

# UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



## NIVELES DE COX-2 EN CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL. EFECTO DE TGF- $\beta$ 1 Y NGF EN LOS NIVELES DE COX-2, PGE<sub>2</sub> Y VEGF EN LÍNEAS CELULARES DE OVARIO.

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de  
Magíster en Bioquímica, área de especialización en Bioquímica  
Clínica Aplicada, y Memoria para optar al Título de Bioquímico

por:

**IVÁN ANDRÉS HURTADO TORRES**

Directores de tesis: Dra. Carmen Romero y Dr. Julio Tapia

Santiago-CHILE  
Junio 2015

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

### INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster y Memoria de Título presentada por el candidato

## IVÁN ANDRÉS HURTADO TORRES

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Bioquímica, Área de Especialización: Bioquímica Clínica Aplicada y Título de Bioquímica, en el examen público rendido el día

---

Director de Tesis:

Dra. Carmen Romero

---

Co-director de Tesis:

Dr. Julio Tapia

---

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dr. Hernán Lara

---

Dra. Cecilia Johnson

---

Dr. Alfonso Paredes

---

*Dedicado a mis padres, a quienes amo incondicionalmente...*

## ii. AGRADECIMIENTOS

Desde el momento en que decidí tomar este camino hasta el día de hoy, hay muchas personas a quienes tengo que agradecer de corazón.

Quiero empezar por agradecer a los miembros de mi comisión: **Dr. Hernán Lara**, **Dra. Cecilia Johnson** y al **Dr. Alfonso Paredes** por sus consejos y críticas que permitieron madurar este trabajo.

Quiero agradecer a todo el personal del Laboratorio donde realicé mi tesis, en especial a la **Dra. Carmen Romero**, mi guía más importante en el desarrollo de este trabajo, y a la **Dra. Margarita Vega**, que en todo momento me dieron su apoyo y nutrieron esta tesis con su experiencia. Además, quiero agradecer a mis amigos y compañeros: **Paula García**, **Lorena Oróstica**, **Karla Kohan**, **Francisca Plaza**, **Silvana Girardi**, **Carolina Vera**, **Carlos Valenzuela**, **Cristian Poblete** y **Paula Cuevas**, por sus opiniones, críticas, consejos y por los lindos momentos vividos dentro y fuera del laboratorio. A mi profesorcita **Verónica Tapia**, quiero agradecerle por todas esas conversaciones, risas, momentos de apoyo y contención. No tiene idea de lo mucho que la quiero.

Quiero agradecer a mis amigos, la familia que uno elige. Cada uno de ustedes estuvo presente a lo largo de estos lindos años. Gracias a **Carlos Rivera**, **Fernanda Cuevas**, **Hugo Díaz**, **Pablo Barattini**, **Macarena Las Heras**, **Fabián Pinto**, **Diego Henríquez**, **Rodrigo Peña Y Lillo**, **Cristian Hannud** y a mis preciosas **Francisca Aguirre**, **Alejandra** y **María Jesús Mella**. Además, quiero agradecer a mi mamá putativa **Isabel Pizarro**, **Marcelo Ávila** y **Diego Pereira** por todos estos años viviendo juntos, llenos de momentos maravillosos que jamás olvidaré.

También quiero agradecer a mi familia. Muchas gracias a mis tíos **Brisi**, **Eliana**, **Yayo** y **Linco**, así como también a mis queridísimas primas **Anita María** y **Tati**. ¡Infinitas gracias por acogerme y darme tanto cariño! A todos ustedes, los quiero muchísimo. Y por último, agradecer a las dos personas más importantes de mi vida: **Yazna** y **Juan**. Ellos son mis dos grandes amores. Infinitas gracias a mis padres que me han dado su amor y apoyo incondicional en cada decisión que he tomado en este trayecto. Ellos son mi todo, y no puedo expresar a través de palabras todo lo agradecido y orgulloso que estoy de ustedes. Los amo.

### iii. ÍNDICE DE CONTENIDO

Página

i. Dedicatoria.....	
ii. Agradecimientos.....	
iii. Índice de contenido.....	
iv. Índice de figuras y tablas.....	
v. Financiamiento.....	
vi. Difusión científica.....	
vii. Abreviaturas.....	
viii. Resumen.....	
ix. Abstract.....	
I. Introducción.....	20
I.1. Cáncer de ovario.....	20
I.1.1. Epidemiología y factores de riesgo.....	20
I.1.2. Diagnóstico.....	21
I.1.3. Causas y patogénesis.....	21
I.2. Vía de señalización de TGF- $\beta$ .....	24
I.2.1. Generalidades.....	24
I.2.2. Rol de TGF- $\beta$ en la homeostasis celular.....	25
I.2.3. Rol de TGF- $\beta$ en cáncer.....	26
I.2.3.1. Rol de TGF- $\beta$ en cáncer de ovario.....	26
I.3. NGF y su receptor TRKA.....	27
I.3.1. Generalidades.....	27
I.3.2. Rol en cáncer de ovario.....	28

I.4. Ciclooxygenasa 1 y 2.....	29
I.4.1. Generalidades.....	29
I.4.2. Rol de COX-2 en cáncer.....	31
I.4.2.1. Rol de COX-2 en cáncer de ovario.....	32
II. Hipótesis.....	35
III. Objetivos generales.....	36
IV. Objetivos específicos.....	36
V. Materiales y métodos.....	37
V.1. Diseño experimental.....	37
V.2. Estudios <i>ex vivo</i> .....	38
V.2.1 Obtención de muestras.....	38
V.2.1.1. Preparación de las muestras.....	39
V.2.2. Inmunohistoquímica de COX-2 en tejidos ováricos.....	40
V.2.3. <i>Western blot</i> de COX-2 en tejidos ováricos.....	41
V.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR) de COX-2 en tejidos ováricos.....	43
V.3. Estudios <i>in vitro</i> .....	45
V.3.1. Cultivo celular.....	45
V.3.1.1. Líneas celulares.....	46
V.3.1.2. Preparación de medios condicionados: tratamiento con estímulos.....	46
V.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR) de COX-2 en líneas celulares de ovario.....	47
V.3.3. <i>Western blot</i> de COX-2 en líneas celulares de ovario.....	48

V.3.4. Determinación de los niveles de PGE <sub>2</sub> mediante inmunoensayo....	49
V.3.5. Tratamiento con inhibidor de COX-2, NS-398.....	50
V.3.6. Determinación de los niveles de VEGF mediante ELISA.....	50
V4. Análisis estadístico.....	51
VI. Resultados.....	52
VI.1. Objetivo 1.....	52
VI.2. Objetivo 2.....	55
VI.3. Objetivo 3.....	66
VII. Discusión.....	68
VIII.- Conclusiones.....	78
IX.- Proyecciones.....	80
X.- Bibliografía.....	81

#### iv. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	Página
Figura N°1. Modelo propuesto en líneas celulares de cáncer ovárico.....	34
Figura N°2. Diseño experimental de los estudios <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> .....	37
Figura N°3. Detección de COX-2 en tejidos ováricos mediante inmunohistoquímica.....	52-53
Figura N°4. Determinación de los niveles de COX-2 en tejidos de ovarios por <i>western blot</i> .....	54
Figura N°5. Determinación de los niveles de COX-2 en tejidos de ovarios por RT-PCR.....	54
Figura N°6. Niveles basales de COX-2 en células HOSE y A2780 por <i>western blot</i> .....	56
Figura N°7. Niveles basales de COX-2 en células HOSE y A2780 por RT-PCR.....	56
Figura N°8. Niveles de COX-2 en células HOSE y A2780 estimuladas con NGF por 2 horas.....	57
Figura N°9. Niveles de transcrito de COX-2 en las células A2780 estimuladas con NGF por 2 horas.....	58
Figura N°10. Niveles de COX-2 en células HOSE y A2780 estimuladas con NGF por 24 horas.....	59



Figura N°11.	Niveles de COX-2 en células HOSE y A2780 estimuladas con TGF- $\beta$ 1 por 2 horas.....	61
Figura N°12.	Niveles de transcrito de COX-2 en las células A2780 estimuladas con TGF- $\beta$ 1 por 2 horas.....	62
Figura N°13.	Niveles de COX-2 en células HOSE y A2780 estimuladas con TGF- $\beta$ 1 por 24 horas.....	63
Figura N°14.	Niveles de secreción de PGE <sub>2</sub> en células HOSE y A2780 en condiciones basales.....	64
Figura N°15.	Niveles de secreción de PGE <sub>2</sub> en células HOSE y A2780 estimuladas con NGF por 2 horas.....	65
Figura N°16.	Niveles de secreción de PGE <sub>2</sub> en células HOSE y A2780 estimuladas con TGF- $\beta$ 1 por 2 horas.....	65
Figura N°17.	Niveles de secreción de VEGF en células A2780 por efecto de NGF y el inhibidor NS-398.....	67
Figura N°18.	Niveles de secreción de VEGF en células A2780 por efecto de TGF- $\beta$ 1 y el inhibidor NS-398.....	67
Figura N°19.	Modelo final en líneas celulares de cáncer ovárico.....	79
Tabla 1.	Anticuerpo primario usado en Inmunohistoquímica.....	41
Tabla 2.	Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en <i>Western blot</i> ...	42
Tabla 3.	Programa de PCR usado para amplificar el cDNA de COX-2.....	44
Tabla 4.	Partidores de los genes amplificados por PCR.....	45

## **v. FINANCIAMIENTO**

Proyecto FONDECYT #1110372 (C.R). Beca CONICYT Magíster Nacional (I.H).

## vi. DIFUSIÓN CIENTÍFICA

- **XXV Reunión Anual de la Sociedad Chilena de Reproducción y Desarrollo. 3 al 6 de Septiembre de 2014, Valdivia, Chile.**

ROL DE COX-2 Y SU RELACIÓN CON EL FACTOR DE CRECIMIENTO NERVIOSO (NGF) EN CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL. (Role of COX-2 and its relationship with nerve growth factor (NGF) in epithelial ovarian cancer).  
**Hurtado I.**, Gabler F., Tapia J., Vega M., Romero C.

## vii. ABREVIATURAS

<b>BSA</b>	: Albúmina de suero bovino (del inglés <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>cDNA</b>	: Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés <i>complementary Deoxyribonucleic Acid</i> )
<b>COE</b>	: Cáncer ovárico epitelial
<b>COE I</b>	: Cáncer ovárico epitelial de grado I o bien diferenciado
<b>COE II</b>	: Cáncer ovárico epitelial de grado II o moderadamente diferenciado
<b>COE III</b>	: Cáncer ovárico epitelial de grado III o pobremente diferenciado
<b>COX-2</b>	: Ciclooxygenasa 2 (del inglés <i>Cyclooxygenase 2</i> )
<b>DAB</b>	: 3,3'-diaminobencidina
<b>DEPC</b>	: Dietilpirocarbonato (del inglés <i>Diethylpyrocarbonate</i> )
<b>DMEM</b>	: Medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> )
<b>DMSO</b>	: Dimetilsulfoxido
<b>dNTP</b>	: Desoxinucleótidos trifosfato (del inglés <i>deoxynucleotide triphosphates</i> )
<b>DTT</b>	: Ditiotreitól
<b>EDTA</b>	: Ácido etilendiaminotetraacético (del inglés <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
<b>EGTA</b>	: Ácido etilenglicoltetraacético (del inglés <i>Ethyleneglycoltetraacetic acid</i> )

<b>ELISA</b>	: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (del inglés <i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i> )
<b>GAPDH</b>	: Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (del inglés <i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i> )
<b>HEPES</b>	: del inglés <i>Hydroxyethyl-piperazineethanesulfonic acid</i>
<b>HOSE</b>	: Epitelio de la superficie ovárica humana (del inglés <i>Human Ovarian Surface Epithelium</i> )
<b>IOD</b>	: Densidad óptica integrada
<b>kDa</b>	: kiloDalton
<b>mRNA</b>	: Ácido ribonucleico mensajero (del inglés <i>messenger Ribonucleic Acid</i> )
<b>NGF</b>	: Factor de crecimiento nervioso (del inglés <i>Nerve Growth Factor</i> )
<b>OVI</b>	: Ovario normal inactivo
<b>pb</b>	: Pares de base
<b>PBS</b>	: Solución tampón de fosfato (del inglés <i>Phosphate Buffer Solution</i> )
<b>PCR</b>	: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PGE<sub>2</sub></b>	: Prostaglandina E <sub>2</sub> (del inglés <i>Prostaglandin E<sub>2</sub></i> )
<b>PMFS</b>	: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (del inglés <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> )
<b>RNA</b>	: Ácido ribonucleico (del inglés <i>Ribonucleic Acid</i> )

<b>RT-PCR</b>	: Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (del inglés <i>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>SDS-PAGE</b>	: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (del inglés <i>Sodium Dodecyl-Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
<b>TBE</b>	: Tumor benigno
<b>TBO</b>	: Tumor borderline
<b>TGF-β1</b>	: Factor de crecimiento transformante beta 1 (del inglés <i>Transforming Growth Factor beta 1</i> )
<b>TRKA</b>	: Receptor tirosina quinasa A (del inglés <i>Tyrosine Receptor Kinase A</i> )
<b>TTBS</b>	: Solución salina de Tris con Tween (del inglés <i>Tween Tris-Buffered Salt</i> )
<b>UA</b>	: Unidades arbitrarias
<b>VEGF</b>	: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )

## viii. RESUMEN

El **cáncer ovárico epitelial (COE)** es la primera causa de muerte por neoplasias ginecológicas en países desarrollados como Canadá, EE.UU e Israel. Específicamente en Chile, es la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas. Este cáncer se caracteriza por ser de diagnóstico tardío, debido a su sintomatología inespecífica, y poseer una pobre respuesta al tratamiento. Debido a lo anterior, es importante entender los mecanismos tanto de la génesis como del desarrollo de esta neoplasia. Actualmente, hay mucha literatura sobre los factores de crecimiento que están involucrado en la progresión del COE, así como también de aquellos factores de crecimiento que juegan un rol crítico en la carcinogénesis ovárica. En COE se sabe que la vía de señalización de **TGF- $\beta$ 1** se encuentra alterada de modo que esta vía podría estar involucrada en la progresión de esta patología. Por otro lado, **NGF** y su receptor TRKA participan en la progresión del cáncer ovárico debido a su rol en la proliferación celular y angiogénesis. Estudios en nuestro laboratorio han reportado que a medida que progresa el cáncer ovárico epitelial, hay un aumento en los niveles de VEGF, NGF, receptor TRKA y su forma activa (p-TRKA). En otras patologías, se ha demostrado que TGF- $\beta$ 1 es capaz de aumentar los niveles de la **ciclooxigenasa-2 (COX-2)**, así como también que NGF puede inducir esta enzima en ovario bovino. COX-2 juega un papel importante en muchos tipos de cáncer y es clave en la síntesis de prostaglandinas a partir de ácido araquidónico, siendo la **PGE<sub>2</sub>** la más común y ubicuamente producida. Se ha reportado que esta prostaglandina es capaz de inducir la expresión de **VEGF** y, por ende, promover la angiogénesis tumoral.

**Hipótesis:** En cáncer ovárico epitelial, hay un aumento en los niveles de COX-2, y los factores de crecimiento NGF y TGF- $\beta$ 1, en forma independiente, aumentan los niveles de COX-2 y PGE<sub>2</sub>, induciendo un incremento en los niveles de VEGF en líneas celulares de cáncer de ovario.

**Objetivos:** Evaluar si la presencia y el cambio en los niveles de COX-2 se relacionan con la progresión del COE; además, determinar si TGF- $\beta$ 1 o NGF aumentan los niveles de COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub>, y si este último induce un aumento en los niveles de VEGF en las líneas celulares de epitelio de la superficie ovárica humana (HOSE) y de cancer ovárico epitelial humano (A2780).

**Metodología:** En los experimentos *ex vivo* se evaluaron los niveles de COX-2 en 36 muestras de tejido ovárico (6 OVI; 6 TBE; 6 TBO; 6 COE I; 6 COE II y 6 COE III) mediante inmunohistoquímica, *western blot* y RT-PCR. En relación a los experimentos *in vitro*, ambas líneas celulares se estimularon con TGF- $\beta$ 1 o NGF para determinar los niveles de COX-2, tanto por RT-PCR como *western blot*, y los niveles secretados de PGE<sub>2</sub> y VEGF en los medios de cultivo por inmunoanálisis.

**Resultados:** La inmunotinción de COX-2 en las muestras de tejido ovárico muestra un aumento en los niveles proteicos de esta enzima a medida que progresa el cáncer ovárico epitelial. Acorde a lo anterior, mediante *western blot* y RT-PCR se aprecian mayores niveles de COX-2 en las muestras de tejido de cáncer ovárico en comparación con las muestras de ovario inactivo. En las líneas celulares de ovario, sólo la línea celular cancerígena A2780 respondió ante los tratamientos con NGF o



TGF- $\beta$ 1 durante 2 horas, observando un aumento en los niveles del transcrito y proteína de COX-2 y de PGE<sub>2</sub>. Finalmente, al utilizar un inhibidor de COX-2 no se aprecia una disminución en los niveles de secreción de VEGF, por efecto de los tratamientos con NGF o TGF- $\beta$ 1. Estos resultados sugieren que el incremento en los niveles de VEGF por NGF, demostrado y publicado por nuestro grupo de laboratorio, puede ser sin la participación de PGE<sub>2</sub>.

**Proyecciones:** Desde el punto de vista clínico, sería interesante evaluar qué procesos tales como proliferación, migración o invasión celular está modulando COX-2 y PGE<sub>2</sub>, por efecto de NGF o TGF- $\beta$ 1 en las células A2780. Adicionalmente, sería importante determinar a través de qué vía de señalización esta prostaglandina está mediando tales procesos, puesto que sería crucial tener una visión mucho más acabada de los mecanismos involucrados en esta patología. Considerando lo anterior, se podrían plantear nuevos blancos terapéuticos que permitan mejorar la sobrevida de las pacientes que padecen de este tipo de cáncer.

## ix. ABSTRACT

**COX-2 levels in epithelial ovarian cancer. TGF- $\beta$ 1 and NGF effect on COX-2, PGE<sub>2</sub> and VEGF levels in ovarian cell lines.**

**Epithelial ovarian cancer (EOC)** is the leading cause of death from gynecological malignancies in developed countries like Canada, USA and Israel. Specifically in Chile, is the second leading cause of death from gynecological malignancies. This cancer is characterized by being diagnosed in advanced stages, due to its nonspecific symptoms, and have a poor response to therapy. Because of this, it is important to understand the mechanisms of both the genesis and development of this pathology. Currently, there are many information regarding the effect of growth factors involved in EOC progression as well as those growth factors that play a critical role in ovarian carcinogenesis. It is known that in EOC the signaling pathway of **TGF- $\beta$**  is altered then could be involved in the progression of this disease. On the other hand, **NGF** and TRKA receptor are involved in ovarian cancer progression due to its role in cellular proliferation and angiogenesis. Studies in our laboratory have reported that during epithelial ovarian cancer progression, there is an increase in VEGF, NGF, TRKA and p-TRKA levels. In other pathologies, it has been demonstrated that TGF- $\beta$ 1 is able to increase **cyclooxygenase-2 (COX-2)** levels and that NGF can also induce this enzyme in bovine ovary. COX-2 plays an important role in many cancers and is essential in prostaglandin synthesis from arachidonic acid, where **PGE<sub>2</sub>** is the most common and ubiquitously produced. It has been reported that this prostaglandin induces **VEGF** expression and thus promote tumor angiogenesis.

