

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO



DETECCIÓN DE ADAM-17/TACE COMO UN POSIBLE MARCADOR EN CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL

NAHUM E. AMTMANN NEIMAN

Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas y Ciencias Biológicas
Mención Biología de la Reproducción

Director Tesis: Prof. Dra. **Carmen A. Romero Osses**

2011

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE POSTGRADO

INFORME DE APROBACIÓN TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magister presentada por el candidato

NAHUM E. AMTMANN NEIMAN

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología de la Reproducción en Examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de Diciembre de 2011.

PROF. DRA. CARMEN ROMERO OSSES

Director de Tesis

Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción
Hospital Clínico de la Universidad de Chile J.J. Aguirre.

COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS:

PROF. DR. ARMANDO CORTINEZ CASTRO

PROF. DR. ALFONSO PAREDES VARGAS

PROF. DR. RICARDO MORENO MAURO

PROF. DRA. ROSITA SMITH GARCES

Presidente Comisión de Examen

... "Lo esencial es invisible a los ojos"...

*A mis queridos padres, Jeannette y Patricio,
A mi hermana, Jocelyn,
Y al amor de mi vida, Antonia.*

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que han hecho posible la realización de esta Tesis de Magister.

Agradecer a los Profesores Dr. Andrés Stutzin y Dr. Héctor Alcaíno, por haber confiado en mí al recomendarme en la postulación al Magíster.

Agradecer a mi Directora de Tesis, Prof. Dra. Carmen Romero, por acogerme en su grupo de investigación y permitir la realización de este trabajo. También, agradecer a la Directora de la Mención, Prof. Dra. Margarita Vega, por toda la orientación y ayuda que he recibido de su parte, y al Prof. Dr. Fernando Gabler, por su apoyo y conversaciones con gran significado.

Agradecer al Comité evaluador de Tesis, Profesores Dra. Rosita Smith, Dr. Ricardo Moreno, Dr. Alfonso Paredes y Dr. Armando Cortínez, por la paciencia, críticas constructivas y apoyo.

Agradecer a mis compañeros de Laboratorio, por su ayuda y el aprecio que les tengo, por los buenos momentos y por su rol de guías: Verónica Tapia, Karla Kohan, Francisca Plaza, Silvana Girardi, Carolina Vera, Daniela López, Jessica Astorga, Andrea Silva, Claire Alix, Jaime Espinoza, Edgardo Soto, Rodrigo Rivero, Carlos Rozas, Rodrigo Carvajal.

Agradecer a todo el personal del Laboratorio de Endocrinología Clínica y Biología de la Reproducción, principalmente a Jocelyn Medel y Carlos Carioca.

Agradecer a mis compañeros de Magíster: Jorge Aldunate, Juan Fullá, Edward Parada y Ángela Torreblanca.

Agradecer a mis queridos amigos, Luis Alfredo Ramírez, Alejandro Escobar, Juan Carlos Aldúnes, Carlos Alvear.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN.....	6-7
ABSTRACT.....	8-9
INTRODUCCION.....	10-19
El ovario y el Cáncer Ovárico Epitelial.....	10-13
Angiogenesis en la progresión del Cáncer Ovárico Epitelial.....	14-16
ADAM-17 / TACE y cáncer.....	17-19
HIPOTESIS.....	20
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
MATERIALES Y METODOS.....	21-30
Obtención de muestras de tejidos.....	22-23
Diseño experimental.....	24
Detección de ADAM-17 por Inmunohistoquímica en muestras de ovario.....	25-27
Determinación de los niveles de mRNA de ADAM-17 por RT-PCR convencional.....	28-29
Análisis estadístico.....	30
RESULTADOS.....	31-42
Evaluación de la inmunodetección de ADAM-17 en tejidos de ovario humano.....	31
Inmunodetección de ADAM-17 en ovario inactivo.....	32
Inmunodetección de ADAM-17 en tumores benignos del ovario.....	33
Inmunodetección de ADAM-17 en tumores borderline del ovario.....	34
Inmunodetección de ADAM-17 en Cáncer Ovárico Epitelial.....	35

Semicuantificación de la inmunodetección de ADAM-17 en muestras de ovarios.....	36-38
Semicuantificación de los niveles de mRNA de ADAM-17 en muestras de ovarios.....	39-40
Correlación entre los niveles proteicos de ADAM-17 y otras moléculas de interés.....	41-42
RESUMEN DE RESULTADOS.....	43
DISCUSIÓN.....	44-47
CONCLUSIONES.....	48
REFERENCIAS.....	49-52

RESUMEN

El Cáncer Ovárico Epitelial (COE), un tumor maligno, de causa desconocida, suele presentarse en mujeres mayores de 50 años y con un diagnóstico precoz complejo, ya que las mujeres no presentan síntomas o presentan sólo síntomas leves e inespecíficos ⁽¹⁾. Un vez que el cáncer ovárico es diagnosticado, por lo general se encuentra en una etapa avanzada, siendo difícil de tratar y con alto porcentaje de mortalidad a cinco años ⁽¹⁾. Esta patología es altamente angiogénica y uno de los factores angiogénicos más importantes en cáncer ovárico es el factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) ⁽²⁾. Además, el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) y su receptor de alta afinidad trkA, participan en la angiogénesis del ovario, ya sea a través de una acción directa, aumentando la proliferación de células endoteliales, o bien indirecta, por aumento de la expresión del VEGF ⁽³⁾. Por otra parte, en varios tejidos normales y patológicos como el cáncer, se ha demostrado que ADAM-17, una metaloproteasa responsable del corte de ectodominios de varios factores de crecimientos y receptores, destacándose entre ellos citoquinas, receptores de neurotrofinas, receptores con actividad tirosina quinasa y moléculas de adhesión celular ^(4,5), es efectivamente expresada por líneas celulares de COE y en diferentes tejidos de cáncer, tales como el cáncer mamario, colorrectal, pancreático y ovárico ^(4,6).

Esto, nos llevó a estudiar la localización y expresión de ADAM-17, por inmunohistoquímica y RT-PCR convencional en tejidos ováricos en las distintas etapas de diferenciación epitelial (ovarios normales, tumores ováricos benignos, tumores ováricos borderline y Cáncer Ovárico Epitelial bien diferenciado (COE I), moderadamente diferenciado (COE II) y pobremente diferenciado (COE III). Además, fue de nuestro interés, correlacionar los resultados obtenidos, con los niveles de VEGF, NGF y su receptor trkA en otros estudios de nuestro grupo de trabajo.

Los resultados obtenidos permiten señalar lo siguiente: 1) Se observó inmunodetección de ADAM-17, predominantemente en epitelio ovárico, a nivel citoplasmático, en muestras de ovario inactivo, tumor benigno,

tumor borderline y COE (grado I, II y III de diferenciación histológica), 2) ADAM-17 aumenta su expresión génica y proteica en muestras de COE, pudiendo estar involucrado en la transformación del epitelio en tejido ovárico, desde ovario normal hasta COE, 3) Los niveles proteicos de ADAM-17 con los de VEGF, NGF, trkA y trkA-p, que participan en la progresión y posterior metástasis tumoral, se correlacionan positiva y significativamente en las diferentes muestras de tejido ovárico descritas para este estudio.

Por lo tanto, estos resultados permiten concluir, que si bien, los incrementos en los niveles de ADAM-17 son discretos y podrían cumplir un rol importante en la transformación del epitelio ovárico, no permitirían considerar a ADAM-17, como un marcador tumoral en COE por sí solo.

ABSTRACT

Epithelial ovarian cancer (COE), a malignant tumor of unknown cause, usually occurs in women over 50 years old. Early diagnosis is difficult as women often have no symptoms or only mild and nonspecific ones (i). Once ovarian cancer is diagnosed, usually at an advanced stage, it is difficult to treat and there is a high five year mortality rate(1). This disease is recognized as being highly angiogenic, and one of the most important angiogenic factors in ovarian cancer is the vascular endothelial growth factor (VEGF) (i). In addition, Nerve Growth Factor (NGF) and its high affinity receptor trkA also participate in ovary angiogenesis, either through direct action, increasing endothelial cell proliferation, or indirectly by increased VEGF expression (i). On the other hand, in several normal and pathological tissues, it has been shown that ADAM-17, a metalloprotease which cuts the ectodomain of several growth factors and receptors (among them cytokines, neurotrophin receptors, tyrosine kinase receptors and cell adhesion molecules (ii, iii)), is expressed in COE cell lines and in different cancer tissues such as breast, colorectal, pancreatic and ovarian cancer (4, iv).

This led us to study the localization and expression of ADAM-17 by means of immunohistochemistry and conventional RT-PCR in ovarian tissues at different stages of epithelial differentiation (normal ovaries, benign ovarian tumors, borderline ovarian tumors and well differentiated epithelial ovarian cancer (COE I), moderately differentiated (COE II) and poorly differentiated (COE III)). The results were correlated with VEGF, NGF and trkA receptor levels in the same tissues (results obtained from other studies in our laboratory).

The results indicate the following: 1) immunodetection of ADAM-17 was observed, predominantly in ovarian epithelium (cytoplasmic level) in samples of inactive ovary, benign, borderline and COE tumor (grade I, II and III of histological differentiation), 2) ADAM-17 gene and protein expression were increased in COE samples, and may be involved in the transformation of normal epithelial ovarian tissue to COE, 3) ADAM-17 proteins levels and those

of VEGF, NGF, and trkA trkA-p, involved in the progression and subsequent tumor metastasis, positively and significantly correlated in the different ovarian tissue samples described in this study.

Therefore, these results allow to conclude that although increases in ADAM-17 protein levels are discrete and may play an important role in the transformation of ovarian epithelium, one would not consider ADAM-17 as a COE tumor marker on its own.

INTRODUCCIÓN

EL OVARIO Y EL CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL

Los ovarios son un órgano de múltiples compartimientos, que poseen variadas propiedades biológicas, destacándose entre ellas, una función gametogénica, que determina la producción de óvulos para la reproducción, y una función endocrina, que determina la producción y secreción de hormonas sexuales, tanto esteroidales, peptídicas, como factores de crecimiento.

Estructuralmente, el ovario tiene una corteza externa y una médula interna. Rodeándolo, se encuentra el epitelio de superficie del ovario (ESO), caracterizado por una capa simple de células mesoteliales planas a cuboidales, que tiene la capacidad de secretar y presentar receptores para hormonas (gonadotrofinas), factores de crecimiento y citoquinas, así como el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) y su receptor de alta afinidad trkA. Además, participa en el transporte de materiales desde y hacia la cavidad peritoneal, en la ruptura ovulatoria cíclica y en su reparación (7,8).

Como el ESO se origina desde una invaginación del epitelio celómico, se piensa que puede mostrar características de tejidos derivados del ducto Mülleriano (trompas de Falopio, endometrio y cérvix), así como la capacidad de transformación metaplástica (9).

Dentro de estas transformaciones, encontramos el cáncer ovárico, un tumor maligno, que suele presentarse en mujeres mayores de 50 años. La causa es desconocida y su diagnóstico precoz es complejo, ya que muchas veces, las mujeres no presentan síntomas o presentan sólo síntomas leves e inespecíficos. Un vez que son diagnosticadas por lo general se encuentra en una etapa avanzada, siendo difícil de tratar. El tratamiento suele ser

quirúrgico en conjunto con quimioterapia o radioterapia ⁽¹⁾. Entre los factores de riesgo está tener familiares de primer grado que hayan desarrollado esta patología, mientras que los factores protectores lo constituyen el haber evitado la ovulación (métodos anticonceptivos), multiparidad, lactancia, ligadura tubaria e histerectomía ^(10, 11).

