

	Universidad de la República - CSIC	
	Formulario de Informe final del Programa de Apoyo a la Investigación Estudiantil Edición 2014	

DATOS DEL PROYECTO	
Título del Proyecto: “Detección de MMPs y receptores de colágeno en tejidos provenientes de patologías benignas y malignas de ovario”.	
Número ID del proyecto: 161	
Área de conocimiento: SALUD	
Facultad o Servicio: FACULTAD DE QUÍMICA	
Nombre completo de los-as Integrantes del equipo: Maria Fernanda Delfino Maria Belen Estevez Antonella Long Luciana Oliveri	
Correo electrónico del/de la estudiante referente Inicial: mafer.delfino2012@gmail.com Final: antonellalong92@gmail.com	
Nombre completo del/de la docente orientador-a: Marta Susana Marco Thon	
Correo electrónico del/de la docente orientador-a: marco.marta3@gmail.com	

INFORME FINAL

1) Transcriba los objetivos del proyecto tal cual figuraban en la solicitud financiada

Objetivo general:

Aportar en el entendimiento de los mecanismos moleculares que intervienen en la interacción entre las células de CAO y los componentes de la MEC, apuntando a entender la etiología de los diferentes tumores (conocimiento que se traducirá a nivel de la prognosis de los carcinomas). Por otro lado se puede arribar a nuevas terapias para el tratamiento del CAO bajo la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos de interés o un biomarcador para la fase temprana y avanzada en cáncer de ovario.

Objetivos Específicos:

A.1) Recolección de las muestras adecuadas en cantidad estadísticamente suficiente.

A.2) Caracterización de las muestras por inmunohistoquímica en bloques de parafina para presencia o ausencia, sobreexpresión, distribución, etc., de DDR1, DDR2, MT1-MT6-MMP a nivel del ovario, alterado o normal. Correlación de los datos obtenidos con las historias clínicas.

B) En fracciones de las muestras trabajadas en A) caracterización:

B1) a nivel de mRNA y

B2) a nivel proteico (western blot) de las mismas proteínas tanto en ovarios normales como patológicos.

Preguntas que busca responder el proyecto:

1) ¿Existe una correlación entre el estadio/etiología del tumor y la expresión y/o distribución de DDRs y MMPs del tumor y de los diferentes componentes de la matriz?

2) ¿Existen diferencias de expresión en el trabajo directo en fresco con las muestras a nivel de mRNA y/o de proteínas?

- 2) **Enumere y describa las principales actividades desarrolladas en el marco de su proyecto.**

Objetivo A)

A.1) Obtención de la muestra:

Se captaron las pacientes usuarias del Hospital de Clínicas previa solicitud de consentimiento informado. Se obtuvieron muestras de: 1) Tumor directamente, 2) Tumor con tejido adyacente y 3) sector normal distante del tumor.

Durante la cirugía, se tomó en fresco un fragmento de 4x2x2 mm de un área quística y otro fragmento de un área sólida (si la había). También fue tomado un fragmento de sector normal del ovario, en caso de reconocerse. Se colocaron en crioviales y se fijaron en Nitrógeno Líquido.

Se realizó estudio macroscópico según protocolo del College of American Pathologists (CAP-2010).

Por muestra se tomaron en promedio entre 10 y 35 fragmentos del tumor y se fijaron en formol tamponado. Se incluyeron en parafina y se realizaron cortes con micrótopo semiautomático entre 4 a 6 micras. Se tiñeron con Hematoxilina-Eosina, PAS, PAS-Alcian Blue y Tricrómico de Masson. Se utilizó la última Clasificación de Tumores de ovarios de la OMS (2002). La otra parte se guardó en nitrógeno líquido para caracterización de proteínas y de mRNA.

A.2) Inmunohistoquímica:

A las muestras obtenidas como se detalló anteriormente de: 1) Tumor directamente, 2) Tumor con tejido adyacente y 3) sector normal distante del tumor, embebidas en parafina, se les realizó, usando secciones desparafinadas de 5 mm fijadas en formalina previamente, la inmunohistoquímica. Los tejidos de tumores se probaron para las diferentes MMPs y DDRs con los respectivos anticuerpos específicos.

Los tejidos normales de omentum obtenidos de pacientes con cirugías que resultaron benignas se teñirán para fibronectina, colágeno IV, laminina, colágeno I y vitronectina como controles.

