



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

“Niveles del microRNA-23b en la progresión del cáncer ovárico epitelial y el efecto de NGF en los niveles de este microRNA en líneas celulares de epitelio ovárico”

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímica

ANDREA CAROLINA HERNÁNDEZ JORQUERA

Patrocinante

Dra. Carmen Romero Osses

Laboratorio de Endocrinología y
Biología de la Reproducción, Hospital
Clínico de la Universidad de Chile

Directora de memoria

Dra. Carmen Romero Osses

Laboratorio de Endocrinología y
Biología de la Reproducción, Hospital
Clínico de la Universidad de Chile

Santiago - Chile
2017

*Dedicado a la banda que amo
My Chemical Romance*

Agradecimientos

Primero quisiera agradecer a mi directora de tesis, Dra. Carmen Romero por recibirme durante ya casi 2 años en su laboratorio y por su gran apoyo y cariño entregados durante este proceso.

A todos en el laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción: a la Dra. Margarita Vega, por su apoyo y cariño. A todo el equipo de asistencia del laboratorio, ya que hicieron que mi práctica profesional fuera una experiencia muy grata, haciendo una mención especial en este grupo para Egardo e Iván que me guiaron durante la práctica y me enseñaron todo lo que pudieron, respondiendo mis dudas con mucha paciencia.

A mis compañeros de laboratorio, que hicieron más entretenida mi estancia en el laboratorio, siempre dispuestos a responderme dudas, Rocío, Lorena, Caro, Iván, Christopher, Maritza, gracias por su apoyo, amistad y las buenas conversaciones y experiencias.

A mi sicóloga, por ayudarme a enfrentar distintas cosas durante este proceso.

Agradecer a mi madre y a mi abuela por siempre estar para mí y ayudarme a llegar hasta donde estoy hoy. Y un especial agradecimiento a mi madre por la paciencia que me tuvo durante este proceso. Gracias mami y pelli las amo

Un gran agradecimiento a mis amigos Sara y Sergio y a sus parejas, también mis amigas, Chio y Andrea por todo el gran apoyo que me han brindado y por aguantarme en todas mis mañas y mal humor.

Y finalmente, agradecer a mi pololi, al que adoro incondicionalmente por realmente haber sido mi compañero y mi gran apoyo durante mi tesis, de verdad agradezco que me hayas aguantado en este proceso, porque sé que no fue fácil.

Te amo Luis Eduardo.

iii. ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
i. Dedicatoria.....	ii
ii. Agradecimientos.....	iii
iii. Índice de contenido.....	iv
iv. Índice de figuras y tablas.....	vi
v. Financiamiento.....	vii
vi. Abreviaturas.....	viii
vii. Resumen.....	x
viii. Abstract.....	xii
I. Introducción.....	14
I.1. Cáncer de ovario.....	14
Diagnóstico.....	15
Causas.....	16
I.2. NGF y su receptor TRKA.....	18
Rol en cáncer de ovario.....	19
I.3. miRNAs.....	20
Biogénesis de los miRNAs.....	21
miRNAs en cáncer.....	23
miRNAs en cáncer ovárico epitelial.....	23
II. Hipótesis.....	25
III. Objetivos generales.....	25
IV. Objetivos específicos.....	25
V. Metodología.....	26

V.1. Estudios ex vivo.....	26
Obtención de muestras.....	26
V.2. Estudios in vitro.....	28
Cultivo celular.....	28
Líneas Celulares.....	29
Estímulos.....	29
V.3. Niveles de miRNAs.....	30
Extracción de miRNAs.....	30
RT-PCR de miR-23b-3p.....	31
V.4. Análisis estadístico.....	33
V.5. Diseño experimental.....	34
VI. RESULTADOS.....	36
Objetivo 1. Determinar los niveles de miR-23b en la progresión del COE en muestras de tejido.	36
Objetivo 2. Evaluar en las líneas celulares HOSE y A2780 el efecto de NGF en la disminución de miR-23b.	37
Objetivo 3. Evaluar si el inmunobloqueo de NGF o la inhibición del receptor TRKA cambian los niveles del miRNA-23b en líneas celulares de epitelio ovárico.....	39
VII. DISCUSIÓN.....	41
VIII. CONCLUSION.....	44
IX.- PROYECCIONES.....	45
X. BIBLIOGRAFÍA.....	47
XI. ANEXO.....	54

iv. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura N°1. Biogénesis de los microRNA.....	22
Figura N°2. Diseño experimental de los estudios ex vivo e in vitro.....	35
Figura N°3. Niveles de microRNA-23b-3p en Tejidos Ováricos.....	36
Figura N°4. Niveles basales de microRNA-23b-3p en líneas celulares.....	37
Figura N°5. Efecto de NGF en los niveles de microRNA-23b-3p en líneas celulares.	38
Figura N°6. Efecto de inhibir el receptor TRKA en los niveles de microRNA-23b-3p en líneas celulares.	40
Figura N°7. Efecto de inmunobloquear NGF en los niveles de microRNA-23b-3p en líneas celulares.	40
Tabla 1. Partidores utilizados en RT-PCR.....	32
Tabla 2. Programa de RT-PCR usado para amplificar el cDNA.....	33

v. FINANCIAMIENTO

Esta tesis fue realizada en el Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción, Hospital Clínico Universidad de Chile.

Esta Investigación se desarrolló en el marco del proyecto FONDECYT N° 1160139 (C.R.)

vi. ABREVIATURAS

Ago2: Argonaute 2

BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro (del inglés Brain-Derived Neurotrophic Factor)

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementario (del inglés complementary Deoxyribonucleic Acid)

COE: Cáncer ovárico epitelial

COE I: Cáncer ovárico epitelial de grado I o bien diferenciado

COE II: Cáncer ovárico epitelial de grado II o moderadamente diferenciado

COE III: Cáncer ovárico epitelial de grado III o pobremente diferenciado

COX-2: Ciclooxygenasa 2 (del inglés Cyclooxygenase 2)

DMEM: Medio Eagle modificado por Dulbecco (del inglés Dulbecco's Modified Eagle Medium)

DGCR8: DiGeorge síndrome crítica región 8

EDTA: Ácido etilendiaminetetraacético (del inglés Ethylenediaminetetraacetic acid)

HOSE: Epitelio de la superficie ovárica humana (del inglés Human Ovarian Surface Epithelium)

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero (del inglés messenger Ribonucleic Acid)

miRISC: complejo silenciador inducido por miRNAs (del inglés miRNA-induced silencing complex)

miRNA o Mir: Micro RNA

NGF: Factor de crecimiento nervioso (del inglés Nerve Growth Factor)

OVI: Ovario normal inactivo

pb: Pares de base

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction)

RNA: Ácido ribonucleico (del inglés Ribonucleic Acid)

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (del inglés Real Time-Polymerase Chain Reaction)

TBE: Tumor benigno

TBO: Tumor borderline

TRBP: Proteína de unión a RNA en respuesta a trans-activación (del inglés TAR RNA-binding protein)

TRKA: Receptor tirosina quinasa A (del inglés Tyrosine Receptor KinaseA)

UA: Unidades arbitrarias

UP: Primer Universal (del inglés Universal Primer)

UTR: Del inglés untranslated region

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor)

VEGFR2: Receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2)

XPO5: Exportina-5 (del inglés Exportin-5)

vii. RESUMEN

El cáncer ovárico epitelial (COE) es la primera causa de muerte por neoplasias ginecológicas en países desarrollados como Canadá y EE.UU. En el caso de Chile, es la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas. Este cáncer se caracteriza por ser de diagnóstico tardío, debido a su sintomatología poco específica 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. En COE se ha encontrado que NGF tiene un rol importante, estimulando principalmente, la proliferación y la angiogénesis de manera directa e indirecta. Además, 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, su forma activa (p-TRKA) y c-Myc, entre otros.

Actualmente, la literatura está describiendo otras moléculas involucradas en la carcinogénesis, los microRNA (miRNA o miR). Son pequeños RNA no codificantes de alrededor de 22 nucleótidos, capaces de regular la expresión de genes, al impedir la traducción del mRNA. Están involucrados en varios procesos biológicos como el desarrollo, la diferenciación, la apoptosis y la proliferación, por lo que los miRNA también tienen un importante rol en la oncogénesis, debido a que pueden actuar como supresores de tumores o como oncogenes. Uno de estos miRNA es miR-23b, el cual se ha descrito estar disminuido en varios tipos de cáncer, como lo son el cáncer de próstata, el cáncer de vejiga y el cáncer ovárico entre otros.

Hipótesis: En el cáncer ovárico epitelial el aumento en los niveles de NGF, produce una disminución en los niveles del microRNA 23b-3p.

Objetivos: Evaluar los niveles del miR-23b-3p en muestras de tejidos ováricos y si este se encuentra disminuido por efecto de NGF en líneas celulares.