En Chile, la mortalidad debido a tumores malignos de cualquier índole ha aumentado considerablemente. Esto deja en evidencia, que los esfuerzos de control del cáncer (prevención, diagnóstico y tratamiento) tienen menos éxito que en los países desarrollados en comparación con otras patologías, ya que la tasa de mortalidad general de la población chilena ha disminuido ⁽¹²⁾. Los tumores malignos son la segunda causa de muerte entre el período 1990-2006 ⁽¹³⁾ y la tasa de mortalidad desde 1990 al 2007 aumentó de 107,5 a 129,5 muertes por cada 100.000 habitantes ⁽¹⁴⁾. El cáncer ovárico presentó una tendencia al incremento desde 1990 a 1998 ⁽¹²⁾. La información sobre cáncer ginecológico es escasamente publicada y por lo general poco actualizada.

En Estados Unidos, se estimó que en el año 2009, 21.550 mujeres fueron diagnosticadas con cáncer ovárico, de las cuales 14.600 fallecieron, el 67.7%. Desde el 2002 al 2006, el promedio de edad de mujeres diagnosticadas con cáncer ovárico fue 63 y de mortalidad 71 años. Se destaca que además de diferencias etarias, existen diferencias entre las diferentes razas o etnias de la población, tanto en incidencia como mortalidad. Además, se estimó 5 años en promedio de supervivencia pos diagnóstico y que, desde el año 2004 al 2006, 1,4% de las mujeres nacidas podrían ser diagnosticadas con cáncer ovárico alguna vez durante su vida ⁽¹⁵⁾.

Según su clasificación, dentro de todas las neoplasias malignas ováricas, aproximadamente 90% corresponden a Carcinoma Ovárico Epitelial (COE); el resto se origina en células de la granulosa o, rara vez, en células del estroma o germinales ⁽⁷⁾. Fenotípicamente el COE se encuentra entre los tumores más variables, es decir, puede expresar propiedades relacionadas con el epitelio de las trompas de Falopio (tumores serosos), del endometrio (tumores endometrioides) y del endocervix o epitelio colónico (tumores mucinosos). Aunque estos subtipos

histológicos de COE difieren clínicamente en pronóstico y respuesta a tratamiento, no se conocen los determinantes específicos de esta variación ⁽⁷⁾.

Además, el COE podemos clasificarlo en diferentes etapas según su curso:

- J Etapa I: formación de quistes de inclusión epitelial que invaden la corteza del ovario. Se cree que estos cuerpos de inclusión se forman cuando las células epiteliales quedan atrapadas en la lesión creada en la ruptura folicular o durante la reabsorción lútea. El pronóstico es bueno si el quiste no se ha roto y el crecimiento es limitado a uno o ambos ovarios.
- J Etapa II: se produce cuando el quiste se rompe y las células malignas se dispersan en la cavidad peritoneal.
- J Etapa III: se caracteriza por el desarrollo de tumores que involucran a uno o ambos ovarios, con implantes peritoneales fuera de la pelvis y positividad para nodos retroperitoneales o inguinales.
- J Etapa IV: se define por el crecimiento del ovario con metástasis diseminadas distantes ⁽¹⁰⁾.

El tejido tumorogénico derivado del OSE se asocia cercanamente con el tejido estromal. La invasión tumoral requiere a menudo una asociación con el tejido estromal del huésped y la mayoría de los tumores de ovario tienen un componente parecido al estroma; por lo tanto, las interacciones entre las células epiteliales y estromales son importantes para el desarrollo, crecimiento, angiogénesis y metástasis del tumor ⁽¹⁶⁾.

Para explicar la etiología del COE se han propuesto numerosas hipótesis: ovulación incesante ⁽¹⁰⁾, elevada exposición a gonadotrofinas, aumentando la producción de estrógenos por parte del ESO ⁽⁹⁾, exceso de estimulación androgénica sobre el ESO ⁽⁹⁾, inflamación ovárica local con producción de moléculas proinflamatorias y citoquinas ⁽⁹⁾ y conversión epitelio-mesénquima de células del ESO ⁽⁷⁾. También se ha propuesto un modelo

dualístico para la carcinogénesis del COE. Una vía involucra una progresión gradual, desde un tumor borderline a un carcinoma seroso no invasivo, seguido por uno invasivo y otra vía se caracteriza por la rápida progresión desde el epitelio superficial del ovario o desde quistes de inclusión hasta un carcinoma seroso convencional de alto grado de invasión ⁽¹⁷⁾.

Por último, otro criterio por el cual los tumores epiteliales se clasifican es a través de su grado de diferenciación, lo cual refleja su comportamiento clínico. Estas categorías son:

- J COE I (bien diferenciado): estructuras papilares irregulares con malignidad celular, epitelio pseudoestratificado y algunos focos de invasión.
- J COE II (moderadamente diferenciado): disminución de estructuras papilares debido a la presencia de zonas indiferenciadas, se observan núcleos atípicos y aumentan los focos de invasión.
- J COE III (pobremente diferenciado): masa pobremente diferenciada, con pleomorfismo celular y nuclear y con bastantes focos de invasión ⁽¹⁸⁾.

ANGIOGÉNESIS EN LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL

Para resguardar el crecimiento celular normal y evitar la progresión tumoral se requiere un control estricto de los factores que promueven el ciclo celular ⁽¹⁹⁾. Cuando no se logra esto, la angiogénesis tumoral cumple un rol importante, que consiste en la formación de vasos sanguíneos nuevos a partir de los vasos preexistentes, a través de brotes o intususcepciones, permitiendo una progresión tumoral en cuanto a tamaño y metástasis ^(20,21).

La formación de nuevos capilares se lleva a cabo en cuatro fases; primero existe un estímulo angiogénico sobre las células endoteliales de los vasos sanguíneos y proteólisis de la membrana basal; segundo, una migración de estas células activadas hacia la matriz extracelular circundante; tercero, una proliferación de estas células endoteliales; y cuarto, un ensamblaje de las células endoteliales en capilares. Finalmente los pericitos migran hacia los nuevos capilares y envuelven la pared externa de los nuevos vasos, dándoles mayor resistencia y madurez funcional ⁽²¹⁾.

La angiogénesis está regulada por factores de crecimiento que son específicos para la proliferación y diferenciación de las células endoteliales, siendo el más importante el factor de crecimiento endotelio vascular (VEGF) ⁽²¹⁾, aunque, nuestro grupo de investigación, ha demostrado que otro factor importante en el COE es el Factor de Crecimiento Nervioso (NGF), ya que éste induce la expresión de VEGF, un potente mitógeno de células endoteliales micro y macro vasculares derivadas de vasos sanguíneos y linfáticos, pero que carece de actividad mitogénica en otros tipos celulares ⁽³⁾.

También, se ha encontrado que VEGF promueve la angiogénesis en modelos in vitro, induciendo a células endoteliales confluentes para invadir geles de colágeno y formar estructuras semejantes a capilares ⁽²²⁾. El gen de VEGF codifica para cinco isoformas proteicas a través de splicing alternativo: VEGF 121, 145, 165, 189 y 206, de

las cuales en ovario se expresan las isoformas 121, 165 y 189⁽³⁾. La isoforma 121 es secretada desde la célula, a diferencia de la isoforma 165 que es parcialmente retenida en la superficie celular, mientras que el resto de las isoformas no son secretadas⁽²²⁾. También se han identificado dos receptores de tirosina quinasa de alta afinidad para VEGF, los receptores Flt-1 y KDR. Ambos tienen siete dominios semejantes a inmunoglobulinas en la parte extracelular, un dominio transmembrana y un dominio intracelular que es una secuencia de consenso tirosina quinasa⁽²²⁾.

Una vez que VEGF se ha unido a su receptor se transmiten señales intracelulares vía MAP quinasas que resultan en un aumento de la proliferación y de la migración de las células endoteliales y una disminución de la apoptosis celular, consecuencia de la activación de la PI3K/Akt y aumento en Bcl-2. Por otro lado, VEGF disminuye la adhesión de las células endoteliales a la pared celular, mecanismo que facilita la separación y migración, que es necesaria para iniciar la angiogénesis. Además VEGF cumple las funciones de aumentar la permeabilidad vascular induciendo edema y la acumulación de proteínas que participan en la adhesión celular. También VEGF facilita la migración leucocitaria, por lo cual este factor es un agente pro-angiogénico y pro-inflamatorio. Cabe destacar que el principal factor regulador de la síntesis y secreción del VEGF es la hipoxia de los tejidos, causada por procesos tan diferentes como la obstrucción arterial o durante la formación y metástasis tumoral⁽²¹⁾.

Por otra parte, estudios de hibridización in situ han demostrado que el mRNA de VEGF está sobre-expresado en la mayoría de los tumores, incluido el ovario. Además se ha encontrado una correlación entre la expresión de mRNA de VEGF y la vascularidad del tumor⁽²²⁾. Por otro lado, se ha encontrado una elevada expresión de mRNA de VEGF en tumores primarios y metastásicos de ovario, por lo que se cree que existiría una correlación entre sobre expresión de VEGF y pronóstico en pacientes con carcinoma ovárico⁽²³⁾.

Al mismo tiempo, un importante rol en la angiogénesis se le ha concedido a NGF, tanto de forma directa en las células endoteliales como indirecta en las células epiteliales ⁽²⁴⁾. En un estudio en ratas recién nacidas, tratadas con NGF, se demostró que NGF al unirse con su receptor TrkA tiene un rol indirecto al estimular la inmunorreactividad del VEGF en neuronas de ganglio cervical superior de estos animales ⁽²⁵⁾. También se ha encontrado que en ovario de rata, NGF incrementa la expresión de VEGF y el área de vasos sanguíneos ^(22,24). Respecto al rol directo de NGF sobre la angiogénesis, se ha reportado que esta neurotrofina estimula la invasión celular y la formación de vasos sanguíneos mediante un aumento en la expresión de la metaloproteinasa de la matriz extracelular 2 (MMP-2) en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) ^(26,27).

En otro estudio, se ha determinado que NGF, en cultivos de explantes de COE, logra aumentar tanto la expresión génica de tres isoformas de VEGF (121, 165 y 189) como la expresión proteica, en forma dosis dependiente. Este efecto fue inhibido por inmunobloqueo de NGF y mediante la utilización de un inhibidor de receptores de tirosina quinasa (K252a) ⁽³⁾. Además se ha reportado una sobre expresión del mRNA de trkA en cáncer de ovario en relación a ovarios normales, mientras que el aumento en los niveles de mRNA para NGF es menos importante en COE con respecto a los ovarios normales ⁽²⁸⁾. A su vez se encontraron niveles proteicos muy reducidos o casi ausentes de NGF y trkA en células del ESO en ovarios normales, mientras que estas proteínas se expresaron en altos niveles en células epiteliales de COE ^(3,28).

ADAM-17 / TACE Y CÁNCER

ADAMs (A Disintegrin And Metalloprotease) son un grupo de enzimas unidas a la membrana plasmática de las células, que por un proceso denominado "shedding" (corte), son capaces de liberar una gran cantidad de proteínas, lo que las hace ser consideradas como moduladores cruciales de procesos fisiológicos y patológicos, tales como fusión entre células, adhesión y señalización intracelular. Su participación funcional ha sido descrita en: 1.- la unión y fusión del espermatozoide al óvulo, 2.- invasión y degradación de la matriz del trofoblasto durante el embarazo, 3.- angiogénesis y neovascularización. Clínicamente, están implicados en el cáncer, inflamación, neurodegeneración y fibrosis, a través de la inducción de la apoptosis, Fas-Ligando, citoquinas y factores de crecimiento ^(4,5). Aunque, cabe destacar, que no sólo los miembros de la familia ADAM están implicados en el shedding de ectodominios de proteínas, también metaloproteasas de matriz extracelular ancladas a membrana plasmática (MT-MMP) juegan un papel en este proceso ⁽²⁹⁾.

En 1997, un integrante de esta familia, ADAM-17 o TACE (Tumor necrosis factor- converting enzyme) se identificó como la metaloproteasa responsable del corte del ectodominio de TNF- ^(30,31). Posteriormente se ha podido ir identificando el degradoma o sustratos en que ejerce acción, destacándose entre ellos factores de crecimientos, citoquinas, receptores de neurotrofinas, receptores con actividad tirosina quinasa y moléculas de adhesión celular, como por ejemplo: ProTNF- , ProTGF- , p75 TNF- RII, p55 TNF- y P75 ^{NTR} ⁽²⁹⁾. A su vez, ADAM-17 ha demostrado ser la proteína que corta la mayoría de los ligandos del receptor del Factor de Crecimiento Epidermal (EGFR) y se sabe que su actividad puede ser estimulada externamente por receptores asociados a proteínas G (GPCRs) para inducir el corte de ligandos en la superficie celular ⁽⁴⁾.

