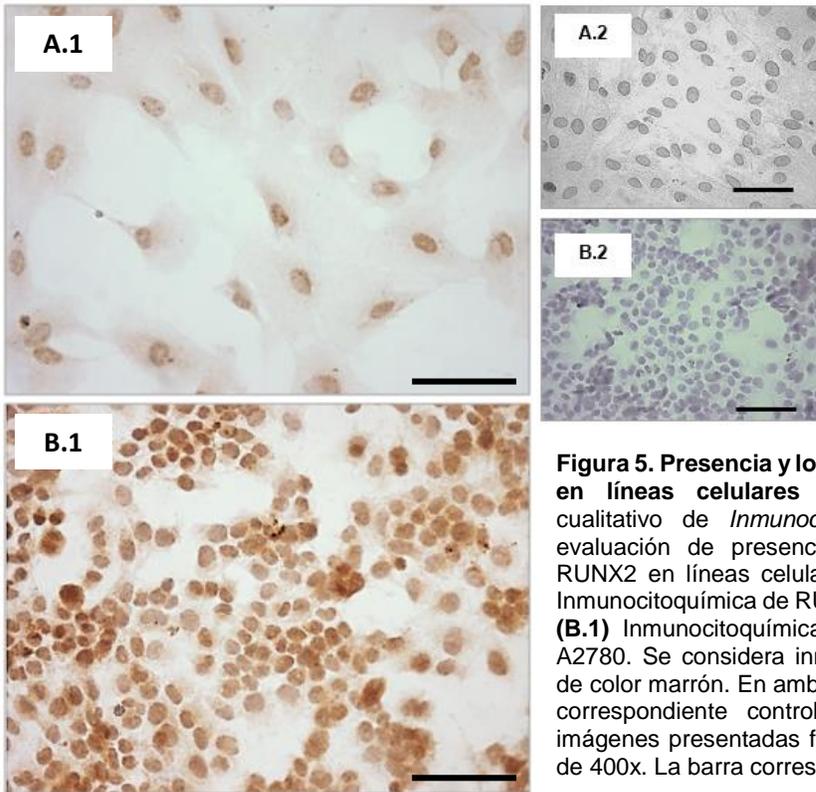


Figura 5. Presencia y localización subcelular de RUNX2 en líneas celulares de epitelio ovárico. Análisis cualitativo de *Inmunocitoquímicas* realizadas para la evaluación de presencia y localización subcelular de RUNX2 en líneas celulares de epitelio ovárico. **A. (A.1)** Inmunocitoquímica de RUNX2 en la línea celular HOSE. **B. (B.1)** Inmunocitoquímica de RUNX2 en la línea celular A2780. Se considera inmunotinción positiva la detección de color marrón. En ambas líneas celulares, se muestra el correspondiente control negativo, **(A.2)** y **(B.2)**. Las imágenes presentadas fueron obtenidas con un aumento de 400x. La barra corresponde a 25 µm.

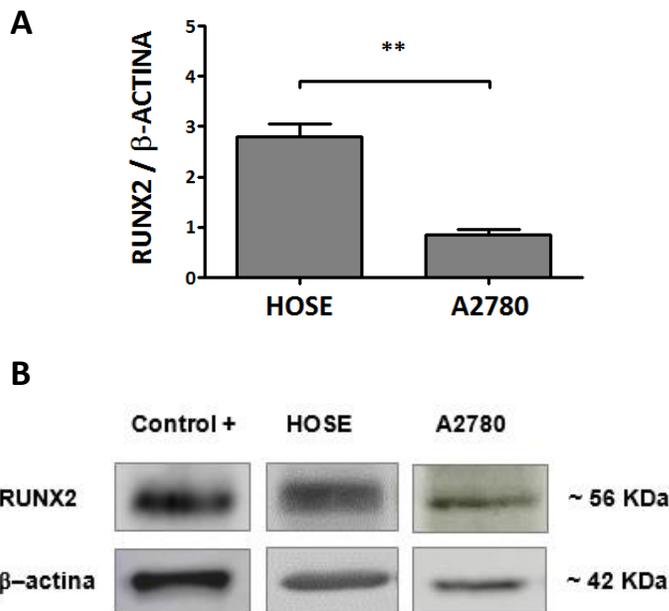


Figura 6. Niveles proteicos de RUNX2 en líneas celulares de epitelio ovárico en condición basal. **A.** Análisis semicuantitativo de *Western Blot* realizados para la evaluación de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780 en condición basal. Los niveles proteicos de RUNX2 son expresados en unidades arbitrarias en relación al contenido de β-ACTINA, como promedio ± error estándar medio, SEM. **B.** Imagen representativa de los *Western Blot* evaluados. Para la identificación de RUNX2 en los tejidos ováricos se utilizan proteínas de líneas celulares de osteosarcoma humano, las cuales expresan altos niveles endógenos de esta proteína. En este caso se usaron proteínas de la línea celular HOS. ** $p < 0.01$, $n=3$ en duplicados.

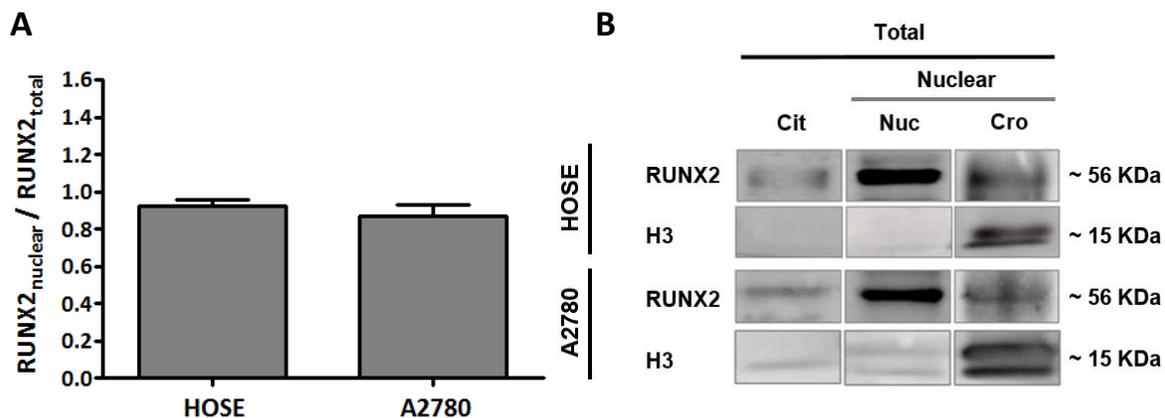


Figura 7. Niveles proteicos nucleares de RUNX2 en líneas celulares de epitelio ovárico. **A.** Análisis semicuantitativo de *Western Blot* realizados con extractos de proteínas obtenidas por *fraccionamiento subcelular* de las líneas HOSE y A2780 para la evaluación de RUNX2. Los niveles de RUNX2 son presentados como el contenido nuclear respecto al contenido celular total. El contenido nuclear corresponde a las cantidades presentes en las fracciones enriquecidas en cromatina, *Cro*, y nucleoplasma, *Nuc*. El total considera adicionalmente el contenido presente en la fracción enriquecida en citosol, *Cit*. Los resultados son presentados como promedio \pm error estándar medio, SEM. **B.** Imagen representativa de los *Western Blot* analizados. En cada una de las fracciones obtenidas se evaluó, además de RUNX2, la presencia de H3 (HISTONA) y GAPDH (no mostrado), para verificar el nivel de pureza de los extractos nucleares y citosólico respectivamente. $n = 5$

VI.3. Objetivo 3. Determinar si NGF induce un aumento en los niveles de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780.

Como ya se mencionó, ha sido bien establecido que la progresión del cáncer ovárico epitelial se asocia con un incremento en los niveles de NGF, el cual eleva los niveles de VEGF en explantes de tejidos ováricos y en las líneas celulares HOSE y A2780, modelos de estudio de cáncer ovárico. Más aún, se ha determinado que en un sistema *in vitro* NGF es un factor pro-angiogénico que favorece el desarrollo de vasos sanguíneos directamente. Por otro lado, ha sido bien descrito que en varios tipos de cáncer RUNX2 induce la transcripción de VEGF. Considerando entonces que tanto NGF como RUNX2 están relacionados con un aumento en los niveles de VEGF, podría existir algún vínculo entre estas 2 proteínas en cáncer ovárico epitelial. Con el objetivo de establecer esta relación, se evaluó un posible aumento de RUNX2 por acción de NGF realizando estímulos con este factor de crecimiento en las líneas celulares HOSE y A2780. Como se ha especificado, se efectuaron estímulos con concentraciones de NGF de 50, 100 y 150 ng/ml, durante 0.5, 2, 6 y 24 h.

Los resultados obtenidos mediante *Western Blot* muestran que las líneas celulares HOSE y A2780, no experimentan cambios significativos en los niveles proteicos de RUNX2 cuando son estimuladas con NGF, en los tiempos y concentraciones consideradas (Figuras 7 y 8). Por lo tanto, estos

resultados son opuestos a lo esperado, aunque es necesario considerar que en algunos casos hay una importante dispersión de los datos.

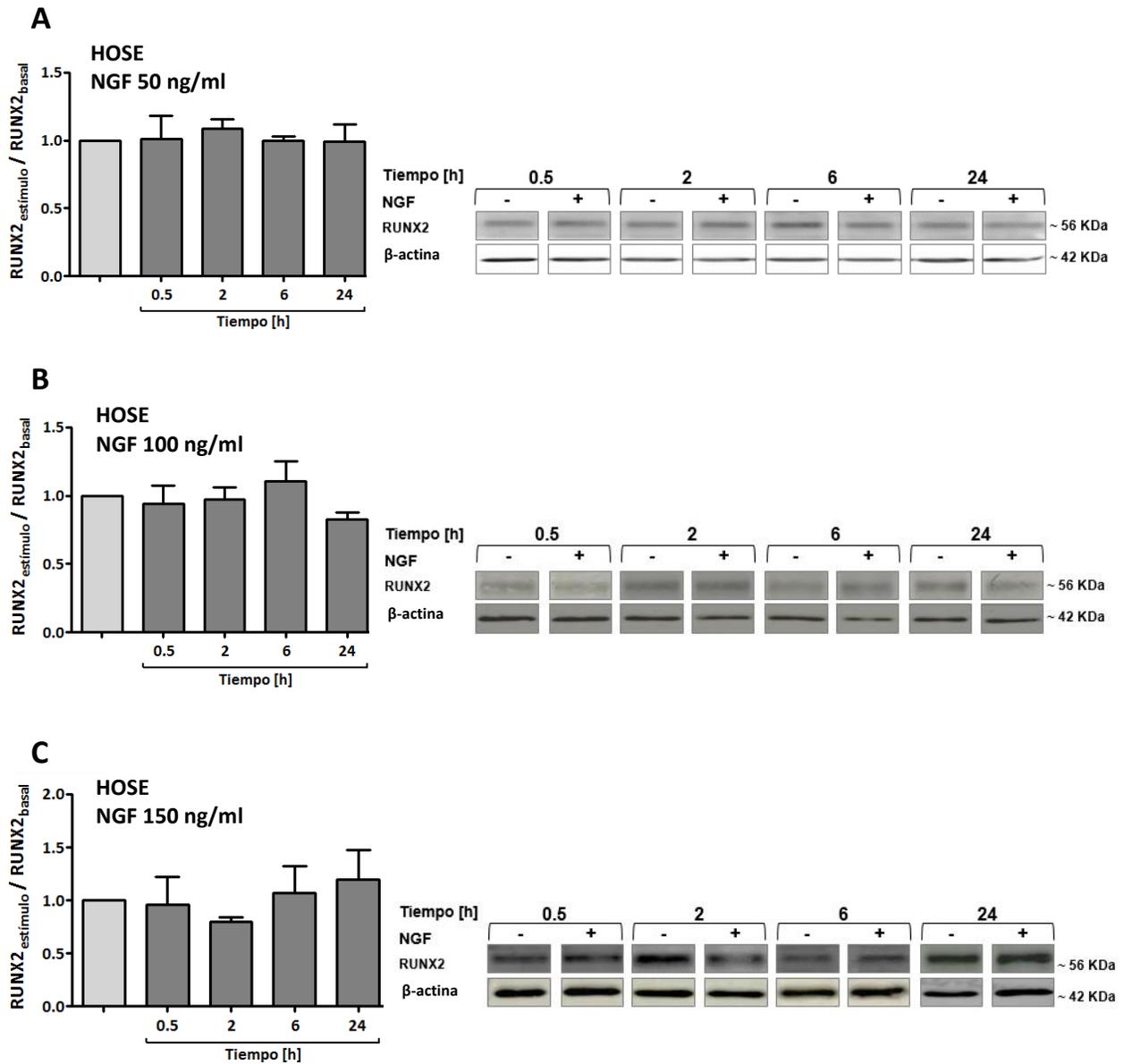


Figura 8. Niveles proteicos de RUNX2 en células HOSE estimuladas con NGF. Análisis semicuantitativo de *Western Blot* realizados para la evaluación de RUNX2 en células A2780 estimuladas durante 0.5, 2, 6 y 24 h con NGF, en concentraciones de **A.** 50 ng/ml, **B.** 100 ng/ml y **C.** 150 ng/ml. Los niveles proteicos son presentados como veces cambio de RUNX2 en las células estimuladas respecto a la condición basal (sin estímulo), considerándose un control sin NGF para cada tiempo de estimulación. En cada gráfico se ha incluido una primera barra referencial que ilustra una condición en la cual el estímulo no induce cambios en RUNX2, la cual permite comparar el efecto del estímulo en los distintos tiempos evaluados. Los resultados de la semicuantificación son expresados como promedio \pm error estándar medio, SEM. Cada gráfico presenta una imagen representativa de los *Western Blot* evaluados. Los ensayos fueron realizados en duplicado con un $n = 3$.