Metodología: En los experimentos ex vivo, se evaluaron los niveles del miR-23b de las muestras de tejido (OVI, Tumores y COE) por RT-PCR. En cuanto a los experimentos en líneas celulares, se evaluó el efecto de NGF sobre los niveles del miR-23b, al estimular directamente con NGF. Para evaluar si NGF inhibe a miR-23b, se utilizó un anticuerpo anti-NGF y un inhibidor de su receptor TRKA.

Resultados: Los niveles del miR-23b en los tejidos ováricos disminuyen en los grupos de tumores y COE al compararlos con los tejidos ováricos normales inactivos. En las líneas celulares, al estimular con NGF se observó una disminución en los niveles del miRNA-23b y el efecto de NGF fue posteriormente revertido al inmunobloquear NGF y al inhibir su vía de señalización con un inhibidor de TRKA.

Proyecciones: Para lograr entender mejor los mecanismos involucrados en este cáncer sería interesante evaluar otras moléculas que podrían estar modificando los niveles del miR-23b, tales como c-Myc y COX-2, ya que en otros tejidos se ha encontrado que alteran los niveles de este miR. También sería importante encontrar los blancos de este miRNA.

viii. ABSTRACT

"Levels of microRNA-23b in the progression of epithelial ovarian cancer and the effect of NGF on the levels of this microRNA in ovarian epithelial cell lines"

Epithelial ovarian cancer (COE) is the leading cause of death from gynecological malignancies in developed countries such as Canada and USA. In the case of Chile, it is the second cause of death due to gynecological neoplasias. This cancer is characterized by late diagnosis, due to its poorly specific symptoms and poor response to treatment. For these reasons, it is important to understand the mechanisms of both the genesis and development of this neoplasm. It is a company that is dedicated mainly to the generation of information and indirect. In addition, studies in our laboratory have reported that epithelial ovarian cancer progression there is an increase of VEGF, NGF and TRKA receptor levels, its active form (p-TRKA), and also c-Myc, among others.

Currently the literature is describing another molecules involved in carcinogenesis, the microRNA (miRNA or miR). They are small non-coding RNAs of about 22 nucleotides, capable of regulating gene expression, by preventing translation of mRNAs. They are involved in several biological processes such as development, differentiation, apoptosis and proliferation, so miRNAs also play an important role in oncogenesis, because they can act as tumor suppressors or as oncogenes. One of these miRNAs is miR-23b, which has been reported to be decreased in several types of cancer, such as prostate cancer, bladder cancer and ovarian cancer among others.

Hypothesis: In epithelial ovarian cancer there is an increase in NGF levels, which causes a decrease of miR23b-3p levels.

Objectives: To evaluate miR-23b-3p levels in samples of ovarian tissues and to evaluate whether NGF diminish miR-23b levels in epithelial ovarian cell lines.

Methods: In ex vivo experiments, miR-23b-3p levels of tissue samples (OVI, Tumors and COE) were evaluated by RT-PCR. Epithelial ovarian cell lines were used to evaluate the effect of NGF on miR-23b levels. This effect was also blocked when an antibody anti-NGF and an inhibitor of TRKA receptor were used.

Results: MicroRNA-23b levels in ovarian tissues were reduced in the tumors and COE groups when were compared to the normal ovarian tissues or control group. In epithelial ovarian cell lines, miRNA-23b levels decreased by NGF stimulation and this effect was subsequently reversed by NGF immunoblocking and when a specific TRKA inhibitor was used to inhibit the signaling pathway through TRKA.

Projections: In order to better understand the mechanisms involved in this cancer, it would be interesting to evaluate molecules that could be affecting miR-23b levels such as c-Myc and COX-2, because in other type of cancer these molecules change miR-23b levels and also it will be important to know which are the target of this miR.

I.INTRODUCCIÓN

I.1. Cáncer de ovario

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 más alta en países desarrollados como Canadá, EE.UU y países de Europa occidental (Hennessy, Coleman, & Markman, 2009; Torre et al., 2015). En Chile, el cáncer de ovario es la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas (MINSAL, Chile, 2013).

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 genitourinarias, de manera que el diagnóstico se realiza en estadios avanzados de esta enfermedad (Cuello F, 2013; Torre et al., 2015). 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 30% (MINSAL, Chile, 2013).

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. Sin embargo, el factor de riesgo más importante es tener antecedentes familiares de cáncer de ovario o de mama. Por otro lado, los factores que disminuyen el riesgo de desarrollar este cáncer son

el uso de anticonceptivos orales, el embarazo y la lactancia, ya que disminuyen el número de ovulaciones (Hennessy et al., 2009).

Diagnóstico

La detección temprana es crítica para mejorar la sobrevida, para lo cual es necesario que la paciente tenga lesiones clínicamente detectables en etapas tempranas (Hennessy et al., 2009). Por otra parte, en la actualidad, los métodos de diagnóstico permiten que sólo el 20% de las pacientes sean diagnosticadas cuando el cáncer se encuentra localizado solamente en el ovario (Bast et al., 2009). En esta línea, 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) (Hennessy et al., 2009).

Cabe destacar que los niveles séricos del marcador tumoral CA125 que se utiliza actualmente, 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 (Yang et al., 2015).

Causas

El cáncer de ovario puede desarrollarse a partir de varios tipos celulares como las células germinales, células de la granulosa o células epiteliales. Cuando la malignidad comienza en estas últimas se denomina cáncer ovárico epitelial (COE), constituyendo más del 90% de los tipos de cáncer de ovario (Chen et al., 2003)

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

- 1. La ovulación incesante.** Se postula que las repetitivas rupturas 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 (Hennessy et al., 2009).
- 2. La estimulación gonadotrópica.** Se postula que los altos niveles de las gonadotropinas 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 (Hennessy et al., 2009). Lo anterior se explica por el hecho que las gonadotropinas producen un aumento en la producción de estrógenos por parte de las células epiteliales (Fleming, Beaugié, Haviv, Chenevix-Trench, & Tan, 2006), de modo que el estradiol

(en conjunto con la gonadotrofinas) aumenta la expresión proteica del factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor de alta afinidad, TRKA, los que juegan un rol importante en la angiogénesis y proliferación del cáncer ovárico epitelial (Campos et al., 2007). Además, los genes de NGF y VEGF tienen elemento de respuesta para estradiol (Valladares et al., 2017), lo que implica un aumento de la angiogénesis, ya que en nuestro laboratorio se ha encontrado que ambos factores de crecimiento aumentan con la progresión del COE (Tapia et al., 2011), y este cáncer se caracteriza por ser altamente angiogénico.

- 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 (Fleming et al., 2006).

Por otro lado, existen diversas mutaciones, que contribuyen a la patogénesis de muchos tipos de cáncer. Específicamente en COE, un 15% de las pacientes tiene mutaciones en el gen *BRCA1* o *BRCA2* (Wahner et al., 2017).

Actualmente, hay muchas moléculas que juegan un rol importante en el desarrollo de este cáncer, entre las que destacan el factor de crecimiento nervioso (NGF) y su receptor de alta afinidad, TRKA (Vera, Tapia, Vega, & Romero, 2014).

I.2. NGF y su receptor TRKA

El factor de crecimiento nervioso (NGF) pertenece a la familia de neurotrofinas, donde encontramos, NGF, BDNF, neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-6 (NT-6) y neurotrofina-4/5 (NT-4/5) (W. Wang et al., 2014).

El factor de crecimiento nervioso promueve la supervivencia neuronal y, a nivel ovárico, se ha encontrado que participa en la expresión de los receptores de FSH en células de granulosa (Julio-pieper et al., 2006; Romero et al., 2002), así como también en la progresión del cáncer de ovario epitelial y en la angiogénesis de esta patología (Tapia et al., 2011; Urzua et al., 2012).

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 (Allard et al., 2012).

Por lo demás, existen tres receptores de la familia TRK. Ellos son: 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 (Julio-Pieper et al., 2009).

Rol en cáncer de ovario

Debido a que NGF promueve la proliferación y sobrevivencia celular, éste 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, causando la secreción de VEGF (Campos et al., 2007).

Posteriormente, VEGF actúa sobre las células endoteliales, provocando el aumento en la sobrevivencia, proliferación y migración de estas células (Tapia et al., 2011), lo que se conoce como angiogénesis. También, el NGF puede actuar de forma directa sobre las células endoteliales, promoviendo así la angiogénesis en el ovario (Campos et al., 2007). 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 (Tapia et al., 2011) y que en explantes de COE se encontró un aumento de la proliferación celular, así como también un aumento en la secreción de VEGF, por estimulación de NGF (Campos et al., 2007) y en líneas celulares de cáncer de ovario (Tapia et al., 2011).

I.3. miRNAs

Los microRNAs (miRNA o miR) son moléculas de RNA pequeños con una longitud de entre 18 y 25 nucleótidos, no codificantes y están altamente conservados entre las especies (Kinose et al., 2014).

Su función es el silenciamiento de moléculas de mRNA a través de dos mecanismos como la represión transcripcional y la degradación dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con el mRNA. Por lo general el sitio de unión al mRNA blanco está dado por la región 3' UTR de este mRNA (Piva et al., 2013). Los miRNAs en su región 5' desde el nucleótido en la posición 2 al 7 son conocidos como la región semilla y es una región clave para el reconocimiento de su blanco (Ha & Kim, 2014). El resto de las bases no requieren de un 100 por ciento de complementariedad para lograr ejercer su función (Müller et al., 2014).