Como ocurre con los integrantes de la familia ADAM, ADAM-17 es una proteína de tipo I (con la región amino-terminal en la zona extracelular/intraluminal) que contiene los siguientes dominios identificables: péptido señal,

prodominio, dominio catalítico o metaloproteasa, dominio desintegrina, dominio rico en cisteínas, dominio tipo factor de crecimiento epidérmico (EGF-like), dominio transmembrana y dominio citosólico ⁽³²⁾, como se puede apreciar, de forma esquemática, en la Figura 1.

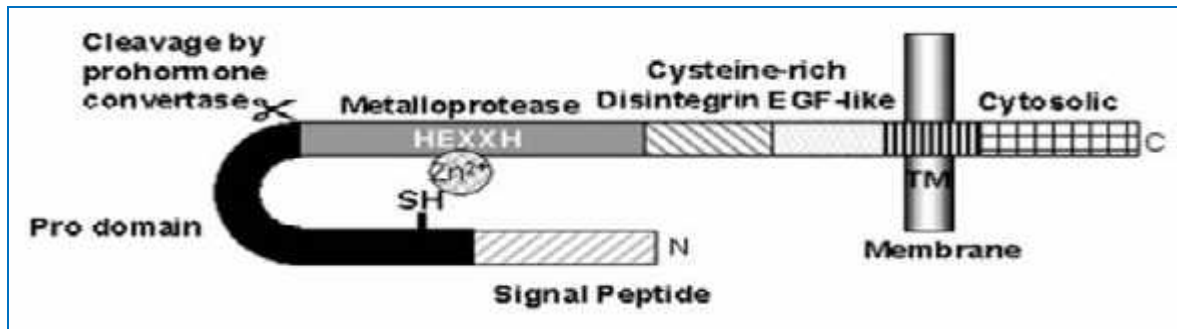


Figura 1. Estructura en dominios de una metaloproteasa típica de la familia ADAM ⁽³²⁾.

Se sabe que, de todos los integrantes de la familia ADAM, ADAM-10 es la que comparte una mayor homología de secuencia con ADAM-17 y en relación a la regulación de la expresión de ADAM-17 ⁽²⁹⁾, originalmente, su ARN mensajero (ARNm) se encontró en una gran variedad de tejidos distintos, sugiriendo que su gen se expresaba de manera ubicua y constitutiva ⁽³⁰⁾. No obstante, dependiendo del estado del desarrollo, se hallaron diferencias sustanciales en los niveles de su ARNm. En tejido adulto se detectaron niveles altos de ARNm en corazón, placenta, músculo esquelético, páncreas, bazo, timo, próstata, testículos, ovarios e intestino delgado, mientras que en tejido fetal se detectaron niveles altos en cerebro, pulmón e hígado ⁽³⁰⁾. Posteriormente, diversos estudios han demostrado que los niveles de ARNm de ADAM-17 no son constantes y su expresión varía en distintas situaciones patológicas como la osteoartritis, la artritis reumática, el infarto agudo de miocardio o el cáncer de mama ⁽³²⁾. Además, ciertos compuestos tales como citoquinas, factores de crecimiento o ésteres de forbol pueden modular la expresión de TACE en algunas líneas celulares ⁽²⁹⁾. Cabe destacar, que la delección en el dominio catalítico de la metaloproteasa ADAM-17, en ratones knock-out, produce letalidad perinatal, demostrando la importancia de la actividad de ADAM-17 en el desarrollo in vivo ⁽³³⁾.

En relación al cáncer, estudios han demostrado que ADAM-17 es el que se expresa con mayor frecuencia dentro de los integrantes de la familia ADAM, tanto como en otras enfermedades. Se ha encontrado en líneas celulares de COE (SKOV-3, OVCAR-3, OVCAR-5, A2780, IGROV-I, A2774, OC315, OC136 y OC314) y en tejidos de cáncer de próstata, pulmón, mama y ovario ^(34,35,36). Asimismo, se ha demostrado (in-vitro) en células de COE, que moléculas de adhesión celular activadas por leucocitos (ALCAM), que son expresadas y juegan un rol importante en la biología de tumores, son cortadas por ADAM-17, generando que el dominio extracelular de ALCAM quede soluble en el extra celular y los dominios restantes se internalicen, estimulando la motilidad de células de COE, pudiendo ser un proceso relevante en el potencial invasivo de COE ⁽³⁴⁾.

Además, el rol de ADAM-17, y de otros integrantes de su familia, principalmente en enfermedades inflamatorias, fibrosis, neurodegeneración y cáncer, juega un rol crítico sobre mediadores de estos procesos, por lo cual, el potencial terapéutico de éstas proteínas podría ser realmente importante, ya que estudios previos han detectado que existe un aumento en la expresión de ADAM-17 en tumores mamarios de alto grado de diferenciación, versus los de bajo grado ⁽⁴⁾. Además, resultados de experimentos in vitro señalan que la inhibición selectiva de miembros de la familia ADAM, como por ejemplo la inhibición combinada de ADAM-17 y ADAM-10, detiene la proliferación celular e invasión en células tumorales ⁽⁴⁾. Por otra parte, la inhibición de integrantes de la familia ADAM en conjunto con la administración de otros fármacos, han demostrado tener buenos resultados en tratamientos de cáncer mamario ⁽⁴⁾.

Por lo tanto, según lo descrito en literatura y estudios previos de nuestro laboratorio, este estudio apunta a la detección de ADAM-17 como un posible marcador en COE, evaluando su expresión, en la transformación del epitelio del tejido ovárico, desde ovario normal hasta Cáncer Ovárico Epitelial.

HIPÓTESIS

ADAM-17 aumenta su expresión en muestras de Cáncer Ovárico Epitelial, cumpliendo un rol en la transformación del epitelio en tejido ovárico, desde ovario normal hasta Cáncer Ovárico Epitelial.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de mRNA y proteína de ADAM-17 y su localización celular en muestras de tejido ovárico inactivo, tumor benigno, tumor borderline y Cáncer Ovárico Epitelial altamente diferenciado (COE I), moderadamente diferenciado (COE II) y pobremente diferenciado (COE III).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la localización proteica de ADAM-17 en muestras de ovario inactivo, tumor benigno, tumor borderline y Cáncer Ovárico Epitelial (grado I, II y III de diferenciación histológica).
2. Determinar los niveles de mRNA y proteína de ADAM-17 en las diferentes muestras de tejido ovárico descritas para este estudio.
3. Correlacionar los niveles de proteína de ADAM-17 con los de VEGF, NGF, trkA y trkA-p, en las diferentes muestras de tejido ovárico descritas para este estudio, cuyos resultados han sido obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva del Departamento de Obstetricia y Ginecología, perteneciente a la Facultad de Medicina del Hospital Clínico Universidad de Chile J.J. Aguirre, ubicado en calle Santos Dumont #999, comuna de Independencia, en Santiago de Chile. El financiamiento de este estudio se desarrolló en el marco del proyecto FONDECYT 1071036 y 1110372.

OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE TEJIDOS

Las muestras de tejido ovárico humano, incluidas en parafina, fueron obtenidas del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico Universidad de Chile J.J. Aguirre. Previo a la obtención de las muestras, las pacientes debieron firmar un Consentimiento Escrito, aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico Universidad de Chile J.J. Aguirre.

Para este estudio se consideraron seis grupos de diferentes muestras de tejido ovárico, tal como se observa en la Figura 2 que se describe a continuación:

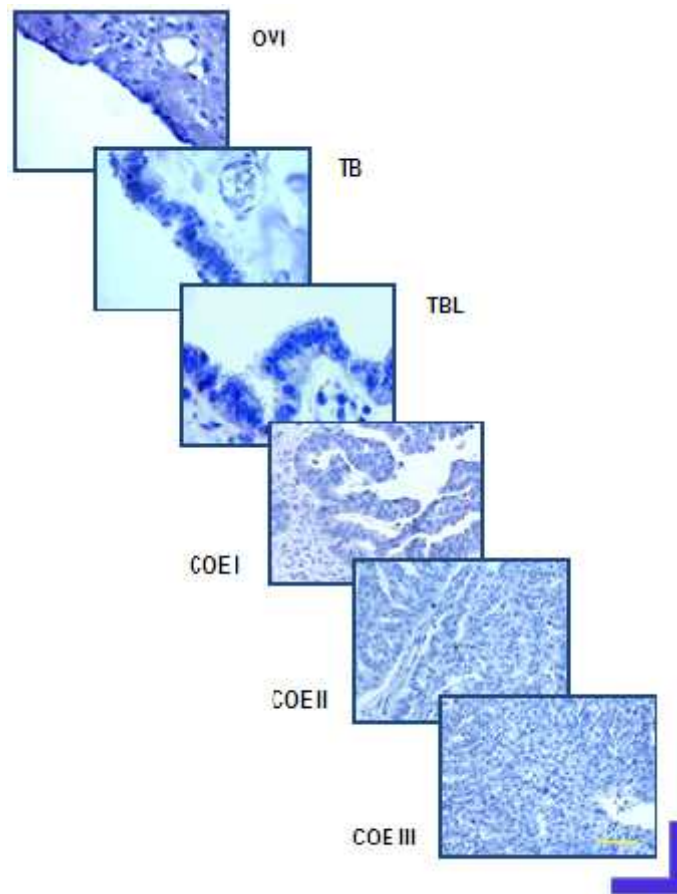


Figura 2. Microfotografías de muestras de tejido ovárico. OVI Ovario Inactivo, TB Tumor Benigno, TBL Tumor Borderline, COE I Cáncer Ovárico Epitelial tipo I, II Cáncer Ovárico Epitelial tipo II, III Cáncer Ovárico Epitelial tipo III. (400x). Barra amarilla corresponde a 50 micrones.

- 1) Ovario Inactivo (OVI): Ovario de mujeres menopáusicas o pos-menopáusicas, con uno o más quistes de inclusión rodeados por una monocapa de células epiteliales.
- 2) Tumor Ovárico Benigno (TB): Quiste de inclusión con un diámetro mayor a 1 cm. y rodeado por una monocapa de células epiteliales.
- 3) Tumor Ovárico Borderline (TBL): Monocapa de células epiteliales que ha proliferado y se observa como un epitelio pseudoestratificado con atipia celular leve a moderada.
- 4) Cáncer Ovárico Epitelial tipo I (COE I) o Bien Diferenciado: Estructuras papilares irregulares con malignidad celular, epitelio pseudoestratificado y algunos focos de invasión de más de 3 mm.
- 5) Cáncer Ovárico Epitelial tipo II (COE II) o Moderadamente Diferenciado: Disminución de las estructuras papilares por presencia de zonas indiferenciadas, con mucha atipia nuclear y mayores focos de invasión.
- 6) Cáncer Ovárico Epitelial tipo III (COE III) o Pobremente Diferenciado: Masa sólida indiferenciada, con evidente pleomorfismo celular y nuclear, y con muchos focos de invasión.

Las muestras obtenidas de ovarios inactivos correspondieron a pacientes sometidas a histerectomía con ooforectomía por patologías no ováricas. El resto se obtuvo mediante histerectomía con ooforectomía, pos-diagnostico de tumor o cáncer ovárico.

DISEÑO EXPERIMENTAL: Estudio observacional retrospectivo

Tal como se muestra en la Figura 3, a partir de biopsias, las muestras se separaron dos grupos: Un trozo fue fijado e incluido en parafina y el otro fue congelado en nitrógeno líquido hasta su procesamiento. De las muestras de tejido ovárico incluidas en parafina se obtuvo cortes de 5 μm de espesor, para el análisis de morfología con la tinción de hematoxilina–eosina y para la evaluación de la expresión proteica de ADAM-17 por inmunohistoquímica. De las muestras de tejido ovárico almacenadas a -80°C se determinó los niveles de expresión génica de ADAM-17 a través de RT-PCR convencional. Los niveles obtenidos fueron correlacionados con otros estudios de nuestro grupo de trabajo.