**Hypothesis:** In epithelial ovarian cancer, there is an increase of COX-2 levels, and the growth factors NGF and TGF- $\beta$ 1, independently, increase COX-2 and PGE<sub>2</sub> levels, inducing an increase in VEGF levels in ovarian cancer cell lines.

**Objectives:** To evaluate whether the presence and change in COX-2 levels are associated with EOC progression; also to determine whether TGF- $\beta$ 1 or NGF increase COX-2 and PGE<sub>2</sub> synthesis, and if the latter induces an increase in VEGF levels in human ovarian surface epithelium (HOSE) and human epithelial ovarian cancer (A2780) cell lines.

**Methods:** In *ex vivo* experiments COX-2 levels were evaluated in 36 ovarian tissue samples (6 OVI; TBE 6; 6 TBO; 6 COE I; 6 COE II and 6 COE III) by immunohistochemistry, western blot and RT-PCR. In relation to *in vitro* experiments, both cell lines were stimulated with TGF- $\beta$ 1 or NGF to determine COX-2 levels by RT-PCR and western blot, and PGE<sub>2</sub> and VEGF levels secreted into the culture medium by immunoassay.

**Results:** Immunohistochemical detection of COX-2 in ovarian tissue samples shows an increase in protein levels of this enzyme with the progression of epithelial ovarian cancer. According to the above, by RT-PCR and western blot, higher COX-2 levels are observed in ovarian cancer compared to inactive ovary tissue samples. In ovarian cell lines, only A2780 cancer cell line responded to the treatment with NGF or TGF- $\beta$ 1 for 2 hours, observing an increase in transcript and protein COX-2 and PGE<sub>2</sub> levels. Finally, when a COX-2 inhibitor is used, there is no decrease in VEGF secretion levels, by NGF or TGF- $\beta$ 1 effect. This results suggest that the increase of

VEGF by NGF found and published by our group may be without the participation of PGE<sub>2</sub>.

**Projections:** From the clinical standpoint, it would be interesting to evaluate what processes such as proliferation, migration or invasion is modulating COX-2 and PGE<sub>2</sub>, by effect of NGF or TGF- $\beta$ 1 in A2780 cells. Additionally, it would be important to determine what signaling pathway is mediating such processes, since it would be important to have a better understanding of the mechanisms involved in this pathology. Considering the above, it could propose new therapeutic targets to improve the survival of patients suffering this cancer.

## **I. INTRODUCCIÓN**

### **I.1. Cáncer de ovario**

#### **I.1.1. Epidemiología y factores de riesgo**

Dentro de las neoplasias que afectan a las mujeres a nivel mundial, el cáncer de ovario ocupa el sexto lugar; sin embargo, entre las neoplasias ginecológicas, la incidencia y mortalidad de este cáncer es la más alta en países desarrollados como Canadá, EE.UU, Israel y países de Europa occidental [1,2]. Específicamente en Chile, el cáncer de ovario es la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas [3].

La alta mortalidad en este tipo de cáncer se explica porque la sintomatología es muy inespecífica, la que se asemeja a la de enfermedades ginecológicas, gastrointestinales y genitourinarios, de manera que el diagnóstico se hace en estadios avanzados de la enfermedad [2,4]. En estos estadios, hay un gran compromiso funcional del ovario y una pobre respuesta a la terapia, lo que lleva a que la sobrevida a 5 años del diagnóstico no sea mayor al 25% [3].

Existen diversos factores que aumentan el riesgo de desarrollar cáncer ovárico, entre los cuales destacan la nuliparidad, mutación en los genes *BRCA1/BRCA2*, menarquía temprana, menopausia tardía y la edad; no obstante, el factor de riesgo

más importante es tener antecedentes familiares de cáncer de ovario o mama. Por el otro lado, el uso de anticonceptivos orales, el embarazo y la lactancia constituyen factores que disminuyen el riesgo de desarrollar la malignidad [1].

### **I.1.2. Diagnóstico**

La detección temprana es crucial para mejorar sustancialmente la sobrevida, para lo cual es necesario que la paciente tenga lesiones clínicamente detectables en estadios tempranos [1]; sin embargo, en la actualidad, los métodos de diagnóstico permiten que sólo el 20% de las pacientes sean diagnosticadas cuando el cáncer se encuentra únicamente en el ovario [4]. Uno de los métodos de diagnóstico es la medición sérica del marcador CA125, el cual por sí solo no posee ni la especificidad ni la sensibilidad para ser usado en screening, de modo que, para mejorar la especificidad, se usa en conjunto con la ultrasonografía transvaginal (TVS) [1].

Cabe destacar, además, que CA125 no aumenta lo suficiente sus niveles séricos en estadios tempranos del cáncer de ovario, y sólo un 80% de los cánceres de ovario expresan este marcador [4,7].

### **I.1.3. Causas y patogénesis**

El cáncer de ovario puede desarrollarse a partir de varios tipos celulares, como las células germinales, de la granulosa o epiteliales, donde estas últimas forman una monocapa en la superficie ovárica. Cuando la malignidad comienza en estas

últimas, se denomina cáncer ovárico epitelial (COE) y constituye más del 90% de los tipos de cáncer de ovario [4].

Hoy en día, existen tres hipótesis relacionadas entre sí que tratan de explicar el desarrollo del cáncer ovárico epitelial o COE:

- 1. La ovulación incesante.** Se postula que rupturas repetitivas del epitelio de la superficie ovárica y la consiguiente proliferación celular, como mecanismo reparativo post-ovulación, conlleva a la formación de quistes de inclusión. Estos quistes aumentarían el riesgo de carcinogénesis capturando células epiteliales en un ambiente con constante estimulación autocrina y/o paracrina por factores de crecimiento como hormonas, fosfolípidos, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), etc. [1].
- 2. La estimulación gonadotrópica.** Se postula que los altos niveles de las gonadotrofinas durante la ovulación y las persistentes altas concentraciones después de la menopausia, estimulan a las células epiteliales de la superficie ovárica, lo que conlleva a la carcinogénesis [1]. Lo anterior se explica por el hecho que las gonadotrofinas producen un aumento en la producción de estrógenos por parte de las células epiteliales [5], de modo que el estradiol, en conjunto con la gonadotrofinas, aumentan la expresión proteica del factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor de alta afinidad, TRKA, los que juegan un rol importante en la proliferación y angiogénesis del cáncer ovárico epitelial [6].

**3. El efecto inflamatorio.** Se postula que durante la ruptura de los folículos maduros, producto de la ovulación, y la consiguiente proliferación de las células epiteliales como mecanismo reparativo, se genera un proceso inflamatorio llevado a cabo por citoquinas y moléculas pro-inflamatorias. Este proceso inflamatorio se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollar cáncer ovárico epitelial [1,5].

Por otro lado, existen diversas mutaciones, tanto germinales como somáticas, que contribuyen a la patogénesis de muchos tipos de cáncer. Específicamente en COE, se ha visto que mutaciones en el gen *BRCA1*, el riesgo de carcinogénesis es de un 39-46%, mientras que mutaciones en el gen *BRCA2*, el riesgo es de un 12-20%. No obstante, la predisposición genética está presente sólo en un 10-15% de las pacientes.

Actualmente, hay muchas moléculas que juegan un rol importante en el desarrollo de este cáncer, entre los que destacan tanto TGF- $\beta$  y su vía de señalización [8] como el factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor de alta afinidad, TRKA [6].



## **I.2. Vía de señalización de TGF- $\beta$**

### **I.2.1. Generalidades**

El factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) pertenece a la superfamilia de factores de crecimiento que juega un papel importante en la homeostasis de diversos tejidos. Este factor ejerce su acción uniéndose al receptor de TGF- $\beta$  tipo II (T $\beta$ RII), el cual recluta al receptor tipo I (T $\beta$ RI), formando un complejo heterotetrámero. A su vez, existe un co-receptor, denominado T $\beta$ RIII o proteoglicano, que ayuda a que el ligando se una a T $\beta$ RII. Luego, el receptor tipo II fosforila una región regulatoria del receptor tipo I, conocida como dominio GS, lo que permite que éste se active y sea capaz de reconocer y fosforilar proteínas SMAD reguladas por receptor (R-SMADS) [8,9].

Las proteínas SMAD2 y SMAD3 son reconocidas por T $\beta$ RI para su posterior fosforilación y, una vez ocurrido esto, se asocian a SMAD4 – ya sea como heterodímeros o heterotrímeros - para translocarse al núcleo y modular la transcripción de diversos genes blanco. Si bien SMAD4 no es fosforilado en respuesta a TGF- $\beta$ , es necesario para la formación de la mayoría de los complejos transcripcionales tipo SMAD. Finalmente, estos complejos transcripcionales se asocian a cofactores de unión a DNA así como también a co-activadores o co-represores, dependiendo de si se promueve o reprime la transcripción del gen blanco [8,9].

La vía de señalización constituida por las proteínas SMAD reguladas por receptor, corresponde a la vía canónica por la cual TGF- $\beta$  ejerce su acción; sin embargo, existen otras vías por las cuales este factor puede modular la expresión de sus genes blanco. Estas vías involucran a TRAF5/TAK/p38-JNK, RhoA/ROCK, ERK/MAPK y PI3K/AKT/mTOR, y corresponden a las vías de señalización no canónicas. Por lo tanto, una vez que TGF- $\beta$  se une a su receptor, cada una de estas vías se encarga de modular la expresión de determinados genes para llevar a cabo sus diversas funciones biológicas [8,9].

### **I.2.2. Rol de TGF- $\beta$ en la homeostasis celular**

TGF- $\beta$  controla muchos aspectos fundamentales del comportamiento celular y, según el tipo celular, puede tener funciones disímiles. En el endotelio, este factor promueve la migración y morfogénesis así como también el control del crecimiento y la apoptosis [10].

En los fibroblastos y las células epiteliales, induce la producción de matriz extracelular y secreción de citoquinas; no obstante, mientras que en los fibroblastos promueve la proliferación, en el epitelio la inhibe induciendo apoptosis y deteniendo el ciclo celular [11,12].

A nivel del sistema inmune, tiene un efecto supresor, ya que inhibe la proliferación de los linfocitos T, la función de las células NK (*Natural Killer*) y la presentación antigénica [13,14].

Por otro lado, durante el desarrollo embrionario, la vía de señalización de TGF- $\beta$  es un importante promotor del crecimiento del tejido y de la morfogénesis, debido a su

rol en la vasculogénesis y angiogénesis. Por consiguiente, más que TGF- $\beta$  por sí mismo, son la naturaleza de la célula y el contexto celular los que determinan la respuesta final ante la acción de este ligando [10].

### **I.2.3. Rol de TGF- $\beta$ en cáncer**

Durante la carcinogénesis, se van generando mutaciones somáticas al azar en distintos niveles de la vía de señalización que conllevan a que tanto las funciones apoptóticas como antiproliferativas se vean desreguladas [9].

A nivel de receptores, se ha visto que en cáncer de colon el receptor tipo II (T $\beta$ RII) sufre mutaciones tanto en el dominio kinasa como en el dominio extracelular [15,16], donde éste último también se ha visto alterado en cáncer gástrico [18]. A su vez, se ha reportado que el receptor tipo I (T $\beta$ RI) también se encuentra desregulado en algunos tipos de cáncer como mama y páncreas [18,19].

En relación a las proteínas SMADs, se ha observado que mutaciones en SMAD4 se encuentran presentes en el 10% de todos los cánceres de colon y en un 30% de los cánceres de colon metastásicos [20]. Además, de manera infrecuente, se han reportado mutaciones en SMAD2 en cáncer colorectal y pulmón [21,22].

#### **I.2.3.1. Rol de TGF- $\beta$ en cáncer de ovario**

Respecto al ligando, se ha reportado que las tres isoformas (TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3) se encuentran considerablemente elevadas en células de cáncer de ovario [23]. Resultados similares se han visto respecto de los niveles de mRNA tanto de TGF-

$\beta 1$  como de TGF- $\beta 3$  [24]. Además, se ha observado que los niveles de TGF- $\beta 1$  en plasma y fluido peritoneal de pacientes con cáncer ovárico en estadios avanzados se encuentran incrementados [25].

A nivel de receptores, se ha visto que el receptor tipo II (T $\beta$ RII) se encuentra presente en algunas líneas celulares de cáncer de ovario como SKOV3 mientras que en las líneas AZ224 y AZ547 los transcritos son indetectables [26]. Por otro lado, tanto en el receptor tipo I como el III (T $\beta$ RI y T $\beta$ RIII) se ha observado que disminuyen sus niveles en varias muestras de tumores ováricos [24].

En relación a las proteínas SMAD, tal como se ha descrito en cáncer de páncreas, se ha reportado que en varias líneas celulares de cáncer de ovario hay una disminuida expresión de SMAD4 [27].

Estudios en nuestro laboratorio han demostrado que líneas celulares de cáncer ovárico hay menores niveles proteicos del receptor tipo I (T $\beta$ RI) en relación a la línea celular del epitelio normal de la superficie ovárica. Por otro lado, en las líneas celulares cancerígenas hay mayores niveles de Smad2 y Smad3 fosforilado (la forma activa) en comparación a la línea celular del epitelio normal [28].

### **I.3. NGF y su receptor TRKA**

#### **I.3.1. Generalidades**

El factor de crecimiento nervioso (NGF) pertenece a la familia de neurotrofinas, donde encontramos, además, a la neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-6 y 7 (NT-6 y NT-7), neurotrofina-4/5 (NT-4/5) y a Brain-Derived Neurotrophic Factor (BDNF) [29].

Como su nombre lo indica, este factor promueve la supervivencia neuronal y, a nivel ovárico, se ha observado que participa tanto en la esteroidogénesis como en la foliculogénesis [30]. Los receptores para cada una de las diferentes neurotrofinas pertenecen a una familia de receptores tirosinas kinasas (TRK). Estos receptores poseen un dominio extracelular, una única región transmembrana y una región intracelular con varios residuos de tirosina fosforilables [31]. Existen tres receptores de la familia TRK: TRKA, receptor de alta afinidad por NGF; TRKB, que se une a BDNF y NT-4; y TRKC, que une NT-3. Cuando la neurotrofina se une a su receptor, éste dimeriza y se autofosforila en los residuos de tirosina permitiendo la activación de distintas vías de señalización. Dentro de aquellas vías que se activan por estimulación de NGF, está la vía PI3K/AKT y MAPK/ERK2, promoviendo la supervivencia y diferenciación celular, respectivamente [32].

### **I.3.2. Rol en cáncer de ovario**

Debido a que NGF promueve la proliferación y supervivencia celular, juega un rol importante en el desarrollo y progresión del cáncer ovárico epitelial. Por otro lado, NGF también promueve la angiogénesis, proceso que es clave para la mantención y progresión de cualquier tipo de cáncer. Lo anterior se explica por el hecho que las células de la granulosa secretan NGF y, de manera autocrina, éste estimula, a través de la activación de su receptor de alta afinidad, la secreción de VEGF [33]. Posteriormente, VEGF actúa sobre las células endoteliales, promoviendo el aumento en la supervivencia, proliferación y migración de estas células, lo que se conoce como angiogénesis. Además, NGF puede actuar de forma directa sobre

las células endoteliales, promoviendo así la angiogénesis en el ovario [6,34]. Finalmente, cabe destacar que estudios de nuestro laboratorio han demostrado que en muestras de tejido de cáncer de ovario hay un aumento en los niveles de TRKA y p-TRKA [35], así como también un aumento en la secreción de VEGF, por estimulación de NGF, en explantes de COE [6] y en líneas celulares de cáncer de ovario [35].

## **I.4. Ciclooxygenasa 1 y 2**

### **I.4.1. Generalidades**

A pesar de todas las diferencias que hay entre TGF- $\beta$  y NGF, en cuanto a estructura, receptores de unión y funciones fisiológicas, ambos tienen algo en común: inducir la expresión de la ciclooxygenasa 2 (COX-2) [39,41].

Las ciclooxygenasas (COX) son enzimas clave en la síntesis de prostaglandinas (PGs) a partir de ácido araquidónico. Dichas prostaglandinas son: PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , PGI<sub>2</sub>, tromboxano y PGE<sub>2</sub>, siendo ésta última la más común y ubicuamente producida. Existen dos isoformas de ciclooxygenasa: COX-1 y COX-2, que son homodímeros de 576 y 581 aminoácidos, respectivamente. A su vez, poseen tres oligosacáridos de manosa como modificación post-traducciona y, específicamente COX-2, posee un cuarto oligosacárido cuyo papel es regular su degradación. Cada subunidad del dímero posee tres dominios: el dominio factor de crecimiento epidermal, el dominio de unión a membrana y el dominio catalítico [36].

COX-1 es una enzima constitutiva, es decir, tanto el mRNA como la proteína están presentes en niveles estables en casi todos los tejidos. Debido a que posee pocos elementos regulatorios y no posee TATA box en la región 5' del gen, se ha considerado que COX-1 es un gen "*housekeeping*". La localización subcelular de COX-1 es en el retículo endoplásmico y el núcleo y, en cuanto a sus principales funciones biológicas, cabe destacar la agregación plaquetaria, el balance de agua a nivel renal y la citoprotección gástrica [36, 37, 38].

COX-2, en cambio, es una enzima inducible, lo que se explica por la región 3' no traducible extremadamente rica en bases AT, existiendo 17 copias de la secuencia ATTTA. Este motivo es común en muchos genes inducibles, como los de interleuquinas y la NO sintasa, y contribuye a la inestabilidad del mRNA. Además, a diferencia de su isoforma relacionada, COX-2 posee numerosos elementos regulatorios en la región 5' del gen, de manera que hay muchos factores capaces de inducir la expresión de esta enzima. Al igual que COX-1, la localización subcelular de COX-2 es en el retículo endoplásmico y en el núcleo, pero principalmente en este último. No obstante, es posible encontrarla en una fracción menor en el aparato de Golgi y citoplasma. Las principales funciones biológicas de COX-2 son la desagregación plaquetaria, fiebre, vasodilatación, resorción ósea e inflamación [36, 37, 38].

#### **I.4.2. Rol de COX-2 en cáncer**

Sin embargo, a diferencia de COX-1, la isoforma COX-2 juega un rol crítico en procesos patológicos y, especialmente, en cáncer. En muchos trabajos se ha reportado que los niveles de COX-2 aumentan considerablemente en muchos tipos de cáncer como de colon, mama y estómago, de manera que se ha establecido que COX-2 juega un papel importante en la tumorigénesis y crecimiento del tumor. Lo anterior se debe a que la sobreexpresión de esta ciclooxigenasa en células tumorales contribuye a que éstas evadan la apoptosis y sean capaces de migrar e invadir otros tejidos. Se ha visto que en cultivos de células epiteliales de rata, la transfección con el cDNA de COX-2 y el consecuente aumento en la síntesis de prostaglandina E<sub>2</sub> llevan a una disminución en la tasa de apoptosis, lo que se revierte al inhibir la producción de prostaglandinas mediante el compuesto sulindac. Además, estudios *in vivo* demostraron que al inducir químicamente cáncer de colon en ratas y, posteriormente, administrar sulindac a la dieta, redujo a la mitad la incidencia de adenocarcinoma y dobló el índice apoptótico en el tejido tumoral. No obstante, hay otros estudios que han evaluado el rol de COX-2 no solo en la apoptosis y el crecimiento tumoral sino que también en la angiogénesis. Estudios con macrófagos asociados a tumor *in vivo* y con líneas celulares tumorales han demostrado que éstos producen PGE<sub>2</sub>, y que ésta es capaz de inducir la expresión de VEGF [38].