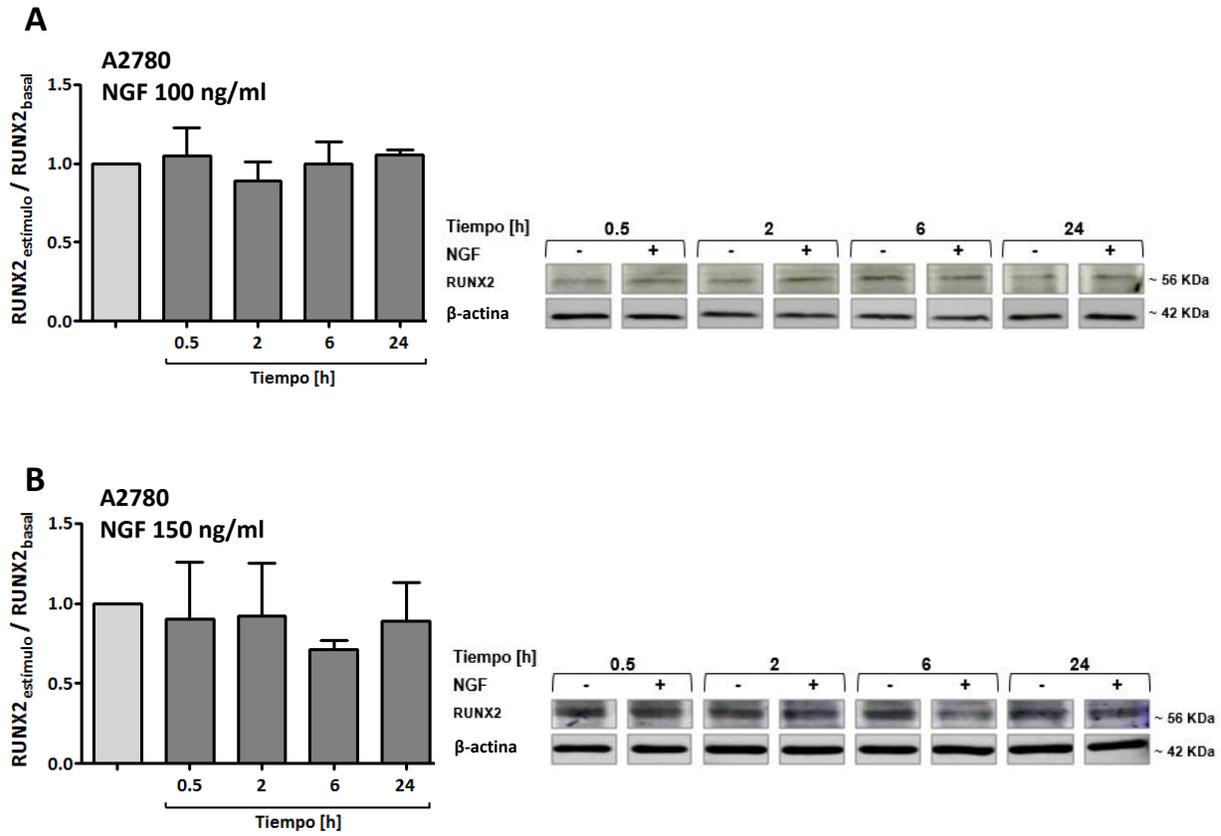


Figura 9. Niveles proteicos de RUNX2 en células A2780 estimuladas con NGF. Análisis semicuantitativo de *Western Blot* realizados para la evaluación de RUNX2 en células A2780 estimuladas durante 0.5, 2, 6 y 24 h con NGF, en concentraciones de **A.** 100 ng/ml y **B.** 150 ng/ml. Los niveles proteicos son presentados como veces cambio de RUNX2 en las células estimuladas respecto a la condición basal (sin estímulo), considerándose un control sin NGF para cada tiempo de estimulación. En cada gráfico se ha incluido una primera barra referencial que ilustra una condición en la cual el estímulo no induce cambios en RUNX2, la cual permite comparar el efecto del estímulo en los distintos tiempos evaluados. Los resultados de la semicuantificación son expresados como promedio \pm error estándar medio, SEM. Cada gráfico presenta una imagen representativa de los *Western Blot* evaluados. Los ensayos fueron realizados en duplicado con un $n = 3$.

VI.4. Objetivo 4. Establecer si la condición de hipoxia produce un incremento en los niveles de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780;

VI. 4. 1. Ensayos en cámara de hipoxia;

En un amplio número de tipos celulares la condición de hipoxia es un importante estímulo para la estabilización de HIF-1 α , factor que promueve la transcripción de *VEGF* y se asocia a la activación de procesos angiogénicos. Por otro lado, se sabe que RUNX2 establece interacciones con HIF-1 α , que sus niveles son aumentados en hipoxia y que en varios

modelos induce la expresión de *VEGF*. Estos antecedentes sugieren que la privación de oxígeno puede aumentar los niveles de RUNX2 en cáncer de ovario epitelial. Con el objetivo de evaluar esta posibilidad, las células HOSE y A2780 fueron cultivadas en hipoxia (2 % de O₂) durante 24 y 48 h, con sus correspondientes controles en normoxia (20 % de O₂). Adicionalmente, se analizaron los niveles proteicos de HIF-1 α para evaluar una posible relación con los niveles de RUNX2 en las condiciones de normoxia e hipoxia.

El análisis semicuantitativo de los *Western Blot* realizados para la evaluación de RUNX2 y HIF-1 α , muestra que las células HOSE sometidas hipoxia durante 24 y 48 h experimentan una reducción significativa en los niveles de RUNX2, con un valor $p < 0.01$ y $p < 0.05$ respectivamente (Figuras 9A y 9C). Sin embargo, en estas condiciones no se observan cambios significativos en los niveles de HIF-1 α (Figuras 10A y 10C), sugiriendo que la reducción de RUNX2 en las células HOSE en hipoxia no estaría relacionada con cambios en los niveles de HIF-1 α . Por otra parte, en las células A2780 no se observan cambios significativos en los niveles de RUNX2 cuando son sometidas a hipoxia durante 24 y 48 hs (9B y 9D). En estas células la privación de oxígeno tampoco afecta los niveles proteicos de HIF-1 α en los tiempos evaluados (Figura 10B y 10D).

VI. 4. 2. Estímulos con CoCl₂;

Los estímulos con CoCl₂ son utilizados en cultivos celulares como una estrategia para simular condición de hipoxia a nivel intracelular. Esto, debido a que tales estímulos se asocian a una estabilización, y consecuente incremento en los niveles de HIF-1 α , marcador clásico de hipoxia. Con la finalidad de establecer si esta condición simulada de hipoxia induce cambios en los niveles de RUNX2, se realizaron estímulos con CoCl₂ en concentraciones de 25, 50 y 100 [μ M] (considerando el correspondiente control de 0 [μ M] de CoCl₂) durante 3, 6 y 12 h, en las líneas celulares HOSE y A2780.

El análisis semicuantitativo de los niveles de RUNX2, evaluados por *Western Blot*, indica que en las células HOSE los estímulos de CoCl₂ sostenidos durante 3 h, con concentraciones de 25, 50 y 100 μ M (Figura 11A), y durante 6 h, en concentraciones de 50 y 100 μ M (Figura 11B), podrían inducir un incremento en los niveles de RUNX2, sin embargo estas variaciones

no son significativas y se observa una importante dispersión en los datos. Del mismo modo, los estímulos efectuados durante 12 h no conducen a variaciones estadísticamente significativas de RUNX2 (Figura 11C). Por otro lado, los resultados muestran que en las células A2780 los estímulos con CoCl_2 no inducen cambios significativos en el contenido de RUNX2 en los tiempos y concentraciones evaluadas (Figura 12A, 12B y 12C). No obstante, se observa que estímulos aplicados durante de 6 h con concentraciones de 50 y 100 μM CoCl_2 (Figura 12B), así como aquellos sostenidos durante 12 h en concentraciones de 100 μM (Figura 12C), podrían conducir a un aumento de RUNX2. Aunque nuevamente hay que considerar la variabilidad de los datos.

En síntesis, considerando los resultados anteriores se puede indicar que, dadas las características de los ensayos efectuados (% de O_2 utilizado, concentraciones de CoCl_2 usadas y tiempos de incubación y estimulación), la condición de hipoxia (y su simulación mediante CoCl_2) es incapaz de producir un incremento significativo en los niveles de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780. Contrariamente, la privación de oxígeno por 24 y 48 h conduce a una reducción significativa en los niveles de RUNX2 en las células HOSE. Adicionalmente, la condición de hipoxia aplicada no produce cambios en los niveles de HIF-1 α en las líneas celulares HOSE y A2780.

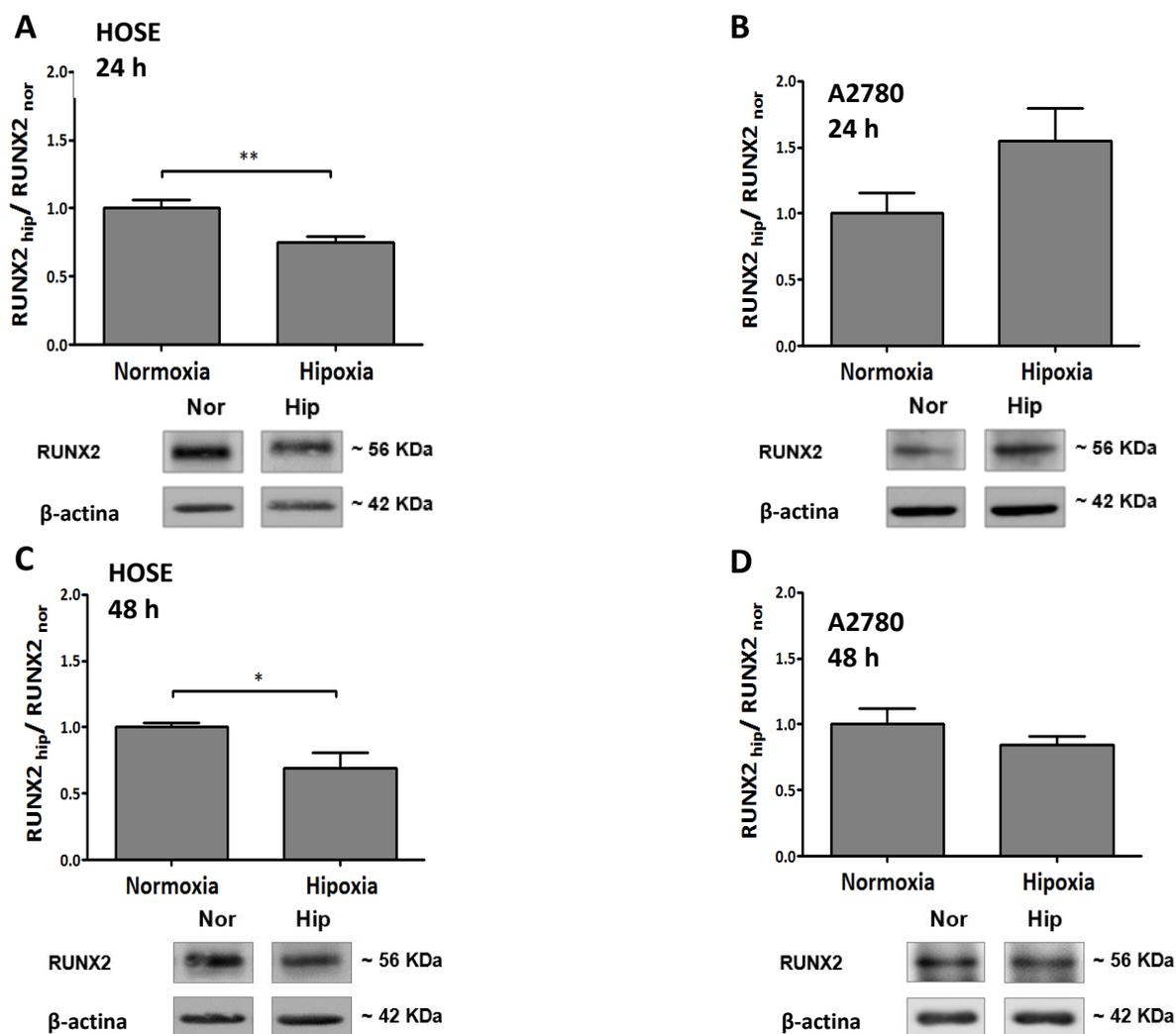


Figura 10. Niveles proteicos de RUNX2 en condiciones de normoxia e hipoxia en líneas celulares de epitelio ovárico. Análisis semicuantitativo de *Western Blot* realizados para la evaluación de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780 en condiciones de normoxia e hipoxia. A. Niveles de RUNX2 en células HOSE y B. A2780 sometidas a condición de normoxia (20% de oxígeno) e hipoxia (2% de oxígeno) durante 24 h. C. Niveles de RUNX2 en células HOSE y D. A2780 sometidas a condición de normoxia (20% de oxígeno) e hipoxia (2% de oxígeno) durante 48 h. Los niveles proteicos son presentados como veces de cambio de RUNX2 en hipoxia respecto a sus niveles en normoxia. Los resultados de la semicuantificación son expresados como promedio \pm error estándar medio, SEM. Para cada línea celular y condición, se presenta una imagen representativa de los *Western Blot* evaluados. n=3 en duplicado.