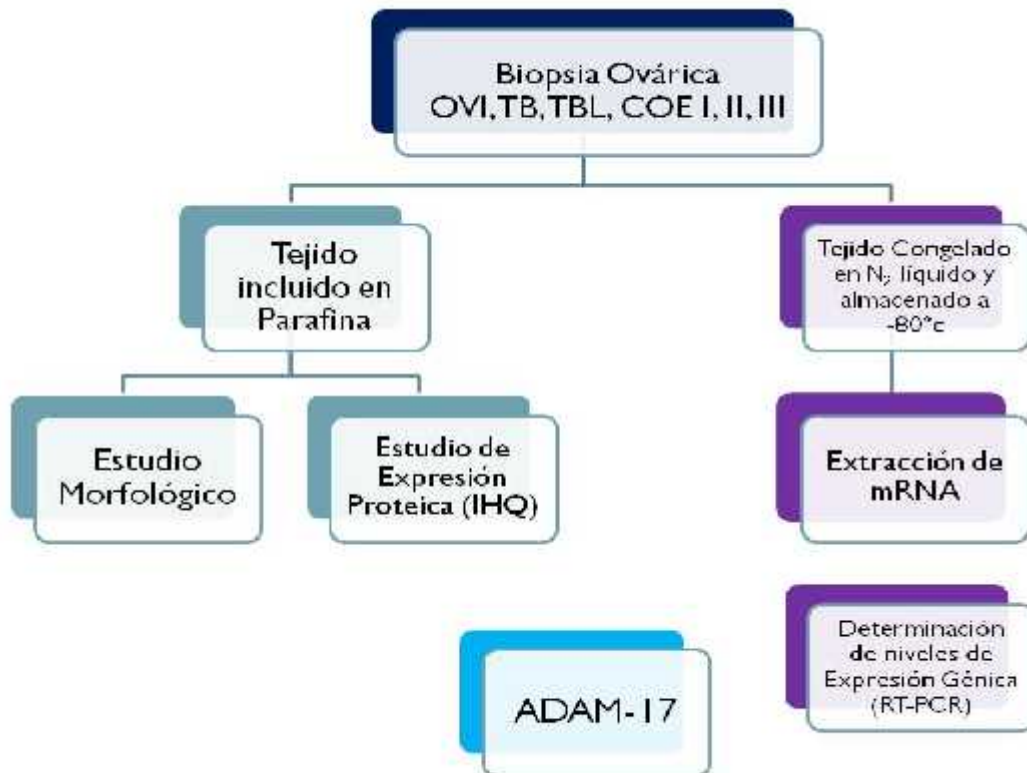


Figura 3. Diseño Experimental. OVI Ovario Inactivo, TB Tumor Benigno, TBL Tumor Borderline, COE I Cáncer Ovárico Epitelial tipo I, II Cáncer Ovárico Epitelial tipo II, III Cáncer Ovárico Epitelial tipo III, IHQ Inmunohistoquímica, RT-PCR Reacción de Polimerización en Cadena de DNA complementario.

Detección de ADAM-17 por Inmunohistoquímica (IHQ) en muestras ovario.

Este estudio se realizó con el objetivo de identificar la localización y semi-cuantificación de la proteína ADAM-17 en las diferentes muestras de tejido ovárico humano: ovario normal inactivo, tumores benignos del ovario, tumores borderline y Cáncer Ovárico Epitelial bien diferenciado (COE-I) moderadamente diferenciado (COE-II) y pobremente diferenciado (COE-III). Se utilizó un anticuerpo TACE H-300: sc-13973. Sta. Cruz Biotechnology, Inc. en una dilución de 1:500.

La técnica se realizó en cortes de tejidos previamente incluidos en parafina. Dichos cortes tuvieron un espesor de 5 μm , y fueron desparafinados en Xilol y posteriormente hidratados en concentraciones decrecientes de alcohol. Para la recuperación antigénica, las muestras se incubaron en buffer citrato 10 mM a pH 6.0, a 96-98°C por 20 minutos. Posteriormente, para bloquear la acción de peroxidasas endógenas, los tejidos fueron tratados con peróxido de hidrógeno al 3% en agua destilada por 15 minutos. Para evitar las uniones inespecíficas, las muestras se incubaron por 10 minutos con el bloqueador específico del kit Invitrogen (Histostain® SP - Ref 95-9943B) y posteriormente las muestras fueron incubadas con el anticuerpo primario. Dicha incubación se realizó a 4°C por 20 horas. Luego se incubó con el segundo anticuerpo biotinilado del kit Invitrogen por 20 minutos y, posteriormente, las muestras fueron incubadas con Estreptavidina del kit Invitrogen, marcada con peroxidasa, por 20 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó como sustrato final de la reacción, el cromógeno diaminobencidina durante 40 segundos, por lo que la tinción positiva fue de color café. Los tejidos pasaron por la batería de contra-tinción, Hematoxilina durante 2 minutos, seguido por una sumersión en Borato y posteriormente en Alcohol Ácido al 0,75%, para poder evidenciar los núcleos de color azul. Cada estudio contó con su control negativo al cual no se le agregó el primer anticuerpo. Al finalizar cada placa fue deshidratada en concentraciones crecientes de alcohol y en Xilol y fueron montadas en cubre-objeto para su evaluación. La evaluación de las placas se realizó en un microscopio

Olympus modelo BX51TF. Se obtuvieron las microfotografías y se realizó la semi-cuantificación a través de tres métodos independientes entre sí, con el fin de respaldar los resultados obtenidos:

1) H-Score. La evaluación de las placas se llevó a cabo por tres observadores independientes y ciegos a la categoría de la muestra. Cada sección del tejido analizado se dividió en cuatro cuadrantes. En cada uno de ellos se contaron 250 células epiteliales, dando un total de 1000 células epiteliales por muestra, asignándoles distintas intensidades de tinción (i): 0- sin tinción; 1- tinción leve; 2- tinción moderada; 3- tinción intensa. Para el cálculo de la intensidad de tinción de cada compartimiento se aplicó la siguiente fórmula de H-Score (HS), validada en nuestro laboratorio: $HS = S \% \text{ células teñidas} \times (i+1)/100$. Se obtuvo un promedio por tejido y posteriormente un promedio por grupo, según la clasificación considerada.

2) IOD. Cada sección del tejido analizado se dividió en seis cuadrantes, donde en cada uno de ellos se midió la intensidad óptica integrada de la tinción positiva, a través del programa computacional Image-Pro Plus 6.2, como se aprecia en la Figura 4. Se obtuvo un promedio por tejido y posteriormente un promedio por grupo, según la clasificación considerada.

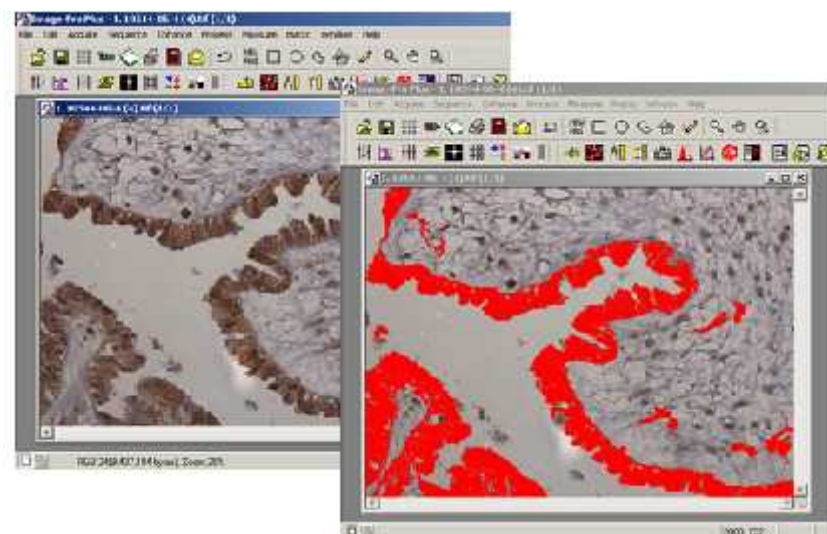


Figura 4. Tejido ovárico analizado con programa computacional Image-Pro Plus 6.2. Medición: IOD de la tinción positiva correspondiente al color rojo.

3) Porcentaje de células positivas. La evaluación de las placas se llevó a cabo por tres observadores independientes y ciegos a la categoría de la muestra. Cada sección del tejido analizado se dividió en cuatro cuadrantes. En cada uno de ellos se contaron 250 células epiteliales, dando un total de 1000 células epiteliales por muestra, asignándoles distintas intensidades de tinción (i): 0- sin tinción; 1- tinción leve; 2- tinción moderada; 3- tinción intensa. Para calcular el porcentaje de células con tinción positiva se sumaron los porcentajes de las intensidades 2 + 3.

Determinación de los niveles de mRNA de ADAM-17 por RT-PCR Convencional

Este estudio se realizó con el objetivo de caracterizar los niveles de mRNA de ADAM-17 en las diferentes muestras de tejido ovárico descritas para este estudio. La técnica de extracción de RNA se realizó a partir de tejidos congelados, utilizando aproximadamente 100 mg de tejido. Se les agregó Trizol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA) para homogeneizarlos, cloroformo para eliminar las trazas de fenol, y se incubó durante 15 minutos para luego ser centrifugado a 16.000 g por 15 minutos a 4°C. A continuación se extrajo 300-500 µl de la fase acuosa, donde se encuentra el RNA, luego se agregó el mismo volumen de isopropanol, y se incubó toda la noche a -20°C, para precipitar el RNA. Posteriormente se centrifugó a 16.000 g por 15 minutos a 4°C. El pellet resultante se lavó con etanol al 75% y se re-suspendió en H₂O_{DEPC}. La concentración y pureza del RNA, fueron medidas en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm. El DNA complementario (cDNA) fue sintetizado en una mezcla de reacción de 20 µl, utilizando 5 µg de RNA total, dNTPs 10 mM, Random Primers (500 µg/ml, Madison, WI, USA) y un volumen de H₂O necesario para completar 10,5 µl. Esta mezcla se calentó por 5 minutos a 65°C y se dejó enfriar otros 5 minutos en hielo. Posteriormente, se le agregó Buffer 5X first strand, DTT 0,1 M, RNAsa OUT 40 U/ul, y la enzima Superscript II (Invitrogen, 200 U/µl), se incubó 10 minutos a 25°C y luego 50 minutos a 42°C. El cDNA fue amplificado en una mezcla de reacción de 25 µL, utilizando 5 µl de Buffer 5X, 2 µl de MgCl₂ 50mM, 1 µl de dNTPs 10Mm, 0,2 µl de DNA polimerasa (Promega, 5U/µl), 1,5 µl de partidores sense y antisense de Adam-17 (15 pmol), 1 µl de partidores sense y antisense de β actina (1 pmol), un volumen de H₂O necesario para llegar a 24 µl y 1 µL de cDNA. Los partidores específicos para el gen ADAM-17 ⁽³⁷⁾ y β actina y su respectivo programa de PCR se resumen en las Tablas 1 y 2 respectivamente. Como control de carga (gen constitutivo) se utilizó β actina. Los productos de PCR fueron separados en un gel de agarosa al 2%, para validar el tamaño predicho de las bandas del amplificado, se utilizó un estándar de peso molecular. Los geles fueron visualizados bajo luz ultravioleta, fotografiados y analizados con un programa de densitometría UV Transilluminator UVP con Doc-it Software Image

Acquisition and 1 D Analysis (UVP, Inc. Laboratory Products, Upland, CA, USA). Como control negativo del PCR, se utilizó agua estéril (ausencia de cDNA), y como control positivo del PCR, se utilizó cDNA de células HOSE (Células epiteliales de la superficie del ovario humano), ya que en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se ha descrito la presencia de ADAM-17 en esta línea celular. La semicuantificación de los niveles de mRNA se realizó a través del programa computacional UN-SCAN-IT gel 4.1 (Silo Scientific Corporation).