Por otro lado, en células de la teca de ovario bovino, se ha visto que NGF aumenta los niveles de COX-2 y, por lo tanto, la síntesis de PGE<sub>2</sub> [39]. Resultados similares se observaron en otro estudio que trabajaron con mastocitos de tipo seroso de rata,



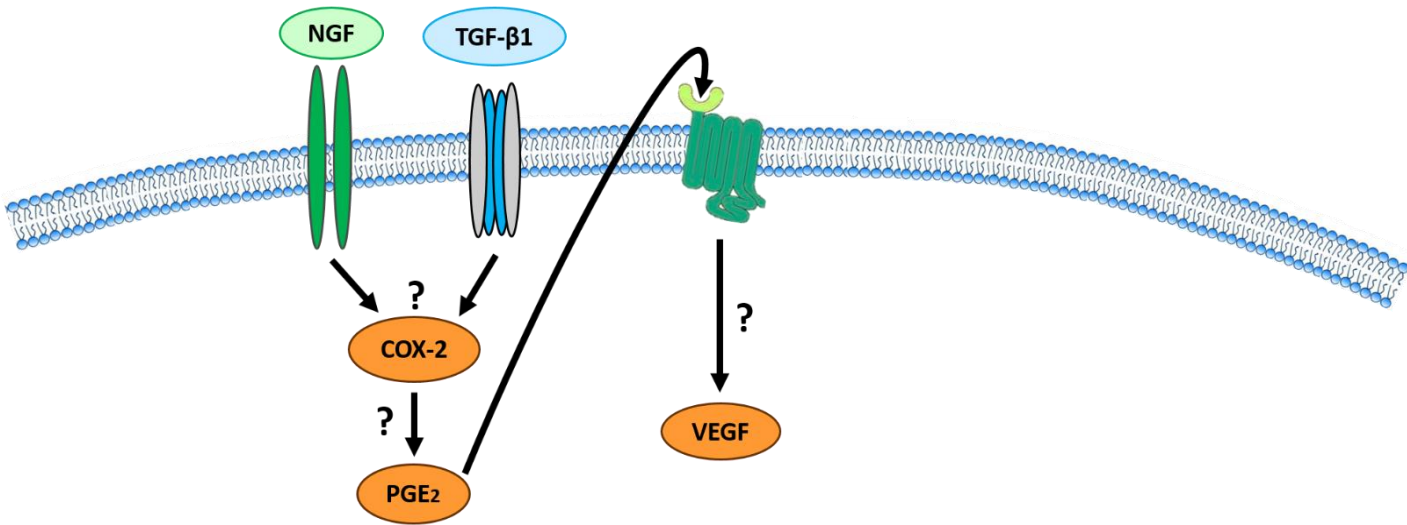
y demostraron que al estimular dichas células con NGF hay un aumento en los niveles de COX-2 [40]. Se ha reportado, además, que en células mesangiales, TGF- $\beta$ 1 promueve la expresión de COX-2 y, por ende, un aumento en la síntesis de PGE<sub>2</sub> [41]. Lo anterior también se ha visto en líneas celulares de cáncer de próstata, donde TGF- $\beta$ 1 induce la expresión de COX-2 y, en consecuencia, aumenta la producción de PGE<sub>2</sub>, la que, a su vez, modula procesos de migración e invasión en la línea cancerígena [42].

#### **I.4.2.1. Rol de COX-2 en cáncer de ovario**

Debido a que, como se describió anteriormente, una de las teorías del desarrollo del cáncer ovárico epitelial es el efecto inflamatorio, mucho se ha estudiado sobre la función de COX-2 en la carcinogénesis ovárica. Sin embargo, hay mucha literatura discordante en cuanto a la expresión de COX-2 en cáncer de ovario. En algunos trabajos se ha reportado que no hay expresión de COX-2 en tumores ováricos; mientras que otros trabajos si han encontrado una alta expresión de esta enzima tanto en tumores malignos como benignos [43]. También se ha tratado de establecer una relación entre COX-2 y determinadas características clínico-patológicas y marcadores moleculares. Se ha visto que hay una alta correlación entre la expresión de COX-2 con el tipo histológico, el estadio (clasificación FIGO) y la sobrevida [43,44]. Respecto al grado del tumor (I, II y III), también hay literatura disímil, ya que un estudio observó que en tumores de tipo endometriode y seroso, no había una correlación entre la expresión de COX-2 con el grado de diferenciación del cáncer [43], mientras que en otro estudio se encontró correlación entre la

expresión de COX-2 y el grado de diferenciación celular; es decir, mientras más desdiferenciado el tumor, más expresión de COX-2. [45]. Además, se ha reportado que hay una correlación positiva entre la expresión de COX-2 con la de p53 y VEGF, los cuales son marcadores moleculares de malignidad avanzada [43].

## MODELO PROPUESTO



**Figura N°1. Modelo propuesto en líneas celulares de cáncer ovárico.**

Modelo propuesto considerando los antecedentes presentados en este trabajo. NGF: factor de crecimiento nervioso; TGF-β1: factor de crecimiento transformante beta 1; COX-2: ciclooxigenasa 2; PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

## II. HIPÓTESIS

*“En cáncer ovárico epitelial, hay un aumento en los niveles de COX-2, y los factores de crecimiento NGF y TGF- $\beta$ 1, en forma independiente, aumentan los niveles de COX-2 y PGE<sub>2</sub>, induciendo un incremento en los niveles de VEGF en líneas celulares de cáncer de ovario”*

### **III. OBJETIVO GENERAL**

- 1.- Evaluar si en COE se expresa COX-2, y si los niveles de esta enzima se relacionan con la progresión del cáncer ovárico epitelial. Además, determinar si TGF- $\beta$ 1 o NGF aumentan los niveles de COX-2, PGE<sub>2</sub> y VEGF en líneas celulares de ovario.

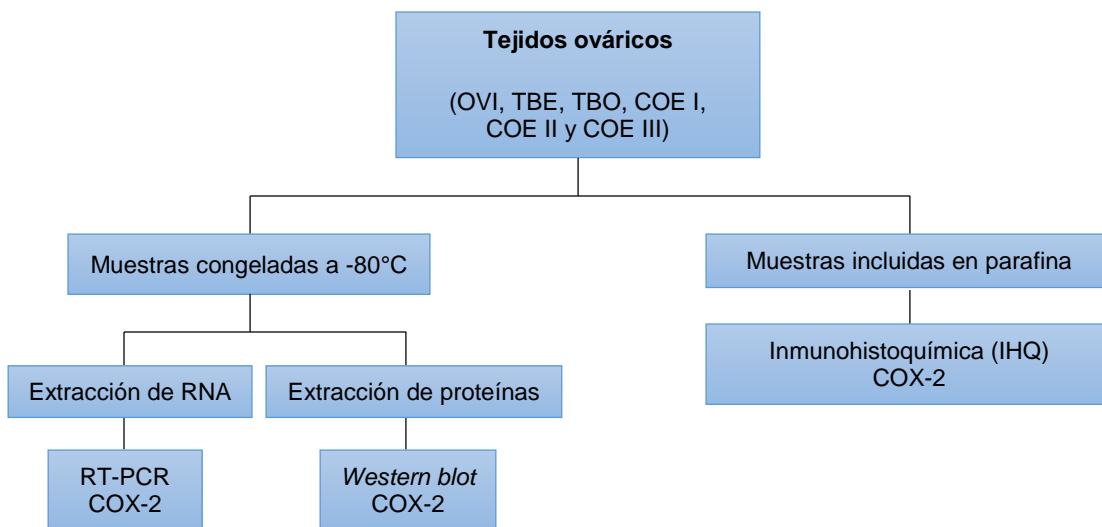
### **IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1.- Determinar si los niveles de COX-2 en tejidos de ovario se relacionan con la progresión del COE.
- 2.- Evaluar si en las líneas celulares HOSE y A2780 se expresa COX-2, y si por efecto de TGF- $\beta$ 1 o NGF aumentan los niveles de COX-2 y PGE<sub>2</sub>.
- 3.- Evaluar si el aumento en PGE<sub>2</sub>, por efecto de TGF- $\beta$ 1 o NGF, incrementa los niveles de VEGF en las líneas celulares HOSE y A2780.

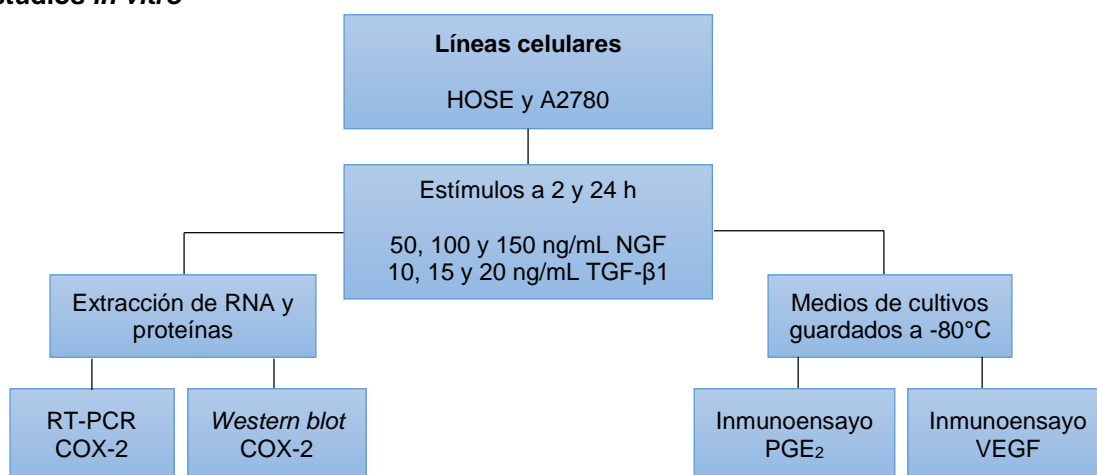
## V. MATERIALES Y MÉTODOS

### V.1. Diseño experimental

#### Estudios *ex vivo*



#### Estudios *in vitro*



**Figura N°2. Diseño experimental de los estudios *ex vivo* e *in vitro*.**

OVI: ovario normal inactivo; TBE: tumor benigno; TBO: tumor borderline; COE I: cáncer ovárico epitelial bien diferenciado o de grado I; COE II: cáncer ovárico epitelial moderadamente diferenciado o de grado II; COE III: cáncer ovárico epitelial pobremente diferenciado o de grado III; COX-2: ciclooxigenasa 2; HOSE: epitelio normal de la superficie ovárica humana; A2780: línea celular de cáncer ovárico epitelial humano; NGF: factor de crecimiento nervioso; TGF-β1: factor de crecimiento transformante beta 1; PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>; RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

## V.2. Estudios *ex vivo*

### V.2.1 Obtención de muestras

Las muestras correspondientes a tejidos ováricos humanos fueron obtenidas a través de histerectomía realizada a pacientes que asistieron al Servicio de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Estas pacientes previamente firmaron un Consentimiento Informado, el cual fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Para realizar este estudio se consideraron los siguientes tipos de muestras:

- 1.- **Ovario normal Inactivo (OVI):** Tejido ovárico de pacientes controles cuyos ovarios no están ciclando. A su vez, presenta quistes de inclusión de diámetro menor a 1 cm, los cuales están rodeados por una monocapa de células epiteliales en su interior.
- 2.- **Tumor Benigno (Tbe):** Ovarios con quistes de inclusión de diámetro mayor a 1 cm, los cuales están rodeados por una monocapa de células epiteliales en su interior.
- 3.- **Tumor Borderline (Tbo):** La monocapa de células epiteliales ha proliferado, produciendo un epitelio pseudoestratificado. Respecto a los quistes de inclusión, éstos tienen grandes proyecciones papilares y, en algunos casos, puede observarse un mínimo grado de invasión hacia el estroma.

- 4.- **Cáncer Ovárico Epitelial bien diferenciado o de grado I (COE I):** Ovarios con estructura papilar irregular, con invasión de células epiteliales hacia el estroma mayor a 3 mm y epitelio pseudoestratificado.
- 5.- **Cáncer Ovárico Epitelial moderadamente diferenciado o de grado II (COE II):** Ovarios con mayor cantidad de zonas desdiferenciadas, con núcleos atípicos y más focos de invasión.
- 6.- **Cáncer Ovárico Epitelial pobremente diferenciado o de grado III (COE III):** Corresponde a una masa solida desdiferenciada, con evidente polimorfismo tanto celular como nuclear, además de muchos focos de invasión.

Las muestras de ovario normal inactivo corresponden a tejidos provenientes de ovarios de mujeres sometidas a histerectomía con ooforectomía, uni o bilateral, por patologías no ováricas. El resto de los grupos se obtuvo mediante histerectomía con ooforectomía o por histerectomía radical, a pacientes a las cuales se les diagnosticó un tumor ovárico o cáncer de ovario. Además, es importante señalar que las muestras de cáncer ovárico epitelial poseen una histología de tipo seroso.

#### **V.2.1.1. Preparación de las muestras**

Las muestras de tejido ovárico se dividieron en tres o más trozos. Uno de éstos se incluyó en parafina y se utilizó para realizar una clasificación del tejido llevado a cabo por un anatomopatólogo. A los trozos restantes, guardados a -80°C, se les extrajo RNA y proteínas para hacer los estudios respectivos.



### **V.2.2. Inmunohistoquímica de COX-2 en tejidos ováricos**

Este estudio se realizó con el objetivo de identificar la localización de COX-2 y semi-cuantificar sus niveles proteicos durante la progresión del cáncer ovárico epitelial. La técnica se realizó en cortes de tejidos previamente incluidos en parafina. Los tejidos fueron desparafinados en xilol dos veces por 10 min e hidratados en concentraciones seriadas de alcohol por 5 min cada vez. Para la recuperación antigénica, las muestras se incubaron en buffer citrato 10 mM, pH 6.0, a 95-98°C por 20 min. Posteriormente, se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena con peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) al 3% durante 15 min y los sitios inespecíficos usando el bloqueador del kit Ultravision LP Detection System (Thermo Fisher Scientific, Inc., CA, USA) por 5 min. Luego, se incubó con el anticuerpo primario diluido en PBS-BSA al 2%, a 4°C durante 20 h (Tabla 1). Posteriormente, se incubó con HRP polymer por 15 min a temperatura ambiente y, finalmente, se utilizó como sustrato final de la reacción el cromógeno diaminobencidina (DAB) del kit Ultravision LP Detection System (Thermo Fisher Scientific, Inc., CA, USA), dando una tinción positiva de color café. Los tejidos fueron contrateñidos con hematoxilina diluida 1:5 por 1 min y 40 seg con el objetivo de evidenciar los núcleos. Luego, las placas fueron deshidratadas en concentraciones seriadas de alcohol y colocadas en xilol a los mismos tiempos mencionados anteriormente. Por último, las placas fueron montadas con un cubreobjetos, utilizando Entellan. Cabe mencionar que cada placa contó con un control negativo incubado sólo con PBS-BSA al 2%, sin anticuerpo primario. Las fotografías fueron capturadas con el microscopio Olympus BX51 y analizadas con el programa computacional Image-ProPlus 6.2 (Media Cybernetics

Inc., Silver Spring, MD, USA). El análisis fue realizado midiendo la intensidad del pixel positivo con una herramienta de semi-cuantificación llamada densidad óptica integrada (IOD) en el programa computacional ya mencionado. Los datos fueron presentados como IOD unidades arbitrarias (UA).

**Tabla 1.** Anticuerpo primario usado en Inmunohistoquímica

Anticuerpo Primario	Dilución	Proveedor	Tipo
COX-2	1:600	Cell Signaling	Rabbit monoclonal

### V.2.3. *Western blot* de COX-2 en tejidos ováricos

Se utilizó tejido guardado a -80°C para la extracción de proteínas. Para lo anterior, se usó buffer de lisis (HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PMSF 15 µM, Triton X-100 1X, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,4 mM) y un cocktail inhibidor de proteasas y fosfatasas (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific, Inc., CA, USA). Este homogenizado fue centrifugado a 1000 g por 20 min a 4°C y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 10.000 g por 20 min a 4°C. Para la determinación de la concentración proteica se utilizó el kit BCA Protein Assay (Pierce, IL). Se trabajó con un volumen equivalente 50 µg de proteína que fueron denaturadas a 95°C por 5 min para posteriormente ser cargadas en un SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis) al 8% por 2 h aproximadamente a 100 volts. Posteriormente, se llevó a cabo la transferencia en membranas de nitrocelulosa durante 70 min a 300 mA. Para evitar la unión no

específica, se utilizó leche al 5% en buffer TTBS durante 1 h. Luego, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en leche al 5% en buffer TTBS durante toda la noche y, posteriormente, se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano diluido en TTBS por 1 h (Tabla 2). Como control de carga se utilizó  $\beta$ -actina, la que se detectó utilizando un anticuerpo primario diluido en TTBS por 1 h. Luego, se usó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano diluido en TTBS por 1 h (Tabla 2). Como control positivo, se utilizó células HEK (Human Embryonic Kidney 293 cells) que sobreexpresan COX-2. Finalmente, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia, usando el kit Western Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA). Las imágenes fueron adquiridas en el ImageQuant LAS500 (GE Healthcare, USA) y las bandas obtenidas fueron evaluadas por densitometría con el programa UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific Corporation).

**Tabla 2.** Anticuerpos primarios y secundarios utilizados en *Western blot*

<b>Anticuerpo Primario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>	<b>Tipo</b>
COX-2	1:500	Cell Signaling	Rabbit monoclonal
$\beta$ -actina	1:20000	Sigma	Mouse monoclonal

<b>Anticuerpo Secundario</b>	<b>Dilución</b>	<b>Proveedor</b>
Anti-rabbit	1:5000	KPL
Anti-mouse	1:5000	KPL

#### **V.2.4. Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR) de COX-2 en tejidos ováricos**

Para realizar la extracción del RNA total, se utilizó 100 mg de tejido congelado. Se comenzó homogenizando el tejido con TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies, USA) en un Ultra-turrax, para luego agregar cloroformo. Después de 15 min de incubación, se centrifugó a 16000 g durante 15 min a 4°C. A continuación, se extrajo la fase acuosa y se agregó isopropanol frío. Después de incubar toda la noche a -30°C, se centrifugó a 16000 g por 20 min a 4°C, para posteriormente lavar el pellet resultante con etanol 75%. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 16000 g durante 10 min a 4°C, y se dejó secando el pellet obtenido. Luego, se resuspendió en agua DEPC, y, finalmente, se procedió a calcular la concentración y pureza del RNA extraído, mediante lectura en NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., CA, USA).

Una vez finalizada la extracción del RNA total, se llevó a cabo la transcripción inversa para obtener DNA complementario (cDNA). Se calculó el volumen para trabajar con 2 µg de RNA y se agregó una cantidad de agua estéril necesaria para completar 10,5 µL. Luego, se agregó dNTPs 10 mM y Random Primers 500 µg/mL (Madison, WI, USA), y la mezcla se incubó a 65°C durante 5 min. Terminado lo anterior, se dejó enfriar en hielo durante 5 min. Posteriormente, se añadió Buffer 5X first strand, DTT 0,1 M, RNAsa OUT 40 U/µL y transcriptasa inversa M-MLV 200 U/µL (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), y se dejó incubando a 42°C durante 50 min. Finalmente, se dejó en hielo por 10 min.