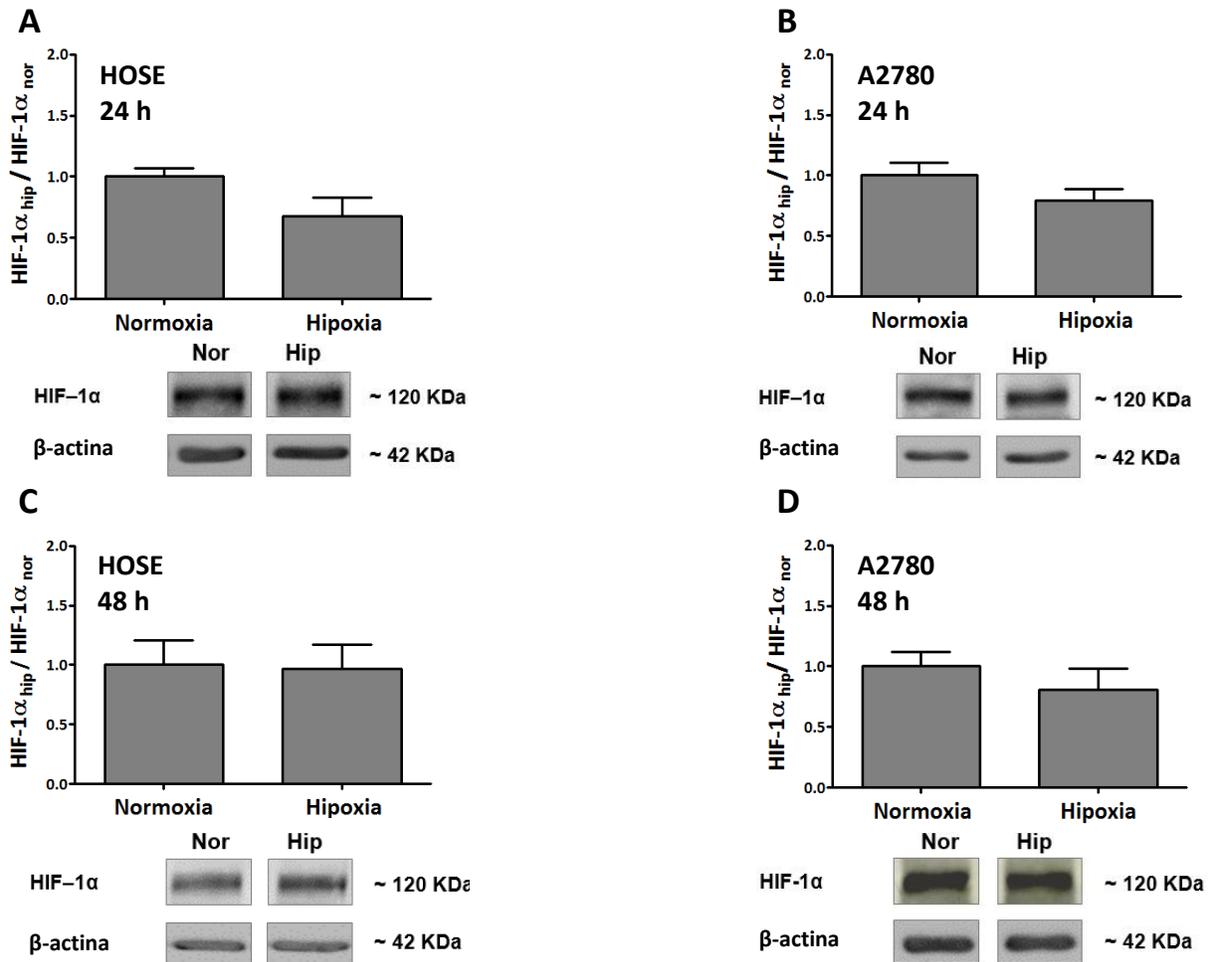


Figura 11. Niveles proteicos de HIF-1 α en condiciones de normoxia e hipoxia en líneas celulares de epitelio ovárico. Análisis semicuantitativo de *Western Blot* realizados para la evaluación de HIF1- α en las líneas celulares HOSE y A2780 en condiciones de normoxia e hipoxia. A. Niveles de HIF1- α en células HOSE y B. A2780 sometidas a condición de normoxia (20% de oxígeno) e hipoxia (2% de oxígeno) durante 24 h. C. Niveles de HIF1- α en células HOSE y D. A2780 sometidas a condición de normoxia (20% de oxígeno) e hipoxia (2% de oxígeno) durante 48 h. Los niveles proteicos son presentados como veces de cambio de HIF-1 α en hipoxia respecto a sus niveles en normoxia. Los resultados de la semicuantificación son expresados como promedio \pm error estándar medio, SEM. Para cada línea celular y condición, se presenta una imagen representativa de los *Western Blot* evaluados. n=3 en duplicado.

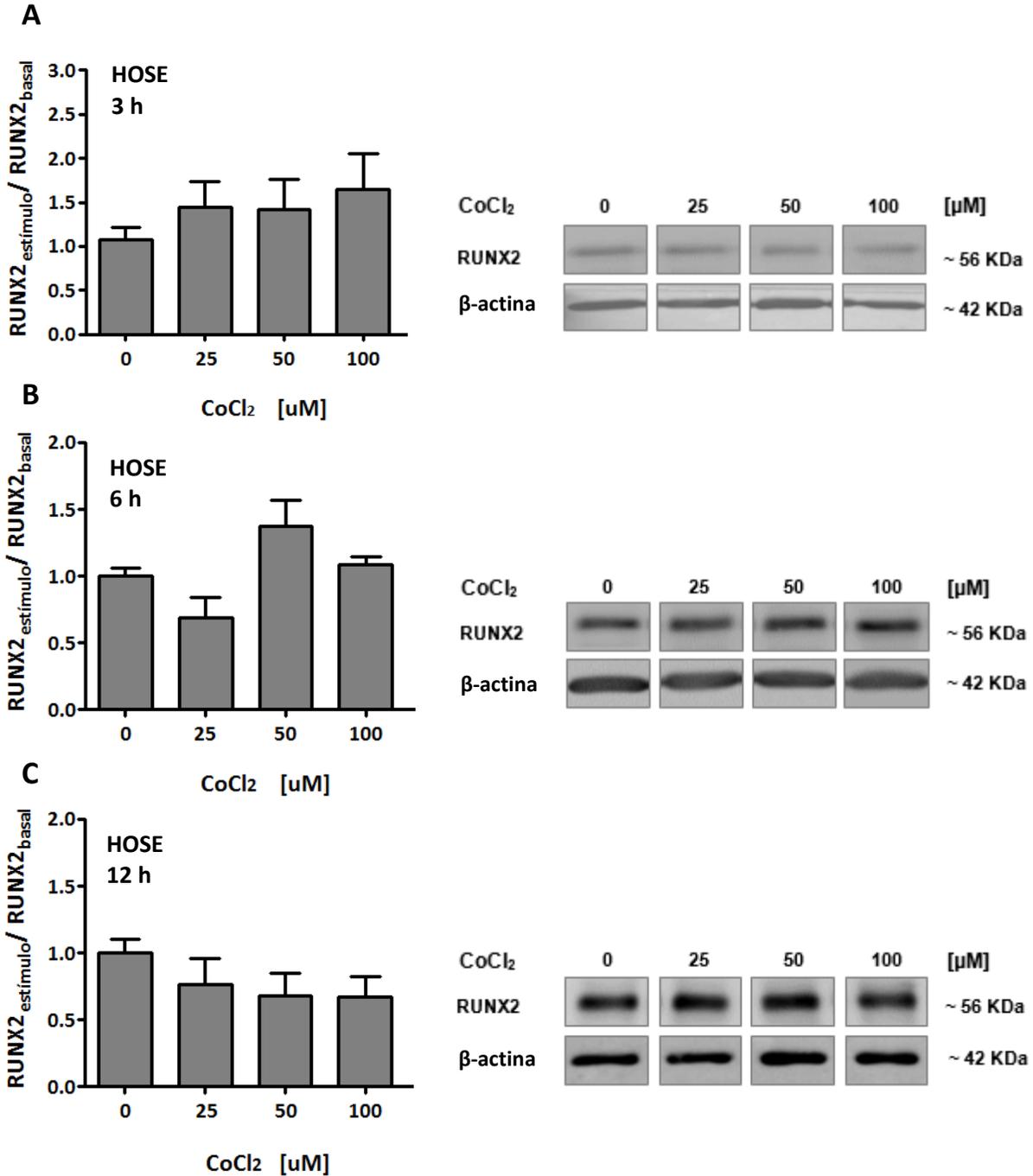


Figura 12. Niveles proteicos de RUNX2 en células HOSE estimuladas con CoCl₂. Análisis semicuantitativo de *Western Blot* realizados para la evaluación de RUNX2 en la línea celular HOSE estimuladas con CoCl₂ a concentraciones de 0, 25, 50 y 100 [μM]. Semicuantificación de RUNX2 en células estimuladas durante **A.** 3h, **B.** 6h y **C.** 12h, con las concentraciones especificadas de CoCl₂. Los niveles proteicos son presentados como veces cambio de RUNX2 en las células estimuladas respecto a la condición control (0 [μM] CoCl₂). Los resultados de la semicuantificación son expresados como promedio ± error estándar medio, SEM. Para cada condición de estímulo se presenta una imagen representativa de los *Western Blot* evaluados. n=3 en duplicado.

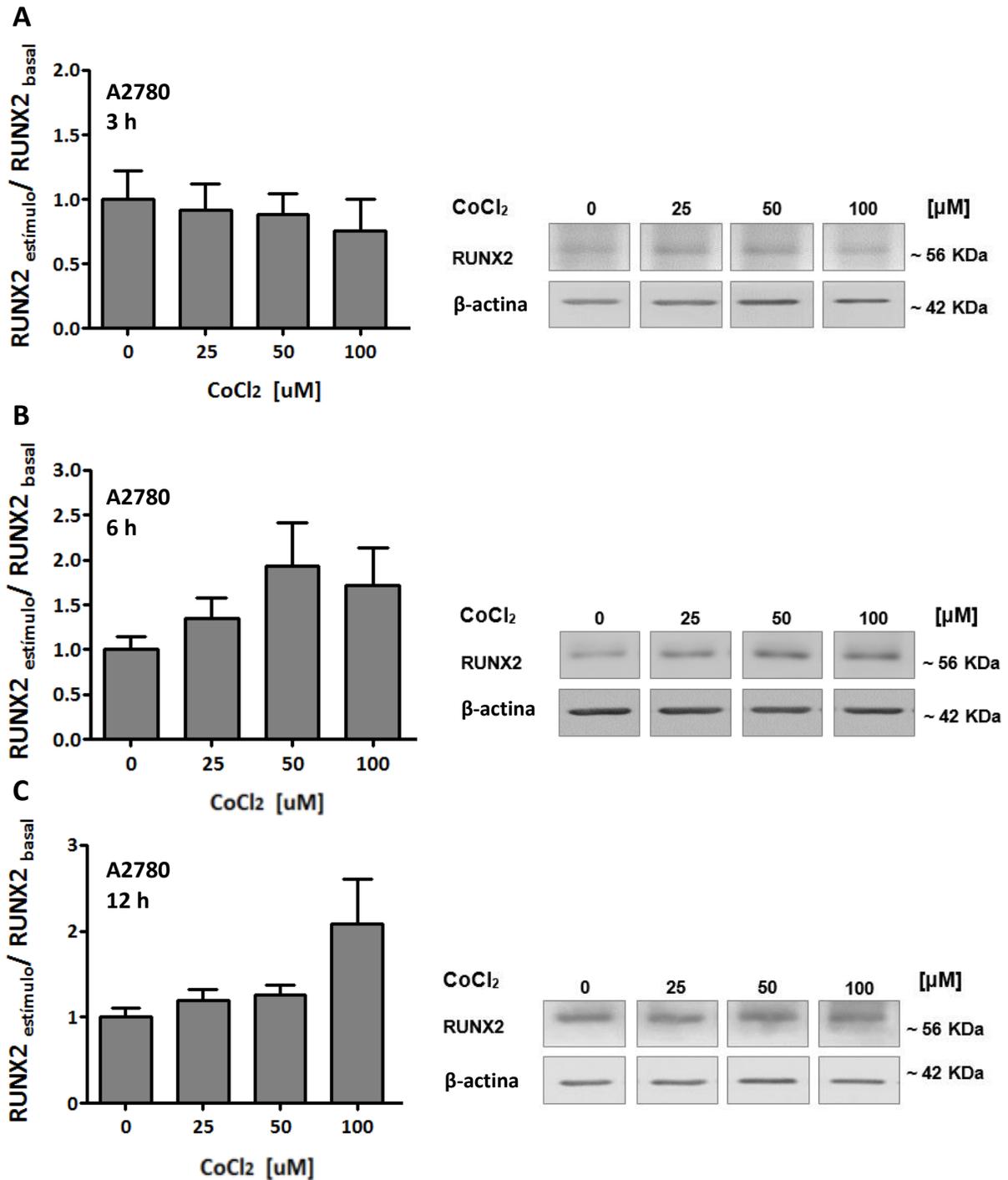


Figura 13. Niveles proteicos de RUNX2 en células A2780 estimuladas con CoCl₂. Análisis semicuantitativo de *Western Blot* realizados para la evaluación de RUNX2 en la línea celular A2780 estimuladas con CoCl₂ a concentraciones de 0, 25, 50 y 100 [μM]. Semicuantificación de RUNX2 en células estimuladas durante **A.** 3h, **B.** 6h, y **C.** 12 h, con las concentraciones especificadas de CoCl₂. Los niveles proteicos son presentados como veces de cambio de RUNX2 en las células estimuladas respecto a la condición control (0 [μM] CoCl₂). Los resultados de la semicuantificación son expresados como promedio ± error estándar medio, SEM. Para cada condición de estímulo se presenta una imagen representativa de los *Western Blot* evaluados. n=3 en duplicado.