Tabla 1. Partidores específicos para la amplificación por PCR de ADAM-17 y α -actina.

Gen	Partidores	Producto
ADAM-17	Sense: 5'-GTTGGTGAGCCTGACTCTA-3' Antisense: 5'-CCTCTTGTGGAGACTTGAG-3'	513 pb
α -ACTINA	Sense:5'-TGACCGGGTCACCCACACTGTGCCCATCTA-3' Antisense:5'-CTAGAAGCATTGCGGTGGACGATGGAGGG-3'	661 pb

Tabla 2. Programa de PCR para gen ADAM-17

Gen	Desnaturación	Annealing	Extensión	Ciclos
ADAM-17	94°C, 45''	60°C, 45''	72°C, 1'	28

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El cálculo del tamaño muestral (n) para este estudio, se realizó utilizando la fórmula de comparación de medias: $n = 2 (Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 S^2 / d^2$, asumiendo un α de 0,05, un β de 0,20, una desviación estándar de 0,16 y una diferencia entre las medias de un 25 %.

A partir de un total de siete muestras por cada grupo de estudio considerado, los resultados fueron expresados como Promedio \pm Error Estándar de la Media (EEM). Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graph Pad 5.0. En cada análisis, se realizó el test de normalidad Kolmogorov–Smirnov con el objetivo de conocer la distribución de los datos. En los datos obtenidos con distribución paramétrica, se realizó el test de Análisis de Varianza (ANOVA), para conocer la existencia de diferencias significativas, y finalmente se utilizó el post test de comparación múltiple Tukey, para identificar entre cuales grupos existen diferencias significativas. Para la Correlación de datos, se asumió un test Spearman no paramétrico, con intervalo de confianza de un 95%. Como criterio de significancia para este análisis se consideró un $p < 0,05$.

RESULTADOS

Objetivo 1. Determinar la localización proteica de ADAM-17 en muestras de ovario inactivo, tumor benigno, tumor borderline y Cáncer Ovárico Epitelial (grado I, II y III de diferenciación histológica) por Inmunohistoquímica

1) Evaluación de la inmunodetección de ADAM-17 en tejidos de ovario humano.

En todas las muestras de ovario de los distintos grupos en estudio, la inmunodetección de la proteína ADAM-17 se observó mayoritariamente en epitelio ovárico, generalmente de forma homogénea, en el citoplasma de células epiteliales. En la Figura 5 se observa la inmunodetección de ADAM-17 representativa de las muestras de COE I. En cambio, la tinción positiva en el estroma ovárico fue de forma heterogénea, en comparación a la tinción del epitelio. Es importante destacar que el anticuerpo utilizado está diseñado tanto para detectar la proteína ADAM-17 como la proteína precursora.

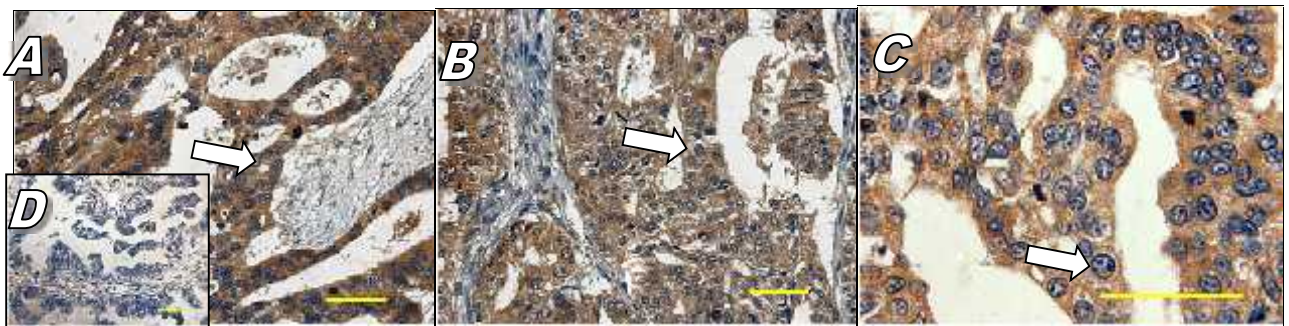


Figura 5. Inmunodetección de ADAM-17 en citoplasma de células epiteliales en tejidos ováricos. A y B. (400X). C. (1000X). D. Control negativo (400X). Barras amarillas corresponden a 50 micrones.

1.1) Inmunodetección de ADAM-17 en ovario inactivo.

En las muestras de ovarios inactivos se observa tinción positiva tanto en epitelio de la superficie ovárica, como en epitelios de invaginaciones y quistes de inclusión, como se aprecia en las microfotografías representativas de las IHQ de muestras de tejidos ováricos inactivos en la Figura 6. Cabe destacar, que el epitelio de la superficie del ovario (OSE) es una capa celular muy lábil y debido al corte del tejido y a las distintas etapas que se realizan durante la técnica de inmunohistoquímica, la capa del OSE normalmente se pierde; por esta razón, en ovarios normales inactivos es más fácil encontrar células epiteliales en invaginaciones y quistes de inclusión.

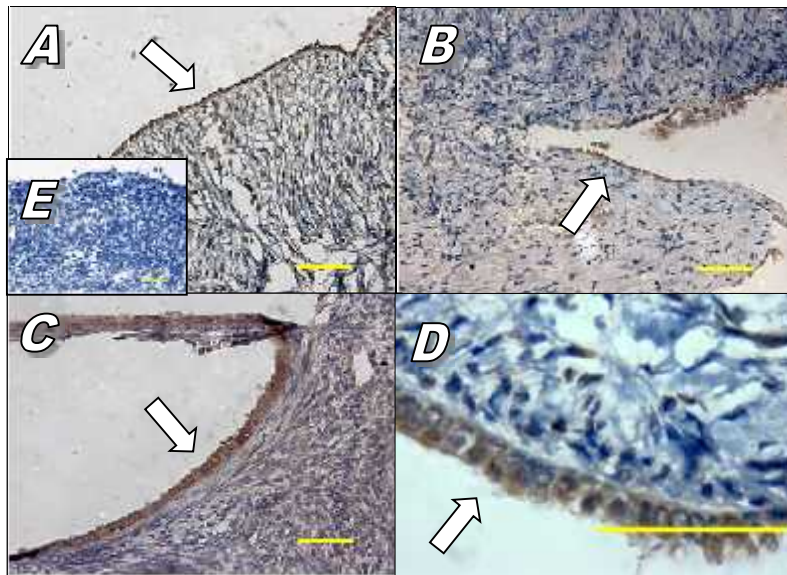


Figura 6. Inmunodetección de ADAM-17 en tejidos de OVI. A. Epitelio de superficie (400x). B. Epitelio de invaginación (400x). C. Epitelio de quiste de inclusión (400x). D. Epitelio de superficie (1000x). E. Control negativo (400X). Barras amarillas corresponden a 50 micrones.

1.2) Inmunodetección de ADAM-17 en tumores benignos del ovario.

La Figura 7 muestra microfotografías representativas de la inmunodetección de ADAM-17, principalmente en el epitelio de muestras de tumores benignos del ovario (TB). En el panel A, la flecha blanca señala la zona del epitelio superficial del ovario, donde se ha perdido la característica de la monocapa de este tipo celular, observándose que el epitelio está proliferando. En el panel B, la flecha blanca señala la zona del quiste de inclusión, donde se ha perdido la característica monocapa de este tipo celular.



Figura 7. Inmunodetección de ADAM-17 en tejidos ováricos de TB. A. Epitelio de superficie (400x). B. Quiste de inclusión (400x). C. Epitelio de superficie (1000x). D. Control negativo (400x). Barras amarillas corresponden a 50 micrones.

1.3) Inmunodetección de ADAM-17 en tumores borderlines del ovario.

Las microfotografías con inmunodetección de ADAM-17, representativas de los Tumores Borderline del ovario (TBL) se muestran en la Figura 8. La inmunodetección se observa principalmente en el epitelio, el cual ha proliferado, cambiando a un epitelio pseudoestratificado. En el estroma ovárico la inmunodetección es leve e irregular. En el panel A, la flecha blanca señala el epitelio pseudoestratificado. En el panel B, la flecha blanca señala el estroma ovárico.

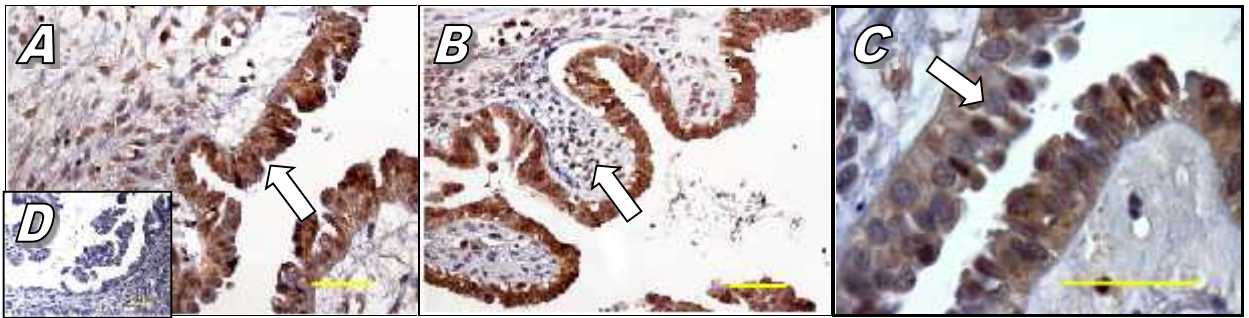


Figura 8. Inmunodetección de ADAM-17 en tejidos ováricos de TBL. A. Epitelio de superficie pseudoestratificado (400x). B. Estroma (400x). C. de superficie pseudoestratificado (1000x). D. Control negativo (400x). Barras amarillas corresponden a 50 micrones.

1.4) Inmunodetección de ADAM-17 en Cáncer Ovárico Epitelial

Las microfotografías con inmunodetección de ADAM-17, representativas de COE I, II y III, se muestran en la Figura 9, donde se aprecia mayor inmunodetección en relación a las muestras representativas de los grupos anteriores. La inmunodetección casi en su totalidad es en epitelio y de forma homogénea.

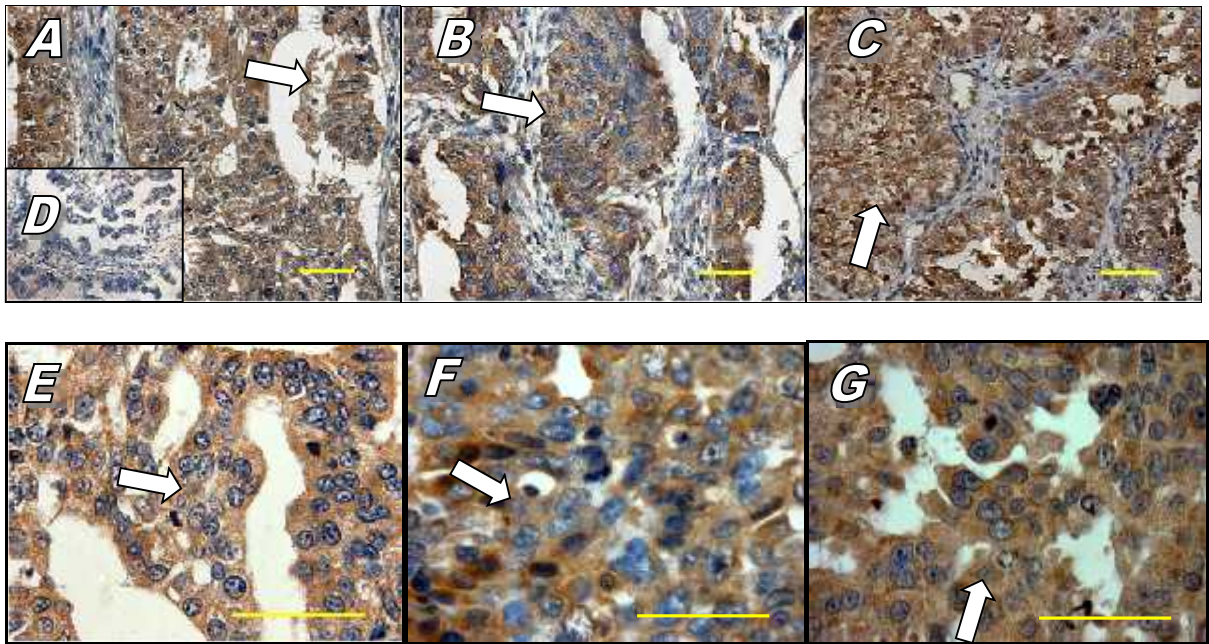


Figura 9. Inmunodetección de ADAM-17 en muestras de Cáncer Ovarico Epitelial. A. Inmunodetección de ADAM-17 en epitelio de COE I (400x). B. Inmunodetección de ADAM-17 en epitelio de COE II (400x). C. Inmunodetección de ADAM-17 en epitelio de COE III (400x). D. Control negativo COE I (400x). E. Inmunodetección de ADAM-17 en epitelio de COE I (1000x). F. Inmunodetección de ADAM-17 en epitelio de COE II (1000x). G. Inmunodetección de ADAM-17 en epitelio de COE III (1000x). Barras amarillas corresponden a 50 micrones.