Posteriormente, el cDNA fue amplificado en una mezcla de reacción de 25  $\mu$ L, utilizando Buffer 5X, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, dNTPs 10 mM, DNA GoTaq polimerasa 5 U/ $\mu$ L (Promega, Madison, USA), partidores sense y antisense (10  $\mu$ M c/u) y un volumen de agua estéril necesario para completar 23  $\mu$ L de reacción, agregando 2  $\mu$ L de cDNA. Como gen constitutivo se usó GAPDH. La reacción se realizó en el termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Foster city CA, USA), con su respectivo programa de PCR (Tabla 3) y los partidores específicos para cada gen (Tabla 4). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%, utilizando un estándar de peso molecular para validar el tamaño predicho de las bandas del amplificado. Los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta, fotografiados y analizados con el programa de densitometría UV Transilluminator UVP with Doc-it Software Image Acquisition and 1D Analysis (UVP, Inc. Laboratory Products, Upland, CA, USA). Como control negativo de la reacción, en vez de cDNA, se agregó agua estéril.

**Tabla 3.** Programa de PCR usado para amplificar el cDNA de COX-2

Programa de PCR	T°, Tiempo
Denaturación	94°C, 30 seg
Alineamiento	55°C, 30 seg
Extensión	72°C, 30 seg
Ciclos	30
Extensión final	72°C, 7 min

**Tabla 4.** Partidores de los genes amplificados por PCR

Gen	Secuencia	Producto (pb)
COX-2	5'-TTC AAA GAG ATT GTG GGA AAA TTG CT-3' 5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'	307
GAPDH	5'-GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3' 5'-ATC CAC AGT CTT CTG GGT G-3'	548

### V.3. Estudios *in vitro*

#### V.3.1. Cultivo celular

Las líneas celulares del epitelio de la superficie ovárica humana (HOSE) y de cáncer de ovario epitelial humano (A2780), fueron cultivadas en medio Dulbecco's minimal essential medium/Ham F-12 (DMEM/Ham F-12) sin rojo fenol (Sigma-Aldrich Co, St Louis MO, USA), suplementado con 1,2 g/L de bicarbonato de sodio, 10% de suero de bovino fetal (FBS), y una solución de antibióticos (penicilina-estreptomina) y antimicótico (variconazole). Las células fueron cultivadas a 37°C, en atmósfera húmeda, a una concentración de 5% CO<sub>2</sub>. Al alcanzar un 80% de confluencia, las células fueron tripsinizadas con una solución de Tripsina-EDTA al 0,25%.

### **V.3.1.1. Líneas celulares**

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

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

### **V.3.1.2. Preparación de medios condicionados: tratamiento con estímulos**

Las líneas celulares HOSE y A2780 estuvieron 24 h en medio sin suero, previo a los tratamientos con NGF (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) o TGF- $\beta$ 1 (Abcam, Cambridge, UK). Los tratamientos fueron de 50, 100 y 150 ng/mL de NGF, y 10, 15 y 20 ng/mL de TGF- $\beta$ 1 por 2 y 24 h. Una vez finalizados dichos tratamientos, las células fueron utilizadas para la determinación del mRNA y proteína de COX-2, y los medios de cultivos (medios condicionados) fueron almacenados a -80°C para la determinación de los niveles de PGE<sub>2</sub> por ELISA.

### **V.3.2. Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción inversa (RT-PCR) de COX-2 en líneas celulares de ovario**

La extracción del RNA total se hizo usando TRIZOL (Gibco BRL, Life Technologies, USA). Posteriormente, al homogenizado se le añadió glicógeno y cloroformo. Después de 15 min de incubación, se dejó en hielo durante 5 min y se centrifugó a 16000 g durante 15 min a 4°C. A continuación, se extrajo la fase acuosa y se agregó isopropanol frío. Después de incubar toda la noche a -30°C, se centrifugó a 16000 g por 20 min a 4°C y se lavó el pellet resultante con etanol al 75%. Posteriormente, se volvió a centrifugar a 16000 g durante 10 min a 4°C, y se dejó secando el pellet obtenido. Luego, se resuspendió en agua DEPC, y, finalmente, se procedió a calcular la concentración y pureza del RNA extraído, mediante lectura en NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Inc., CA, USA).

Una vez finalizada la extracción del RNA total, se llevó a cabo la transcripción inversa para obtener DNA complementario (cDNA). Se calculó el volumen para trabajar con 2 µg de RNA y se agregó una cantidad de agua estéril necesaria para completar 10,5 µL. Luego, se agregó dNTPs 10 mM y Random Primers 500 µg/mL (Madison, WI, USA), y la mezcla se incubó a 65°C durante 5 min. Terminado lo anterior, se dejó enfriar en hielo durante 5 min. Posteriormente, se añadió Buffer 5X first strand, DTT 0,1 M, RNAsa OUT 40 U/µL y transcriptasa inversa M-MLV 200 U/µL (Invitrogen, Carlsbad CA, USA), y se dejó incubando a 42°C durante 50 min. Finalmente, se dejó en hielo por 10 min.

Posteriormente, el cDNA fue amplificado en una mezcla de reacción de 25 µL, utilizando Buffer 5X, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, dNTPs 10 mM, DNA GoTaq polimerasa 5 U/µL



(Promega, Madison, USA), partidores sense y antisense (10  $\mu$ M c/u) y un volumen de agua estéril necesario para completar 23  $\mu$ L de reacción, agregando 2  $\mu$ L de cDNA. Como gen constitutivo se usó GAPDH. La reacción se realizó en el termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf AG, Foster city CA, USA), con su respectivo programa de PCR (Tabla 3) y los partidores específicos para cada gen (Tabla 4). Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%, utilizando un estándar de peso molecular para validar el tamaño predicho de las bandas del amplificado. Los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta, fotografiados y analizados con el programa de densitometría UV Transilluminator UVP with Doc-it Software Image Acquisition and 1D Analysis (UVP, Inc. Laboratory Products, Upland, CA, USA). Como control negativo de la reacción, en vez de cDNA, se agregó agua estéril.

### **V.3.3. *Western blot* de COX-2 en líneas celulares de ovario**

La extracción de proteínas se realizó homogenizando 500.000 células en buffer de lisis (HEPES 20 mM, EDTA 2 mM, EGTA 2 mM, PSMF 15  $\mu$ M, Triton X-100 1X, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> 0,4 mM) con un cocktail inhibidor de proteasas y fosfatasa (Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Fisher Scientific, Inc., CA, USA). Este homogenizado fue centrifugado a 16000 g durante 20 min a 4°C. Para la determinación de la concentración proteica se utilizó el kit BCA Protein Assay (Pierce, IL). Se trabajó con un volumen equivalente 50  $\mu$ g de proteína que fueron denaturadas a 95°C por 5 min para posteriormente ser cargadas en un SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis) al 8% por 2 h

aproximadamente a 100 volts. Posteriormente, se llevó a cabo la transferencia en membranas de nitrocelulosa durante 70 min a 300 mA.

Para evitar la unión no específica, se utilizó leche al 5% en buffer TTBS durante 1 h. Luego, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo primario diluido en leche al 5% en buffer TTBS durante toda la noche y, posteriormente, se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano diluido en TTBS por 1 h (Tabla 2). Como control de carga se utilizó  $\beta$ -actina, la que se detectó utilizando un anticuerpo primario diluido en TTBS por 1 h. Luego, se usó un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano diluido en TTBS por 1 h (Tabla 2). Como control positivo, se utilizó células HEK (Human Embryonic Kidney 293 cells) que sobreexpresan COX-2. Finalmente, las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia, usando el kit Western Lightning® Plus-ECL (PerkinElmer Life Sciences, Wellesley, MA). Las imágenes fueron adquiridas en el ImageQuant LAS500 (GE Healthcare, USA) y las bandas obtenidas fueron evaluadas por densitometría con el programa UN-SCAN-IT gel 6.1 (Silk Scientific Corporation).

#### **V.3.4. Determinación de los niveles de PGE<sub>2</sub> mediante inmunoensayo**

Los niveles de PGE<sub>2</sub> secretados se evaluaron en los medios de cultivos condicionados mediante inmunoensayo. La detección de esta prostaglandina se llevó a cabo utilizando el Kit Prostaglandin E2 ELISA (Chemiluminescent) (Abcam, Cambridge, UK), de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Finalmente, la lectura de la placa se realizó en un luminómetro.

### **V.3.5. Tratamiento con inhibidor de COX-2, NS-398**

Las líneas celulares estuvieron 24 h en medio sin suero, previo al tratamiento con el inhibidor NS-398 (Abcam, Cambridge, USA). El inhibidor se usó a una concentración de 10 y 20  $\mu\text{M}$ , de acuerdo a lo visto en la literatura donde se observó una inhibición significativa en los niveles secretados de  $\text{PGE}_2$  en diversas líneas celulares. Una vez agregado el inhibidor, éste se dejó actuar por una 1 hora previa al tratamiento con NGF o  $\text{TGF-}\beta 1$ . NS-398 se disolvió en dimetilsulfoxido (DMSO) (Winkler, Santiago, Chile), cuya concentración final en el medio de cultivo fue  $<0.02\%$  vol/vol., acorde a lo observado en la literatura con el objetivo de evitar muerte celular debido a la toxicidad del solvente [46, 47].

### **V.3.6. Determinación de los niveles de VEGF mediante ELISA**

Los niveles de VEGF secretados se evaluaron en los medios de cultivos condicionados mediante inmunoensayo. La detección de VEGF se realizó con el kit Quantikine Human VEGF Immunoassay (R&D Systems Inc. Minneapolis, MN, USA), el que es altamente específico en el reconocimiento de VEGF 121, isoforma secretada completamente, y VEGF 165, isoforma que es secretada parcialmente. El inmunoensayo se realizó según las instrucciones entregadas por el fabricante y la medición de la absorbancia se llevó a cabo en un lector de ELISA (Sigma, St. Louis, MO, USA).

#### V.4. Análisis estadístico

El cálculo para el tamaño muestral ( $n$ ) para los experimentos *ex vivo* e *in vitro* se realizó utilizando la fórmula de comparación de medias:  $n = (2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2)/d^2$ , asumiendo un  $\alpha$  de 0,05 ( $Z\alpha = 1,96$ ), un  $\beta$  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%. Considerando los valores anteriores, se obtuvo un  $n = 6$  para los experimentos *ex vivo* (para cada tipo de muestra) y un  $n = 4$  para los experimentos *in vitro*.

En el caso de los experimentos *ex vivo*, los distintos grupos de muestras fueron comparados con el grupo Ovario normal Inactivo (OVI), siendo este último considerado como control frente a los diferentes grupos representativos del estado patológico. En los experimentos *in vitro*, particularmente en los ensayos con los distintos tratamientos, se comparó con su basal, de modo que los resultados se expresaron como “veces el basal”. A su vez, cabe señalar que todos los ensayos fueron realizados en duplicado. Finalmente, los resultados obtenidos se expresaron como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio.

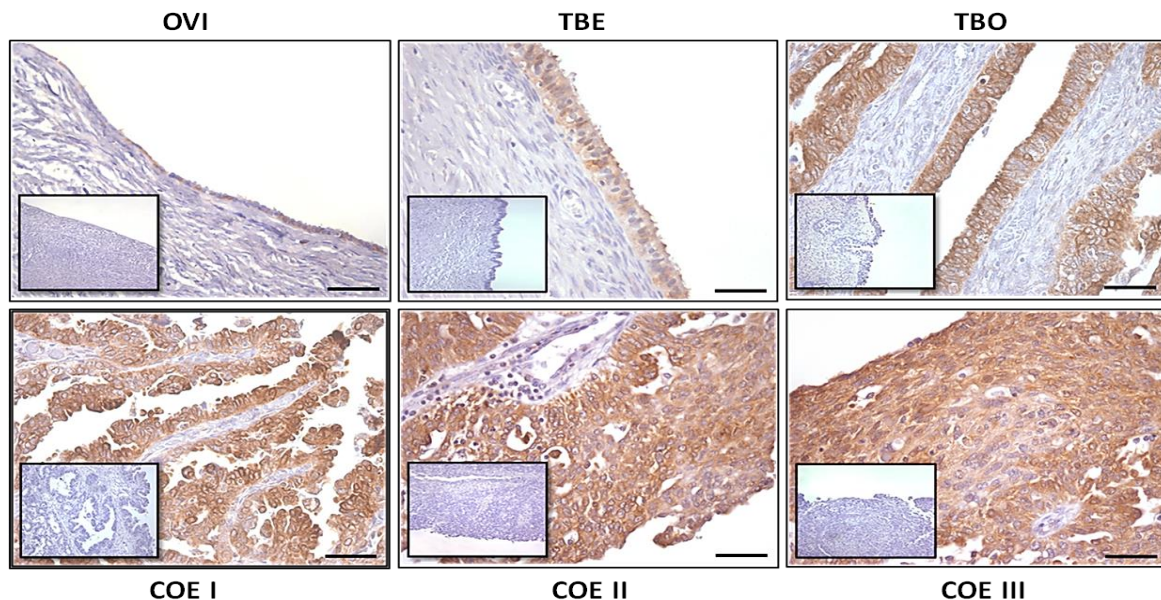
El análisis de los datos se llevó a cabo en el programa GraphPad Prism 5. Debido a que los datos son no paramétricos, se utilizó el test de Kruskal-Wallis, seguido de un post test de Dunn, y el test de Mann-Whitney, según corresponda. Por último, como criterio de significancia, se estableció un valor de  $p \leq 0,05$ .

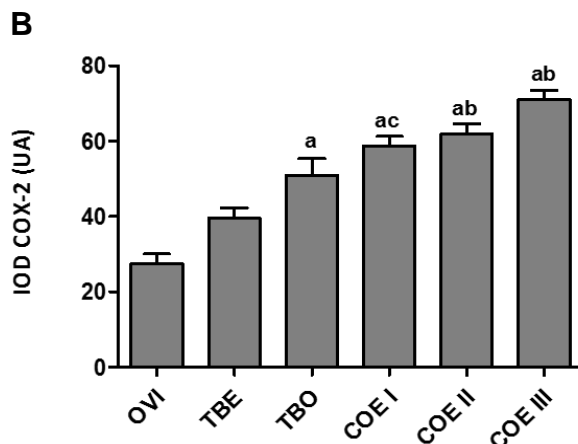
## VI. RESULTADOS

### VI.1. Objetivo 1. Determinar si los niveles de COX-2 en tejidos de ovario se relacionan con la progresión del COE.

La inmunodetección de COX-2 en las muestras de tejido ovárico por inmunohistoquímica muestra una tinción principalmente citoplasmática en el epitelio de estos tejidos, y se observa que a medida que progresa el cáncer ovárico epitelial hay un aumento en los niveles proteicos de COX-2. Este incremento en los niveles de COX-2 se hace estadísticamente significativo a partir del grupo TBO ( $p < 0.001$  vs OVI). A su vez, se aprecia que el grupo COE presenta mayores niveles de esta enzima en comparación al grupo TBE ( $p < 0.01$ ) (Fig. N°2).

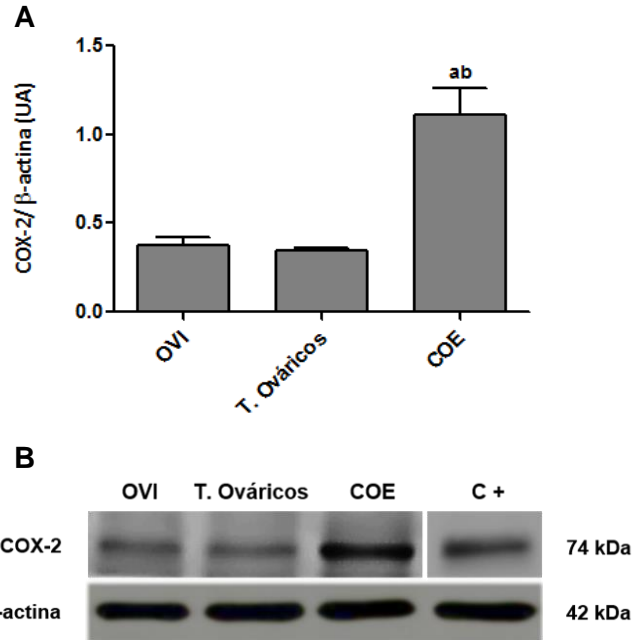
A



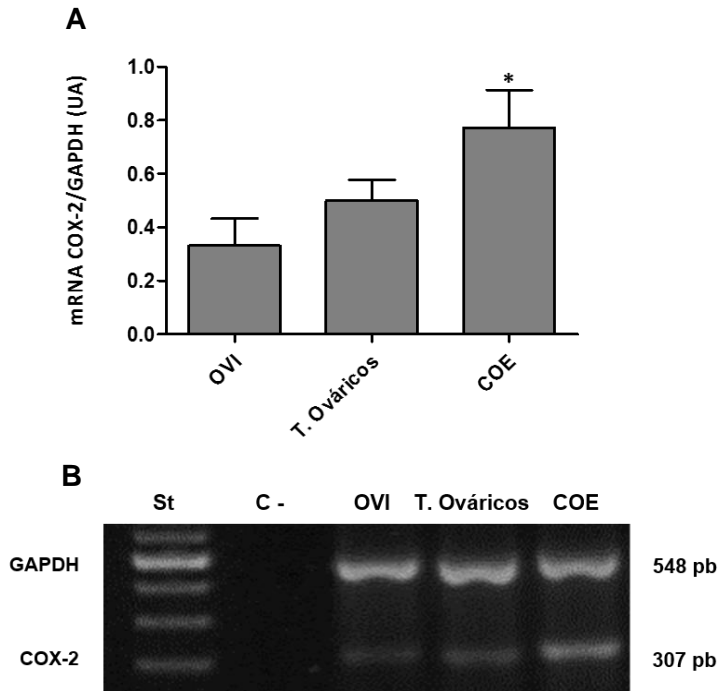


**Figura N°3. Detección de COX-2 en tejidos ováricos mediante inmunohistoquímica. Panel A:** IHQ de COX-2 en OVI: ovario normal inactivo; TBE: tumor benigno; TBO: tumor borderline; COE I: cáncer ovárico epitelial bien diferenciado; COE II: cáncer ovárico epitelial moderadamente diferenciado; COE III: cáncer ovárico epitelial pobremente diferenciado. Las imágenes fueron tomadas con un aumento de 400x. Control negativo: esquina inferior izquierda. Barra: 50  $\mu$ m. **Panel B:** Análisis semi cuantitativo de los niveles de COX-2 en tejidos ováricos. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. a:  $p < 0.001$  vs OVI; b:  $p < 0.001$  vs TBE; c:  $p < 0.01$  vs TBE. n=6 experimentos independientes para cada grupo de estudio.

Tal como se explicó en el análisis estadístico, se obtuvo un  $n = 6$  para los experimentos *ex vivo* y para cada grupo de estudio; sin embargo, para el grupo de COE bien diferenciado o COE I no fue posible obtener el total de muestras necesarias. Por tal motivo, las muestras de COE I, COE II y COE III se agruparon como COE, así como también los tumores benignos y borderline se agruparon como Tumores Ováricos. Al evaluar los niveles de COX-2 en las muestras de tejido ovárico mediante *western blot*, se encontraron mayores niveles proteicos de COX-2 en el grupo COE en comparación al grupo OVI y Tumores Ováricos ( $p < 0.05$ ). En este último grupo, debido a la dispersión de los datos, no se aprecian diferencias entre ambos tipos de tumores ni tampoco respecto del grupo OVI (Fig. N°3). Posteriormente, al evaluar los niveles del transcrito de COX-2, también se encontraron mayores niveles de este mensajero en el grupo COE en comparación al grupo OVI ( $p < 0.05$ ) (Fig. N°4).