VII. DISCUSIÓN

Presencia, distribución y niveles proteicos de RUNX2 en tejidos ováricos

Los ensayos de inmunohistoquímica muestran la presencia de RUNX2 en todos los tejidos ováricos evaluados, esto es, en el epitelio superficial ovárico normal (OVI), tumores Benignos y Borderline (TBE-TBO), y en tejidos de Cáncer Ovárico Epitelial (COE). En todos los casos la localización subcelular de RUNX2 es citoplasmática y nuclear, con predominancia en este último compartimento. El análisis cuantitativo de estos ensayos muestra que, en promedio, el porcentaje de células con presencia nuclear de RUNX2 corresponde a un 53, 67 y 71 %, en los grupos OVI, TBE-TBO y COE respectivamente. Por lo tanto, se establece que existe un incremento significativo en el porcentaje de células positivas para RUNX2 nuclear en los grupos TBE-TBO y COE respecto a los tejidos OVI, sin diferencias estadísticamente significativas entre los tejidos TBE-TBO y COE. Estos hallazgos son consistentes con antecedentes previos, que han mostrado un incremento en los niveles proteicos y en el número de células positivas para RUNX2 en tumores Borderline y en tejidos de COE (tanto en tumores primarios como en tejidos metastásicos), respecto al epitelio superficial ovárico normal. Como el presente trabajo, estos estudios tampoco identifican diferencias en los niveles de RUNX2 entre los grupos TBO y COE. La identificación principalmente nuclear de RUNX2 en tejidos ováricos, es consistente con reportes previos (Li W. *et al.*, 2012; Wang Z.Q. *et al.*, 2013). Esta ubicación sugiere que RUNX2 estaría activamente regulando la expresión génica en dichos tejidos. En el caso de TBE-TBO y COE, RUNX2 promovería la expresión de genes asociados a proliferación, supervivencia, invasión y migración, según lo observado en líneas celulares de cáncer ovárico (Wang Z.Q. *et al.*, 2013; Li W. *et al.*, 2014; Wen C. *et al.*, 2015).

La evaluación de RUNX2 en tejidos ováricos mediante *Western Blot* parece indicar un resultado contradictorio respecto a lo obtenido por inmunohistoquímica, al mostrar una reducción (sin diferencias significativas) en los niveles de RUNX2 en los grupos TBE-TBO y COE comparados con el grupo OVI. Sin embargo, debido a la elevada dispersión de los datos resulta necesario incrementar el número de observaciones para determinar si la tendencia observada se conserva, y en ese caso, establecer posibles explicaciones para las

disparidades con los resultados obtenidos por inmunohistoquímica. Efectivamente, una de las importantes limitaciones de este trabajo fue la reducida cantidad de muestras a las que se tuvo acceso.

En comparación con otros estudios que han evaluado niveles de RUNX2 en cáncer ovárico, el presente trabajo incluye un grupo de tejidos previamente no considerados, correspondientes a tumores Benignos (TBE), mostrándose que ellos presentan niveles aumentados de RUNX2 respecto al epitelio superficial ovárico normal (OVI). En este punto es necesario mencionar que existen 2 hipótesis sobre el desarrollo del cáncer ovárico, las cuales establecen que; (1) La transformación del epitelio normal es paulatina, comenzando con una lesión Benigna que progresa a Borderline, para generar finalmente un tumor maligno, y que (2) La transformación maligna del epitelio normal es directa (Kurman R. & Shih IM., 2011). Por lo tanto, el hallazgo de altos niveles de RUNX2 en los tejidos TBE y TBO, sugiere que en aquellos carcinomas que surgen de transformaciones sucesivas, RUNX2 se incrementaría tempranamente y sería importante en la génesis tumoral.

Sobre los mecanismos que pueden producir el aumento en RUNX2 en COE, sin duda deben ser diversos, no obstante, la regulación post-transcripcional mediada por microRNAs parece ser relevante. Nuestro laboratorio y otro grupo de investigación, han mostrado que los niveles de mir-23b se encuentra significativamente reducidos en tejidos TBE-TBO y COE respecto a los tejidos normales (Cuevas P. 2014; Li W. *et al.*, 2014). *In vitro*, mir-23b es un regulador negativo de RUNX2, que al unirse directamente a su transcrito conduce a la reducción de sus niveles proteicos con la concomitante atenuación de procesos de proliferación, migración e invasión en líneas celulares de cáncer ovárico (Li W. *et al.*, 2014). Por lo tanto, la disminución de este microRNA puede explicar, al menos en parte, el incremento de RUNX2 en los tejidos ováricos transformados. También se ha descrito que miR-338-3p se encuentra disminuido en COE, y que *in vitro* tiene efectos análogos a mir-23b sobre RUNX2 (Wen C. *et al.*, 2015).

La disfunción de p53 también se ha relacionado con desregulación de los niveles de RUNX2. Estudios en la línea celular U2OS y en tejidos de osteosarcoma humano, han mostrado que los niveles proteicos de p53 y RUNX2 se relacionan de forma inversa. Particularmente, *in*

vitro, p53 induce la expresión de miRNA-34c, el cual se une al transcrito de RUNX2 imposibilitando su traducción (Van der Deen M. *et al.*, 2013). Considerando que más de un 50 % de los casos de cáncer ovárico presentan mutaciones que inducen pérdida de función o inactivación de p53 (llegando a casi un 100 % en los tumores ováricos serosos de alto grado), el aumento de RUNX2 en cáncer ovárico podría estar determinado, en parte, por la disfunción de la vía de p53 (Bast R. *et al.*, 2009; Hennessy B. *et al.*, 2009; The Cancer Genome Atlas Research Network, 2011; Domke S. *et al.*, 2013).

Finalmente, considerando que existen diferencias en la incidencia de cáncer ovárico epitelial entre mujeres de distintas etnias y razas (Goodman M.T. *et al.*, 2003; Goodman M.T. *et al.*, 2003b; Moorman P.G. *et al.*, 2009; Centers for disease Control and Prevention, CDC, 2015), es relevante destacar que esta investigación ha identificado altos niveles de RUNX2 en los tejidos TBE-TBO y COE, en muestras de pacientes de origen hispano (particularmente sudamericano), y que los trabajos anteriores fueron realizados en tejidos de mujeres asiáticas (Li W. *et al.*, 2012; Li W. *et al.*, 2014; Wen C. *et al.*, 2015). Estos resultados podrían indicar que el aumento de RUNX2 en COE, es una característica común en diferentes razas y etnias, aunque evidentemente esto requiere un estudio mucho más amplio.

Presencia, distribución y niveles proteicos de RUNX2 en líneas celulares HOSE y A2780

El análisis mediante *Western Blot* de los niveles proteicos basales de RUNX2, muestra que la línea celular HOSE presenta niveles significativamente mayores de RUNX2 respecto a la línea celular A2780. De acuerdo a lo observado en la inmunohistoquímica, estos resultados son contrarios a lo esperado. Sin embargo, un aspecto a considerar es que los cultivos celulares fueron privados de suero 24 h antes de su lisis para la extracción de proteínas. Se ha mostrado que en líneas celulares de carcinoma tiroideo, la privación de suero reduce los niveles de RUNX2, a nivel de transcrito y proteína, entre 9 a 10 veces respecto a sus niveles en presencia de 10 % de FBS (Niu D.F. *et al.*, 2012). Adicionalmente, el mismo trabajo indica que esta reducción es consecuencia de la disminución de p-ERK. Por lo tanto, se puede plantear la posibilidad que los niveles reducidos de RUNX2 en las células A2780, sean el resultado de la falta de ligandos contenidos en el suero, entre ellos factores de crecimiento

que activan la vía MAPK/ERK (Gstraunthaler G. et al., 2003; Zheng X. et al., 2006; Brunner D. et al., 2010). Efectivamente, varios ligandos presentes en el suero pueden aumentar los niveles de RUNX2. En este contexto, estudios realizados en líneas celulares humanas y murinas (preosteoblastos, mioblastos y embrionarias de riñón), han mostrado que FGF2, cuyos efectos son mediados en parte por la vía MAPK/ERK, puede incrementar los niveles de RUNX2 a nivel de transcrito y proteína, en algunos casos, inhibiendo su degradación proteosomal (Zhou Y.X. et al., 2000; Park O.J. et al., 2010; An S. et al., 2015). Igualmente, se ha visto que IGF-1 induce la expresión y aumento de los niveles proteicos de RUNX2, en osteoblastos de ratón y en modelos murinos de osteopenia (Chen J. et al., 2012; Guerra-Menéndez L. et al., 2013). Adicionalmente, otros ligandos presentes en el suero, pero que median sus efectos a través de otras vías, como el Factor de crecimiento transformante β 1 (TGF- β 1) y la Proteína Morfogénica del hueso 2 (BMP2), también pueden modular los niveles de RUNX2 en determinados contextos. Así por ejemplo, en mioblastos murinos TGF- β 1 aumenta los niveles de mRNA y proteína de RUNX2, a través de mecanismos que involucran p38 y SMADs (Lee M. H. et al., 1999; Lee K. S. et al., 2002). Por otro lado, BMP2 aumenta RUNX2 al inhibir su degradación proteosomal en mioblastos, osteoblastos murinos y en fibroblastos humanos (Lee M. H. et al., 1999; Jeon E. J. et al., 2006). Concordante con esto, BMPR2, receptor de BMPs, regula positivamente el nivel de RUNX2, transcrito y proteína, en líneas celulares de condrosarcoma humano, lo que al mismo tiempo se relaciona con un incremento en el tamaño tumoral *in vivo* (Yang K. et al., 2016). Es muy relevante mencionar, que todos los ligandos mencionados fueron vinculados con procesos oncogénicos en cáncer ovárico (Auersperg, N. et al., 2001). Entonces, esto puede sugerir que dichos factores y citoquinas pueden inducir fenómenos oncogénicos en cáncer ovárico epitelial, en parte, al modular los niveles o actividad de RUNX2.

Además de lo mencionado respecto a las células A2780, es posible que en las células HOSE los niveles proteicos de RUNX2 también se vean influenciados por la falta de suero. Estudios realizados en las líneas celulares no neoplásicas, MC3T3 (pre-osteoblastos de ratón), C2C12 (mioblastos con potencial osteoblástico), HOB (osteoblastos humanos) y en cultivos primarios de osteoblastos murinos, indican que la privación de suero durante 48 h induce

arresto del ciclo celular en G1 y un aumento significativo de los niveles de transcrito y proteína de RUNX2. Consistentemente, estos estudios muestran que los niveles proteicos de RUNX2 fluctúan durante el ciclo celular, alcanzando niveles máximos en G1 y decreciendo a partir de la interfase G1/S. Es decir, en estas células RUNX2 sería importante en la regulación del ciclo celular, frenándolo. Efectivamente, la sobreexpresión de RUNX2 en algunas líneas celulares de osteosarcoma humano induce la detención del ciclo celular (Pratap J. *et al.*, 2003; Galindo M. *et al.*, 2005; Lucero C. *et al.*, 2013). Por lo tanto, existe la posibilidad que en las células HOSE los niveles de RUNX2 aumenten en ausencia de suero, mediando un efecto antiproliferativo, a diferencia de lo que podría ocurrir en las células A2780, en las cuales RUNX2 podría decrecer con la falta suero, y donde promueve proliferación (Wang Z.Q. *et al.*, 2013). Sin embargo, esta presunción respecto a los niveles de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780 debe ser investigada, ya que los efectos de RUNX2 son variables, estimulando diferenciación, proliferación o controlando las fases del ciclo celular según tipo y contexto celular.

Los antecedentes planteados sugieren que los resultados obtenidos mediante *Western Blot*, que muestran mayores niveles proteicos de RUNX2 en las células HOSE respecto a las células A2780, y que no coinciden con lo identificado en tejidos, puede ser consecuencia de las condiciones en las cuales se realizó la determinación, esto es, en ausencia de suero. Por consiguiente, los hallazgos *in vitro* no son necesariamente inconsistentes con los resultados *ex vivo*, y en cambio, podrían sustentar la idea que RUNX2 tiene efectos oncogénicos en las células neoplásicas, y contrariamente, efectos antiproliferativos en las células no neoplásicas. Es interesante recordar que, *in vivo*, las células están en un microambiente determinado por ligandos de origen autocrino, paracrino y provenientes de la circulación sistémica, además de estar estableciendo interacciones célula-célula, célula-matriz, etc. En relación con esto, los ensayos de inmunohistoquímica permiten observar la expresión de una proteína en el contexto fisiológico de un tejido, lo cual no es posible en los estudios *in vitro*. Así, si se quiere evaluar el contenido de una molécula en líneas celulares con el fin de establecer si esto se aproxima al comportamiento *in vivo*, lo más certero sería intentar homologar en parte el contexto celular, lo cual evidentemente es imposible, sin embargo,

en mi opinión, sería una mejor *aproximación* evaluar la proteína de interés en un medio no privado, donde las células no están sincronizadas, pues esto no necesariamente ocurre *in vivo*. Por otra parte, si se quiere analizar el efecto de un estímulo dado, es necesario, indiscutiblemente, excluir factores adicionales que puedan afectar la visualización de los efectos particulares de dicho estímulo.

Concordante con la evaluación mediante *Western Blot*, el análisis mediante inmunocitoquímica muestra que tanto las células HOSE como A2780 presentan RUNX2, tanto a nivel citoplasmático como nuclear, con un claro predominio en este último compartimiento. A pesar de no ser un análisis cuantitativo, las imágenes sugieren que las células A2780 presentan mayores niveles de RUNX2 respecto a las células HOSE, siendo esto consistente con los resultados obtenidos en los tejidos. Sin embargo, al comparar estos resultados con los obtenidos mediante *Western Blot*, nuevamente parecen ser contradictorios, no obstante, el ensayo de inmunohistoquímica se realizó en presencia de suero. Tomando este antecedente en consideración, más que discordantes, en conjunto estos resultados pueden respaldar el planteamiento de que la ausencia de suero influencia los niveles de RUNX2. Según lo discutido anteriormente, en términos generales, parece ser que un cultivo celular en presencia de suero, sería más parecido a un tejido respecto a un cultivo privado. Desde este punto de vista, es aceptable que los resultados obtenidos mediante inmunocitoquímica sean concordantes con los resultados obtenidos en la inmunohistoquímica. Por el contrario, los resultados obtenidos mediante *Western Blot*, aparentemente incompatibles con los otros, serían más bien la consecuencia de una condición determinada, la ausencia de suero, que no necesariamente ocurre *in vivo*. Pero evidentemente estos supuestos deben ser analizados experimentalmente.