2.1) Semicuantificación de la inmunodetección de ADAM-17 en muestras de ovarios.

Existe una tendencia a aumentar la inmunodetección de ADAM-17, tanto en intensidad como área, a medida que aumenta la transformación del epitelio, perdiendo la diferenciación celular, desde OVI a COE, encontrando diferencias estadísticamente significativas (* = $p < 0,05$) entre OVI versus COE II y COEIII, como se aprecia a través del método H-Score en la Tabla 1 y Figura 10. Además, en la Figura 11, se puede apreciar un cuadro comparativo de tres métodos diferentes de semicuantificación de la inmunodetección de ADAM-17, con la finalidad de respaldar los datos obtenidos.

Semicuantificación de la inmunodetección de ADAM-17 en muestras de ovarios

GRUPOS DE ESTUDIO	PROMEDIO \pm ESM (H-Score - Unidades Arbitrarias)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
OVI	2.24 \pm 0.36 ^{1,2}	43.5%
TB	3.22 \pm 0.21	17.8%
TBL	3.27 \pm 0.13	10.9%
COE I	3.44 \pm 0.06	5.2%
COE II	3.80 \pm 0.09 ¹	6.4%
COE III	3.57 \pm 0.09 ²	7.3%

Tabla 1. Semicuantificación de la inmunodetección de ADAM-17, a través del método H-Score, en siete muestras por cada grupo de estudio, donde se observa el promedio \pm ESM. (¹ y ² = $p < 0,05$) y el Coef. de Variación (%).

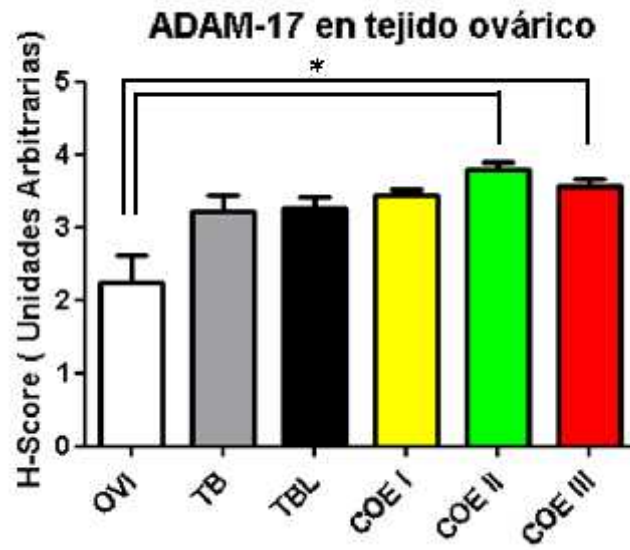


Figura 10. Semicuantificación de la inmunodetección de ADAM-17 en siete muestras por cada grupo de estudio, donde se observa el promedio \pm ESM. (* = $p < 0,05$).

Cuadro comparativo de tres metodologías diferentes de semicuantificación de la inmunodetección ADAM-17 en muestras de ovarios

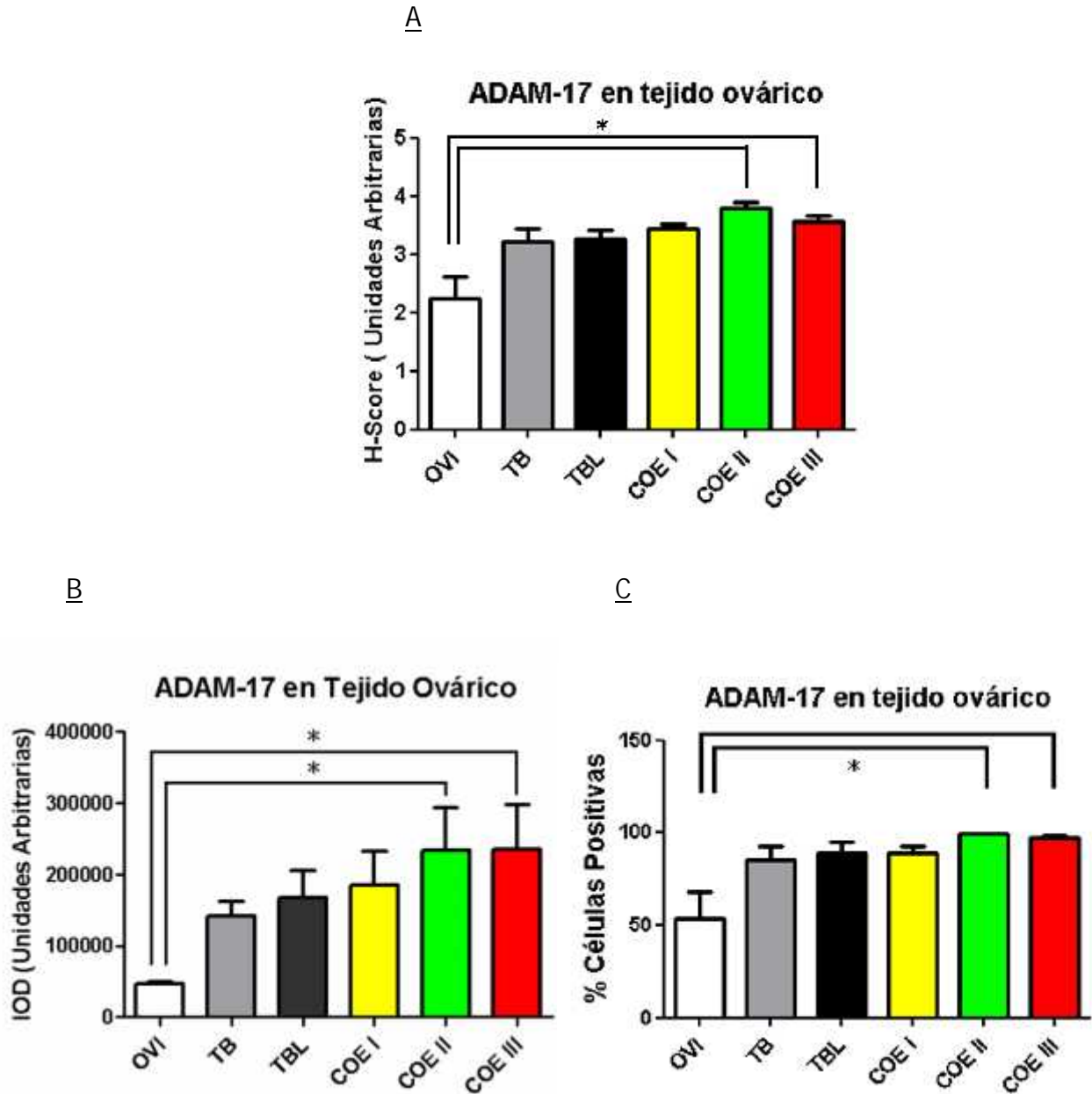


Figura 11. Cuadro comparativo, de tres métodos diferentes de semicuantificación de la inmunodetección de ADAM-17 en siete muestras por cada grupo de estudio, donde se observa el promedio \pm ESM. (* = $p < 0,05$). A. Método H-Score. B. Método IOD y C. Método Porcentaje de células positivas.

2.2) Semicuantificación de los niveles de mRNA de ADAM-17 en muestras de ovarios.

En todos los grupos de tejidos ováricos evaluados se detectó el mRNA de ADAM-17. Desde el grupo OVI hasta COE II, se aprecia un aumento gradual para los niveles de mRNA de ADAM-17, a excepción del grupo COE I en que se observa una leve baja. Se aprecian diferencias estadísticamente significativas ($* = p < 0,05$) entre los grupos OVI - COE II y TB - COE II, como se aprecia en las Figuras 12 y 13 y en la Tabla 2, donde los niveles de mRNA de ADAM-17 fueron normalizados con los niveles de mRNA de β -actina y semicuantificados a través del programa computacional UN-SCAN-IT gel 4.1.

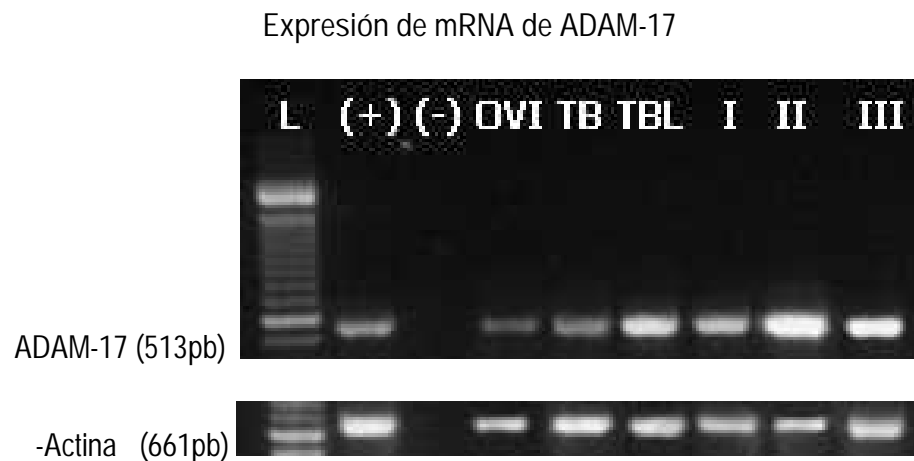


Figura 12. Gel de agarosa representativo de los PCR de ADAM-17, donde se aprecia en la parte superior, los niveles de mRNA de ADAM-17 y en la parte inferior, los niveles de mRNA de β -Actina en muestras de ovarios.

Semicuantificación de los niveles de mRNA de ADAM-17 en muestras de ovarios

GRUPOS DE ESTUDIO	PROMEDIO ± ESM (mRNA ADAM-17/mRNA -actina)	COEFICIENTE DE VARIACIÓN (%)
OVI	0,38 ± 0,06 ¹	39,3 %
TB	0,39 ± 0,04 ²	31,2%
TBL	0,50 ± 0,08	32.6%
COE I	0,50 ± 0,06	22.1%
COE II	0,67 ± 0,08 ^{1'2}	30.1%
COE III	0,65 ± 0,05	19.5%

Tabla 2. Semicuantificación de los niveles de mRNA de ADAM-17 en muestras de ovarios, donde se observa el promedio ± ESM (¹ y ² = p < 0,05) y el Coeficiente de Variación (%).