**Figura N°4. Determinación de los niveles de COX-2 en tejidos de ovarios por *western blot*.** Panel A: Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en tejidos de ovarios. Panel B: Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las muestras de tejido ovárico. OVI: ovario normal inactivo; T. Ováricos: tumores ováricos; COE: cáncer ovárico epitelial; C+: control positivo. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. a:  $p < 0.05$  vs OVI; b:  $p < 0.05$  vs T. Ováricos. OVI n=4, T. ováricos n=9 y COE n=8 experimentos independientes.

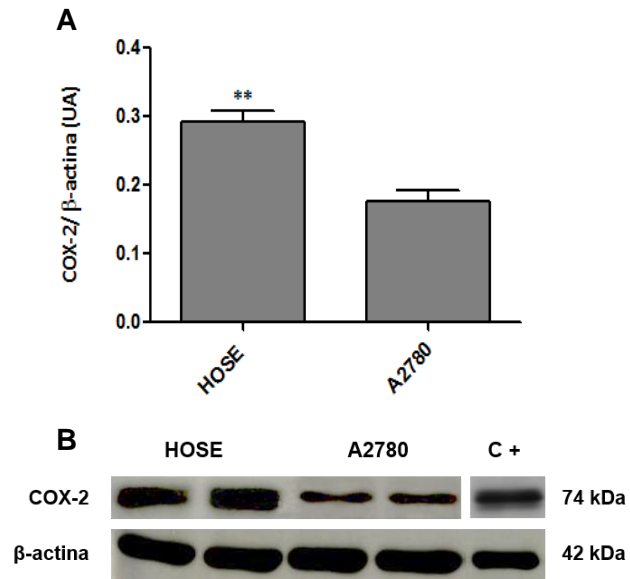


**Figura N°5. Determinación de los niveles de COX-2 en tejidos de ovarios por RT-PCR.** Panel A: Análisis semi cuantitativo de los RT-PCR de COX-2 en tejidos de ovarios. Panel B: Gel representativo de los RT-PCR de COX-2 en las muestras de tejido ovárico. OVI: ovario normal inactivo; T. Ováricos: tumores ováricos; COE: cáncer ovárico epitelial; C-: control negativo. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. \*:  $p < 0.05$  vs OVI. OVI n=3, T. ováricos n=15 y COE n=10 experimentos independientes.

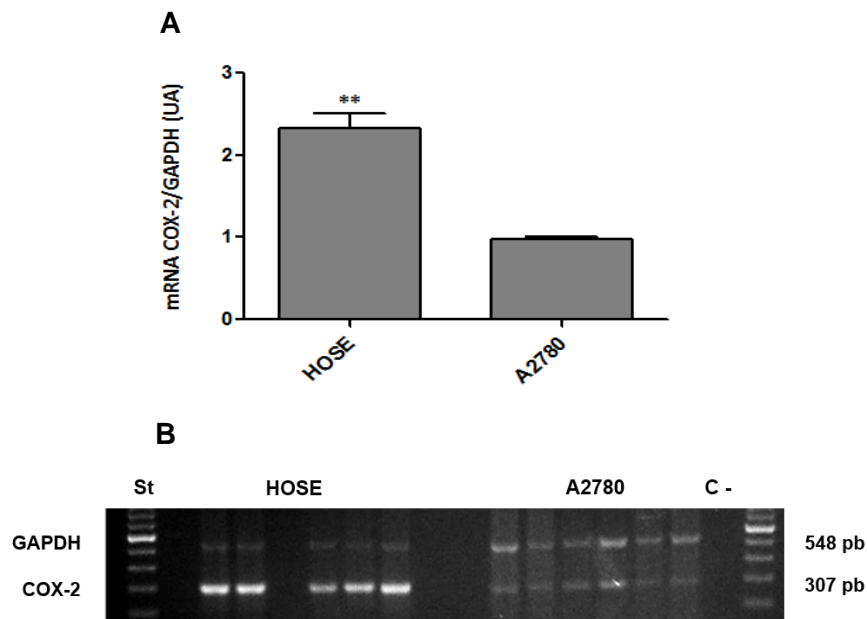
## **VI.2. Objetivo 2. Evaluar si en las líneas celulares HOSE y A2780 se expresa COX-2, y si por efecto de TGF- $\beta$ 1 o NGF aumentan los niveles de COX-2 y PGE<sub>2</sub>**

En condiciones basales, fue interesante observar mayores niveles proteicos de COX-2 en las células HOSE en comparación con la línea celular cancerígena A2780 ( $p < 0.01$ ) (Fig. N°5). Para complementar los resultados anteriores, se procedió a evaluar los niveles del transcrito de COX-2 y, tal como se observó a nivel proteico, se vio que las células HOSE presentan mayores niveles de mensajero respecto de la línea celular cancerígena A2780 ( $p < 0.01$ ) (Fig. N°6). Sin embargo, cuando se realizaron los estímulos con NGF por un periodo de 2 horas, no hubo variación en los niveles proteicos de COX-2 en las células HOSE (Fig. N°7AB); sin embargo, en las células A2780, se encontró un incremento estadísticamente significativo en los niveles de la enzima a 100 y 150 ng/mL de NGF ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente) (Fig. N°7CD). Dado los resultados anteriores, se evaluó si en las células A2780 dicho efecto ocurría también a nivel del transcrito. Efectivamente, el tratamiento con NGF indujo un aumento significativo ( $p < 0.01$ ) en los niveles del mensajero de COX-2 a 100 y 150 ng/mL de NGF (Fig. N°8). Finalmente, al estimular con NGF por un periodo de 24 horas, en ninguna de las líneas celulares se observó una variación significativa en los niveles de la enzima, aunque sí se apreció una disminución en los niveles proteicos respecto de la condición basal (Fig. N°9).

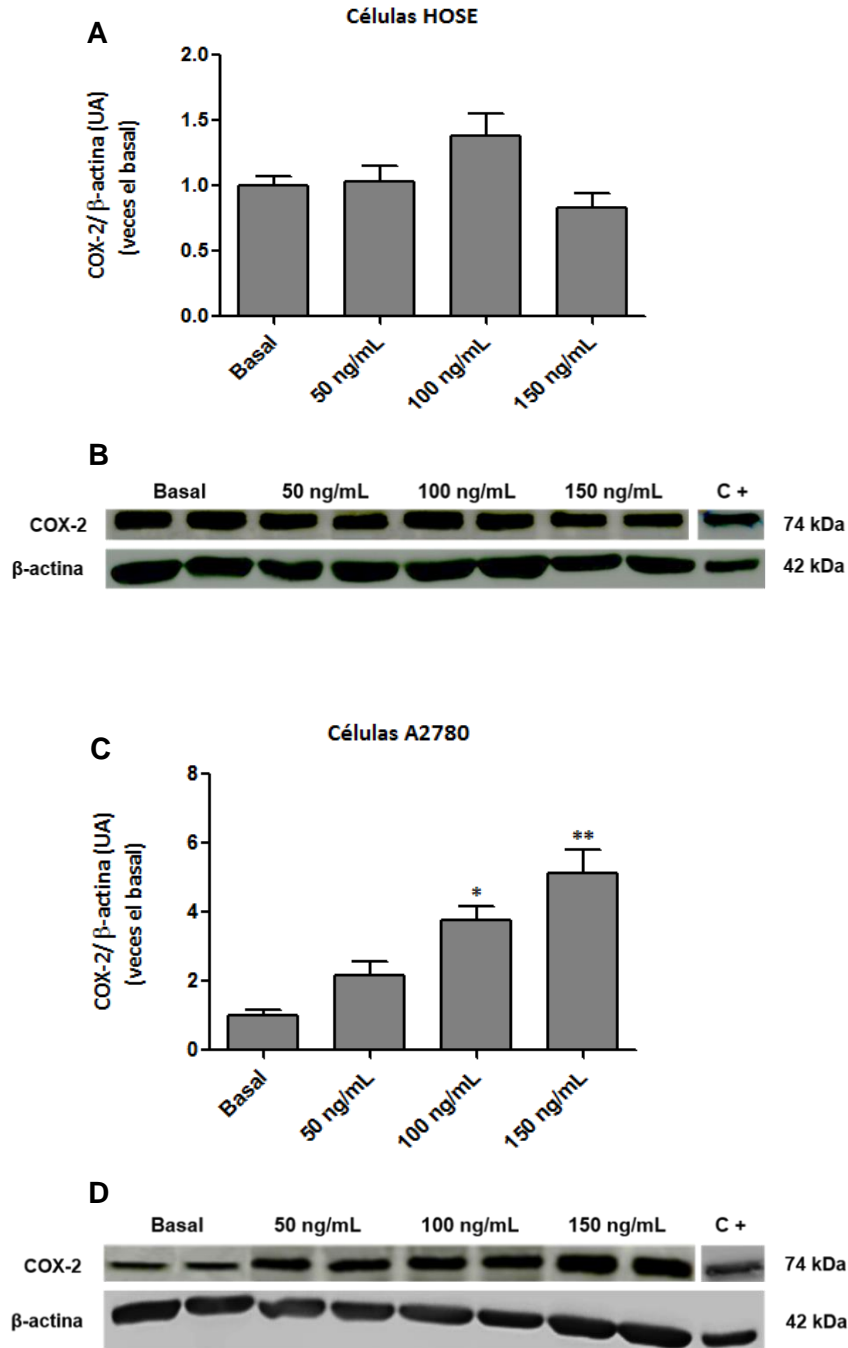




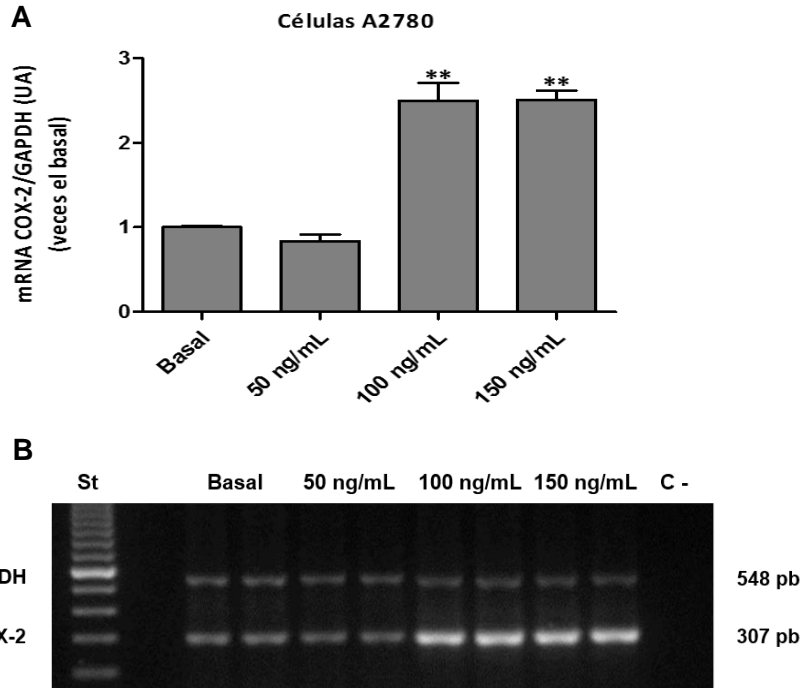
**Figura N°6. Niveles basales de COX-2 en células HOSE y A2780 por western blot.** **Panel A:** Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en las células HOSE y A2780 en condiciones basales. **Panel B:** Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las células HOSE y A2780 en condiciones basales. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. \*\*:  $p < 0.01$  vs A2780.  $n = 4$  experimentos independientes en duplicado.



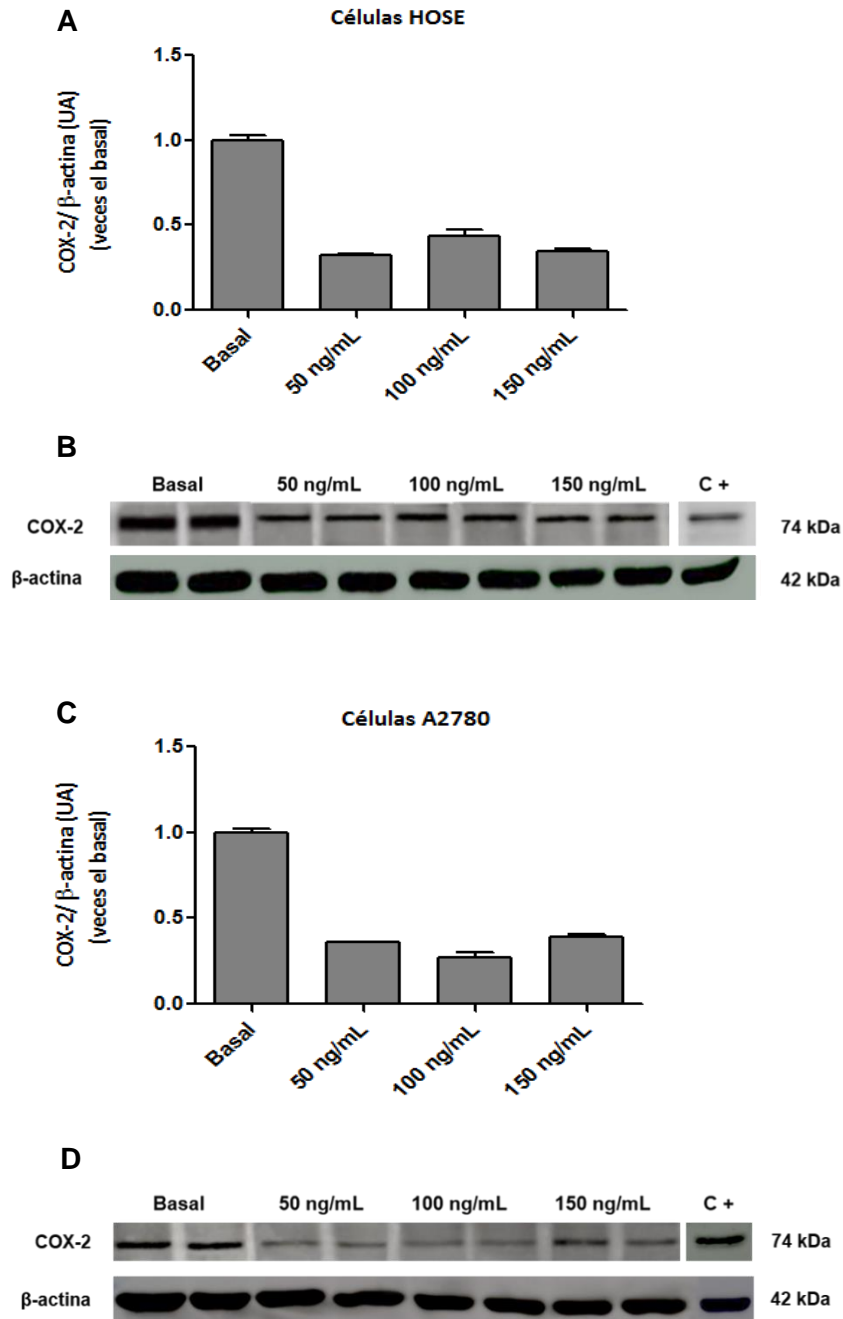
**Figura N°7. Niveles basales de COX-2 en células HOSE y A2780 por RT-PCR.** **Panel A:** Análisis semi cuantitativo de los RT-PCR de COX-2 en las células HOSE y A2780 en condiciones basales. **Panel B:** Gel representativo de los RT-PCR de COX-2 en las células HOSE y A2780 en condiciones basales. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. \*\*:  $p < 0.01$  vs A2780.  $n = 3$  experimentos independientes en duplicado.



**Figura N°8. Niveles de COX-2 en células HOSE y A2780 estimuladas con NGF por 2 horas.** **Panel A:** Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en células las HOSE al ser estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 2 horas. **Panel B:** Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las células HOSE estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 2 horas. **Panel C:** Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en las células A2780 al ser estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 2 horas. **Panel D:** Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las células A2780 estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 2 horas. C+: control positivo. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. \*:  $p < 0.05$  vs basal; \*\*:  $p < 0.01$  vs basal.  $n = 4$  experimentos independientes en duplicado.

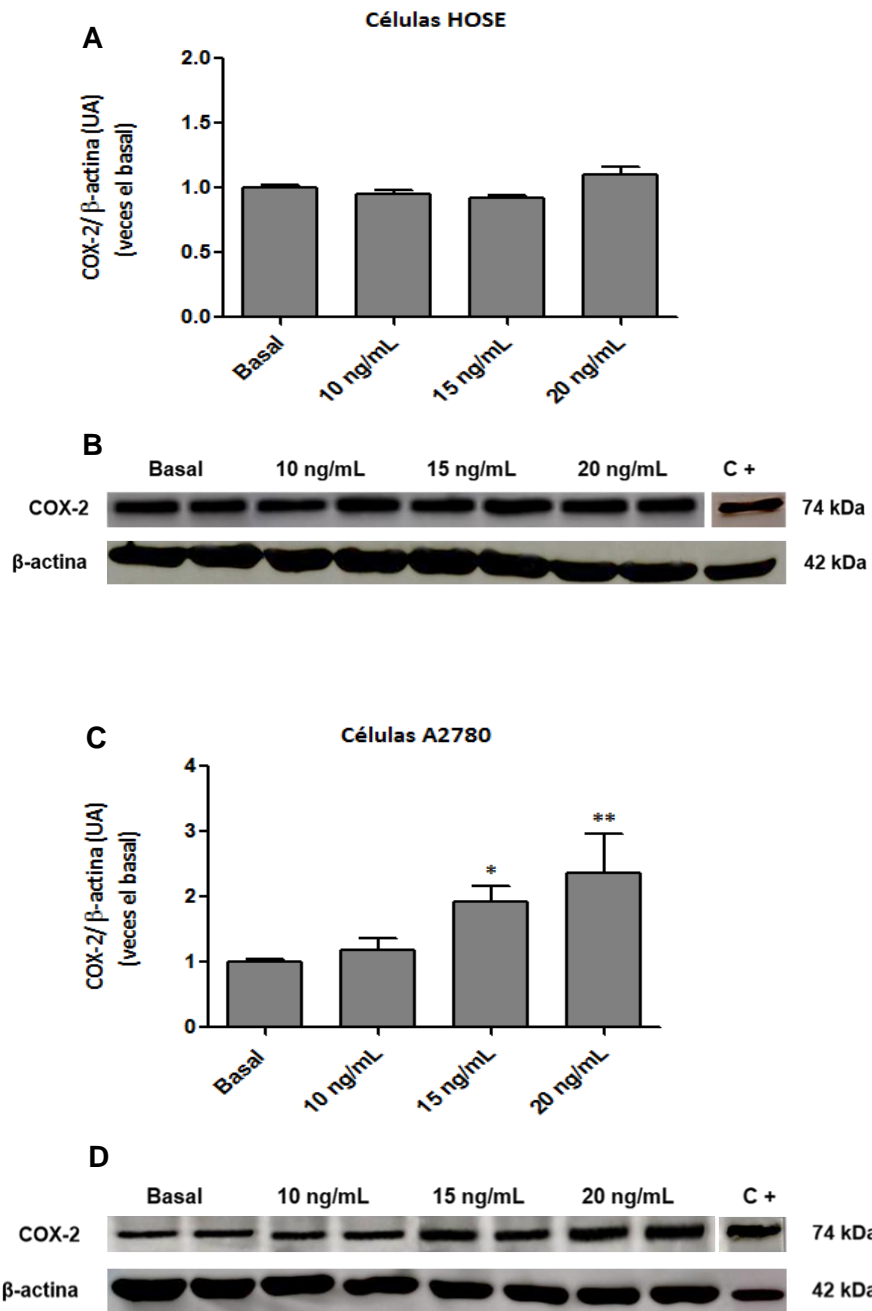


**Figura N°9. Niveles de transcrito de COX-2 en las células A2780 estimuladas con NGF por 2 horas. Panel A:** Análisis semi cuantitativo de los RT-PCR de COX-2 en las células A2780 al ser estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 2 horas. **Panel B:** Gel representativo de los RT-PCR de COX-2 en las células A2780 estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 2 horas. St: estándar de peso molecular. C -: control negativo. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. \*\*:  $p < 0.01$  vs basal.  $n = 4$  experimentos independientes en duplicado.