La evaluación de los niveles proteicos de RUNX2 en fracciones subcelulares de células HOSE y A2780, indica que RUNX2 tiene una localización fundamentalmente nuclear, consistente con los ensayos de inmunocitoquímica y lo observado en tejidos. Esto sugiere que, en ambas líneas celulares RUNX2 estaría activamente modulando la transcripción de ciertos genes, en el caso de las células A2780, genes potencialmente oncogénicos, dentro de los cuales se han descrito MMP-2 y MMP-9 (Wen C. *et al.*, 2015). La función de RUNX2 en las

células HOSE es aún incierta, y es necesario realizar mayores estudios para plantear una propuesta consistente. Sin embargo, he planteado la posibilidad que promueva acciones antiproliferativas. El análisis de los niveles de RUNX2 en la fracción de cromatina respecto al contenido total, así como el contenido en la fracción de nucleoplasma respecto al total, no muestra diferencias significativas entre las líneas celulares HOSE y A2780, debido a la dispersión de los resultados que es atribuible a la variabilidad intrínseca de la metodología. No obstante, es contundente el resultado que la localización de RUNX2 es fundamentalmente nuclear en ambas líneas celulares.

Efecto de NGF en los niveles proteicos de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780

Considerando que las células A2780, modelo *in vitro* de cáncer ovárico epitelial, expresan el receptor TRKA y responden NGF con la expresión y secreción de VEGF, existe la posibilidad de que NGF promueva este proceso al aumentar los niveles de RUNX2. Por esta razón, las células HOSE y A270 fueron estimuladas con NGF, esperando que las células A2780 incrementaran sus niveles de RUNX2 de forma significativa, y sobre la respuesta de la línea HOSE. No obstante, los niveles de RUNX2 no se vieron influenciados de forma significativa tras la exposición a NGF, en ninguno de los tiempos, concentraciones y líneas celulares evaluadas. Esto puede indicar que, RUNX2 no forma parte de la señalización inducida por NGF que conduce a la expresión de *VEGF* en las células A2780. Sin embargo, se debe considerar que la capacidad de RUNX2 de modular la expresión génica, no sólo está determinada por sus niveles, sino que requiere modificaciones post-transduccionales e interacción con otras proteínas, que aumentan o disminuyen la capacidad de unirse al DNA y transactivar genes (Franceschi R.T. & Xiao G., 2003; Schoeder T. M. *et al.*, 2009; Jonason J.H. *et al.*, 2009). La función de RUNX2 es modulada por múltiples vías transduccionales, entre ellas, las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK, que como se ha dicho son rutas activadas por NGF. Estas vías generalmente tienen un efecto activador sobre RUNX2, al influenciar sus niveles y/o actividad. (Franceschi R.T. & Xiao G., 2003; Schoeder T. M. *et al.*, 2009; Jonason J.H. *et al.*, 2009). Así, existen casos en los cuales el incremento en la capacidad transcripcional de RUNX2, no se asocia con cambio en sus niveles. En el caso de la línea celular HBME-1 (células endoteliales de la médula ósea humana), IGF-1 incrementa la

capacidad de RUNX2 de unirse al DNA en sus secuencias blanco, en parte, al inducir la movilización de RUNX2 desde el citoplasma al núcleo (Quiao M. *et al.*, 2004). Por otro lado, ensayos *in vitro* realizados en la línea celular de cáncer mamario, SUM159, muestran que la fosforilación de RUNX2 por AKT, aumenta su capacidad de unirse al DNA en secuencias de reconocimiento, e inducir la transcripción de sus genes blanco, en este caso *MMP9*, *MMP13* y *VEGF* (Pande S. *et al.*, 2013). Adicionalmente, *in vitro* se ha visto que en células prostáticas, AKT incrementa la actividad transcripcional de RUNX2 a través de un proceso indirecto, al fosforilar FOXO1 evitando su migración al núcleo, donde este reprime a RUNX2 (Cohen-Solal K. *et al.*, 2015). Estos, son solo ejemplos para mostrar que la actividad transcripcional de RUNX2 puede ser aumentada por las vías PI3K/AKT y MAPK/ERK, y que su función puede ser modulada sin necesidad de cambios en sus niveles proteicos. En consecuencia, los resultados presentados permiten establecer que, en las concentraciones y tiempos en los cuales se realizaron los estímulos, NGF no modula el nivel proteico de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780, pero no se puede aseverar que NGF no tenga un efecto sobre la función transcripcional de RUNX2. Para ello, se deben realizar otro tipo de estudios.

Efecto de Hipoxia y CoCl₂ en los niveles proteicos de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780

En las células A2780, los resultados muestran claramente que la proteína HIF-1 α se encuentra tanto en normoxia como hipoxia, pero que sus niveles no se incrementan con la privación de O₂ en ninguno de los tiempos evaluados. Estos resultados primeramente sorprenden, pues está extensamente descrito que los niveles de HIF-1 α permanecen bajos durante normoxia, y que éstos se incrementan drásticamente durante la hipoxia (Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J., 2003). Ahora bien, es necesario considerar que las células neoplásicas tienen mecanismos intracelulares alterados y atípicos. En células normales, la estabilización de HIF-1 α durante hipoxia, es consecuencia de la inactivación de enzimas dependientes de O₂, que hidroxilan HIF permitiendo su interacción con pVHL, que es parte de un complejo con actividad E3 ubiquitín ligasa. La asociación de HIF-1 α con pVHL permite su ubiquitinación y degradación proteosomal (Pugh, C. W., & Ratcliffe, P. J., 2003). Al mismo tiempo, existen otros mecanismos normales que aumentan los niveles proteicos de HIF en

normoxia, como el estímulo con factores de crecimiento u otros ligandos que activan las vías PKC y PI3K, las cuales incrementan su transcripción y traducción (Ziello J. *et al.*, 2007). No obstante, además de los mecanismos descritos, en los carcinomas es un evento común que HIF-1 α se encuentre sobreexpresado, como efectivamente ocurre en cáncer ovárico (Bertout J. A. *et al.*, 2008). Estos incrementos anormales ocurren como consecuencia de la activación de oncogenes, como Ras y PI3K, o por disfunción o pérdida de supresores tumorales como la proteína Von Hippel Lindau (pVHL) y la fosfatasa del fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PTEN) (Denko N. C., 2008). La línea celular A2780 presenta mutaciones en varios componentes de las vías mencionadas, de manera que resulta posible que en esta línea celular HIF-1 α se encuentre constitutivamente en niveles altos. Consecuentemente, las células cancerosas necesitan privaciones de O₂ más severas para generar incrementos de HIF-1 α sobre niveles ya aumentados respecto a una célula normal, esto puede explicar por qué no se evidenció un aumento de HIF-1 α en las células A2780 en hipoxia. En este contexto, hay estudios *in vivo* que indican que los tumores presentan una condición hipóxica persistente, en el cual las células pueden vivir. Los datos señalan que el porcentaje de O₂ que reciben las células neoplásicas en tumores sólidos, prácticamente siempre es menor al 2 %. En tumores de la cavidad abdominal siempre es bajo el 1 %, y hay situaciones extremas, como los carcinomas de páncreas y próstata, cuyas células reciben entre 0.3 y 0.6 % de O₂. *In vitro*, cultivos celulares de la línea LNCaP (de cáncer prostático humano), son viables por 48 hs en 0.1 % de O₂. *In vivo*, xenógrafos de esta línea celular pueden mantenerse cerca de 10 días con 0.1 % de O₂. Concretamente, se ha mostrado que en células neoplásicas la respuesta óptima de HIF-1 α , en promedio, ocurre con un 0.5 % de O₂ (Bertout J. A. *et al.*, 2008; Mckeown S.R., 2013). Ahora bien, esta resistencia a la reducción de O₂ se explica en parte por el cambio en el metabolismo energético de las células neoplásicas, basado principalmente en el proceso anaeróbico de la glicólisis a diferencia de las células normales que obtienen ATP esencialmente de la respiración mitocondrial dependiente de O₂. Por esto, las células normales activan mecanismos de respuesta a hipoxia con privaciones más sutiles de O₂ respecto a las células cancerosas (Bertout J. A. *et al.*, 2008; Denko N. C., 2008; Mckeown S.R., 2013). En la presente investigación, la condición

de hipoxia a la cual fueron sometidos los cultivos fue de 2 % de O₂, una privación muy discreta para células neoplásicas. De manera que esto puede explicar por qué los niveles de HIF-1 α no se incrementaron en las células A2780 durante hipoxia, y sugeriría que no hay una activación total de los mecanismos que induce la falta de O₂. Por otro lado, la evaluación de los niveles proteicos de RUNX2 en las células A2780, muestra que esta proteína es detectable en normoxia e hipoxia, sin embargo, sus niveles no cambian significativamente entre las 2 condiciones. Nuevamente, los resultados no son los esperados considerando trabajos previos en modelos de cáncer, que indicaban un aumento de RUNX2 en hipoxia. Ahora bien, un análisis más exhaustivo de dichos trabajos, indica que es la severidad de la condición de hipoxia aplicada lo que determina el aumento de RUNX2. Uno de dichos estudios, basado en un modelo *in vivo* con xenógrafos establecidos a partir de la línea celular LNCaP, muestra que el incremento de RUNX2, tanto a nivel de transcrito como proteína, se produce cuando el tumor alcanza una condición de hipoxia severa con un nivel de O₂ de 0.2 %. El mismo estudio muestra que *in vitro*, el alza del transcrito de RUNX2 se produce cuando las células son sometidas a una condición aguda de hipoxia, de 0.1 % de O₂, durante 1 o 24 h (Browne G. *et al.*, 2012; Ming J. *et al.*, 2013). Otro artículo describe que *in vitro*, en células LNCaP, el alza de RUNX2 se produce en condiciones sostenidas con 0.1 % de O₂ (Butterworth K. T. *et al.*, 2008).

Como un punto aparte, un hallazgo interesante de estos estudios muestra que *in vivo*, el aumento de RUNX2 por hipoxia se suscita varios días antes del incremento en la expresión de VEGF e IL-8, y de la aparición de nuevos vasos (Browne G. *et al.*, 2012; Ming J. *et al.*, 2013). Entonces, estos trabajos sostienen la idea central del presente estudio, de que RUNX2 puede ser un mediador de angiogénesis en cáncer ovárico epitelial, y además muestran que el aumento de RUNX2 en respuesta a hipoxia se produce con reducciones severas en la concentración de O₂, lo que puede tomar días *in vivo*. Considerando lo anterior, parece tener sentido que RUNX2 no aumente en las células A2780 en un 2% de O₂, porque las respuestas angiogénicas se desencadenarían con restricciones de O₂ más drásticas, y es ahí donde RUNX2 podría modular la expresión de VEGF.

Finalmente, el no haber detectado cambios en los niveles de RUNX2, puede ser significativo; (1) Los incrementos de RUNX2 requieren de privaciones más severas de O₂ en las células A2780, pues en este estudio se utilizó un ambiente con 20 veces más O₂ que lo descrito. Esto posibilitaría que al cambiar las condiciones del ensayo, si se obtengan alzas de RUNX2, o, (2) Los resultados pueden indicar que en la línea celular A2780, el nivel de O₂ no modula los niveles proteicos de RUNX2 de ninguna manera.

El CoCl₂ induce una condición *mimética* a hipoxia al intervenir la vía de HIF-1 α . El modelo más conocido para explicar el mecanismo de acción del Co⁺², es que este se uniría e inhibiría las prolin-hidroxilasas que median la degradación proteosomal de HIF-1 α , con el consecuente aumento de éste (Al Okail M.S., 2010). Previamente, se ha reportado que en células MDPC-23, tipo odontoblasticas murinas, el tratamiento con DMOG (Dimetil-oxaliglicina), que *mimetiza* hipoxia al inhibir las prolin-hidroxilasas, conduce a un ascenso en los niveles proteicos y actividad transcripcional de RUNX2 (Rahman, S. U. *et al.*, 2014). Este último estudio y los presentados anteriormente, que muestran un alza de RUNX2 en hipoxia propiamente tal, parecen indicar que este aumento sería consecuencia de la estabilización de HIF tras la inhibición de las prolin-hidroxilasas, es decir, RUNX2 se ubicaría *abajo* de dichas enzimas y HIF. Uno de los mecanismos a través de los cuales HIF-1 α podría aumentar los niveles de RUNX2 sería a nivel transcripcional, ya que se ha descrito que su promotor tiene sitios de unión para HIF-2 α , y que *in vitro*, efectivamente este puede unirse a sus elementos de respuesta e inducir la transcripción de *RUNX2* (Tamiya H. *et al.*, 2008). Considerando los estudios mencionados, se decidió evaluar los niveles proteicos de RUNX2 en las líneas celulares HOSE y A2780, esperando que esta última respondiera con un incremento significativo de RUNX2. Por el contrario, los resultados muestran que los estímulos con CoCl₂, en distintos tiempos y concentraciones, no cambian de forma significativa los niveles de RUNX2 en las células A2780. Un aspecto importante a considerar, es que en estos ensayos sólo se evaluó RUNX2 y no HIF-1 α , de manera que no se puede asegurar que la condición *mimética* de hipoxia se haya logrado. Entonces, considerando el modelo que establece que RUNX2 está *abajo* de las hidroxilasas y de HIF, se puede decir

que; (1) Si los estímulos no condujeron a un aumento del HIF-1 α , esto indicaría que las concentraciones y/o tiempos de estímulo fueron insuficientes para aumentarlo, y consecuentemente no se observarían cambios en los niveles proteicos de RUNX2, de manera que esto posibilitaría que, al modificar las condiciones del experimento podrían generarse cambios en los niveles de HIF-1 α y consecuentemente de RUNX2, (2) Si los estímulos produjeran un incremento de HIF-1 α , esto significaría que los niveles proteicos de RUNX2 no estarían modulados por la vía de las hidroxilasas y HIF.