Un punto importante a considerar de los miRNAs es que un solo miRNA es capaz de reconocer múltiples blancos y que solo un mRNA puede ser regulado por varios miRNAs, lo que hace importante entender la regulación de los microRNA y sus blancos (Piva et al., 2013).

Por último, los miRNAs están involucrados en varios procesos celulares como el desarrollo, la diferenciación, la apoptosis y la proliferación (Ebert & Sharp, 2012; Vitsios et al., 2017).

Biogénesis de los miRNAs

Las secuencias precursoras de los miRNAs están ubicadas en diferentes partes del DNA y pueden presentarse como unidades transcripcionales mono o policistrónicas (Olena & Patton, 2009).

Los miRNAs son transcritos desde el genoma por la RNA polimerasa II, produciendo una molécula larga con una estructura en forma de horquilla (stem-loop) compuesta por un tallo y un bucle, denominada miRNA primario (pri-miRNA). Luego, el tallo es cortado por la endonucleasa Drosha que junto con el cofactor DGCR8 (también llamado Pasha en invertebrados), forman el complejo microprocesador (Fig. 1). DGCR8 interactúa con los pri-microRNAs a través de los segmentos de cadena simple y del tallo, permitiendo que Drosha los elimine. El producto resultante es una molécula de 60-70 nucleótidos denominada miRNA precursor (pre-miRNA).

El pre-miRNA es exportado del núcleo al citoplasma gracias a la exportina-5 dependiente de actividad Ran-GTP. Una vez en el citoplasma, GTP es hidrolizada a GDP y el pre-miRNA es liberado del complejo exportador al desensamblarse, y es reconocido por el complejo endonucleasa formado por Dicer y TRBP (Proteína de unión a RNA en respuesta a trans-activación). Dicer rompe y elimina el bucle de los pre-miRNAs, generando un miRNA de doble hebra de aproximadamente 22 nucleótidos, que contiene una cadena madura de miRNA y su cadena complementaria.

Posteriormente, este complejo se ensambla con la proteína Ago2 gracias a la unión con TRBP, para formar el complejo silenciador miRISC (Fig.1), el cual selecciona una de las cadenas que será responsable de dirigir el silenciamiento (madura), y la otra será degradada (Ha & Kim, 2014).

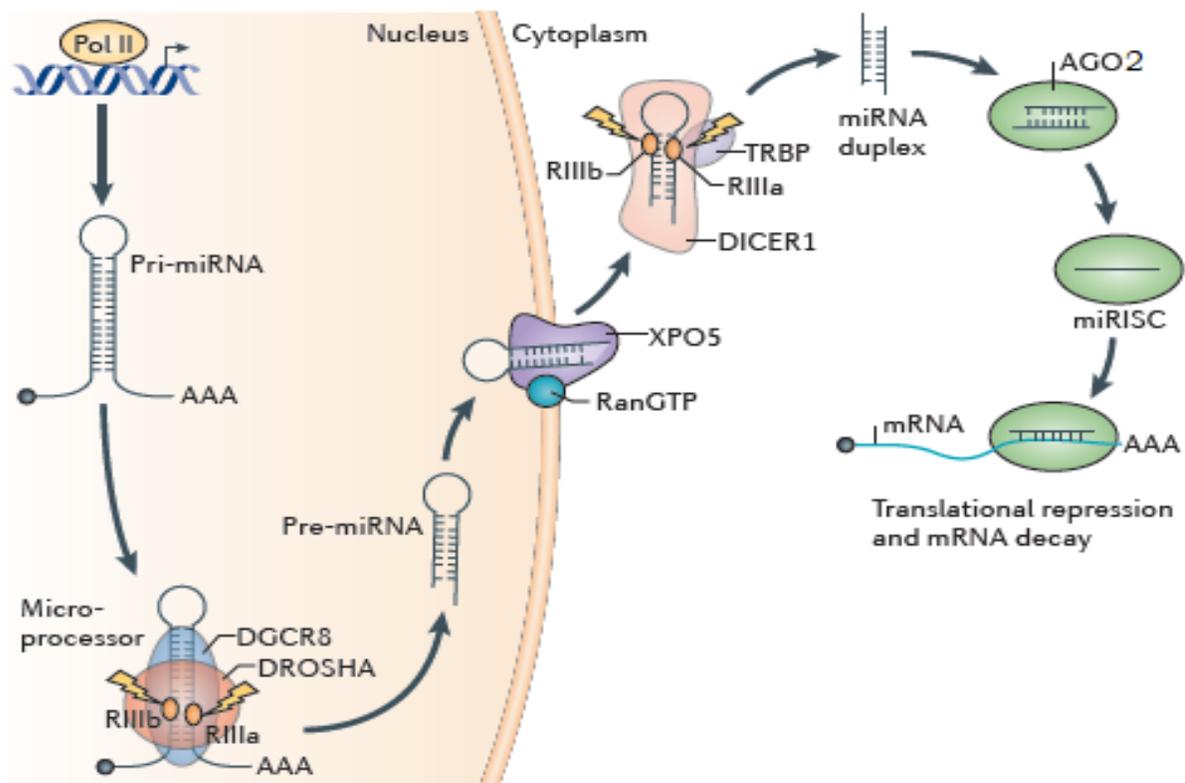


Figura N°1. Biogénesis de los microRNA. Los miRNAs son transcritos como Pri-miRNA por la RNA Pol II en el núcleo, luego son cortados por Drosha y DGCR8 produciendo el Pre-miRNA, que es exportado desde el núcleo al citoplasma por XPO5 y es posteriormente procesado por Dicer generando un miRNA maduro de doble hebra, este se ensambla con Ago2, formando el complejo miRISC (Modificado de Lin & Gregory, 2015).

miRNAs en cáncer

La regulación y el equilibrio de los miRNAs son muy importantes para el correcto funcionamiento celular, ya que estos están regulando proteínas oncogénicas y oncosupresoras. En el proceso neoplásico se pierde el equilibrio y cambia la expresión de los miRNAs (Iorio & Croce, 2012).

Varios estudios muestran que los miRNAs se expresan de forma anormal en diferentes tipos de cánceres (Visone & Croce, 2009). Además, se ha determinado que más del 50% de los genes que transcriben para estos miRNAs, se localizan en sitios de inestabilidad genómica asociadas al desarrollo de cáncer (Esquela-Kerscher & Slack, 2006).

En la actualidad, el nuevo desafío es encontrar patrones de expresión de los miRNAs en los distintos cánceres, identificar posibles miRNAs que sirvan de biomarcadores y blancos terapéuticos para los distintos tipos de cáncer.

miRNAs en cáncer ovárico epitelial

Hay una amplia evidencia de que los miRNAs están desregulados en el COE. Dentro de los miRNAs que están elevados en esta patología, tenemos a la familia del miR-200, al miR-221, etc. Mientras que los miRs que están disminuidos podemos encontrar al miR-145, al miR-125b y al miR-23b entre otros (Mezzanzanica et al., 2010).

Dentro de los miRNAs mencionados se destaca la presencia del miR-23b, que es un miRNA de 21 pb, existen 2 hebras provenientes del pre-miRNA, pero a la hebra a la que nos referiremos en este trabajo es al miR-23b-3p.

Se ha documentado que en cáncer de mama, próstata y de cuello uterino se encuentran niveles reducidos de este miR (Campos-Viguri et al., 2015). Adicionalmente, en COE se han encontrado que sus niveles están disminuidos y esto está asociado a una menor supervivencia en las pacientes (Li et al., 2014).

Además en glioma y en cáncer de próstata se ha asociado a que sus niveles pueden ser reducidos por c-Myc (Fulciniti et al., 2016; Gao et al., 2009). Por lo que lo hace interesante estudiar más al miR-23b en COE, ya que los niveles de c-Myc están elevados por la acción de NGF y su vía de señalización TRKA (Urzua et al., 2012).

Debido a lo anterior es de interés medir los niveles del miR-23b en COE y si NGF está involucrado en los cambios de niveles del miR-23b en líneas celulares de cáncer de ovario.

II. HIPÓTESIS

“En el cáncer ovárico epitelial el aumento en los niveles de NGF, produce una disminución en los niveles del microRNA 23b-3p”

III. OBJETIVO GENERAL

- Evaluar si los niveles de miR-23b se encuentra disminuido en cáncer ovárico epitelial versus los tejidos de ovario normal y si NGF disminuye los niveles de miR-23b en líneas celulares de epitelio ovárico.

IV. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar los niveles de miR-23b en la progresión del COE en muestras de tejido
- 2.- Evaluar en las líneas celulares HOSE y A2780 el efecto de NGF en la disminución de miR-23b.
- 3.- Evaluar si el inmunobloqueo de NGF o la inhibición del receptor TRKA cambia los niveles del miRNA-23b en líneas celulares de epitelio ovárico.