Para el diagnóstico definitivo se realizaron técnicas de Inmunohistoquímica, se cortaron los bloques sobre láminas silanizadas, se realizó recuperación antigénica con vaporeira, como kit general se utilizó el flex de DAKO y como anticuerpos primarios una batería de acuerdo al diagnóstico histológico. La misma será: WT1, CK cocktail, EMA, Vimentina, CK7, CK20, CA.19.9, CA 125, Calretinina, Inhibina, B72.3, BerEp4, Leu M1, CK5, Cromogranina, Enolasa Neuronal Específica, Sinaptofisina, S100, Alfatoproteína, PLAP, OC3-4, CK117,CD99, AML, hCG, P53 y Ki67. Específicamente se probaron anticuerpos contra: DDR1. DDR2. MT1-MT6 MMP, otras MMPs solubles, anti diferentes colágenos, lamininas y otros componentes de la MEC.

Objetivo B)

Caracterización de las muestras:

B1) RT-PCR:

Se preparó el mRNA de las diferentes muestras según protocolo del kit de Qiagen, y se determinó expresión de los productos deseados mediante el uso de primers adecuados para cada una de las moléculas en estudio en geles de agarosa. El primer h GAPDH fue utilizado como control.

B2) Análisis por Western Blot:

Los tejidos tumorales se lisaron en presencia de buffers con detergentes, se determinaron proteínas por técnicas standards de las muestras y se analizaron por Western Blot en geles de SDS.PAGE 10%. Luego se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, probándose con los respectivos anticuerpos primarios y secundarios. El revelado se realizó por quimioluminiscencia en equipos adecuados para tales fines.

NOTA:

La parte de Inmunohistoquímica se realizó en el Laboratorio de Anatomía Patológica del Hospital de Clínicas por ser un laboratorio de referencia en el tema (junto a la Prof. Gisele Acosta, patóloga encargada del Departamento). La parte de Biol. Mol. y los Western Blots se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología del Polo Tecnológico de Pando de la Facultad de Química en donde se posee toda la infraestructura necesaria para el desarrollo de estas técnicas.

- 3) **Indique si se han efectuado todas las etapas planteadas en el cronograma de ejecución del proyecto. En caso de que su cronograma haya sufrido alteraciones o no se haya podido cumplir con todas las etapas definidas en el cronograma, aclare los motivos de tal situación.**

Las etapas planteadas en el cronograma pudieron realizarse acorde a lo previsto.

- 4) **Indique los principales resultados obtenidos. Aclare hasta qué punto coinciden - o no - con los resultados esperados por parte del equipo.**

Actividad 1: Obtener un número de muestras estadísticamente adecuado.

Se colectaron un total de 65 muestras con diagnóstico clínico de tumoración de ovario durante el período de trabajo. De éstas 62% fueron patologías diversas benignas de ovario, 20% CAO (cáncer de ovario) positivas primitivas de ovario, 3% primario de otro origen con metástasis ovario, 3% cánceres peritoneales, 12% cáncer de otros órganos con tumor de ovario benigno (datos confirmados por Anatomía Patológica diferido en parafina).

Del total de los casos CAO Positivos: 67% resultaron ser del tipo epitelial (70% serosos y 30% mucinosos) y 17% fueron del tipo no epitelial (cordones) mientras que el 16% restante de los casos fueron de origen mesenquimal.

En cuanto a la distribución según estadio FIGO al momento del diagnóstico, encontramos que los SEROSOS se distribuyen en 29% borderline, 13% estadio FIGO I y II y 58% estadios III y IV mientras que los MUCINOSOS fueron 25% borderline, 50% estadios I y II y 25% estadios III y IV. Todos estos datos son coincidentes con los reportados en bibliografía.

Actividad 2: Concluir presencia, ausencia, sobreexpresión y distribución de las moléculas en estudio en las muestras obtenidas en la **Actividad 1**, y correlacionar dicha expresión con el tipo, estadio y grado de diferenciación de la patología de ovario.

A) Se estandarizó la técnica de inmunohistoquímica para cada uno de los anticuerpos a estudiar (MT1-MT6-MMP y DDRs) frente a los controles positivos sugeridos en bibliografía previo pasaje de los tejidos seleccionados a histoplast y cortado de los mismos a 2 µm. Como control negativo se utilizaron los anticuerpos irrelevantes de la misma especie.