En síntesis, en las células A2780 los ensayos de hipoxia y estímulos con CoCl₂ no permiten establecer una conclusión respecto a si estas condiciones regulan o no los niveles proteicos de RUNX2, para ello se requerirían varios ensayos adicionales. Como se ha mencionado, aún existe la posibilidad de que condiciones más severas de hipoxia puedan aumentar los niveles de RUNX2 en las células A2780, como se ha descrito en otras líneas neoplásicas. Si se realizaran otros ensayos y se determinara un incremento de RUNX2 con la privación de O₂, sería necesario realizar estímulos con CoCl₂ para establecer si los cambios son mediados por la inactivación de las prolin-hidroxilasas y la estabilización de HIF-1 α . Más aún, si se identificaran aumentos en los niveles de RUNX2 en hipoxia, sin modificación en los niveles de HIF-1 α , y sin respuesta a CoCl₂, entonces debería considerarse la posibilidad de que la falta de oxígeno regule los niveles de RUNX2 por vías alternativas a la de HIF-1 α . Y finalmente, también es posible que en las células A2780 la hipoxia no regule de ninguna manera los niveles de RUNX2.

En el caso de las células HOSE, también se observa la presencia HIF-1 α en normoxia e hipoxia. No se observaron cambios significativos en los niveles proteicos de HIF entre las condiciones evaluadas, en ninguno de los tiempos considerados. En este caso, puede sorprender la presencia de HIF-1 α en células HOSE durante la normoxia, ya que éstas presentan un genotipo no neoplásico. Sin embargo, como ya se mencionó, HIF-1 α puede ser estabilizado por factores de crecimiento, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Ziello J. E. *et al.*, 2007; Denko N. C., 2008). Así por ejemplo, en normoxia se ha descrito la expresión de HIF-1 α en tejidos normales, como cerebro, riñón, hígado, corazón y músculo esquelético (Stroka D. M. *et al.*, 2001). Esto podría sugerir que existe una

expresión basal de HIF-1 α en el epitelio superficial ovárico, y explicaría su detección en nuestro modelo *in vitro*, la línea celular HOSE. Por otra parte, no se observó un aumento de HIF-1 α durante la hipoxia, contrario a lo esperado. Nuevamente, es necesario considerar que aquello denominado “hipoxia” y “normoxia” *in vitro*, no necesariamente representa lo que ocurre en los tejidos. Así, los antecedentes disponibles indican que en condiciones fisiológicamente normales, las células se desarrollan en ambientes con concentraciones de O₂ menores al 7 %. Más aún, se ha establecido que un 2 % de oxígeno es, en promedio, el valor en el cual comienzan a desencadenarse las respuestas más categóricas a la hipoxia (Denko N. C., 2008; Mckeown S. R., 2014). Como se ha mencionado, nuestra condición de hipoxia fue un 2% de O₂, siendo entonces un valor que puede bordear la normalidad. Aunque estos valores son relativos y determinados para cada tipo y contexto celular, es posible que en las células HOSE, HIF-1 α no pueda estabilizarse con un 2 % de O₂, y por tanto, no evidenciarse cambios entre los estados de normoxia e hipoxia.

En el caso de RUNX2 en las células HOSE, los resultados muestran que sus niveles proteicos decrecen significativamente en hipoxia, tanto en 24 como 48 h de cultivo. Más aún, existe una relación inversa entre los niveles de RUNX2 y el tiempo de permanencia del cultivo en hipoxia. Consistente con esto, varios estudios *in vitro* realizados con células no neoplásicas, como C3H10T1/2 (fibroblastos multipotenciales de ratón), cultivos primarios de MSC (células mesenquimales humanas), cultivos primarios de osteoblastos humanos y murinos, y células MC3T3-E1 (preosteoblastos de ratón), también muestran una reducción de los niveles de RUNX2 en hipoxia, y lo más interesante es que este decrecimiento es detectado en ambientes con concentraciones de O₂ de entre 1 a 10 % (Park J. H. *et al.*, 2002; Ontiveros C. *et al.*, 2004; Salim A. *et al.*, 2004; Heinzman J. M. *et al.*, 2008; Kawato Y. *et al.*, 2011; Yang D. C. *et al.*, 2011). Estos antecedentes son muy relevantes, porque de alguna manera refuerzan los argumentos que se han planteado previamente. Primero, muestra que en células no neoplásicas existen respuestas a hipoxia que se gatillan con niveles de O₂ muy por sobre lo que se observa en células cancerosas. Segundo, que en términos generales, las células normales responden a bajas discretas de O₂ reduciendo sus niveles de RUNX2, a diferencia de las células transformadas, que incrementan sus niveles en hipoxia severa,

indicando claramente que RUNX2 ejecuta funciones muy distintas en ambos tipos celulares. En el caso de las células transformadas, el incremento de RUNX2 tras la hipoxia se relaciona con la generación de células resistentes a esta condición. En el caso de las células LNCaP, el incremento de RUNX2 tras exposición a hipoxia conduce directamente al incremento de Bcl-2, adquiriendo las células mayor capacidad de sobrevivida (Browne G. *et al.*, 2012). Por su parte, la disminución de RUNX2 en condiciones leves de hipoxia, en células normales como C3H10T1/2, MSC y MC3T3-E1, entre otras, se relaciona con la detención de los procesos de diferenciación osteoblástica, probablemente como un mecanismo de protección a una condición adversa que es la falta de oxígeno. En el caso de las células HOSE, no existe ningún reporte que pueda indicar que función desarrolla RUNX2 en ellas, y por lo tanto, es muy difícil explicar porque se produce su descenso durante la hipoxia.

Recapitulando entonces, se ha planteado que las células HOSE en presencia de 2% de oxígeno por periodos de 24 y 48 h, no activan las máximas respuestas a la privación de oxígeno, razón por la cual no se observa un incremento en los niveles de HIF-1 α . Paralelamente, los niveles de RUNX2 disminuyen significativamente en esta condición, lo que sugiere que, en las condiciones del estudio, se están ejecutando procesos celulares en respuesta a una falta de oxígeno que son independientes de HIF-1 α . Esto sugiere además, que la regulación de los niveles proteicos de RUNX2 podría estar totalmente desacoplada de la vía de HIF-1 α , dependencia que sí se ha descrito en otros casos, pero que estaría influenciada por otras vías activadas en hipoxia. Efectivamente existen vías que se activan con la privación de oxígeno y que son independientes de la vía HIF (o por lo menos independientes en algún grado), ellas son la supresión del Complejo 1 diana de Rapamicina en mamíferos (mTORC1) y la activación de la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) ante el estrés de retículo (Simon M. C., *et al* 2008). La inactivación de mTORC1 y la respuesta UPR conducen a una serie de efectos con el objetivo de mantener la homeostasis celular. Entre estos efectos es importante destacar la drástica reducción de la transcripción y traducción, procesos que sólo se sostienen para aquellos genes que resultan esenciales para la sobrevivida celular. De manera que, si RUNX2 ejecuta funciones prescindibles en las células HOSE, entonces su transcripción y traducción descenderán progresivamente llevando la

baja de sus niveles proteicos, lo que podría explicar los resultados obtenidos. Es posible que las células HOSE activen antes que las células A2780 estos mecanismos independientes de HIF, como consecuencia del enlentecimiento del metabolismo asociado a la falta de oxígeno, lo que conduce a una acumulación de AMP con la consecuente activación de AMPK, que inhibe a mTORC1 (Denko N. C., 2008; Simon M. C., *et al* 2008). Esto tardaría más en producirse en las células A2780, debido a que ellas constantemente desarrollan un metabolismo anaeróbico, y controlarían de mejor manera los niveles de Adenosín monofosfato (AMP). Ahora bien, no es posible descartar que al someter las células HOSE a una reducción de O₂ más intensa, es decir una hipoxia declaradamente patológica, HIF-1 α no participe en la regulación de los niveles de RUNX2. Es evidente que esta investigación presenta un número muy reducido de ensayos, los cuales no proporcionan la información suficiente para darle validar estas ideas.

Como en el caso de las células A2780, las células HOSE no experimentan cambios en los niveles proteicos de RUNX2 con los estímulos de CoCl₂, en ninguno de los tiempos y concentraciones evaluadas. Considerando los ensayos de hipoxia, donde se observó una disminución de RUNX2 sin cambios en los niveles de HIF-1 α , los resultados aquí obtenidos, donde el Co⁺² no cambia los niveles de RUNX2, parecen indicar que la vía de las proli-hidroxilasas y HIF-1 α no son las responsables de las bajas de RUNX2 producidas por el descenso en la disponibilidad de O₂, por lo menos cuando la hipoxia es leve. Sin embargo, tampoco se puede excluir la posibilidad que al aplicar estímulos más intensos de CoCl₂ no se produzca un decrecimiento mayor en los niveles de RUNX2, lo que indicaría que en una condición más dramática de hipoxia la vía de HIF-1 α podría contribuir en la regulación de RUNX2.

En síntesis, en el caso de las células HOSE los resultados parecen ser más claros, e indicar que una baja leve en los niveles de O₂ activa mecanismos de respuesta que son independientes de HIF-1 α , posiblemente inactivación de mTORC1 y respuesta UPR, que podrían conducir a la reducción en los niveles proteicos de RUNX2. Además, no puede descartarse la posibilidad que en una situación de hipoxia severa HIF-1 α pueda participar en la regulación de los niveles de RUNX2.

VIII. CONCLUSIÓN

El presente trabajo permite concluir que los tejidos transformados de epitelio ovárico poseen un alto porcentaje de células con RUNX2 nuclear. Concordante con esto, la línea celular A270, de cáncer ovárico epitelial presenta elevados niveles de RUNX2 en el núcleo. Estos hallazgos permiten establecer que RUNX2 tendría un rol en los procesos oncogénicos implicados ya sea en la génesis, mantención, progresión y/o metástasis del COE, pero es necesario realizar más estudios para determinar sus funciones específicas.

Por otra parte, los ensayos *in vitro* indican que, en las condiciones evaluadas, los niveles proteicos de RUNX2 no son influenciados por las condiciones proangiogénicas de hipoxia y estímulo de NGF. No obstante, se requiere realizar ensayos adicionales para determinar si NGF e hipoxia pueden modificar la actividad transcripcional de RUNX2.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Abir, R.**, Fisch, B., Jin, S., Barnnet, M., Ben-Haroush, A., Felz, C., & Ao, A. (2005). Presence of NGF and its receptors in ovaries from human fetuses and adults. *Molecular human reproduction*, *11* (4), 229-236.
- Akech, J.**, Wixted, J. J., Bedard, K., Van der Deen, M., Hussain, S., Guise, T. A. & Pratap, J. (2010). Runx2 association with progression of prostate cancer in patients: mechanisms mediating bone osteolysis and osteoblastic metastatic lesions. *Oncogene*, *29* (6), 811-821.
- Al Okail, M. S.** (2010). Cobalt chloride, a chemical inducer of hypoxia-inducible factor-1 α in U251 human glioblastoma cell line. *Journal of Saudi Chemical Society*, *14* (2), 197-201.
- Alliston, T.**, Choy, L., Ducey, P., Karsenty, G., & Derynck, R. (2001). TGF- β -induced repression of CBFA1 by Smad3 decreases cbfa1 and osteocalcin expression and inhibits osteoblast differentiation. *The EMBO journal*, *20* (9), 2254-2272.
- Anderson, R. A.**, Robinson, L. L., Brooks, J., & Spears, N. (2002). Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *87* (2), 890-897.
- An, S.**, Huang, X., Gao, Y., Ling, J., Huang, Y., & Xiao, Y. (2015). FGF-2 induces the proliferation of human periodontal ligament cells and modulates their osteoblastic phenotype by affecting Runx2 expression in the presence and absence of osteogenic inducers. *International journal of molecular medicine*, *36* (3), 705-711.
- Auersperg, N.**, Wong, A. S., Choi, K. C., Kang, S. K., & Leung, P. C. (2001). Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology 1. *Endocrine reviews*, *22* (2), 255-288.
- Banerjee, C.**, Javed, A., Choi, J. Y., Green, J., Rosen, V., Van Wijnen, A. J., & Stein, G. S. (2001). Differential regulation of the two principal Runx2/Cbfa1 n-terminal isoforms in response to bone morphogenetic protein-2 during development of the osteoblast phenotype. *Endocrinology*, *142* (9), 4026-4039.
- Baniwal, S. K.**, Khalid, O., Gabet, Y., Shah, R. R., Purcell, D. J., Mav, D., & Frenkel, B. (2010). Runx2 transcriptome of prostate cancer cells: insights into invasiveness and bone metastasis. *Molecular cancer*, *9* (1), 1.
- Bast, R. C.**, Hennessy, B., & Mills, G. B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature Reviews Cancer*, *9* (6), 415-428.
- Bertout, J. A.**, Patel, S. A., & Simon, M. C. (2008). The impact of O₂ availability on human cancer. *Nature Reviews Cancer*, *8* (12), 967-975.
- Blyth, K.**, Cameron, E. R., & Neil, J. C. (2005). The RUNX genes: gain or loss of function in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *5* (5), 376-387.
- Browne, G.**, Nesbitt, H., Ming, L., Stein, G. S., Lian, J. B., McKeown, S. R., & Worthington, J. (2012). Bicalutamide-induced hypoxia potentiates RUNX2-mediated Bcl-2 expression resulting in apoptosis resistance. *British journal of cancer*, *107* (10), 1714-1721.
- Brunner, D.**, Frank, J., Appl, H., Schöffl, H., Pfaller, W., & Gstraunthaler, G. (2010). Serum-free cell culture: the serum-free media interactive online database. *Altex*, *27* (1), 53.
- Butterworth, K. T.**, McCarthy, H. O., Devlin, A., Ming, L., Robson, T., McKeown, S. R., & Worthington, J. (2008). Hypoxia selects for androgen independent LNCaP cells with a more malignant geno-and phenotype. *International Journal of Cancer*, *123* (4), 760-768.
- Campos, X.**, Muñoz, Y., Selman, A., Yazigi, R., Moyano, L., Weinstein-Oppenheimer, C., & 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. *Gynecologic oncology*, *104* (1), 168-175.