V. Metodología

V.1. Estudios *ex vivo*

Obtención de muestras

Las muestras correspondientes a tejidos ováricos humanos fueron obtenidas a través de histerectomía con ooforectomía 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 y con una monocapa de células epiteliales en la superficie del ovario
- 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 y el epitelio de la superficie del ovario se observa con signos de proliferación

3. Tumor Borderline (Tbo): La monocapa de células epiteliales de la superficie del ovario ha proliferado, produciendo un epitelio pseudo-estratificado. Los quistes de inclusión tienen grandes proyecciones papilares y, en algunos casos, puede observarse un mínimo grado de invasión del estroma.

4. Cáncer Ovárico Epitelial bien diferenciado o de grado I (COE I): Ovarios con estructura papilar irregular, con invasión de células epiteliales mayor a 3 mm hacia el estroma y con epitelio de la superficie del ovario se presenta 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 sólida 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.
Para un mejor análisis de los datos las muestras fueron agrupadas en:

Tejidos OVI: Ovario Normal Inactivo

Tejidos Tumores: Tumor benigno y tumor borderline

Tejidos de Cáncer Ovárico Epitelial COEs: COE I, COE II y COE III

V.2. Estudios *in vitro*

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, suplementado con 1,2 g/L de bicarbonato de sodio, 10% de suero de bovino fetal (FBS), con una solución de antibióticos (penicilina-estreptomicina) y antimicótico (variconazole). Las células fueron cultivadas a 37°C, en atmósfera húmeda, a una concentración de 5% CO₂. Al alcanzar un 80% de confluencia, las células fueron tripsinizadas con una solución de Tripsina-EDTA al 0,25%.

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.

Estímulos

Se sembraron 1.000.000 células de las líneas celulares HOSE y A2780, estuvieron 24 h en medio sin suero, pasado este tiempo se hicieron los siguientes estímulos:

1. **NGF:** Células estimuladas con 100 ng/mL de NGF (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) durante 180 minutos.
2. **GW441756:** Células incubadas con 20 nM de GW441756 (Tocris Bioscience, Bristol, UK), inhibidor específico de TRKA durante 180 minutos.

3. **Anti-NGF:** Células incubadas con el anticuerpo contra NGF (Abcam, Cambridge, UK) en una concentración de 1:1000 durante 180 minutos.

4. **GW441756 + NGF:** Las células fueron pre-incubadas con 20 nM de GW441756 por 30 minutos y luego estimuladas con 100 ng/mL de NGF por 180 minutos.

5. **Anti-NGF + NGF:** Las células fueron pre-incubadas con el anticuerpo contra NGF diluido 1:1000 y posteriormente estimuladas con 100 ng/ml de NGF por 180 minutos.

Los tiempos de estos estímulos están dados por trabajos anteriores del laboratorio, en donde se encontró que a los 180 minutos posterior al estímulo ocurre un cambio en los niveles de los microRNA.

V.3. Niveles de miRNAs

Extracción de miRNAs

La extracción de los miRNAs se realizó a partir de muestras de tejidos y de líneas celulares, de acuerdo a los siguientes procedimientos:

Para las muestras de tejido, se tomó el tejido congelado a -80°C , fue pesado para tomar aproximadamente 50 mg de tejido, el cual fue agregado a un tubo eppendorff con 700 μL de Quiazol (Qiagen, Hilden, Alemania). Cada tejido se homogenizó utilizando Ultraturrax (Polytron PT10/35 Homogenizer; KINEMATICA) y luego se incubó durante 5 minutos en hielo.

Para los experimentos en las líneas celulares se usaron 1.000.000 de células en placas de 6 cm, a las que se les agregó directamente 700 μL de Quiazol y se raspó con un asa raspadora de células, posteriormente se tomó el líquido y se trasladó a un tubo eppendorff.

Los pasos siguientes son comunes para las muestras de tejido y las líneas celulares. Para lo que se procedió a realizar la extracción de los miRNAs usando el kit miRNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania). EL kit fue utilizado siguiendo las instrucciones del proveedor.

Para la retrotranscripción de los miRNAs, obtenidos de muestras de tejidos y de líneas celulares, a cDNA se utilizó miScript II RT kit (Qiagen, Hilden, Alemania), en el termociclador Mastercycler, Eppendorff, según las instrucciones del proveedor. Dentro de este kit se tiene la opción de elegir la retrotranscripción de miRNAs o de RNA total, para esto se elige el buffer Hi-Spec o Hi-Flex respectivamente. En este caso se decidió usar el buffer Hi-Spec, para solo medir miRNAs. En este paso se le adiciona un universal tag a los miRNAs para su posterior amplificación.

RT-PCR de miR-23b-3p

Para la detección y cuantificación del miR-23b-3p se usó miScript SYBR Green qPCR kit (Qiagen, Hilden, Alemania) en el equipo StepOne Real-Time PCR (Applied Biosystems, California, USA) según las instrucciones del proveedor. Los partidores (Tabla 1) fueron comprados en Qiagen, el otro partidador necesario para amplificar el miRNA viene dado por el universal tag, por lo que se usa un partidador universal.

Tabla 1. Partidores utilizados en RT-PCR.

miRNA	Secuencia
miR-23b-3p	5'AUCACAUUGCCAGGGAUUACC
RNU6	No especificada por el proveedor
UP	No especificada por el proveedor

Como control y normalizador se usó el RNA endógeno, RNU6 y el control negativo fue agua estéril, el programa utilizado está en la Tabla 2. El volumen final de la reacción es de 12 μ L.

Tabla 2. Programa de RT-PCR usado para amplificar el cDNA.

Programa de PCR	Tiempo	Temperatura
Activación	15 minutos	95°C
Denaturación	15 segundos	94°C
Alineamiento	30 segundos	55°C
Extensión	30 segundos	70°C
Ciclos	40	
Curva de Melting		60°C a 95°C

V.4. Análisis estadístico

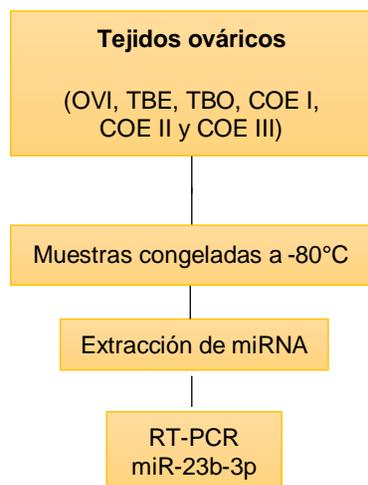
El cálculo para el tamaño muestral (n) para los experimentos *ex vivo* e *in vitro* se realizó utilizando la fórmula de comparación de medias: $n = (2(Z\alpha + Z\beta)^2 S^2)/d^2$, asumiendo un α de 0,05 ($Z\alpha = 1,96$), un β de 0,20 ($Z\beta = 0,842$), una desviación estándar (S^2) de 0,09 (*ex vivo*) o 0,06 (*in vitro*), y una diferencia entre las medias (d^2) de un 25% (Fernández, 1996). 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 experimentos individuales 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 $p \leq 0,05$.

V.5. Diseño experimental

Estudios *ex vivo*



Estudios *in vitro*

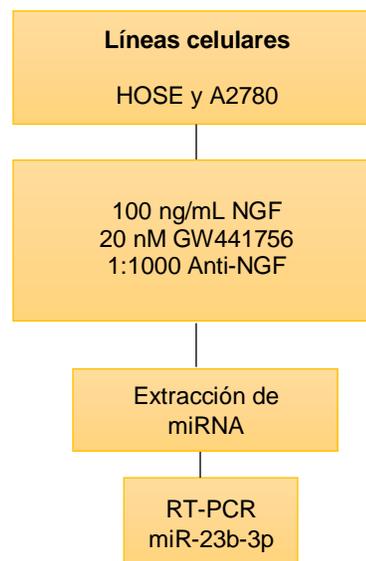


Figura N°2. Diseño experimental de los estudios *ex vivo* e *in vitro*.

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; HOSE: línea celular de epitelio normal de la superficie ovárica humana; A2780: línea celular de cáncer ovárico epitelial humano; NGF: factor de crecimiento nervioso; GW441756: inhibidor de TRKA.

Resumen de los experimentos a realizar y de los estímulos usados (Fig.2), en donde para los tejidos se realizará una extracción directa de los miRNA y luego el RT-PCR. Para las líneas celulares se harán estímulos previos a la extracción de miRNAs y el RT-PCR.

VI. RESULTADOS

Objetivo 1. Determinar los niveles de miR-23b en la progresión del COE en muestras de tejido.

En las muestras analizadas es posible observar que los niveles del miRNA-23b-3p presentan una disminución significativa de un 51% en los grupos de tumores ováricos y un 50% en COE al compararlos con OVI ($p < 0.01$). Además se observa que no existen cambios de los niveles de miR-23b-3p en las muestras de tejidos de tumores ováricos y en los tejidos de COE. (Fig. 3).