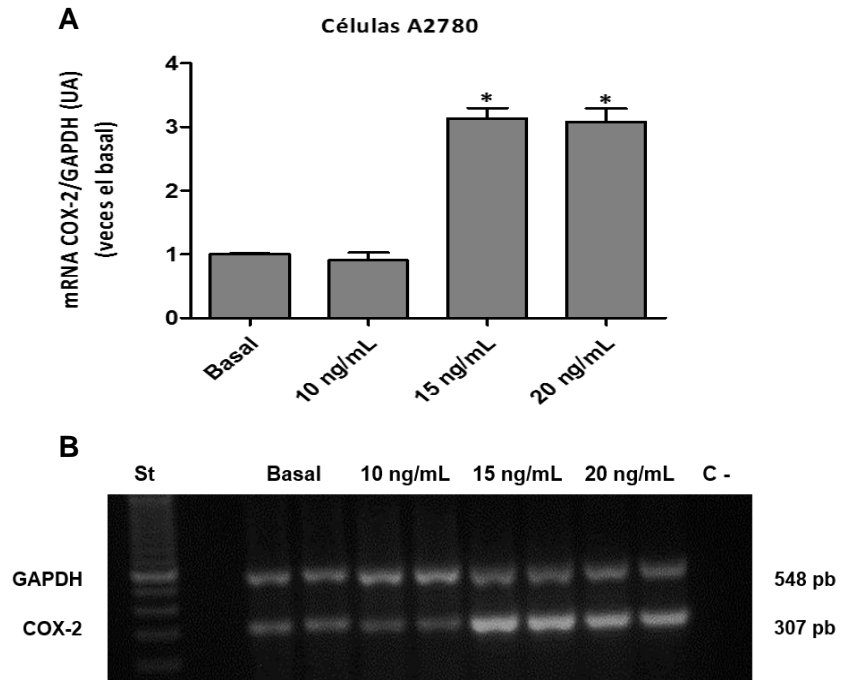


**Figura N°10. Niveles de COX-2 en células HOSE y A2780 estimuladas con NGF por 24 horas. Panel A:** Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en células las HOSE al ser estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 24 horas. **Panel B:** Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las células HOSE estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 24 horas. **Panel C:** Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en las células A2780 al ser estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 24 horas. **Panel D:** Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las células A2780 estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 24 horas. C+: control positivo. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. n=4 experimentos independientes en duplicado.

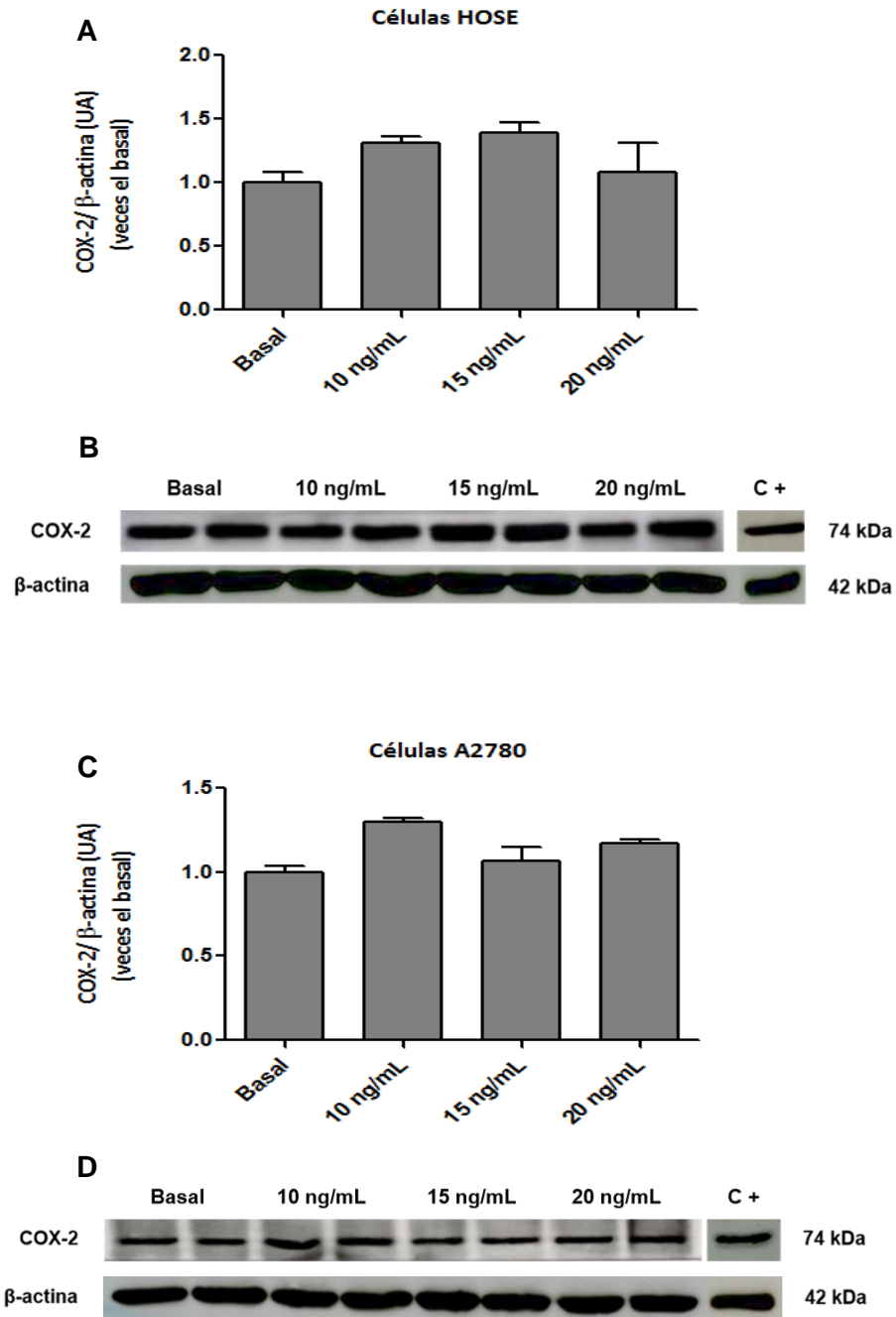
Al realizar los tratamientos con TGF- $\beta$ 1 por un periodo de 2 horas, se observó que en las células HOSE no hubo variación en los niveles proteicos de la enzima (Fig. N°10AB); sin embargo, nuevamente la línea celular cancerígena A2780 fue la única que respondió ante el estímulo, y se encontró un incremento significativo en los niveles proteicos de COX-2 a 15 y 20 ng/mL de TGF- $\beta$ 1 ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$ , respectivamente) (Fig. N°10CD). Posteriormente, debido a que sólo las células A2780 respondieron ante el estímulo, se evaluó si el tratamiento con TGF- $\beta$ 1 modula o no los niveles del mensajero. En efecto, TGF- $\beta$ 1 fue capaz de inducir un aumento significativo en los niveles del transcrito de COX-2 a una concentración de 15 y 20 ng/mL respecto de la condición basal ( $p < 0.05$ ) (Fig. N°11). Por último, cuando se evaluaron los niveles de COX-2 al estimular por un periodo de 24 horas, en ninguna de las líneas celulares se encontraron cambios estadísticamente significativos en los niveles proteicos de la enzima (Fig. N°12).



**Figura N°11. Niveles de COX-2 en células HOSE y A2780 estimuladas con TGF-β1 por 2 horas. Panel A:** Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en células las HOSE al ser estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 2 horas. **Panel B:** Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las células HOSE estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 2 horas. **Panel C:** Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en las células A2780 al ser estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 2 horas. **Panel D:** Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las células A2780 estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 2 horas. C+: control positivo. Los resultados están expresados como el promedio ± error estándar del promedio. \*: p<0.05 vs basal; \*\*: p<0.01 vs basal. n=4 experimentos independientes en duplicado.



**Figura N°12. Niveles de transcrito de COX-2 en las células A2780 estimuladas con TGF-β1 por 2 horas. Panel A:** Análisis semi cuantitativo de los niveles de COX-2 evaluados por RT-PCR en las células A2780 al ser estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 2 horas. **Panel B:** Gel representativo de los RT-PCR de COX-2 en las células A2780 estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 2 horas. St: estándar de peso molecular. C-: control negativo. Los resultados están expresados como el promedio ± error estándar del promedio. \*:  $p < 0.05$  vs basal.  $n = 4$  experimentos independientes en duplicado.

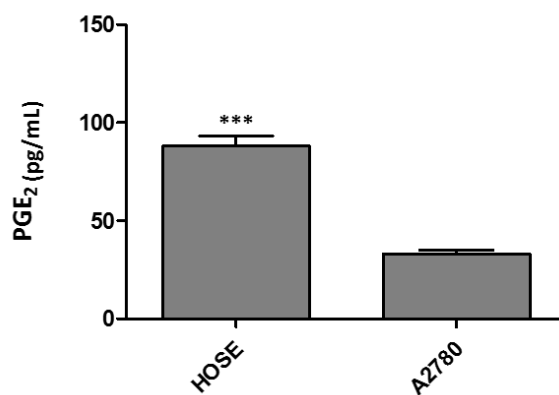


**Figura N°13. Niveles de COX-2 en células HOSE y A2780 estimuladas con TGF-β1 por 24 horas. Panel A:** Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en células las HOSE al ser estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 24 horas. **Panel B:** Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las células HOSE estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 24 horas. **Panel C:** Análisis semi cuantitativo de los *western blot* de COX-2 en las células A2780 al ser estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 24 horas. **Panel D:** Gel representativo de los *western blot* de COX-2 en las células A2780 estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 24 horas. C+: control positivo. Los resultados están expresados como el promedio ± error estándar del promedio. n=4 experimentos independientes en duplicado.

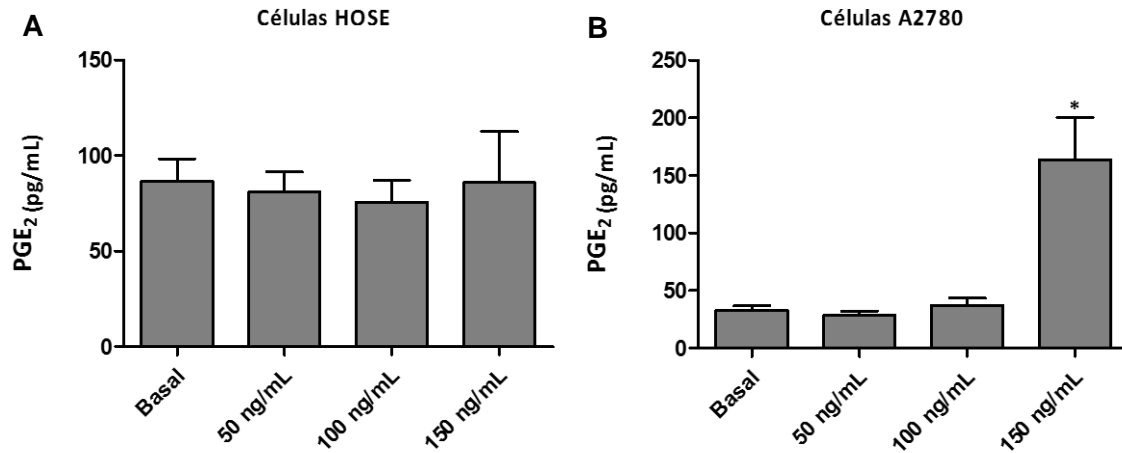


Los niveles de secreción de prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) se midieron mediante un inmunoensayo de competencia, cuya curva estándar dio acorde a lo esperado. Como se observaron cambios significativos a las 2 horas post tratamiento con NGF y TGF-β1, la evaluación de los niveles de secreción de PGE<sub>2</sub> se realizó a dicho tiempo.

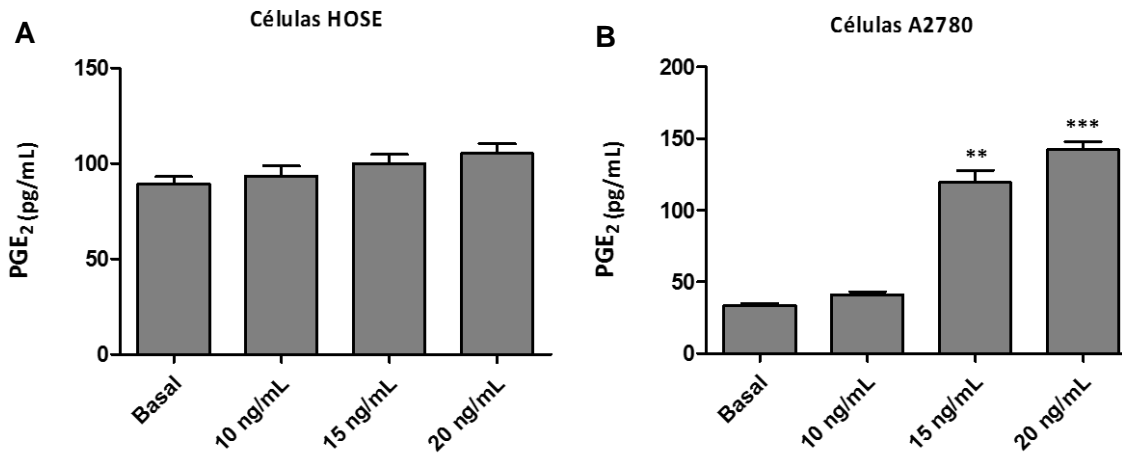
En condiciones basales, se encontró una mayor secreción de PGE<sub>2</sub> en las células HOSE en comparación con la línea celular cancerígena A2780 (p<0.01) (Fig. N°13A), lo cual era lo esperado de acuerdo a los resultados obtenidos mediante *western blot*. Luego, al estimular con NGF, se vio que en las células HOSE no hay cambios en la secreción de PGE<sub>2</sub> (Fig. N°14A), mientras que en las células A2780 se encontró un aumento significativo en la secreción de PGE<sub>2</sub> a 150 ng/mL de NGF (p<0.05) (Fig. N°14B). Por otro lado, al tratar ambas líneas celulares con TGF-β1, sólo en las células A2780 se apreció un incremento significativo en los niveles PGE<sub>2</sub> a 15 y 20 ng/mL de estímulo (Fig. N°15B).



**Figura N°14. Niveles de secreción de PGE<sub>2</sub> en células HOSE y A2780 en condiciones basales.** Los resultados están expresados como el promedio ± error estándar del promedio. \*\*\*: p<0.001 vs A2780. n=8 experimentos independientes en duplicado.



**Figura N°15. Niveles de secreción de PGE<sub>2</sub> en células HOSE y A2780 estimuladas con NGF por 2 horas.**  
**Panel A:** Secreción de PGE<sub>2</sub> en células HOSE estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 2 horas. **Panel B:** Secreción de PGE<sub>2</sub> en células A2780 estimuladas con 50, 100 y 150 ng/mL de NGF por 2 horas. Los resultados están expresados como el promedio ± error estándar del promedio. \*: p<0.05 vs 50 ng/mL. n=4 experimentos independientes en duplicado.



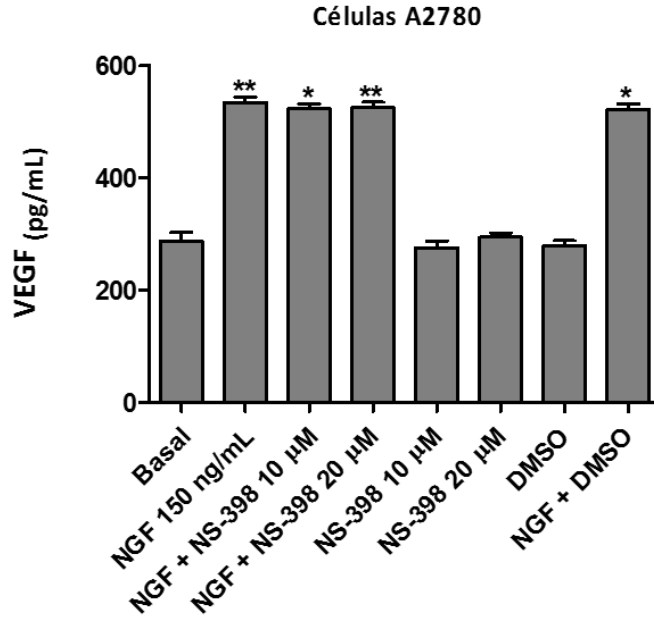
**Figura N°16. Niveles de secreción de PGE<sub>2</sub> en células HOSE y A2780 estimuladas con TGF-β1 por 2 horas.**  
**Panel A:** Secreción de PGE<sub>2</sub> en células HOSE estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 2 horas. **Panel B:** Secreción de PGE<sub>2</sub> en células A2780 estimuladas con 10, 15 y 20 ng/mL de TGF-β1 por 2 horas. Los resultados están expresados como el promedio ± error estándar del promedio. \*\*: p<0.01 vs basal; \*\*\*: p<0.001 vs basal. n=4 experimentos independientes en duplicado.

### **VI.3. Objetivo 3. Evaluar si el aumento en PGE<sub>2</sub>, por efecto de TGF-β1 o NGF, incrementa los niveles de VEGF en las líneas celulares HOSE y A2780.**

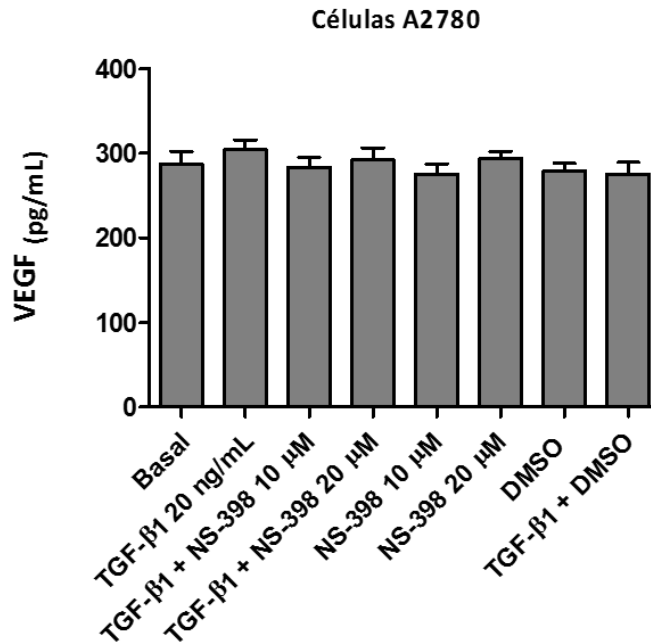
Debido a que sólo la línea celular A2780 aumentó sus niveles de secreción de prostaglandina E<sub>2</sub> tanto por efecto de NGF como de TGF-β1, los tratamientos con el inhibidor NS-398 se llevaron a cabo sólo en esta línea celular. A su vez, los mayores niveles de secreción se observaron con 150 ng/mL de NGF y 20 ng/mL de TGF-β1, de modo que se usaron estas concentraciones para realizar el inmunoensayo de VEGF.