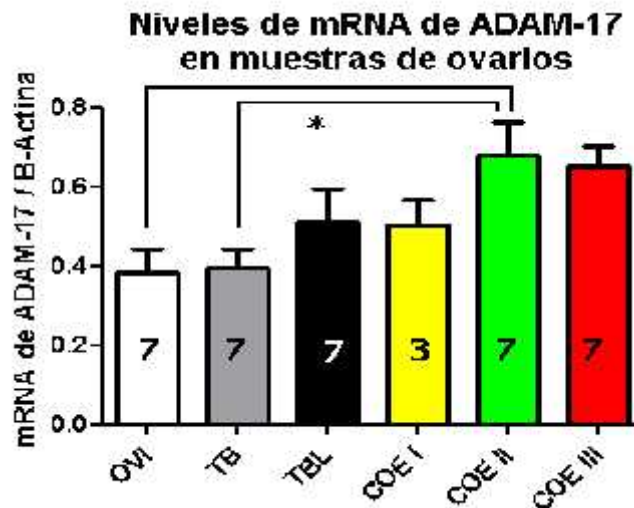


Figura 13. Semicuantificación de los niveles de mRNA de ADAM-17 en muestras de ovarios, donde se observa el promedio ± ESM, expresado en unidades arbitrarias normalizados con los niveles de -actina y representado por la razón mRNA ADAM-17/mRNA -actina. (* = p < 0,05).

Objetivo 3. Correlacionar los niveles de proteína de ADAM-17 con los de VEGF, NGF, trkA y trkA-p, en las diferentes muestras de tejido ovárico descritas para este estudio, cuyos resultados han sido obtenidos previamente en nuestro grupo de trabajo.

Los niveles proteicos de ADAM-17 evaluados con los niveles proteicos de VEGF, NGF, trkA y trkA-p, a través del método H-Score, en los grupos patológicos de este estudio, se encuentran asociados positivamente y de manera directamente proporcional, con correlaciones estadísticamente significativa ($p \leq 0,05$), de ADAM-17 y VEGF de 0,4477, ADAM-17 y NGF de 0,3871, ADAM-17 y trkA de 0,4936 y ADAM-17 y trkA-p de 0,5557, como se observa en la Figura 14.

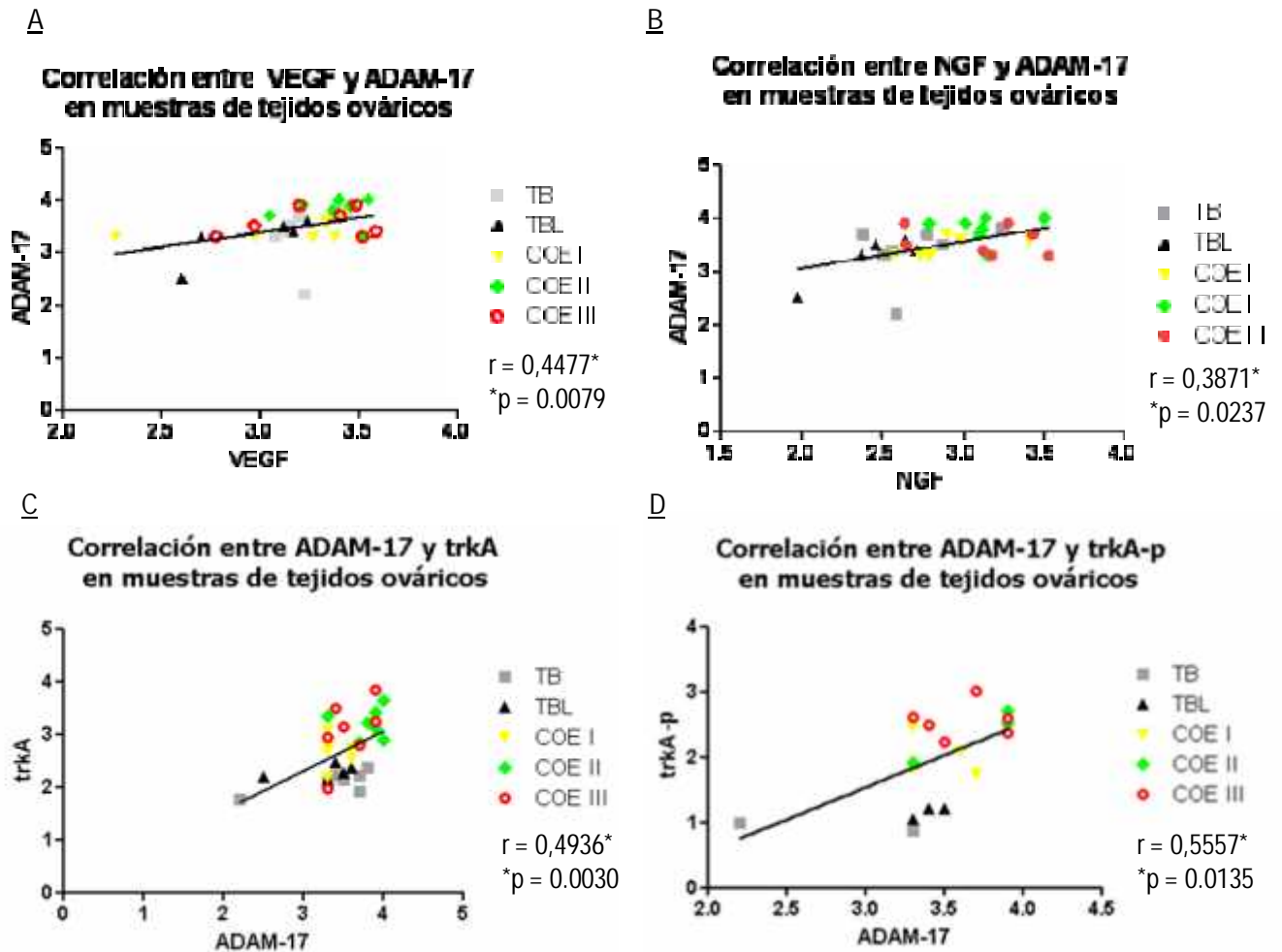


Figura 14. Relación de los niveles proteicos de ADAM-17 con los niveles proteicos de VEGF, NGF, trkA y trkA-p, en muestras de ovarios patológicos, donde en A se aprecia una correlación de $0,4477^*$ entre los niveles proteicos de ADAM-17 y VEGF, en B una correlación de $0,3871^*$ entre los niveles proteicos de ADAM-17 y NGF, en C una correlación de $0,4936^*$ entre los niveles proteicos de ADAM-17 y trkA y en D una correlación de $0,5557^*$ entre los niveles proteicos de ADAM-17 y trkA-p. (* = $p < 0,05$).

RESUMEN DE RESULTADOS

1. Se observó inmunodetección de ADAM-17, predominantemente en epitelio ovárico, a nivel citoplasmático, en muestras de ovario inactivo, tumor benigno, tumor borderline y COE (grado I, II y III de diferenciación histológica).
2. ADAM-17 aumenta su expresión génica y proteica en muestras de COE, pudiendo estar involucrado en la transformación del epitelio en tejido ovárico, desde ovario normal hasta COE.
3. Los niveles proteicos de ADAM-17 con los de VEGF, NGF, trkA y trkA-p, que participan en la progresión tumoral, se correlacionan positiva y significativamente en las diferentes muestras de tejido ovárico descritas para este estudio.

DISCUSIÓN

Para resguardar el crecimiento celular normal, se requiere de un control estricto de los factores que promueven el ciclo celular. Cuando esto no se logra, las diferentes moléculas y el entorno de estas, juegan un rol importante en la fisiopatología del cáncer en general ⁽¹⁾.

En este trabajo se encontró inmunodetección de ADAM-17 en todas las muestras de ovarios evaluadas, observándose principalmente en el citoplasma del epitelio ovárico, de forma homogénea. Además, como el anticuerpo utilizado está diseñado tanto para detectar la proteína ADAM-17 como la proteína precursora, sería interesante evaluar en estudios posteriores el tráfico intracelular y la activación de ADAM-17, con el fin de ver si existen diferencias en los niveles de ADAM-17 en los diferentes tejidos evaluados en este estudio.

Como los niveles de RNAm y proteína de ADAM-17 aumentan en muestras de COE en comparación a las muestras de ovario normal en este estudio, también sería interesante evaluar en estudios posteriores la actividad enzimática de ADAM-17, ya que un aumento en los niveles proteicos de ADAM-17 no necesariamente indicaría un aumento de la actividad enzimática de esta proteína.

Debido a que los resultados obtenidos en esta tesis podrían sugerir que ADAM-17 estaría involucrado en la transformación del epitelio en tejido ovárico: desde ovario normal hasta COE; sin embargo, no es posible considerar a ADAM-17 como molécula aislada y en un sistema cerrado; por lo cual, la interacción con otras moléculas y sus entornos, son importantes para evaluar un sistema biológico. Es así, como fue necesario evaluar correlaciones entre ADAM-17 y las proteínas que tienen importancia en la angiogénesis del cáncer ovárico epitelial como son: VEGF, NGF, trkA-total y trkA-p (resultados obtenidos previamente por nuestro grupo). Estos resultados

mostraron correlaciones positivas; lo cual sugeriría que existe alguna relación entre ADAM-17 y las proteínas mencionadas en la fisiopatología del cáncer ovárico.

Interesantemente, la mayor correlación encontrada fue entre ADAM-17 y TRKA-p, indicando una importante relación entre ambas proteínas. Esta relación puede ser explicada y avalada, por estudios que evidencian que trKA es sensible a sufrir un clivaje proteolítico en la membrana celular ⁽³⁸⁾, deleción de su ectodominio, que genera fragmentos activos, fosforilados constitutivamente en tirosina y participan en la vía de transducción de señales de dicho receptor ⁽³⁹⁾. Además, la correlación entre ADAM-17 y VEGF, podría estar avalada por evidencias en la literatura, ya que se ha encontrado que VEGF activa a ADAM-17, vía MAPK/ERK, y, a su vez, potencia el corte de su receptor VEGFR2 en células endoteliales ⁽⁴⁰⁾. Considerando que una de las funciones principales de ADAM-17 es el clivaje de proteínas ancladas a la membrana y debido a que su expresión se encuentra aumentada en el COE, podría facilitar el clivaje de moléculas y modular vías de señalización que están involucradas en la progresión de la enfermedad. Resultados preliminares de nuestro grupo, donde se examinó la localización de TrkA y ADAM-17 en una línea celular de COE por inmunofluorescencia, muestran que ambas proteínas (TrkA y ADAM-17) están localizadas de manera cercana en éstas células, al ser evaluadas por sobre posición (merge) de ambas inmunofluorescencias. Eventualmente, podríamos sugerir que ADAM-17, y también TrkA, puedan ser posibles blancos terapéuticos para el COE.

Los marcadores tumorales, también conocidos como biomarcadores, son sustancias producidas por las células tumorales o por otras células del cuerpo en respuesta al cáncer o a ciertas afecciones benignas (no cancerosas). Estas sustancias se pueden encontrar en muestras biológicas, tales como: sangre, orina y tejidos. Distintos marcadores tumorales se encuentran en distintos tipos de cáncer, y la concentración de un marcador tumoral específico varía dependiendo del tipo de cáncer ⁽⁴¹⁾. Sin embargo, las concentraciones de los marcadores tumorales no varían en todas las personas con cáncer, especialmente si el cáncer está en una etapa temprana.

Además, las concentraciones de algunos marcadores tumorales pueden variar en pacientes con enfermedades benignas. Hasta la fecha, no se han encontrado marcadores específicos para cada tipo de cáncer ⁽⁴¹⁾.

Es por esto, como habíamos postulado a ADAM-17 como un posible marcador tumoral y si bien, ADAM-17 cumple varios de estos requisitos, los incrementos discretos en los niveles proteicos en las muestras de COE, sugieren que ADAM-17 podría cumplir un rol en la transformación del epitelio ovárico, aunque no permitiría considerarlo como un marcador tumoral en COE por sí solo.