- Cancer Genome Atlas Research Network.** (2011). Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. *Nature*, 474 (7353), 609-615.
- Centers for disease control and prevention, CDC.** (2015) Gynecologic Cancers, Ovarian Cancer Statics [En línea]
< <http://www.cdc.gov/cancer/ovarian/statistics/>> [Consulta 05 de enero de 2016]
- Chao, M. V.,** Rajagopal, R., & Lee, F. S. (2006). Neurotrophin signalling in health and disease. *Clinical science*, 110 (2), 167-173.
- Chen, J.,** Yuan, K., Mao, X., Miano, J. M., Wu, H., & Chen, Y. (2012). Serum response factor regulates bone formation via IGF-1 and Runx2 signals. *Journal of Bone and Mineral Research*, 27 (8), 1659-1668.
- Chuang, L. S. H.,** Ito, K., & Ito, Y. (2013). RUNX family: Regulation and diversification of roles through interacting proteins. *International Journal of Cancer*, 132 (6), 1260-1271.
- Cohen-Solal, K. A.,** Boregowda, R. K., & Lasfar, A. (2015). RUNX2 and the PI3K/AKT axis reciprocal activation as a driving force for tumor progression. *Molecular cancer*, 14 (1), 1.
- Crosbie, E. J.,** & Menon, U. (2005). Epithelial ovarian cancer and induction of ovulation. *Reviews in Gynaecological Practice*, 5(3), 131-138.
- Cuevas, P.** Evaluación de miRNAs en cáncer ovárico epitelial, su relación con el efecto de NGF y sus receptores. Tesis (Magíster en Bioquímica, especialidad Clínica Aplicada). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2014.
- Drissi, H.,** Pouliot, A., Koolloos, C., Stein, J. L., Lian, J. B., Stein, G. S., & Van Wijnen, A. J. (2002). 1, 25-(OH) 2-vitamin D3 suppresses the bone-related Runx2/Cbfa1 gene promoter. *Experimental cell research*, 274 (2), 323-333.
- D'Souza, R. N.,** Aberg, T., Gaikwad, J., Cavender, A., Owen, M., Karsenty, G., & Thesleff, I. (1999). Cbfa1 is required for epithelial-mesenchymal interactions regulating tooth development in mice. *Development*, 126(13), 2911-2920.
- Fleming, J. S.,** Beaugié, C. R., Haviv, I., Chenevix-Trench, G., & Tan, O. L. (2006). Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *Molecular and cellular endocrinology*, 247 (1), 4-21.
- Franceschi, R. T.,** & Xiao, G. (2003). Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: Responsiveness to multiple signal transduction pathways. *Journal of cellular biochemistry*, 88 (3), 446-454.
- Galindo, M.,** Pratap, J., Young, D. W., Hovhannisyanyan, H., Im, H. J., Choi, J. Y., & Van Wijnen, A. J. (2005). The bone-specific expression of Runx2 oscillates during the cell cycle to support a G1-related antiproliferative function in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, 280 (21), 20274-20285.
- Gilbert, L.,** He, X., Farmer, P., Rubin, J., Drissi, H., Van Wijnen, A. J., & Nanes, M. S. (2002). Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2αA) is inhibited by tumor necrosis factor-α. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (4), 2695-2701.
- Girardi, S.** Isoformas del receptor TRKA y su relación con ADAM17 en Cáncer Ovárico Epitelial. Tesis (Magíster en Bioquímica, especialidad Clínica Aplicada). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2011.
- Goodman, M. T.,** Howe, H. L., Tung, K. H., Hotes, J., Miller, B. A., Coughlin, S. S., & Chen, V. W. (2003). Incidence of ovarian cancer by race and ethnicity in the United States, 1992–1997. *Cancer*, 97 (S10), 2676-2685.
- Goodman, M. T.,** & Howe, H. L. (2003b). Descriptive epidemiology of ovarian cancer in the United States, 1992–1997. *Cancer*, 97 (S10), 2615-2630.
- Goff, B. A.,** Mandel, L., Muntz, H. G., & Melancon, C. H. (2000). Ovarian carcinoma diagnosis. *Cancer*, 89 (10), 2068-2075.

- Guerra-Menéndez, L.**, Sádaba, M. C., Puche, J. E., Lavandera, J. L., de Castro, L. F., de Gortázar, A. R., & Castilla-Cortázar, I. (2013). IGF-I increases markers of osteoblastic activity and reduces bone resorption via osteoprotegerin and RANK-ligand. *Journal of translational medicine*, *11* (1), 1.
- Gstraunthaler, G.** (2003). Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. *Altex*, *20* (4), 275-281.
- Guppy, A. E.**, Nathan, P. D., & Rustin, G. J. (2005). Epithelial ovarian cancer: a review of current management. *Clinical Oncology*, *17* (6), 399-411.
- Hanai, Y.**, Tokuda, H., Yasuda, E., Noda, T., Ohta, T., Takai, S., & Kozawa, O. (2006). Up-regulation by zinc of FGF-2-induced VEGF release though enhancing p44/p42 MAP kinase activation in osteoblasts. *Life sciences*, *80* (3), 230-234.
- Heinzman, J. M.**, Brower, S. L., & Bush, J. E. (2008). Comparison of angiogenesis-related factor expression in primary tumor cultures under normal and hypoxic growth conditions. *Cancer cell international*, *8*(1), 1.
- Hennessy, B. T.**, Coleman, R. L., & Markman, M. (2009). Ovarian cancer. *The Lancet*, *374*(9698), 1371-1382.
- Instituto nacional de estadísticas, INE.** (2015) Estadísticas Vitales Anuario 2013 [en línea] <http://www.ine.cl/canales/menu/publicaciones/calendario_de_publicaciones/pdf/completa_vitales_2013.pdf> [Consulta 05 de enero de 2016]
- Jeon, E. J.**, Lee, K. Y., Choi, N. S., Lee, M. H., Kim, H. N., Jin, Y. H., & Oh, B. C. (2006). Bone morphogenetic protein-2 stimulates Runx2 acetylation. *Journal of Biological Chemistry*, *281*(24), 16502-16511.
- Jha, U. P.** (2004). Epithelial ovarian cancer: Basic overview of the deadliest genital cancer. *Apollo Medicine*, *1* (2), 117-122.
- Jonason, J. H.**, Xiao, G., Zhang, M., Xing, L., & Chen, D. (2009). Post-translational regulation of Runx2 in bone and cartilage. *Journal of dental research*, *88* (8), 693-703.
- Julio-Pieper, M.**, Lozada, P., Tapia, V., Vega, M., Miranda, C., Vantman, D., & 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. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *94* (8), 3065-3071.
- Kawato, Y.**, Hirao, M., Ebina, K., Tamai, N., Shi, K., Hashimoto, J., & Myoui, A. (2011). Nkx3. 2-induced suppression of Runx2 is a crucial mediator of hypoxia-dependent maintenance of chondrocyte phenotypes. *Biochemical and biophysical research communications*, *416* (1), 205-210.
- Kobayashi, T.**, & Kronenberg, H. (2005). Minireview: transcriptional regulation in development of bone. *Endocrinology*, *146* (3), 1012-1017.
- Kolar, P.**, Gaber, T., Perka, C., Duda, G. N., & Buttgerit, F. (2011). Human early fracture hematoma is characterized by inflammation and hypoxia. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, *469* (11), 3118-3126.
- Kotch, L. E.**, Iyer, N. V., Laughner, E., & Semenza, G. L. (1999). Defective vascularization of HIF-1 α -null embryos is not associated with VEGF deficiency but with mesenchymal cell death. *Developmental biology*, *209* (2), 254-267.
- Krock, B. L.**, Skuli, N., & Simon, M. C. (2011). Hypoxia-induced angiogenesis good and evil. *Genes & cancer*, *2* (12), 1117-1133.
- Kwon, T. G.**, Zhao, X., Yang, Q., Li, Y., Ge, C., Zhao, G., & Franceschi, R. T. (2011). Physical and functional interactions between Runx2 and HIF-1 α induce vascular endothelial growth factor gene expression. *Journal of cellular biochemistry*, *112* (12), 3582-3593.
- Lee, M. H.**, Javed, A., Kim, H. J., Shin, H. I., Gutierrez, S., Choi, J. Y., & Lian, J. B. (1999). Transient upregulation of CBFA1 in response to bone morphogenetic protein-2 and transforming growth

factor β 1 in C2C12 myogenic cells coincides with suppression of the myogenic phenotype but is not sufficient for osteoblast differentiation. *Journal of cellular biochemistry*, 73 (1), 114-125.

Lee, K. S., Kim, H. J., Li, Q. L., Chi, X. Z., Ueta, C., Komori, T., & Bae, S. C. (2000). Runx2 is a common target of transforming growth factor β 1 and bone morphogenetic protein 2, and cooperation between Runx2 and Smad5 induces osteoblast-specific gene expression in the pluripotent mesenchymal precursor cell line C2C12. *Molecular and cellular biology*, 20 (23), 8783-8792.

Lee, K. S., Hong, S. H., & Bae, S. C. (2002). Both the Smad and p38 MAPK pathways play a crucial role in Runx2 expression following induction by transforming growth factor-beta and bone morphogenetic protein. *Oncogene*, 21 (47), 7156-7163.

Lee, S. H., Che, X., Jeong, J. H., Choi, J. Y., Lee, Y. J., Lee, Y. H., & Lee, Y. M. (2012). Runx2 protein stabilizes hypoxia-inducible factor-1 α through competition with von Hippel-Lindau protein (pVHL) and stimulates angiogenesis in growth plate hypertrophic chondrocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (18), 14760-14771.

Li, W., Xu, S., Lin, S., & Zhao, W. (2012). Overexpression of runt-related transcription factor-2 is associated with advanced tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *BioMed Research International*, 2012.

Li, W., Liu, Z., Chen, L., Zhou, L., & Yao, Y. (2014). MicroRNA-23b is an independent prognostic marker and suppresses ovarian cancer progression by targeting runt-related transcription factor-2. *FEBS letters*, 588 (9), 1608-1615.

McKeown, S. R. (2014). Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response. *The British journal of radiology*, 87 (1035), 20130676.

Ming, L., Byrne, N. M., Camac, S. N., Mitchell, C. A., Ward, C., Waugh, D. J. & Worthington, J. (2013). Androgen deprivation results in time-dependent hypoxia in LNCaP prostate tumours: Informed scheduling of the bioreductive drug AQ4N improves treatment response. *International journal of cancer*, 132 (6), 1323-1332.

Ministerio de salud, Departamento de estadísticas e información de salud, DEIS. (2013) Indicadores básicos de salud Chile 2014. pp 5-6 [en línea] <<http://www.deis.cl/wp-content/uploads/2015/04/IBS-2014.pdf>> [Consulta 05 de enero 2016].

Molloy, N. H., Read, D. E., & Gorman, A. M. (2011). Nerve growth factor in cancer cell death and survival. *Cancers*, 3 (1), 510-530.

Moorman, P.G., Palmieri, R. T., Akushevich, L., Berchuck, A., & Schildkraut, J. M. (2009). Ovarian cancer risk factors in African-American and white women. *American journal of epidemiology*, kwp176.

Namba, K., Abe, M., Saito, S., Satake, M., Ohmoto, T., Watanabe, T., & Sato, Y. (2000). Indispensable role of the transcription factor PEBP2/CBF in angiogenic activity of a murine endothelial cell MSS31. *Oncogene*, 19 (1), 106-114.

National library of medicine, nlm (2014). National institutes of health, NIH. MedlinePlus. Ovarian Cancer [En línea] <<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/000889.htm>> [Consulta 06 de enero de 2016]

Niu, D. F., Kondo, T., Nakazawa, T., Oishi, N., Kawasaki, T., Mochizuki, K. & Katoh, R. (2012). Transcription factor Runx2 is a regulator of epithelial–mesenchymal transition and invasion in thyroid carcinomas. *Laboratory investigation*, 92 (8), 1181-1190.

Ontiveros, C., Irwin, R., Wiseman, R. W., & McCabe, L. R. (2004). Hypoxia suppresses runx2 independent of modeled microgravity. *Journal of cellular physiology*, 200 (2), 169-176.

Otto, F., Lübbert, M., & Stock, M. (2003). Upstream and downstream targets of RUNX proteins. *Journal of cellular biochemistry*, 89 (1), 9-18.