Al realizar los estímulos con NGF, se observa un aumento significativo en los niveles secretados de VEGF en comparación a la condición basal ( $p < 0.01$ ), lo cual era lo esperado ya que en resultados previos en nuestro laboratorio se ha demostrado que NGF es capaz de inducir un incremento en los niveles de VEGF [6]. Posteriormente, al realizar los tratamientos con NS-398 (10 y 20 μM) y NGF, no se observa inhibición en los niveles secretados de VEGF, siendo éstos similares a lo encontrado con NGF solo. Tal como se esperaba, en los tratamientos con DMSO (10 y 20 μL) y NGF se aprecia un aumento importante en la secreción de VEGF en relación a la condición basal ( $p < 0.05$ ) y en niveles similares a lo visto cuando se estimula con NGF (Fig. N°16). Por otro lado, los tratamientos con TGF-β1 no generaron cambios en los niveles secretados de VEGF, observándose niveles similares a la condición basal (Fig. N°17).

Finalmente, los tratamientos solamente con el inhibidor o DMSO no generaron cambios en la secreción de VEGF con respecto a la condición basal.



**Figura N°17. Niveles de secreción de VEGF en células A2780 por efecto de NGF y el inhibidor NS-398.** **NGF + NS-398:** las células fueron tratadas con el inhibidor 1 hora previa a la incubación con NGF durante 2 horas. **NS-398:** las células fueron tratadas solamente con el inhibidor por 3 horas. **DMSO:** las células fueron tratadas solamente con DMSO por 3 horas. **NGF + DMSO:** las células fueron tratadas con DMSO 1 hora previa a la incubación con NGF durante 2 horas. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio. \*:  $p < 0.05$  vs basal; \*\*:  $p < 0.01$  vs basal.  $n = 3$  experimentos independientes en duplicado.



**Figura N°18. Niveles de secreción de VEGF en células A2780 por efecto de TGF-β1 y el inhibidor NS-398.** **TGF-β1 + NS-398:** las células fueron tratadas con el inhibidor 1 hora previa a la incubación con TGF-β1 durante 2 horas. **NS-398:** las células fueron tratadas solamente con el inhibidor por 3 horas. **DMSO:** las células fueron tratadas solamente con DMSO por 3 horas. **TGF-β1 + DMSO:** las células fueron tratadas con DMSO 1 hora previa a la incubación con TGF-β1 por 2 horas. Los resultados están expresados como el promedio  $\pm$  error estándar del promedio.  $n = 3$  experimentos independientes en duplicado.

## VII. DISCUSIÓN

El cáncer ovárico epitelial (COE) constituye la primera causa de muerte por neoplasias ginecológicas en países desarrollados como Canadá, EE.UU y países de Europa occidental [1,2]. Específicamente en Chile, es la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas [3]. La alta mortalidad se explica porque la sintomatología es muy inespecífica, lo que conlleva a que el diagnóstico se haga en estadios avanzados de la enfermedad donde hay un gran compromiso funcional del ovario y, por lo tanto, una pobre respuesta a la terapia [2,4]. Debido a lo anterior, es necesario investigar y entender los mecanismos que subyacen tanto en la génesis como en el desarrollo de esta neoplasia.

Dentro de las teorías que tratan de explicar la génesis y el desarrollo del COE, están los procesos inflamatorios. Esta teoría postula que durante la ruptura de los folículos maduros, producto de la ovulación, y la consiguiente proliferación de las células epiteliales como mecanismo reparativo, se genera un proceso inflamatorio mediado por citoquinas y moléculas pro-inflamatorias. Este proceso inflamatorio se ha asociado a un mayor riesgo de desarrollar cáncer ovárico epitelial [1,5].

En los últimos años, mucho se ha publicado en relación a la sobreexpresión de COX-2 en una gran variedad de neoplasias, incluyendo cáncer de colon, estómago, mama, pulmón, esófago, páncreas, vejiga, próstata y de células escamosas bucal [48]. Hoy en día, hay varios trabajos donde se ha estudiado la

expresión de COX-2 en cáncer de ovario. En algunos trabajos se ha reportado que no hay expresión de COX-2 en tumores ováricos; mientras que otros trabajos sí han encontrado una alta expresión de esta enzima tanto en tumores malignos como benignos [43]. En esta tesis, se analizaron 36 muestras de pacientes, de las cuales 6 corresponden a Ovario Inactivo; 6 a Tumor Benigno; 6 a Tumor Borderline; 6 a COE de grado I o bien diferenciado; 6 a COE de grado II o moderadamente diferenciado y 6 a COE de grado III o pobremente diferenciado. La inmunodetección de los niveles de COX-2 mediante inmunohistoquímica se observa a nivel citoplasmático; sin embargo, se ha descrito que la localización subcelular de esta enzima es nuclear [37,38]. A pesar de esto último, otros investigadores también han observado inmunotinción citoplasmática de COX-2 en otros tejidos, por lo tanto, lo encontrado en este trabajo es concordante con lo publicado por estos autores [54,55]. Además, se aprecia una sobreexpresión de esta enzima en todas las muestras de cáncer (2.6 veces vs OVI) y de tumor borderline (2 veces vs OVI), por lo que las discrepancias vistas en este trabajo respecto de los ya mencionados pueden deberse a varios factores como el tamaño muestral, el tipo histológico de las muestras, la metodología empleada o los distintos métodos de semi-cuantificación utilizados. Los resultados obtenidos mediante esta técnica se conciben con lo visto mediante *western blot*, donde se aprecian mayores niveles de COX-2 en el grupo COE en comparación al grupo Ovario Inactivo; no obstante, en el grupo de Tumores Ováricos, no se aprecian mayores niveles de la enzima en las muestras de tejido de tumor borderline respecto del grupo OVI como se observa en la inmunohistoquímica. Lo anterior puede deberse al hecho

que en la inmunohistoquímica la semi-cuantificación se hace específicamente en el epitelio, mientras que en el *western blot* la inmunodetección de COX-2 se hace en varios tipos celulares, de modo que en esta última técnica no se aprecia del todo los niveles proteicos de esta enzima a nivel epitelial. Con el objetivo de complementar los resultados anteriores, se evaluaron los niveles de mRNA de COX-2 en las distintas muestras de tejido ovárico, donde se aprecia que los niveles del transcrito son mucho mayores en las muestras de cáncer en comparación a las muestras de ovario inactivo. Estos resultados son similares a lo encontrado por otros trabajos, donde demostraron que en cáncer papilar de tiroides, gástrico, colorectal y de pulmón hay mayores niveles del transcrito de COX-2 en relación a las muestras de tejido normal [49, 50, 51, 52]. Estos resultados son interesantes, puesto que la sobreexpresión de COX-2 se ha tratado de correlacionar con distintas variables clínico-patológicas como la edad del paciente, tamaño del tumor, estadio (según la clasificación FIGO), tipo y grado histológico, etc. [48, 53, 54, 55]

En relación al grado histológico, éste da cuenta de la rapidez con la que probablemente crecerá y se extenderá el tumor y, por ende, de la agresividad de éste mismo [56]. En este trabajo, a pesar de que no son estadísticamente significativos, se aprecian mayores niveles proteicos de COX-2 en el cáncer pobremente diferenciado respecto del bien diferenciado. Estos resultados son similares a lo descrito en otros trabajos donde, en muestras de cáncer endometrial y de esófago de células escamosas, observaron mayores niveles proteicos de COX-2 en las muestras de cáncer pobremente diferenciado [54,55]. Estos resultados tienen sentido considerando que, en algunos tipos de cáncer,

la sobreexpresión de COX-2 se ha correlacionado con una mayor resistencia a la quimioterapia [48] y a una baja supervivencia del paciente [53,55], características que, a su vez, le confieren una alta mortalidad al cáncer ovárico epitelial [3].

En relación a las líneas celulares de ovario estudiadas en este trabajo, se observan altos niveles de COX-2 a nivel de mensajero y proteína en las células HOSE, lo cual era lo esperado puesto que esta enzima, a pesar de que es inducible, es constitutiva en el aparato reproductor femenino [38]. Por el contrario, los niveles basales de COX-2 en la línea celular A2780 son bajos y significativamente menores en comparación con la línea celular HOSE. Al evaluar los niveles basales de secreción de PGE<sub>2</sub>, nuevamente se aprecia una mayor secreción por parte de las células HOSE respecto de las células A2780, lo que se condice con los resultados obtenidos mediante *western blot*. A pesar de que estos resultados se contraponen con lo esperado, se condicen con lo reportado en otras publicaciones. En cáncer prostático, observaron mayores niveles proteicos y de mensajero de COX-2 en las células epiteliales de próstata en comparación a lo visto en tres líneas celulares de cáncer [57]. Específicamente en cáncer de ovario, hay un trabajo que evaluó los niveles de mRNA de COX-2 en las células HOSE y líneas celulares de cancer SKOV-3, BG-1 y PEO-4, y encontraron que los niveles de transcritos en las células HOSE son hasta tres veces mayores en comparación con las líneas celulares de cancer [58]. Por otro lado, otro grupo evaluó los niveles proteicos de COX-2 en las líneas celulares de cáncer ovárico A2780, OVCAR4, OVCAR8, OVCAR10 y OVCAR5, y encontraron que sólo en estas últimas células hay expresión de



COX-2 [59]. Sin embargo, los resultados en este trabajo son similares a lo publicado por otros investigadores donde observaron una baja expresión de COX-2 en las células A2780 y OVCAR3 [60]. Estos autores sugieren que, probablemente, las células cancerígenas no expresan COX-2 con el objeto de disminuir la inflamación y, por consiguiente, evadir la respuesta inmune. A su vez, plantean la posibilidad de que las líneas cancerígenas de ovario pueden contener enzimas que convierten la  $PGH_2$ , el producto de reacción catalizada por COX-2, en otras prostaglandinas y tromboxanos, cuya actividad son desfavorables para el crecimiento de las células cancerígenas ováricas y, por ende, la progresión tumoral. Por lo tanto, al haber una baja o nula expresión de COX-2, se favorecería el crecimiento del tumor [59]. Lo anterior podría explicar por qué, en condiciones basales, las células A2780 presentan bajos niveles de COX-2 y  $PGE_2$  en relación a las células HOSE. Sin embargo, es importante destacar la diferencia en cuanto a los niveles proteicos de COX-2 en las muestras de tejido de cáncer respecto de lo visto en las células A2780. En las publicaciones ya citadas, también se aprecia esta discordancia entre el tejido y las líneas celulares, por lo que se condice con lo observado en este trabajo a pesar de que no era lo esperado. Hay que señalar que en tejido las células epiteliales se encuentran en un microambiente determinado donde están bajo los estímulos de muchas células adyacentes como las células del estroma, endotelio, etc. Por otro lado, las líneas celulares son capaces de secretar determinados factores de crecimiento que, a su vez, pueden ejercer tanto un efecto autocrino como paracrino, sin embargo, no están sometidas al mismo microambiente que en el tejido ni tampoco bajo los estímulos de las células ya

mencionadas. Considerando esto último, no es extraño observar diferencias entre ambos modelos de estudio.

En relación a los tratamientos realizados en este trabajo, sólo en la línea celular cancerígena se vio un aumento en los niveles de COX-2, tanto a nivel proteico como de mRNA, y de PGE<sub>2</sub> por efecto de NGF. No obstante, a las 24 horas se pierde el efecto y los niveles de la proteína disminuyen por debajo de los niveles basales. Esto podría explicarse por una desensibilización de los receptores junto a un aumento en la tasa de degradación de la proteína, una inhibición en la expresión del gen o de la traducción del mensajero, etc. Notablemente, a pesar de que las células A2780 presentan niveles bastante bajos de COX-2 en condiciones basales, son capaces de responder ante el tratamiento con esta neurotrofina. Estos resultados se condicen con lo publicado por otros investigadores, donde trabajaron con células NIH-3T3 transfectadas con un plasmidio que contenía la secuencia del promotor de COX-2 y del gen de la luciferasa. Al estimular con NGF a concentraciones similares a las usadas en este trabajo, los investigadores observaron un aumento significativo en la actividad reportera [39]. Junto con lo anterior, trabajaron con células de la teca de ovario bovino que fueron tratadas con NGF, y observaron un incremento significativo en la secreción de PGE<sub>2</sub> respecto de aquellas células no tratadas. Además, los investigadores demostraron que el efecto de NGF sobre la actividad reportera y la secreción de prostaglandina E<sub>2</sub> ocurren solamente cuando dichas células expresan el receptor de alta afinidad TRKA [39]. Lo anterior explicaría por qué sólo las células A2780 responden ante NGF, puesto

que en nuestro laboratorio se ha demostrado que las células A2780 presentan niveles significativamente mayores del receptor TRKA y p-TRKA, su forma activa, en comparación con las células HOSE [61]. Lo anterior también se ha observado en tejido, donde las células epiteliales de las muestras de ovario inactivo presentan una baja inmunodetección de TRKA y p-TRKA en relación a lo observado en las muestras de cáncer ovárico epitelial [35].

Por otro lado, se sabe que NGF puede unirse a su receptor de baja afinidad P75, el cual es capaz de activar el factor transcripcional NF- $\kappa$ B. Estudios en líneas celulares de cáncer gástrico humano han demostrado que el aumento en los niveles de COX-2 está mediado vía NF- $\kappa$ B [62], sin embargo, resultados previos no publicados en nuestro laboratorio han demostrado que no hay variaciones en los niveles de NF- $\kappa$ B por efecto de NGF [63]. Lo anterior apoya la idea de que el efecto de NGF sobre los niveles de COX-2 y PGE<sub>2</sub>, exclusivamente en las células A2780, se puede deber a los mayores niveles del receptor TRKA en estas células.

Respecto de los tratamientos con TGF- $\beta$ 1, nuevamente las células A2780 fueron las únicas que respondieron ante el estímulo, observándose un aumento en los niveles de mRNA y proteína de COX-2 así como también de PGE<sub>2</sub>. Sin embargo, este efecto no se aprecia a las 24 horas, lo que podría explicarse nuevamente por una desensibilización de los receptores. El hecho que las células HOSE no hayan respondido al tratamiento tiene sentido teniendo en cuenta que TGF- $\beta$ 1 posee un efecto anti proliferativo y de inducir la apoptosis en las células epiteliales, mientras que COX-2 posee efectos totalmente

contrarios. Teniendo en cuenta esto, tiene sentido que los estímulos con este factor de crecimiento no promuevan un aumento en los niveles de esta enzima. Considerando los antecedentes previos, se sabe que en cáncer la vía canónica de TGF- $\beta$  se encuentra desregulada y, en relación a esto, como resultados aún no publicados en nuestro laboratorio se ha visto que las células A2780 presentan menores niveles proteicos del receptor tipo I de TGF- $\beta$  respecto de las células HOSE; no obstante, la línea cancerígena presenta mayores niveles proteicos de la forma activa de Smad 2 y 3, en comparación con las células HOSE [28]. Lo anterior podría explicar por qué sólo las células cancerígenas responden ante el tratamiento con TGF- $\beta$ 1, puesto que, a pesar de presentar bajos niveles del receptor tipo I de TGF- $\beta$ , en estas células habría mayor formación de complejos transcripcionales tipo Smad. Sin embargo, lo anterior no descarta la posibilidad que la desregulación de la vía también esté río abajo de las proteínas Smad, por lo tanto, hay que considerar que TGF- $\beta$ 1 puede estar activando otras vías no canónicas para llevar a cabo su acción. En relación a esto último, se ha descrito que TGF- $\beta$ 1 puede inducir un aumento en los niveles de COX-2 y PGE<sub>2</sub> a través de la activación de ERK1/2, p38MAPK y PI3K en células mesangiales humanas [64]. Además, se ha reportado que en células de cáncer gástrico humano, el aumento en los niveles de COX-2 está mediado vía NF- $\kappa$ B [62], factor transcripcional que, como se ha descrito en la literatura, puede ser activado por TGF- $\beta$ 1 [65].

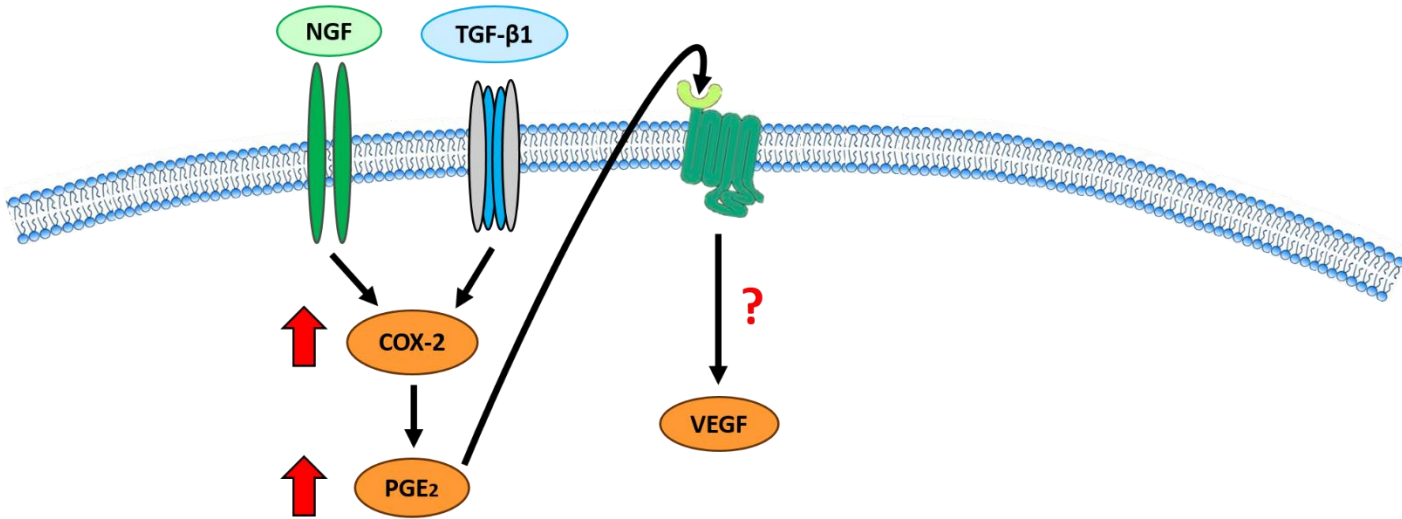
En relación a los niveles de VEGF secretados ante los diferentes tratamientos, NGF produjo un aumento importante en la secreción de VEGF respecto de la condición basal, acorde a lo demostrado por nuestro laboratorio en trabajos ya publicados [6]. Por su parte, los tratamientos con NS-398 (inhibidor de COX-2) junto a NGF no generaron una disminución en la secreción de VEGF como se esperaba, observándose niveles de VEGF similares al tratamiento con NGF. Cabe la posibilidad que en nuestro modelo de estudio se requiera de concentraciones mayores de NS-398, sin embargo, las concentraciones y el tiempo de inhibición usados en este trabajo son las mismas que se han utilizado en otras publicaciones, donde han observado una disminución significativa en los niveles de PGE<sub>2</sub> [46,47]. Por lo tanto, estos resultados sugieren que COX-2 y, por ende, PGE<sub>2</sub> no estarían mediando el efecto de NGF sobre la secreción de VEGF. Dado que NS-398 es un inhibidor de la actividad enzimática, sería interesante utilizar un siRNA de COX-2, con el objetivo de complementar los resultados anteriores y, por consiguiente, hacer un análisis más acabado. Junto con lo anterior, los tratamientos con TGF-β1 no generaron cambios en la secreción de VEGF respecto de la condición basal, de modo que, en las células A2780, TGF-β1 debe estar modulando otros efectos. El hecho de que PGE<sub>2</sub> no esté modulando los niveles de VEGF, ya sea por efecto de NGF o TGF-β1, no es extraño teniendo en cuenta todos los antecedentes sobre los procesos que modula este prostanoide en cáncer, como proliferación, migración, invasión y sobrevida [37, 38, 42]. En la literatura, se ha reportado que NGF promueve procesos de sobrevida, proliferación, migración e invasión celular en varios tipos de cáncer como mama, próstata, páncreas y piel [66]. Adicionalmente, se ha

demostrado que TGF- $\beta$ 1 induce la migración, invasión y evasión de la apoptosis en cáncer de próstata, mama y pulmón [67]. Por lo tanto, el aumento en los niveles de COX-2 y PGE<sub>2</sub>, por efecto de ambos factores de crecimiento, podría estar promoviendo la tumorigénesis a través de los procesos mencionados anteriormente.