Por último, dentro de las proyecciones de esta tesis, sugerirían evaluar la expresión de ADAM-17 en otras muestras biológicas, tales como sangre, ya que esta proteína se expresa en algunas células sanguíneas ⁽²⁹⁾, en busca de un marcador útil como prueba de detección temprana, esperando una mayor sensibilidad y especificidad, ya que la mayoría de los marcadores tumorales no son lo suficientemente sensibles o específicos para detectar tempranamente el cáncer, como ocurre con el examen del marcador tumoral CA 125 para la detección de cáncer ovárico en mujeres con riesgo de esta patología ⁽⁴¹⁾. Actualmente, se está evaluando si la medición de CA 125, junto con otras pruebas y exámenes, ayudarían a detectar el cáncer ovárico antes de que se presenten los síntomas. Hasta ahora, la medición de CA 125 no ha sido lo suficientemente sensible o específica para que se use como examen selectivo de detección de cáncer de ovarios en todas las mujeres. El CA 125 se usa, por lo general, como un marcador para evaluar la respuesta al tratamiento y para evaluar la regresión del cáncer ovárico ⁽⁴¹⁾. Es por esto que, el CA125 sirve principalmente para el monitoreo de la terapia en cáncer de ovario.

Se podría sugerir que, ADAM-17 y también TrkA, pudieran ser posibles blancos terapéuticos para el COE, ya que la inhibición de ADAM-17 podría disminuir la activación de los receptores tirosina-quinasa, tales como TrkA. Así como también, la inhibición parcial de este receptor (TrkA) o la inhibición de la fosforilación de este receptor podrían inhibir la progresión del cáncer o la aparición de una metástasis. Además, la inhibición de ADAM-17 con

otros integrantes de su familia o en conjunto con medicamentos quimioterapéuticos podrían ser una alternativa para potenciar el tratamiento de esta enfermedad.

CONCLUSIONES

1. Debido a que la mayor correlación encontrada fue entre ADAM-17 y trkA-p, sugiere una importante relación entre estas proteínas, podría sugerir que ADAM-17 participaría en el clivaje proteolítico de trkA en la membrana celular, generando deleción de su ectodominio, con lo cual generaría fragmentos activos constitutivamente, fosforilados en tirosina y que participarían activando la vía de transducción de señales de dicho receptor.
2. Si bien los incrementos en los niveles de ADAM-17 son discretos, sugieren que ADAM-17 podría cumplir un rol en la transformación del epitelio ovárico, aunque no permitiría considerarlo como un marcador tumoral en COE por sí solo.

REFERENCIAS

- ¹ Biblioteca Nacional de Medicina de EE.UU. y los Institutos Nacionales de Salud. MedlinePlus. <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ovariancancer.html>
- ² Nagy JA, Dvorak AM, Dvorak HF. VEGF-A and induction of pathological angiogenesis. *Annu Rev Pathol.* 2:251-275. 2007.
- ³ Campos X, Munoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheimer C, Lara HE, Romero C. Nerve Growth Factor and its High-Affinity Receptor TrkA Participate in the Control of Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Epithelial Ovarian Cancer. *Gynecologic Oncology.* 104: 168-175, 2007.
- ⁴ Van Goor H, Melenhorst W, Turner A, Holgate S. Adamalysins in biology and disease. *Journal of Pathology;* 219: 277–286, 2009.
- ⁵ Arribas J, Borroto A. Protein ectodomain shedding. *Chem Rev* 102(12): 4627-38, 2002.
- ⁶ Kirkegaard T, Naresh A, Sabine VS, Tovey SM, Edwards J, Dunne B, Cooke TG, Jones Fey, Bartlett JMS. Expression of Tumor Necrosis Factor Converting Enzyme in Endocrine Cancers. *Am J Clin Pathol;*129:735-743, 2008.
- ⁷ Auersperg N, Wong A, Choi K-C, Kang SK, Leung P. Ovarian Surface Epithelium: Biology, Endocrinology and Pathology. *Endocrine Reviews.* 22:255-288, 2001.
- ⁸ Dyck H, Hamilton T, Godwin AK, Lynch HT, Maines-Bandiera S, Auersperg N. Autonomy of the epithelial phenotype in human ovarian surface epithelium: changes with neoplastic progression and with a family history of ovarian cancer. *Int J Cancer.* 69:429–436, 1996.
- ⁹ Fleming JS, Beaugié CR, Haviv I, Chenevix-Trench G, Tan OL.. Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: revisiting old hypotheses. *MCE.* 247: 4-21, 2006.
- ¹⁰ Murdoch W, McDonnell A. Roles of the Ovarian Surface Epithelium in Ovulation and Carcinogenesis. *Reproducción.* 123:743-750, 2002.
- ¹¹ Jordan S, Green A, Webb P. Benign Epithelial Ovarian Tumours-Cancer Precursors or Markers for Ovarian Cancer Risk? *Cancer Causes Control.* 17:623-632, 2006.
- ¹² Medina E., Kaempffer A. Mortalidad por Cáncer en Chile: consideraciones epidemiológicas. *Rev. méd. Chile.* vol.129, n.10, pp. 1195-1202, 2001. (ISSN 0034-9887).
- ¹³ Departamento de Estadística e Información de Salud, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. Indicadores de salud básicos del año 2008. <http://deis.minsal.cl/deis/indicadores/indi2008.pdf>

¹⁴ Departamento de Estadística e Información de Salud, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. Estadísticas Vitales. Mortalidad por causas. http://163.247.51.54/nuev/salida/tumores_1990_2007.php

¹⁵ Horner MJ, Ries LAG, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Howlader N, Altekruse SF, Feuer EJ, Huang L, Mariotto A, Miller BA, Lewis DR, Eisner MP, Stinchcomb DG, Edwards BK (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2006, National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/ based on November 2008 SEER data submission, posted to the SEER web site, 2009.

¹⁶ Parrott J, Nilsson E, Mosher R, Magrane G, Albertson D, Pinkel D, Gray J, Skinner M. Stromal-epithelial interactions in the progression of ovarian cancer: influence ad source of tumor stromal cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 175:29–39, 2001.

¹⁷ Singer G, Kurman R, Chang HW, Cho SK, Shih leM. Diverse Tumorigenic Pathways in Ovarian Serous Carcinoma. *Am. J. Pathol*. 160:1223–1228, 2002.

¹⁸ Scully R. Classification of human ovarian tumors. *Environmental Health Perspectives*. 73: 15-24, 1987.

¹⁹ Odegaard E, Staff A, Abeler VM, Kopolovic J, Onsrud M, Lazarovici P, Davidson B. The activated nerve growth factor receptor p-TrKA is selectively expressed in advanced-stage ovarian carcinoma. *Human Pathology*. 38:140-146, 2007.

²⁰ Guanter V. Estudio del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y del factor de crecimiento fibroblástico básico (BFGA) en la patología benigna y maligna de la próstata. Tesis doctoral. Universitat de Valencia, Facultat de Medicina y Odontología, Departament de Cirugía. Servei de publicacions: 39-64, 2005.

²¹ Martínez J. Angiogénesis tumoral. XLVII Reunión Nacional de la AEHH y XXI Congreso Nacional de la SETH, Lección conmemorativa. *Haematologica/edición española* .90 (Supl 1): 85- 94, 2005.

²² Ferrara N, Davis-Smyth T. The Biology of Vascular Endothelial Growth Factor. *Endocrine Reviews*. 18 (1): 4-25, 1997.

²³ Abulafia O, Sherer D. Angiogenesis of the ovary. *Am J Obstet Gynecol*. 182:240-6, 2000.

²⁴ Julio-Pieper M, Lara H, Bravo J, Romero C. Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogénico factors VEGF and TGFbeta I in the rat ovary. *Reproductive biology and endocrinology*. 4:57, 2006.

²⁵ Calzá L, Giardino L, Giuliani A, Aloe L, Levi-Montalcini R; Nerve growth factor control of neuronal expression of angiogenetic and vasoactive factors, *PNAS*, 98: 4160-4165, 2001.

²⁶ Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatt D, Lombardo G, Lazarovici P, Zappalá G, Pafumi C, Bernardini R. Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *FASEB*. 16:1307-1309, 2002.

-
-
- ²⁷ Park M, Kwak H, Lee H, Yoo D, Park I, Kim M, Lee S, Rhee C, Hong S. Nerve growth factor induces endothelial cell invasion and cord formation by promoting matrix metalloproteinase-2 expression through the phosphatidylinositol-3 kinase/akt signaling pathway and ap-2 transcription factor, the journal of biological chemistry, 282:30485-30496, 2007.
- ²⁸ Tapia V, Glaber F, Muñoz M, Yazigi R, Paredes A, Selman A, Vega M, Romero C. Tyrosine kinase A receptor (trkA): a potential marker in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol.* 121(1):13-23, 2011.
- ²⁹ Ruiz Paz, S. Tráfico intracelular y activación de la metaloproteasa ADAM17/TACE. Tesis de Doctorado. 2005.
- ³⁰ Black RA, CT Rauch, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature* 385(6618): 729-33, 1997.
- ³¹ Moss ML, SL Jin, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Carter HL, Chen WJ, Clay WC, Didsbury JR, Hassler D, Hoffman CR, Kost TA, Lambert MH, Leesnitzer MA, McCauley P, McGeehan G, Mitchell J, Moyer M, Pahel G, Rocque W, Overton LK, Schoenen F, Seaton T, Su JL, Becherer JD, et al. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature* 385 (6618): 733-6, 1997.
- ³² Allinson TM, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases" *J Neurosci Res* 74(3): 342-52, 2003.
- ³³ Peschon J, Slack J, Reddy P, Stocking KL, Sunnarborg SW, Lee DC, Russell WE, Castner BJ, Johnson RS, Fitzner JN, Boyce RW, Nelson N, Kozlosky CJ, Wolfson MF, Rauch CT, Cerretti DP, Paxton RJ, March CJ, Black RA. An essential role for ectodomain shedding in mammalian development. *Science* 282 (5392): 1281-4, 1998.
- ³⁴ Rosso O, Piazza T, Bongarzone I, Rossello A, Mezzanzanica D, Canevari S, Orengo AM, Puppo A, Ferrini S, Fabbi M. The ALCAM Shedding by the Metalloprotease ADAM17/TACE Is Involved in Motility of Ovarian Carcinoma Cells. *Mol Cancer Res*; 5 (12):1246–53, 2007.
- ³⁵ Kirkegaard T, Naresh A, Sabine V, Tovey S, Edwards J, Dunne B, Cooke T, Jones F, Bartlett J. Expression of Tumor Necrosis Factor Converting Enzyme in Endocrine Cancers. *Am J Clin Pathol*;129:735-743, 2008.
- ³⁶ Dijkstra A, Postma D, Noordhoek J, Lodewijk M, Kauffman H, Hacken N, Timens W. Expression of ADAMs ("a disintegrin and metalloprotease") in the human lung. *Virchows Arch.* 454:441–449, 2009.
- ³⁷ Lizama C, Rojas-Benítez D, Antonelli M, Ludwig A, Bustamante-Marín X, Brouwer-Visser J, Moreno RD. TACE/ADAM17 is involved in germ cell apoptosis during rat spermatogenesis. *Reproduction*, 2010.
- ³⁸ Cabrera N, Diaz-Rodriguez E, Becker E, Martín-Zanca D, Pandiella A. TrkA Receptor Ectodomain Cleavage Generates a Tyrosine-phosphorylated Cell-associated Fragment. *J Cell Biol.* Vol 132 (3): 427-436, 1996.

³⁹ Díaz-Rodríguez E, Cabrera N, Esparís-Ogando A, Montero JC, Pandiella A. Cleavage of the TrkA neurotrophin receptor by multiple metalloproteases generates signalling-competent truncated forms. *Eur J Neurosci*. Vol. 11: 1421–1430, 1999.

⁴⁰ Swendeman S, Mendelson K, Weskamp G, Horiuchi K, Deutsch U, Scherle P, Hooper A, Rafii S, Blobel C. VEGF-A stimulates ADAM17-dependent shedding of VEGFR2 and crosstalk between VEGFR2 and ERK signaling. *Cir Res*. October 24: 103 (9):916-918, 2008.

⁴¹ Bigbee W, Herberman RB. Tumor markers and immunodiagnosis. In: Bast RC Jr., Kufe DW, Pollock RE, et al., editors. *Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc., 2003.