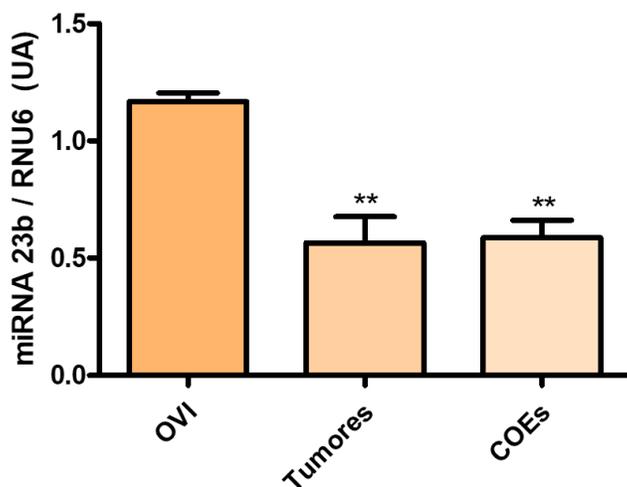


Figura N°3. Niveles de microRNA-23b-3p en Tejidos Ováricos. RT-PCR de miR-23b-3p. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar del promedio ** $p < 0.01$ vs. OVI. OVI $n=6$, Tumores $n=7$ y COE $n=10$.

Las muestras de tejidos ováricos fueron agrupadas en OVI, Tumores y COEs, encontrando una disminución significativa en los niveles de miR-23b-3p en los tejidos tumorales de esta patología. Los resultados de la figura 3 corresponden a 6 muestras de OVI, 7 muestras de tumores y 10 muestras de COEs).

Objetivo 2. Evaluar en las líneas celulares HOSE y A2780 el efecto de NGF en la disminución de miR-23b.

Los resultados de los niveles basales del miR-23b-3p en ambas líneas celulares muestran que los niveles de este miRNA son un 99% menores en las células A2780 al ser comparadas con las células HOSE ($p < 0.05$) (Fig. 4).

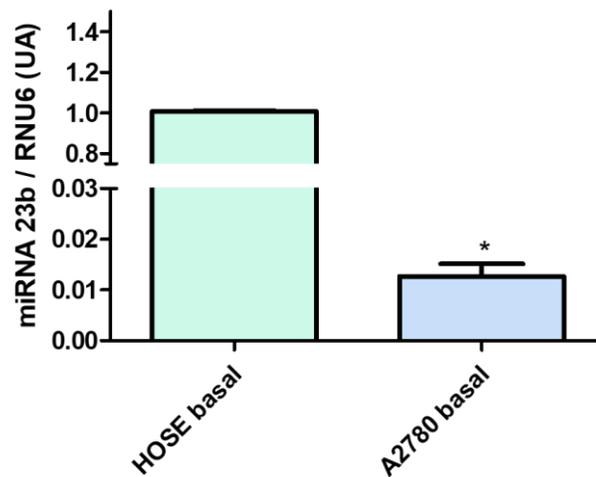


Figura N°4. Niveles basales de microRNA-23b-3p en líneas celulares. RT-PCR de miR-23b-3p en células A2780 y HOSE en condiciones basales. Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar del promedio * $p < 0.05$ vs. HOSE basal. $n=3$ experimentos independientes en duplicado.

Estos resultados dan cuenta de que ambas líneas celulares son un buen modelo para el cáncer ovárico epitelial, ya que las células HOSE corresponden a células epiteliales normales de la superficie ovárica y A2780 a células de cáncer ovárico epitelial y en los tejidos observamos un comportamiento similar, en donde los niveles del miR-23b están disminuidos en tumores y cáncer en comparación a los tejidos normales.

Posteriormente se analizaron los niveles del miR-23b-3p al estimular las líneas celulares HOSE y A2780 con NGF, estos resultados muestran que los niveles del miR-23b-3p disminuyen significativamente en presencia de NGF con respecto a los niveles basales de este microRNA. Esto sucede tanto para las células HOSE (Fig. 5A) como para las células A2780 (Fig. 5B).

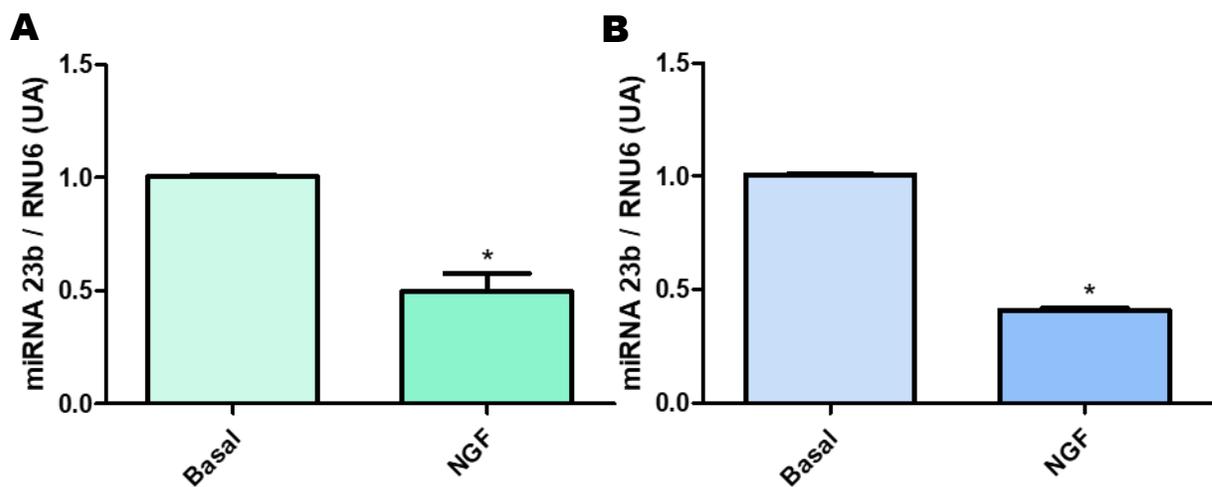


Figura N°5. Efecto de NGF en los niveles de microRNA-23b-3p en líneas celulares.

RT-PCR de miR-23b-3p A: HOSE B: A2780

Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar del promedio * $p < 0.05$ vs. Basal $n = 3$ experimentos independientes en duplicado.

Objetivo 3. Evaluar si el inmunobloqueo de NGF o la inhibición del receptor TRKA cambian los niveles del miRNA-23b en líneas celulares de epitelio ovárico.

Finalmente, se evaluó si al bloquear el efecto de NGF ya sea por un anticuerpo o por un inhibidor farmacológico del receptor TRKA se restauraban los niveles del microRNA.

Al inhibir TRKA (Fig. 6) podemos notar que hay una reversión del efecto causado por NGF, pero este cambio no es significativo. En las células HOSE los niveles del miR-23b disminuyen un 50% con NGF y en presencia del inhibidor de TRKA estos niveles se revierten (Fig. 6A). Mientras que para A2780, en presencia de NGF los niveles del miR-23b se reducen en un 59% y al inhibir TRKA sus niveles se revierten (Fig. 6B).

Al inmunobloquear NGF con un anticuerpo específico (Fig. 7), se logra revertir el efecto de NGF; sin embargo este no es significativo.

Para las células HOSE la disminución del miR-23b al estimular con NGF es de un 50% y al inmunobloquear NGF se encontró una reversión de un 33% (Fig. 7A).

Adicionalmente, en las células A2780, los niveles del miR-23b disminuyeron en un 59% y al inmunobloquear NGF, la reversión en los niveles del miR fue de un 24% (Fig. 7B).

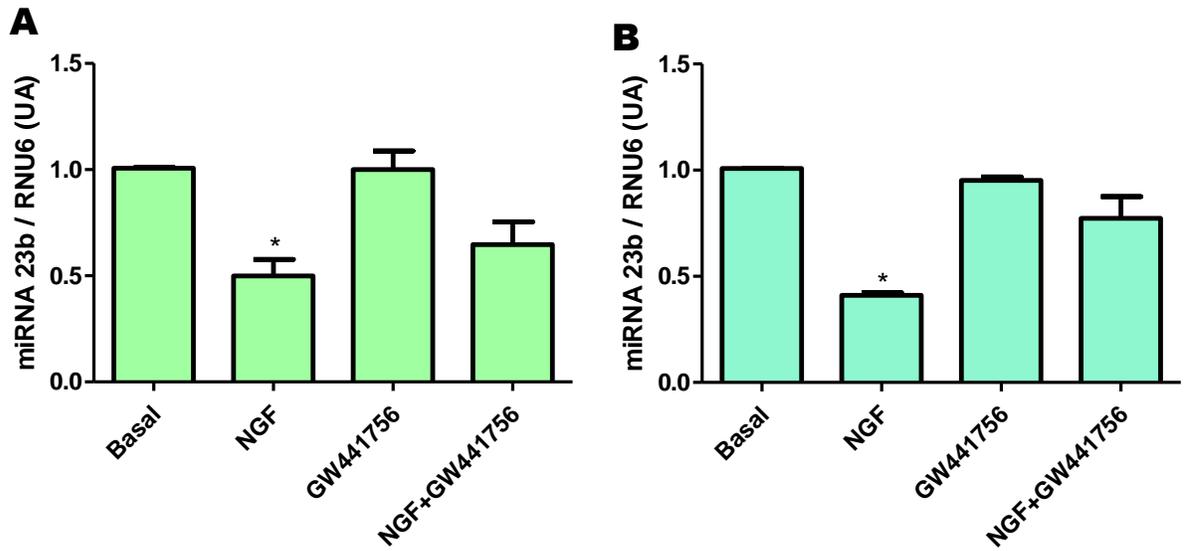


Figura N°6. Efecto de inhibir el receptor TRKA en los niveles de microRNA-23b-3p en líneas celulares.