## VIII. CONCLUSIONES

Considerando los resultados de los experimentos *ex vivo* de este trabajo, se puede concluir que COX-2 podría estar jugando un rol importante en la progresión del cáncer ovárico epitelial. En el estudio *in vitro*, la línea celular de cáncer ovárico epitelial A2780 es un buen modelo del epitelio de estos tejidos en cuanto a la expresión de NGF, TRKA y VEGF. Debido a que estas células presentan altos niveles de TRKA, así como también receptores para TGF- $\beta$ , responden adecuadamente a los tratamientos con NGF o TGF- $\beta$ 1. Por lo tanto, esta línea celular es un buen modelo para estudiar la expresión de COX-2. Tanto los resultados *ex vivo* como *in vitro* sugieren que estas moléculas inflamatorias (COX-2 y PGE<sub>2</sub>) estarían involucradas en la carcinogénesis ovárica. Además, esta prostaglandina podría estar modulando otros procesos como proliferación, sobrevivencia, migración o invasión celular, puesto que se sabe que este prostanoide es capaz de mediar dichos procesos en otros tipos de cáncer.

## MODELO FINAL



**Figura N°19. Modelo final en líneas celulares de cáncer ovárico.**

Modelo final considerando los resultados obtenidos en este trabajo. NGF: factor de crecimiento nervioso; TGF-β1: factor de crecimiento transformante beta 1; COX-2: ciclooxigenasa 2; PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.



## **IX.- PROYECCIONES**

Estos resultados sugieren la importancia del rol que tiene COX-2 en la carcinogénesis ovárica e insta a que, a futuro, se evalúe la participación de esta enzima en otros procesos como la sobrevida, invasión o proliferación celular. A su vez, sería importante determinar a través de qué vía de señalización PGE<sub>2</sub> estaría mediando tales procesos. Además, sería interesante evaluar cuál de todos los receptores de prostaglandina E<sub>2</sub> están presentes en las células A2780, puesto que cada uno de estos receptores activa diferentes vías de señalización y, por ende, promueve distintas respuestas biológicas. Dilucidar lo anterior, implicaría tener un mejor entendimiento de los mecanismos que subyacen esta patología y permitiría proponer nuevos blancos terapéuticos que permitan mejorar la sobrevida de las pacientes que, en el 25% de los casos, no supera los 5 años de sobrevida a partir del diagnóstico.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Bryan T Hennesy, Robert L Coleman, Maurie Markman. (2009) Ovarian Cancer. *The Lancet*. Vol. 374: 1371-1382
- 2.- Jemal A, Bray F, Center M, Ferlay Jacques, Ward E, Forman D. (2011) Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* Vol. 61: 69-90
- 3.- Ministerio de Salud del Gobierno de Chile. (2004) Programa Nacional del Cáncer. Documento descargado desde <http://www.redsalud.gov.cl/archivos/cancer/prcancernino.pdf>, al 10-05-2010
- 4.- Bast RC Jr, Hennesy B, Mills GB. (2009) The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nat. Rev. Cancer*. Vol. 6: 415-428
- 5.- Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL. (2006) At the Cutting Edge. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Mol. Cell. Endocrinol.* Vol. 247: 4–21
- 6.- Campos X, Muñoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheimer C, Lara HE, Romero C. (2007) Nerve growth factor and its high-affinity receptor TrKA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* Vol. 104 (1): 168-175
- 7.- Hartge, P. (2010) Designing Early Detection Programs for Ovarian Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* Vol. 102 (1): 3-4
- 8.- Kyle Bauckman, Christie Campla and Meera Nanjundan. (2012) Dysregulated TGF $\beta$  signaling in ovarian cancer. *Ovarian Cancer-Basic Science Perspective*. Chapter 7: 121-138.
- 9.- Peter M. Siegel and Joan Massagué. (2003) Cytostatic and apoptotic action of TGF- $\beta$  in homeostasis and cancer. *Nat. Rev. Cancer*. Vol. 3: 807-21
- 10.- Goumans, M. J. *et al.* (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors. *EMBO J.* Vol. 21: 1743-1753
- 11.- Lee, M.S. *et al.* (1995) Accumulation of extracellular matrix and developmental dysregulation in the pancreas by transgenic production of transforming growth factor- $\beta$ 1. *Am. J. Pathol.* Vol. 147: 42-52
- 12.- Ko, T.C. *et al.* (1998) TGF- $\beta$ 1 effects on proliferation of rat intestinal epithelial cells are due to inhibition of cyclin D1 expression. *Oncogene*. Vol. 16: 3445-3454

- 13.- Shull, M.M. *et al.* (1992) Targeted disruption of the mouse transforming growth factor- $\beta$ 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature*. Vol. 359: 693-699
- 14.- Kulkarni, A.B. *et al.* (1993) Transforming growth factor- $\beta$ 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *Proc. Natl Acad. Sci.* Vol. 90: 770-774
- 15.- Lu, S.L., Zhang, W.C., Akiyama, Y., Nomizu, T. and Yuasa, Y. (1996) Genomic structure of the transforming growth factor  $\beta$  type II receptor genes and its mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancers. *Cancer Res.* Vol. 56: 4595-4598
- 16.- Grady, W.M. *et al.* (1999) Mutational inactivation of transforming growth factor  $\beta$  receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res.* Vol. 59: 320-324
- 17.- Myeroff, L.L. *et al.* (1995) A transforming growth factor  $\beta$  receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res.* Vol. 55: 5545-5547
- 18.- Chen, T., Carter, D., Garrigue-Antar, L. and Reiss, M. (1998) Transforming growth factor  $\beta$  type I receptor kinase mutant associated with metastatic breast cancer. *Cancer Res.* Vol. 58: 4805-4810
- 19.- Goggins, M. *et al.* (1998) Genetic alterations of the transforming growth factor  $\beta$  receptor genes in pancreatic and biliary adenocarcinomas. *Cancer Res.* Vol. 58: 5329-5332
- 20.- Miyaki, M. *et al.* (1999) Higher frequency of *Smad4* gene mutation in human colorectal cancer with distant metastasis. *Oncogene. Res.* Vol. 18: 3098-3103
- 21.- Uchida, K. *et al.* (1996) Somatic *in vivo* alterations of the *JV18-1* gene at 18q21 in human lung cancers. *Cancer Res.* Vol. 56: 5583-5585
- 22.- Eppert, K. *et al.* (1996) *MADR2* maps to 18q21 and encodes a TGF $\beta$ -regulated MAD-related protein that is functionally mutated in colorectal carcinoma. *Cell.* Vol. 86: 543-552
- 23.- Henriksen R., Gobl A., Wilander E., Oberg K., Miyazono K. and Funa K.. (1995) Expression and prognostic significance of TGF-beta isotypes, latent TGF-beta 1 binding protein, TGF-beta type I and type II receptors, and endoglin in normal ovary and ovary neoplasms. *Lab. Invest.* Vol. 73: 213-220

- 24.- Bristow R.E., Baldwin R.L., Yamada S.D., Korc M. and Karlan B.Y. (1999) Altered expression of transforming growth factor-beta ligands and receptors in primary and recurrent ovarian carcinoma. *Cancer*. Vol 85: 658-668
- 25.- Santin A.D., Bellone S., Ravaggi A., Roman J., Smith C.V., Pecorelli S., Cannon M.J. and Parham G.P. (2001) Increased levels of interleukin-10 and transforming growth factor -beta in the plasma and ascitic fluid of patients with advanced ovarian cancer. *Bjog*. Vol. 108: 804-808
- 26.- Zeinoun Z., Teugels E., De Bleser P.J., Neyns B., Geerts A. and De Greve J. (1999) Insufficient TGF-beta 1 production inactivates the autocrine growth suppressive circuit in human ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res*. Vol. 19: 413-420
- 27.- Hu W., Wu W., Nash M.A., Freedman R.S., Kavanagh J.J. and Verschraegen C.F. (2000) Anomalies of the TGF-beta postreceptor signaling pathway in ovarian cancer cell lines. *Anticancer Res*. Vol. 20: 729-733
- 28.- Karla Kohan. (2015) Participación de dihidrotestosterona (DHT) y su relación con TGF-β1 en el proceso de proliferación celular y en la expresión de factores angiogénicos en células de cancer de ovario epitelial. Tesis de Doctorado en Bioquímica. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.
- 29.- Woszczycka-Korczyńska I, Lewin-Kowalik J, Górka D, Olakowska E. (2006) Neutrophins in biology and medicine. *Pol. Merkur Lekarski*. Vol. 20(119): 602-5
- 30.- Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B, Ojeda SR, Lara HE, Romero C. (2006) Nerve growth factor-dependent activation of TrKA receptors in the human ovary results in synthesis of FSH receptors and estrogen secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. Vol. 91: 2396–2403
- 31.- Allard S, Leon WC, Pakavathkumar P, Bruno MA, Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. (2012) Impact of the NGF maturation and degradation pathway on the cortical cholinergic system phenotype. *J. Neurosci*. Vol. 8: 2002-2012.
- 32.- Reichardt LF. (2006) Neurotrophin-regulated signalling pathways. *Phil. Trans. R. Soc. B*. Vol. 36: 1545-1564.
- 33.- Julio-Pieper M, Lozada P, Tapia V, Miranda C, Vantman D, Ojeda SR, 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 and Metabolism*. Vol. 94(8): 3065-3071

- 34.- Brustmann H., Naude S. (2002) Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Serous Ovarian Carcinoma: Relationship with High Mitotic Activity and High FIGO Stage. *Gynecologic Oncology*, vol. 52: 47-52.
- 35.- Tapia V, Gabler F, Muñoz M, Yazigi R, Paredes A, Selman A, Vega M, Romero C. (2011) Tyrosine kinase A receptor (TrKA): a potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. Vol. 121 (1): 13-23
- 36.- Carol A. Rouzer and Lawrence J. Marnett. (2009) Cyclooxygenases: structural and functional insights. *Journal of lipid research*. Vol. 50: S29-S34
- 37.- Ikuo Morita. (2002) Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins & other lipid mediators*. Vol. 68-69: 165-175
- 38.- J. R. Vane, Y. S. Bakhle, and R. M. Botting. (1998) Cyclooxygenases 1 and 2. Vol. 38: 97-120
- 39.- Dissen GA, Parrott JA, Skinner MK., Hill DF, Costa ME and Ojeda SR. (2000) Direct effects of nerve growth factor on thecal cells from antral ovarian follicles. *Endocrinology*. Vol. 141 (12): 4736-4750
- 40.- Kinji Tada, Makoto Murakami, Terumi Kambe, and Ichiro Kudo. (1998) Induction of cyclooxygenase-2 by secretory phospholipases A<sub>2</sub> in nerve growth factor-stimulated rat serosal mast cells is facilitated by interaction with fibroblasts and mediated by a mechanism independent of their enzymatic functions. *J. Immunol*. Vol. 161 (9): 5008-5015
- 41.- A Rodríguez-Barbero, F Dorado, S Velasco, A Pandiella, B Banas and JM López-Novoa. (2006) TGF- $\beta$ 1 induces COX-2 expression and PEG<sub>2</sub> synthesis through MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells. *Kidney International*. Vol. 70: 901-909
- 42.- BaoHan T. Vo, Derrich Morton, Jr., Shravan Komaragiri, Ana C. Millena, Chelesie Leath, and Shafiq A. Khan. (2013) TGF- $\beta$  effects on prostate cancer cell migration and invasion are mediated by PGE<sub>2</sub> through activation of PI3K/AKT/mTOR pathway. *Endocrinology*. Vol. 154 (5): 1768-1779
- 43.- Sang Soo Seo, Yong Sang Sorig, Dae-hee Kang, In Ae Park, Yung Jue Bang, Soon Beom Kang, and Hyo Pyo Lee. (2004) Expression of cyclooxygenase-2 in association with clinicopathological prognostic factors and molecular markers in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*. Vol. 92: 927-935
- 44.- Jung-Yun Lee, Seung-Kwon Myung and Yong-Sang Song. (2013) Prognostic rol of cyclooxygenase-2 in epithelial ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies. *Gynecologic Oncology*. Vol. 129: 613-619

- 45.- Pauline Athanassiadou, Dimitra Grapsa, Peter Athanassiades, Maria Gonidi, Anna-Maria Athanassiadou, Angelos Tshipis and Efstratios Patsouris. (2008) The prognostic significance of COX-2 and survivin expression in ovarian cancer. *Pathology-Research and Practice*. Vol. 204: 241-249
- 46.- Shawn Ferguson, Richard I. Hebert, and Odette Laneuville (1999) NS-398 Upregulates Constitutive Cyclooxygenase-2 Expression in the M-1 Cortical Collecting Duct Cell Line. *J. Am. Soc. Nephrol.* Vol. 10: 2261-2271
- 47.- GuiFu Wu, Jincal Luo, Jamal S. Rana, Roger Laham, Frank W. Sellke, Jian Li. (2006). Involvement of COX-2 VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*. Vol. 69: 512-519.
- 48.- Shadab Mohammad, Hari Ram and M.L.B. Bhatt. (2011) Overexpression of COX-2 in oral squamous cell carcinoma patients undergoing chemoradiotherapy. *Natl. J. Maxillofac. Surg.* Vol. 2(1): 17-21
- 49.- Chung-Yau Lo, Kin-Yin Lam<sup>1</sup>, Pauline P Leung and John M Luk. (2005) High prevalence of cyclooxygenase 2 expression in papillary thyroid carcinoma. *European Journal of Endocrinology*. Vol. 152: 545–550
- 50.- Ying-Wei Xue, Qi-Fan Zhang, Zhi-Bing Zhu, Qi Wang, Song-Bin Fu. (2003) Expression of cyclooxygenase-2 and clinicopathologic features in human gastric adenocarcinoma. *World J. Gastroenterol.* Vol. 9(2): 250-253
- 51.- Hennie MJ Roelofs, Rene HM te Morsche, Bjorn WH van Heumen, Fokko M Nagengast and Wilbert HM Peters. (2014) Over-expression of COX-2 mRNA in colorectal cancer. *BMC Gastroenterology*. Vol. 14: 1
- 52.- Mari Ochiai, Tetsuya Oguri, Takeshi Isobe,<sup>1</sup> Shinichi Ishioka and Michio Yamakido. (1999) Cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA Expression Levels in Normal Lung Tissues and Non-small Cell Lung Cancers. *Jpn. J. Cancer Res.* Vol. 90: 1338–1343
- 53.- A Juuti, J Louhimo, S Nordling, A Ristimaäki and C Haglund. (2006) Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *J. Clin. Pathol.* Vol. 59: 382–386
- 54.- Gabriella Ferrandina, Francesco Legge, Franco O. Ranelletti, Gian F. Zannoni, Nicola Maggiano, Giovanni Scambia and Libero Lauriola. (2002) Cyclooxygenase-2 Expression in Endometrial Carcinoma. *American Cancer Society*. Vol. 95: 801-807

- 55.- Tadahiro Nozoe, Takahiro Ezaki, Akira Kabashima, Hideo Baba, Yoshihiko Maehara. (2005) Significance of immunohistochemical expression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the esophagus. *The American Journal of Surgery*. Vol. 189: 110-115
- 56.- National Cancer Institute. (2013) Tumor Grade. Documento visto desde <http://www.cancer.gov/cancertopics/diagnosis-staging/prognosis/tumor-grade-fact-sheet>
- 57.- Vemparala Subbarayan, Anita L. Sabichi, Norma Llansa, Scott M. Lippman and David G. Menter. (2001) Differential expression of cyclooxygenase-2 and its regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$  in normal and malignant prostate cells. *Cancer research*. Vol. 61: 2720-2726.
- 58.- O. Gubbay, W. Guo, MT. Rae, D. Niven, SP. Langdon and SG. Hillier. (2005) Inflammation-associated gene expression is altered between normal human ovarian surface epithelial cells and cell lines derived from adenocarcinoma. *British Journal of Cancer*. Vol. 92: 1927-1933
- 59.- Wan-Lin Yang, Isabelle H. Roland, Andrew K. Godwin and Xiang-Xi Xu. (2005) Loss of TNF- $\alpha$ -regulated COX-2 expression in ovarian cancer cells. *Oncogene*. Vol. 24: 7991-8002
- 60.- Zongxian Cao, Ling-Zhi Liu, Dan A. Dixon, Jenny Z. Zheng, Bala Chandran and Bing-Hua Jiang. (2007) Insulin-like growth factor-I induces cyclooxygenase-2 expression via PI3K, MAPK and PKC signaling pathways in human ovarian cancer cells. *Cell Signal*. Vol. 19 (7): 1542-1553
- 61.- Silvana Girardi. (2011) Isoformas del receptor TRKA y su relación con ADAM17 en Cáncer Ovárico Epitelial. Tesis de Magíster en Bioquímica, especialidad Clínica Aplicada. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 79 h.
- 62.- Lim JW, Kim H and Kim KH. (2001) Nuclear factor-kappaB regulates cyclooxygenase-2 expression and cell proliferation in human gastric cancer cells. *Laboratory Investigation*. Vol. 81(3): 349-360
- 63.- Christopher Vallejos. (2014) Rol de la activación del receptor TRKA por NGF en el clivaje de P75 y participación de ADAM17 y  $\gamma$ -secretasa en Cáncer Ovárico Epitelial. Tesis de Magíster en Bioquímica, especialidad Clínica Aplicada. Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas. 112 h.

- 64.- A Rodríguez-Barbero, F Dorado, S Velasco, A Pandiella, B Banas and JM López-  
Novoa. (2006) TGF- $\beta$ 1 induces COX-2 expression and PGE2 synthesis through  
MAPK and PI3K pathways in human mesangial cells. *Kidney International*. Vol.  
70(5): 901-909
- 65.- Christian Freudlsperger, Yansong Bian, Stephanie Contag, Jeffrey Burnett and  
Carter Van Waes. (2013) TGF- $\beta$  and NF- $\kappa$ B signal pathway cross-talk is  
mediated through TAK1 and SMAD7 in a subset of head and neck cancers.  
*Oncogene*. Vol. 32(12): 1549-1559
- 66.- Niamh H. Molloy, Danielle E. Read and Adrienne M. Gorman. (2011) Nerve  
Growth Factor in Cancer Cell Death and Survival. *Cancers*. Vol. 3: 510-530
- 67.- Rebecca L. Elliott and Gerard C. Blobe. (2005) Role of Transforming Growth  
Factor Beta in Human Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. Vol. 23: 2078-2093