- Park, J. H.**, Park, B. H., Kim, H. K., Park, T. S., & Baek, H. S. (2002). Hypoxia decreases Runx2/Cbfa1 expression in human osteoblast-like cells. *Molecular and cellular endocrinology*, *192* (1), 197-203.
- Park, O. J.**, Kim, H. J., Woo, K. M., Baek, J. H., & Ryoo, H. M. (2010). FGF2-activated ERK mitogen-activated protein kinase enhances Runx2 acetylation and stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, *285* (6), 3568-3574.
- Pande, S.**, Browne, G., Padmanabhan, S., Zaidi, S. K., Lian, J. B., Van Wijnen, A. J., & Stein, G. S. (2013). Oncogenic cooperation between PI3K/Akt signaling and transcription factor Runx2 promotes the invasive properties of metastatic breast cancer cells. *Journal of cellular physiology*, *228* (8), 1784-1792.
- Pratap, J.**, Galindo, M., Zaidi, S. K., Vradii, D., Bhat, B. M., Robinson, J. A., & Stein, G. S. (2003). Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. *Cancer research*, *63* (17), 5357-5362.
- Pugh, C. W.**, & Ratcliffe, P. J. (2003). Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system. *Nature medicine*, *9* (6), 677-684.
- Qiao, M.**, Shapiro, P., Kumar, R., & Passaniti, A. (2004). Insulin-like growth factor-1 regulates endogenous RUNX2 activity in endothelial cells through a phosphatidylinositol 3-kinase/ERK-dependent and Akt-independent signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, *279* (41), 42709-42718.
- Rahman, S. U.**, Lee, M. S., Baek, J. H., Ryoo, H. M., & Woo, K. M. (2014). The prolyl hydroxylase inhibitor dimethylxalylglycine enhances dentin sialophosphoprotein expression through VEGF-induced Runx2 stabilization. *PloS one*, *9* (11), e112078.
- Reichardt, L. F.** (2006). Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, *361* (1473), 1545-1564.
- Salas, C., Julio-Pieper, M.**, Valladares, M., Pommer, R., Vega, M., Mastronardi, C., & Romero, C. (2006). Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of follicle-stimulating hormone receptors and estrogen secretion. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *91* (6), 2396-2403.
- Salim, A.**, Nacamuli, R. P., Morgan, E. F., Giaccia, A. J., & Longaker, M. T. (2004). Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry*, *279* (38), 40007-40016.
- Schoeder, T. M.**, Jensen, E. D., & Westendorf, J. J. (2005). Runx2: a master organizer of gene transcription in developing and maturing osteoblasts. *Birth Defects Research Part C: Embryo Today: Reviews*, *75* (3), 213-225.
- Scully, R. E.** (1987). Classification of human ovarian tumors. *Environmental Health Perspectives*, *73*, 15.
- Seghezzi, G.**, Patel, S., Ren, C. J., Gualandris, A., Pintucci, G., Robbins, E. S., & Mignatti, P. (1998). Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis. *The Journal of cell biology*, *141* (7), 1659-1673.
- Shibayama, E.**, & Koizumi, H. (1996). Cellular localization of the Trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *The American journal of pathology*, *148* (6), 1807.
- Shweiki, D.**, Itin, A., Soffer, D., & Keshet, E. (1992). Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, *359* (6398), 843-845.
- Siegel, R. L.**, Miller, K. D., & Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. *CA: a cancer journal for clinicians*, *65* (1), 5-29.
- Simon, M. C.**, Liu, L., Barnhart, B. C., & Young, R. M. (2008). Hypoxia-induced signaling in the cardiovascular system. *Annual review of physiology*, *70*, 51.

- Skaper, S. D.** (2012). The neurotrophin family of neurotrophic factors: an overview. *Neurotrophic Factors: Methods and Protocols*, 1-12.
- Stock, M.,** & Otto, F. (2005). Control of RUNX2 isoform expression: the role of promoters and enhancers. *Journal of cellular biochemistry*, 95 (3), 506-517.
- Streiter, S.,** Fisch, B., Sabbah, B., Ao, A., & Abir, R. (2016). The importance of neuronal growth factors in the ovary. *Molecular human reproduction*, 22 (1), 3-17.
- Stroka, D. M.,** Burkhardt, T., Desbaillets, I., Wenger, R. H., Neil, D. A., Bauer, C., & Candinas, D. (2001). HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *The FASEB Journal*, 15 (13), 2445-2453.
- Sun, L.,** Vitolo, M., & Passaniti, A. (2001). Runt-related Gene 2 in Endothelial Cells Inducible Expression and Specific Regulation of Cell Migration and Invasion. *Cancer research*, 61 (13), 4994-5001.
- Sun, X.,** Wei, L., Chen, Q., & Terek, R. M. (2009). HDAC4 represses vascular endothelial growth factor expression in chondrosarcoma by modulating RUNX2 activity. *Journal of Biological Chemistry*, 284 (33), 21881-21890.
- Sun, S. S.,** Zhang, L., Yang, J., & Zhou, X. (2015). Role of runt-related transcription factor 2 in signal network of tumors as an inter-mediator. *Cancer letters*, 361 (1), 1-7.
- Tamiya, H.,** Ikeda, T., Jeong, J. H., Saito, T., Yano, F., Jung, Y. K., & Choi, J. Y. (2008). Analysis of the Runx2 promoter in osseous and non-osseous cells and identification of HIF2A as a potent transcription activator. *Gene*, 416 (1), 53-60.
- Tapia, V.,** Gabler, F., Muñoz, M., Yazigi, R., Paredes, A., Selman, A., & Romero, C. (2011). Tyrosine kinase A receptor (trkA): a potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 121 (1), 13-23.
- Tsuji, K.,** Ito, Y., & Noda, M. (1998). Expression of the PEBP2 α A/AML3/CBFA1 gene is regulated by BMP4/7 heterodimer and its overexpression suppresses type I collagen and osteocalcin gene expression in osteoblastic and nonosteoblastic mesenchymal cells. *Bone*, 22 (2), 87-92.
- Urzúa, U.,** Tapia, V., Geraldo, M. P., Selman, A., Vega, M., & Romero, C. (2012). Nerve growth factor stimulates cellular proliferation of human epithelial ovarian cancer. *Hormone and Metabolic Research*, 44 (9), 656.
- Van Der Deen, M.,** Taipaleenmäki, H., Zhang, Y., Teplyuk, N. M., Gupta, A., Cinghu, S. & Cool, S. M. (2013). MicroRNA-34c inversely couples the biological functions of the runt-related transcription factor RUNX2 and the tumor suppressor p53 in osteosarcoma. *Journal of Biological Chemistry*, 288 (29), 21307-21319.
- Van Wijnen, A. J.,** Stein, G. S., Peter Gergen, J., Groner, Y., Hiebert, S. W., Ito, Y., & Speck, N. (2004). Nomenclature for Runt-related (RUNX) proteins. *Oncogene*, 23 (24), 4209-4210.
- Vera, C.,** Tapia, V., Vega, M., & Romero, C. (2014). Role of nerve growth factor and its TRKA receptor in normal ovarian and epithelial ovarian cancer angiogenesis. *Journal of ovarian research*, 7 (1), 1.
- Wang, Z. Q.,** Keita, M., Bachvarova, M., Gobeil, S., Morin, C., Plante, M., & Bachvarov, D. (2013). Inhibition of RUNX2 transcriptional activity blocks the proliferation, migration and invasion of epithelial ovarian carcinoma cells. *PLoS one*, 8 (10), e74384.
- Wang, W.,** Chen, J., & Guo, X. (2014). The role of nerve growth factor and its receptors in tumorigenesis and cancer pain. *Bioscience trends*, 8 (2), 68-74.
- Wen, C.,** Liu, X., Ma, H., Zhang, W., & Li, H. (2015). miR-338-3p suppresses tumor growth of ovarian epithelial carcinoma by targeting Runx2. *International journal of oncology*, 46 (5), 2277-2285.
- World health organization, WHO. (2015)** [En línea] <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>> [Consulta 05 de enero de 2016].
- Wu, D.,** & Yotnda, P. (2011). Induction and testing of hypoxia in cell culture. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (54), 2899-2899.

- Yang, D. C.**, Yang, M. H., Tsai, C. C., Huang, T. F., Chen, Y. H., & Hung, S. C. (2011). Hypoxia inhibits osteogenesis in human mesenchymal stem cells through direct regulation of RUNX2 by TWIST. *PLoS one*, 6 (9), e23965.
- Yang, J.**, Zhao, L., Tian, W., Liao, Z., Zheng, H., Wang, G., & Chen, K. (2013). Correlation of WWOX, RUNX2 and VEGFA protein expression in human osteosarcoma. *BMC medical genomics*, 6 (1), 1.
- Yang, K.**, Tang, X. D., Guo, W., Xu, X. L., Ren, T. T., Ren, C. M., & Sun, K. K. (2016). BMPR2-pSMAD1/5 signaling pathway regulates RUNX2 expression and impacts the progression of dedifferentiated chondrosarcoma. *American Journal of Cancer Research*, 6 (6), 1302.
- Zelzer, E.**, Glotzer, D. J., Hartmann, C., Thomas, D., Fukai, N., Soker, S., & Olsen, B. R. (2001). Tissue specific regulation of VEGF expression during bone development requires Cbfa1/Runx2. *Mechanisms of development*, 106 (1), 97-106.
- Zhao, Y.**, & Adjei, A. A. (2015). Targeting angiogenesis in cancer therapy: moving beyond vascular endothelial growth factor. *The oncologist*, 20 (6), 660-673.
- Zheng, X.**, Baker, H., Hancock, W. S., Fawaz, F., McCaman, M., & Pungor, E. (2006). Proteomic analysis for the assessment of different lots of fetal bovine serum as a raw material for cell culture. Part IV. Application of proteomics to the manufacture of biological drugs. *Biotechnology progress*, 22 (5), 1294-1300.
- Zhou, Y. X.**, Xu, X., Chen, L., Li, C., Brodie, S. G., & Deng, C. X. (2000). A Pro250Arg substitution in raton Fgfr1 causes increased expression of Cbfa1 and premature fusion of calvarial sutures. *Human molecular genetics*, 9 (13), 2001-2008.
- Ziello, J. E.**, Jovin, I. S., & Huang, Y. (2007). Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 regulatory pathway and its potential for therapeutic intervention in malignancy and ischemia. *Yale J Biol Med*, 80 (2), 51-60.

X. ANEXO

X.1. Autorización del Comité de ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile para el uso de muestras de pacientes en investigación

AUTORIZACION PARA EL USO DE MUESTRAS DE OVARIO GUARDADAS EN FORMA CODIFICADAS EN DEPENDENCIAS DEL HOSPITAL CLINICO DE LA UNIVERSIDAD DE CHILE

Se solicita en forma oficial, al Director del Hospital de la Universidad de Chile y al Comité de Ética de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, la autorización para el uso de muestras de ovario almacenadas en dependencias del Hospital, para el proyecto de investigación cuyo título es: **Contribución de las isoformas del receptor *trkA* en la proliferación y angiogénesis del cáncer ovárico epitelial: Potenciales blancos para la intervención terapéutica.** Este proyecto es la continuación de un trabajo de investigación que viene realizándose desde el año 2003, con resultados muy interesantes y con muchas proyecciones clínicas.

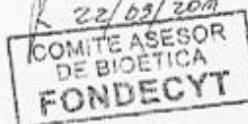
Las muestras de ovario están guardadas en forma codificada a -80°C y en custodia por la investigadora principal del proyecto, Carmen Romero, en el Laboratorio de Bioquímica y Biología de la Reproducción del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Las muestras de ovario incluidas en parafina (tacos de parafina) se encuentran almacenadas en el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Esta solicitud se debe a que esta patología tiene una muy mala respuesta a las terapias y por lo tanto, una alta tasa de mortalidad; motivo por el cual, la mayoría de las pacientes diagnosticadas con cáncer ovárico han fallecido y es difícil encontrar un pariente para la autorización de dichas muestras.

Cabe hacer notar que siempre se mantendrá la confidencialidad de dichas muestras en todas las publicaciones que emanen de este estudio

Director General
Hospital Clínico Universidad de Chile



Presidente Comité de Ética
Hospital Clínico Universidad de Chile



07 JUL 2010

X.2. Consentimiento informado que las pacientes firman autorizando la donación y uso de muestras para su uso en investigación

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA UTILIZACION DE TEJIDO OVARICO

Título: Contribución de las isoformas del receptor trkA en la proliferación y angiogénesis del cáncer ovárico epitelial: Potenciales blancos para la intervención terapéutica.

Nombre del Investigador Principal: Dra. Carmen Romero.- RUT 5271588-7

Nombre del Colaborador Clínico: RUT

Institución: Hospital Clínico Universidad de Chile, Universidad de Chile
Teléfonos: 978 – 8304 / 978 – 8305

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

Yo entiendo que:

- Cuando me practiquen la biopsia, procedimiento que ha indicado el médico, como parte de mi tratamiento, se obtendrá una muestra de mi tejido ovárico. Esta muestra se utilizará para los análisis de este estudio, lo que no interfiere en nada con los otros análisis que requiere mi médico tratante.
- El que se utilice parte del tejido en este estudio, no implica ningún riesgo para mí, aparte de la cirugía, no significa costo para mí, ni para mi sistema de salud.
- Cualquier pregunta que yo quiera hacer con relación a mi participación en este estudio deberá ser contestada por la investigadora principal de este estudio.
- Yo podré negarme a participar de este estudio en cualquier momento sin ser obligada a dar razones y sin que esto me perjudique en mi calidad de paciente o usuario del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.
- Los resultados de este estudio pueden ser publicados, pero mi nombre o identidad no será revelado y mis datos clínicos y experimentales permanecerán en forma confidencial, a menos que mi identidad sea solicitada por ley.
- Mi tejido ovárico se utilizará única y exclusivamente en los estudios que estoy autorizando a través de este documento.
- Mi consentimiento está dado voluntariamente sin que haya sido forzada u obligada.
- Se me ha indicado que si deseo hacer alguna consulta relacionada con los aspectos éticos de mi participación en este protocolo, me puedo dirigir al Presidente del Comité de Ética en Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile, Santos Dumont 999, teléfono 9789008.

Nombre de Paciente
RUT:

Firma de Paciente

Nombre Ministro de Fe

Firma de Ministro de Fe

Fecha:



07 JUL 2010