RT-PCR de miR-23b-3p A: HOSE B: A2780

Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar del promedio * $p < 0.05$ vs. Basal n=3 experimentos independientes en duplicado.

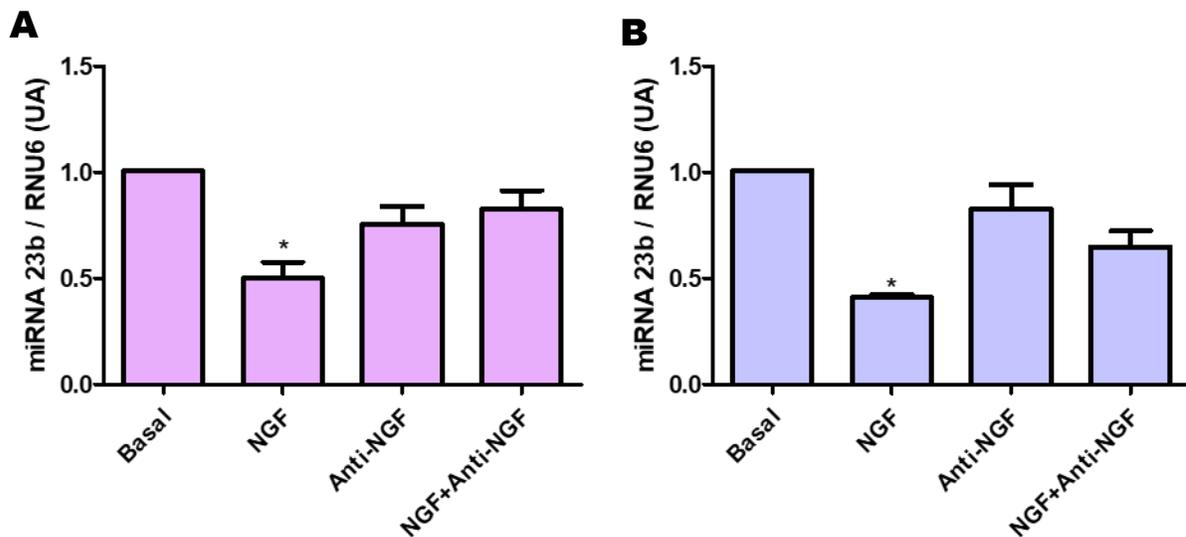


Figura N°7. Efecto de inmunobloquear NGF en los niveles de microRNA-23b-3p en líneas celulares.

RT-PCR de miR-23b-3p A: HOSE B: A2780

Los resultados están expresados como el promedio \pm error estándar del promedio * $p < 0.05$ vs. Basal n=3 experimentos independientes en duplicado.

VII. DISCUSIÓN

El cáncer ovárico epitelial (COE) es la segunda causa de muerte por neoplasias ginecológicas en Chile (MINSAL, Chile, 2013), tiene una alta tasa de mortalidad debido a la dificultad de su diagnóstico.

Además, por antecedentes de nuestro grupo, en los que se señala que hay un aumento de NGF en esta patología y también de su receptor de alta afinidad, TRKA (Tapia et al., 2011). Lo que causa que NGF al activar su receptor TRKA provoque un cambio en distintos números de proteínas (Vera et al., 2014).

Por lo que es interesante estudiar los microRNAs y correlacionar los cambios de estos con las variaciones en los niveles de proteínas.

En este trabajo nos enfocamos en el miR-23b, un miRNA de 21 pb, el cual se encuentra alterado en varios tipos de cáncer (Campos-Viguri et al., 2015). Este miR está también involucrado en otras patologías, como la cardiaca (Latronico & Condorelli, 2009) y patologías inflamatorias autoinmunes (Pers & Jorgensen, 2013).

Particularmente se sabe que los niveles del miR-23b en COE disminuyen sus niveles y que la sobrevida del paciente posterior a la cirugía es baja, lo que lo hace un microRNA interesante para ser estudiado, así como también evaluar el mecanismo por el cual sus niveles disminuirían.

En este trabajo se encontró que los niveles del miR-23b estaban disminuidos en tumores y en COE (Fig. 3), lo que está de acuerdo a lo encontrado en la literatura (Li et al., 2014). Además, en las líneas celulares usadas, las células HOSE, que han probado ser un buen modelo del epitelio ovárico normal y las células A2780, que son un buen reflejo de lo que ocurre en el cáncer ovárico epitelial, encontramos que los niveles de este miRNA están significativamente disminuidos en la línea A2780 (Fig. 4), lo que se condice con lo encontrado en los tejidos.

Por otro lado, se quiso investigar si es que el NGF tenía alguna relación con la disminución de este miRNA, ya que se sabe que sus niveles están elevados en COE y que está involucrado en varios procesos involucrados durante la progresión de esta neoplasia. Con relación a esto, encontramos que al estimular las células con NGF por 3 horas, los niveles del miR-23b disminuyeron de manera significativa en ambas líneas celulares (Fig. 5). El estímulo de 3 horas está dado por un trabajo realizado con anterioridad en el laboratorio, en donde se probó la incubación con NGF a tres tiempos, 30 minutos, 60 minutos y 180 minutos y fue a este último tiempo al que se vio un cambio significativo en los niveles de los microRNAs.

Los tratamientos posteriores en estas líneas celulares fueron realizados con el fin de bloquear la acción de NGF y su vía de señalización, con el propósito de confirmar si NGF estaba involucrado en los cambios de los niveles del miR-23b. Los resultados obtenidos sugieren que NGF juega un rol importante en la disminución de los niveles del miRNA, lo que queda aún por determinar es el mecanismo por el cual ocurre la disminución del miR-23b.

Ya que hay antecedentes de que el factor transcripcional c-Myc estaría involucrado en la regulación transcripcional de este miR y debido a que NGF aumenta c-Myc en explantes de COE; sería interesante evaluar si los cambios en los niveles de este miR por efecto de NGF pueda ser por c-Myc.

VIII. CONCLUSION

Los resultados obtenidos de las muestras de pacientes nos permiten concluir que los niveles del miR-23b disminuyen en la progresión del cáncer ovárico epitelial y por la baja en sus niveles probablemente está modulando proteínas oncogénicas.

En cuanto a los resultados en las líneas celulares podemos decir que la comparación entre ambas líneas es un buen modelo de lo que ocurre in vivo, en donde encontramos que hay mayores niveles del miR-23b en la línea celular HOSE con respecto a la línea A2780. Además los niveles de este miR se ven reducidos luego de estimular las líneas celulares con NGF, lo que posteriormente se revierte al inhibir la señalización de NGF o al bloquear NGF.

Finalmente podemos decir que de acuerdo a las funciones descritas del miR-23b, este estaría actuando como un miRNA supresor de tumores, por lo que es importante seguir evaluando posibles blancos.

IX.- PROYECCIONES

Nuestros resultados sugieren que el miR-23b estaría jugando un rol en la progresión del cáncer y que NGF tendría un rol en la disminución de sus niveles.

Es por esto que es importante dilucidar a futuro los mecanismos por los cuales estaría disminuyendo este miR y además encontrar proteínas blanco del miR-23b.

Según lo mostrado por Fulciniti y su equipo en 2016, c-Myc tendría 4 sitios de unión a la región promotora de miR-23b (Fulciniti et al., 2016), por lo que habría una represión transcripcional del miR-23b mediada por c-Myc, lo que sería interesante investigar y si es que esto se cumple en COE.

Otra molécula a evaluar a futuro y su rol en la reducción de los niveles del miR-23b es COX-2, una molécula pro-inflamatoria, que está descrita es capaz de disminuir los niveles de este miR (Motiño et al., 2015). Ya que esta molécula se ha visto aumentada por efecto de NGF en nuestro grupo (Retamales-Ortega et al., 2017).

La búsqueda de blancos para el miR-23b también es importante, un posible blanco para este miRNA es VEGFR2, que en explantes del canal aurioventricular de pollo se encontró que sus niveles disminuían al ser transfectados con miR-23b (Bonet et al., 2015), esto sumado al conocimiento de que VEGFR2 se encuentra aumentado en COE (Wang et al., 2009) lo hace un buen blanco para ser estudiado a futuro.

Dilucidar lo anterior, implicaría tener un mejor entendimiento de los mecanismos de esta patología y nos permitiría proponer nuevos blancos terapéuticos que permitan mejorar la sobrevida y el pronóstico de las pacientes.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Allard, S., Leon, W. C., Pakavathkumar, P., Bruno, M. A., Ribeiro-da-silva, A., & Cuello, A. C. (2012). Impact of the NGF Maturation and Degradation Pathway on the Cortical Cholinergic System Phenotype, *Journal of Neuroscience* 32(6), 2002–2012.
- Auersperg, N., Wong, A. S. T., Choi, K., Kang, S. K., & Leung, P. C. K. (2016). Ovarian Surface Epithelium : Biology , Endocrinology. *Endocrine reviews* 22(April), 255–288.
- Bast, R. C., Hennessy, B., Mills, G. B., & Mills, G. B. (2009). The biology of ovarian cancer: new opportunities for translation. *Nature Reviews. Cancer*, 9(6), 415–28.
- Bonet, F., Dueñas, Á., López-Sánchez, C., García-Martínez, V., Aránega, A. E., & Franco, D. (2015). MiR-23b and miR-199a impair epithelial-to-mesenchymal transition during atrioventricular endocardial cushion formation. *Developmental Dynamics*, 244(10), 1259–1275.
- Braga, E. A., Fridman, M. V., & Kushlinskii, N. E. (2017). Molecular Mechanisms of Ovarian Carcinoma Metastasis : Key Genes and Regulatory MicroRNAs, *Biochemistry (Moscow)* 82(5).
- Campos-Viguri, G. E., Jiménez-Wences, H., Peralta-Zaragoza, O., Torres-Altamirano, G., Soto-Flores, D. G., Hernández-Sotelo, D., Alarcón-Romero, L., Jiménez-Lopez, M., Illades-Aguilar, B., & Fernández-Tilapa, G. (2015). miR-23b as a potential tumor suppressor and its regulation by DNA methylation in cervical cancer. *Infectious Agents and Cancer*, 10, 42.

- Campos, X., Muñoz, Y., Selman, A., Yazigi, R., Moyano, L., Weinstein-Oppenheimer, C., Lara, E., & Romero, C. (2007). Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, *104*(1),
- Chen, V. W., Ruiz, B., Killeen, J. L., Cot, T. R., Wu, X. C., Correa, C. N., & Howe, H. L. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*, *97*(S10), 2631–2642.
- Cuello F, M. (2013). GES en cáncer de ovario epitelial: un avance sanitario necesario pero no exento de riesgos y dificultades futuras. *Rev. Chil. Obstet. Ginecol*, *78*(3), 161–166.
- Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2012). Roles for MicroRNAs in Conferring Robustness to Biological Processes. *Cell*, *149*(3), 515–524.
- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *6*(4), 259–69.
- Fernández, P. (1996). Investigación: Determinación del tamaño muestral Determinación del tamaño muestral. *Cad Aten Primaria Actualización*, *303*(6), 138–14.
- Fleming, J. S., Beaugié, C. R., Haviv, I., Chenevix-Trench, G., & Tan, O. L. (2006). Incessant ovulation, inflammation and epithelial ovarian carcinogenesis: Revisiting old hypotheses. *Molecular and Cellular Endocrinology*, *247*(1–2), 4–21.

Fulciniti, M., Amodio, N., Bandi, R. L., Cagnetta, A., Samur, M. K., Acharya, C., Prabhala, R., D'Aquila, P., Bellizzi, D., Passarino, G., Adamia, S., Neri, A., Hunter, Z., Tron, S., Anderson, K., Tassone, P., & Munshi, N. C. (2016). miR-23b/SP1/c-myc forms a feed-forward loop supporting multiple myeloma cell growth. *Blood Cancer Journal*, 6(1), e380.

Gao, P., Tchernyshyov, I., Chang, T.-C., Lee, Y.-S., Kita, K., Ochi, T., ... Dang, C. V. (2009). c-Myc suppression of miR-23a/b enhances mitochondrial glutaminase expression and glutamine metabolism. *Nature*, 458(7239), 762–5.

Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(8), 509–524.

Hennessy, B. T., Coleman, R. L., & Markman, M. (2009). Ovarian cancer. *The Lancet*, 374(9698), 1371–1382.

Iorio, M. V., Visone, R., Di Leva, G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C., Alder, H., Calin, G., Ménard, S., & Croce, C. M. (2007). MicroRNA Signatures in Human Ovarian Cancer. *Cancer Research*, 67(18).

Iorio, M. V., & Croce, C. M. (2012). Causes and consequences of microRNA dysregulation. *Cancer Journal*, 18(3), 215–22.

Julio-pieper, M., Lara, H. E., Bravo, J. A., & Romero, C. (2006). Effects of nerve growth factor (NGF) on blood vessels area and expression of the angiogenic factors VEGF and TGFbeta1 in the rat ovary. *Reproductive biology and endocrinology*, 1–11.

Julio-Pieper, M., Lozada, P., Tapia, V., Vega, M., Miranda, C., Vantman, D., Ojeda, S., & Romero, C. (2009). Nerve Growth Factor Induces Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Granulosa Cells via a trkA Receptor/Mitogen-Activated Protein Kinase-Extracellularly Regulated Kinase 2-Dependent Pathway. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, *94*(8), 3065–3071.

Kinose, Y., Sawada, K., Nakamura, K., & Kimura, T. (2014). The Role of MicroRNAs in Ovarian Cancer. *BioMed research international*, 2014.

Latronico, M. V. G., & Condorelli, G. (2009). MicroRNAs and cardiac pathology. *Nature Reviews Cardiology*, *11*(8), 907–912.

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

Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *15*(6), 321–333.

Mezzanzanica, D., Bagnoli, M., De Cecco, L., Valeri, B., & Canevari, S. (2010). Role of microRNAs in ovarian cancer pathogenesis and potential clinical implications. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *42*(8), 1262–1272.

MINSAL, Chile, M. D. S. (2013). Guía Clínica AUGE Cáncer de Ovario Epitelial. *Serie Guías Clínicas MINSAL*, 2–53.

- Motiño, O., Francés, D. E., Mayoral, R., Castro-Sánchez, L., Fernández-Velasco, M., Boscá, L., García-Monzón, C., Brea, R., Casado, M., Agra, N., & Martín-Sanz, P. (2015). Regulation of MicroRNA 183 by Cyclooxygenase 2 in Liver Is DEAD-Box Helicase p68 (DDX5) Dependent: Role in Insulin Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, *35*(14), 2554–67.
- Müller, M., Kuiperij, H. B., Claassen, J. A., Küsters, B., Verbeek, M. M., & Clerici, F. (2014). MicroRNAs in Alzheimer's disease: differential expression in hippocampus and cell-free cerebrospinal fluid. *Neurobiology of Aging*, *35*(1),
- Olena, A. F., & Patton, J. G. (2009). Genomic organization of microRNAs. *Journal of Cellular Physiology*, *222*(3), 540–545.
- Pers, Y.-M., & Jorgensen, C. (2013). MicroRNA in 2012: Biotherapeutic potential of microRNAs in rheumatic diseases. *Nature Reviews. Rheumatology*, *9*(2), 76–8.
- Piva, R., Spandidos, D. A., & Gambari, R. (2013). From microRNA functions to microRNA therapeutics : Novel targets and novel drugs in breast cancer research and treatment. *International journal of oncology*, *43*(4), 985-994.
- Retamales-Ortega, R., Oróstica, L., Vera, C., Cuevas, P., Hernández, A., Hurtado, I., Vega, M., Romero, C. (2017). Role of nerve growth factor (NGF) and miRNAs in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(3) 507.
- Romero, C., Paredes, A., Dissen, G. A., & Ojeda, S. R. (2002). Nerve Growth Factor Induces the Expression of Functional FSH Receptors in Newly Formed Follicles of the Rat Ovary. *Endocrinology*, *143*(4), 1485–1494.

- 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. *Gynecologic Oncology*, 121(1), 13–23.
- Tong, A. W., & Nemunaitis, J. (2008). Modulation of miRNA activity in human cancer : a new paradigm for cancer gene therapy ?. *Cancer gene therapy*, 341–355.
- Torre, L. A., Bray, F., Siegel, R. L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., & Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 65(2), 87–108.
- Urzua, U., Tapia, V., Geraldo, M., Selman, A., Vega, M., & Romero, C. (2012). Nerve Growth Factor Stimulates Cellular Proliferation of Human Epithelial Ovarian Cancer. *Hormone and Metabolic Research*, 44(9), 656–661.
- Valladares, M., Plaza-Parrochia, F., Lépez, M., López, D., Gabler, F., Selman, A., Vega, M., Romero, C. (2017). Effect of estradiol on the expression of angiogenic factors in epithelial ovarian cancer. *Histology and Histopathology*, 11874–11874.
- Vera, C., Tapia, V., Vega, M., & Romero, C. (2014). Role of nerve growth factor and its TRKA receptor in normal ovarian and epithelial ovarian cancer angiogenesis. *Journal of Ovarian Research*, 7, 82.
- Visone, R., & Croce, C. M. (2009). MiRNAs and Cancer. *The American Journal of Pathology*, 174(4), 1131–1138.

Vitsios, D. M., Davis, M. P., van Dongen, S., & Enright, A. J. (2017). Large-scale analysis of microRNA expression, epi-transcriptomic features and biogenesis. *Nucleic Acids Research*, *45*(3), 1079–1090.

Wahner Hendrickson, A. E., Bakkum-Gamez, J. N., J. Couch, F., Ghosh, K., & Boughey, J. C. (2017). Management of Breast Cancer Risk in Women with Ovarian Cancer and Deleterious BRCA1 or BRCA2 Mutations. *Annals of Surgical Oncology*, 1–3.

Wang, F., Barfield, E., Dutta, S., Pua, T., & Fishman, D. A. (2009). VEGFR-2 silencing by small interference RNA (siRNA) suppresses LPA-induced epithelial ovarian cancer (EOC) invasion. *Gynecologic Oncology*, *115*(3), 414–423.

Wang, W., Chen, J., & Guo, X. (2014). The role of nerve growth factor and its receptors in tumorigenesis and cancer pain. *BioScience Trends*, *8*(2), 68–74.

Yang, W.-L., Simmons, A., Lu, Z., Baggerly, K., Lu, K., Gentry-Maharaj, A., ... Bast, R. C. (2015). TP53 autoantibody can detect CA125 screen negative ovarian cancer cases and can be elevated prior to CA125 in preclinical ovarian cancer. *Cancer Research*, *75*

XI. ANEXO

Se adjunta el consentimiento informado firmado por las pacientes.

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

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

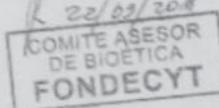
Las muestras de ovario están guardadas en forma codificada a -80°C y en custodia por la investigadora principal del proyecto, Carmen Romero, en el Laboratorio de Bioquímica y Biología de la Reproducción del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

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

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

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

Director General
Hospital Clínico Universidad de Chile



Presidente Comité de Ética
Hospital Clínico Universidad de Chile



07 JUL 2010



CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

Título del Proyecto: Rol del factor de crecimiento nervioso (NGF) en la regulación de los microRNA-23b y microRNA-145 y moléculas inflamatorias involucradas en la proliferación celular y angiogénesis en cáncer ovárico epitelial

Investigador Principal: Dra Carmen Romero, **Servicio o Departamento:** Laboratorio de Endocrinología y Biología de la Reproducción

Este formulario de consentimiento puede contener algunas palabras que usted probablemente no entienda. Por favor pida explicación a uno de los integrantes del grupo de investigación para que lo asesore.

Antes de tomar la decisión de participar en la investigación, lea cuidadosamente este formulario de consentimiento y discuta cualquier inquietud que usted tenga con el investigador. Usted también podrá discutir su participación con los demás miembros de su familia o amigos antes de tomar la decisión.

La invitación a participar en la investigación no necesariamente implica que usted u otros miembros de su familia sufran de una enfermedad particular o tengan riesgo genético para esa enfermedad.

1. Usted ha sido invitado a participar en un proyecto de investigación bajo la supervisión de la Dra Carmen Romero. En el Hospital Clínico de la Universidad de Chile. El propósito de esta investigación es encontrar moléculas que puedan servir como marcadores tempranos de la enfermedad y/o como blancos para futuras terapias en cáncer de ovario
2. Su participación incluye:
 - a) Una entrevista personal. La entrevista dura aproximadamente 15 minutos y será realizada por el Dr. Alberto Selman (staff) del Hospital Clínico Universidad de Chile o por El Dr. Patricio Gayán del Instituto Nacional del Cáncer; la información suministrada en la entrevista es confidencial.
 - b) Se extraerán 10 ml de sangre de su brazo. Parte de esta sangre se usará para determinar nuevos marcadores (micro RNAs). Otra parte de su muestra de sangre será guardada para estudios futuros. Estos estudios futuros podrían involucrar a investigadores en otras instituciones no afiliadas a la Universidad de Chile.

Esta muestra es sólo para propósitos de investigación y los resultados no serán reportados ni a usted ni a su médico; su valor predictivo y diagnóstico actualmente se desconoce.



- c) Además, acepto que se me realice una biopsia de ovario que será tomada por un especialista bajo anestesia general en el Hospital Clínico de la Universidad de Chile o en el Instituto Nacional del Cáncer para obtener una muestra de ovario de 1cm³. Este procedimiento se realizará durante una operación indicada por mi médico tratante, la cual fue programada y me ha explicado que es necesaria. Las posibles molestias y complicaciones de este procedimiento son las mismas que se informa en el consentimiento informado que firmé para mi operación

Acepto _____ No acepto _____

- d) Todas las muestras serán codificadas para su uso actual o futuro. Los resultados individuales serán anónimos y nunca serán mostrados (sin su consentimiento) a nadie fuera del proyecto de investigación.

3. Riesgo y efectos adversos que pueden estar asociados a la investigación:

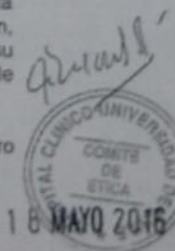
- a) Las preguntas personales para conocer su estado de salud actual e historia clínica pueden ser tediosas y embarazosas. Usted puede discutir las con el entrevistador, y puede decidir no responder a determinadas preguntas o no continuar con su participación. Tanto las respuestas como la información que usted suministre son confidenciales.
- b) Usted puede experimentar ligeras molestias en el sitio de la extracción de la sangre. Algunas personas experimentan mareos o sensación de debilidad general tras la extracción de la muestra. Si se realiza una biopsia de ovario Ud. podría presentar ligera molestia en el sitio, como todo proceso postoperatorio.
- c) Los resultados de la investigación son estrictamente confidenciales. No se entregará información de las evaluaciones clínicas realizadas durante la investigación a compañías de seguros ni otras personas o instituciones sin su previa autorización.
- d) A su muestra se le asignará un código numérico. Esto evitará que la persona que trabaje con su muestra conozca la identidad del paciente. Las personas fuera del proyecto de investigación nunca podrán relacionar los resultados de la investigación con los pacientes en el estudio.

4.- Beneficios para usted/sociedad: Usted no recibirá ningún beneficio médico o económico por la participación en este proyecto.

5. La participación es voluntaria y usted puede rehusarse de participar o retirarse de la investigación en cualquier momento sin ninguna penalidad. Si una vez realizada la donación de su muestra usted desea retirarse del proyecto de investigación, este material será destruido a petición suya. Sin embargo, una vez procesada su muestra, los resultados derivados de la investigación no podrán ser eliminados de aquellos trabajos científicos derivados de este estudio y que ya estén publicados.

El investigador tomará medidas para proteger la confidencialidad de su registro médico y su identidad no será divulgada en ninguna publicación que resulte de

Versión 2. Hospital Clínico Universidad de Chile, Fecha 18.05.2016 Página 2 de 4



este estudio. Para proteger sus derechos, la agencia que suministra los fondos para este proyecto podría en algún momento inspeccionar los registros suministrados por usted para este proyecto (no por nombres, sino utilizando solamente códigos numéricos). Esto con el fin de asegurarse de que sus derechos han sido protegidos en este proyecto.

- i. Este proyecto de investigación no está destinado a proveer diagnóstico ni tratamiento de aquellos problemas médicos no mencionados explícitamente. Su participación en este proyecto de investigación no debe reemplazar las visitas de rutina a su médico de cabecera o de familia.
- ii. Usted será informada de cualquier hallazgo derivado de su participación en la investigación, que pueda cambiar su decisión de continuar en este estudio. El investigador puede retirarlo de esta investigación, si entiende que existen circunstancias médicas que lo aconsejan
- iii. Si tiene preguntas o preocupaciones sobre este estudio, o si experimenta cualquier problema, puede llamar:

Dra./Dr. Carmen Romero y/o Alberto Selman Teléfono: 229788304/ 229788307.

Este estudio cuenta con la aprobación del Comité Ético Científico y de Investigación del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y del Instituto Nacional del Cáncer. Cualquier consulta llamar al teléfono 229789008 o mail: comiteetica@hcuch.cl

PREGUNTAS RELATIVAS A OTROS PROYECTOS DE INVESTIGACION

- Podría algún miembro del grupo de investigación contactarlo e invitarlo a participar en futuros estudios de investigación?

----- Si ----- No

- Podríamos compartir su muestra y sus datos (sólo con códigos numéricos) con investigadores que estén haciendo estudios en campos similares en la Universidad de Chile y en otros centros de investigación? Los otros investigadores no recibirán su nombre ni ninguna otra forma de identificación.

----- Si ----- No

Si usted cree que ha desarrollado alguna complicación derivada de esta investigación, por favor comuníquese con el Investigador Principal/especialista: Dra. Carmen Romero o Dr. Alberto Selman.



He leído este formulario de aprobación y he tenido la oportunidad de hacer preguntas. Entiendo que me darán copia de este documento. Que puedo retirarme cuando lo desee. Consiento en participar en esta investigación.

Nombre del participante:

RUT..... Firma..... Fecha.....

Nombre del Investigador o médico designado:

RUT..... Firma..... Fecha.....

Nombre del Delegado del Director o Ministro de Fe:

RUT..... Firma..... Fecha.....