B) Los resultados obtenidos muestran que, en los casos CAO positivos primitivos de ovario del tipo serosos, existe una clara diferencia de expresión en los receptores de colágeno DDRs, encontrando la expresión de DDR1 en el 100% de los casos aunque éste se manifiesta con expresión decreciente a medida que la patología se vuelve más avanzada. El caso opuesto ocurre con DDR2 en donde en el 100% de los CAO serosos no se encuentra expresión mientras que si se encuentra en los casos normales. En cuanto a la expresión de las MT-MMPs, a diferencia de los ovarios normales (en donde no se detecta expresión), se encontró que el 100% de los CAO son positivos a MT5-MMP y un 90% a MT3-MMP. Por el contrario MT4-MMP en un 80% de los casos es negativo mientras que MT1- y MT2-MMP resultan de expresión errática. La MT6-MMP por su parte comienza a expresarse a medida que el estadio FIGO es más avanzado

Respecto a los casos primarios del tipo mucinoso se encontró igual resultado en cuanto a la expresión de los receptores de colágeno. En estos casos el DDR1 resultó positivo en el 100% de los casos, mientras que DDR2 fue negativo. Los mismos resultados se obtuvieron para MT5- y MT6- que con los obtenidos para los serosos. Sin embargo MT2- y MT3-MMP fueron erráticos. Las MT4- y MT1-MMP se expresaron en la medida que la patología era más avanzada. Cabe destacar que, en el caso de los tumores borderline mucinosos analizados, todos los marcadores resultaron ser negativos mientras que en los casos malignos los mismos fueron positivos como se mencionaba anteriormente. Esto puede llevar a pensar que en el caso de tumores del tipo mucinoso dichos marcadores podrían pasar a expresarse una vez que el tumor se torna maligno. En cuanto a los CAO primitivos de ovario del tipo de células de la granulosa, mostraron una expresión totalmente diferente a los anteriores, lo cual es lógico dado que no son de origen epitelial. En estos casos se encontró que todos los analizados presentaron negatividad total a las MT-MMPs testeadas así como a los DDRs, lo que demuestra un comportamiento y evolución totalmente diferente entre los tumores de origen epitelial y los demás tumores malignos de ovario.

En suma, es importante destacar el cambio que se produce del DDR2 presente en el epitelio del ovario normal por DDR1 al aparecer la patología ya sea del tipo seroso como mucinoso. En el caso de los serosos, que corresponden a una patología de ovario más agresiva, se produce el cambio de la MT4-MMP por la MT5-MMP, así como también aparece claramente positiva la MT3-MMP a diferencia de los CAO del tipo mucinosos menos agresivos.

Los resultados obtenidos hasta el momento resultan prometedores y alentadores para seguir adelante con el proyecto, buscando y procesando más casos para así lograr tener un número estadísticamente significativo y de esta manera lograr cumplir con el objetivo de concluir si existe una correlación entre el estadio y etiología del tumor con la expresión y distribución por parte del mismo de los marcadores estudiados y quizás llegar a determinar si alguno de los mismos resultan de interés como blanco terapéutico.

Actividad 3: Concluir la expresión o no expresión del mRNA y proteínas en las muestras de tejidos y ver correlación con el status de la patología.

Los resultados obtenidos por Western blot y por mRNA mostraron los mismos resultados en líneas generales, sobre todo a nivel de expresión de las moléculas de la familia de las MMPs, siendo importante mencionar a nivel de los receptores DDR (sobre todo DDR1) la presencia de las isoformas DDR1a y DDR1b por mRNA, dato relevante hasta ahora no reportado en CAO.

A nivel del western blot, llama la atención la expresión de DDR1 en altas concentraciones y negativa en ovario normal y en trompas de Falopio (origen de algunos tipos de tumores de ovario de alto grado de agresividad). DDR2 no se encuentra presente. Por esta técnica también se pudo detectar (utilizando dos Acs. Primarios diferentes que reconocían parte extracelular de la molécula e intracelular) que un buen porcentaje de las moléculas de DDR1 (120 kDa) presentes están clivadas (60 kDa). Esto indicaría en principio la existencia de alguna molécula capaz de cortarla, sugiriendo un rol biológico. Por otra parte, el fragmento clivado debería de encontrarse en los fluidos, lo que lo sugiere como un blanco de diagnóstico. La relevancia biológica de este hecho debería ser estudiada.

5) Indique si los resultados parciales o finales del proyecto fueron difundidos a través de alguna actividad (charlas, seminarios, talleres, prensa, edición de materiales impresos, etc.).

La difusión se realizó en principio por medio de charlas, conferencias y congresos relacionados con el tema de las distintas especialidades participantes en la propuesta, tanto en el país como en el exterior.

También se compartieron con el laboratorio de referencia en el tema en USA (Dr.Fridman, WSU, Detroit. MI) generando interés en el tema.

Concretamente, los resultados obtenidos en este trabajo fueron presentados en las siguientes instancias en el transcurso del año en el contexto de la presentación del proyecto ovario.

- Ciclo de seminarios del Department of Pathology WSU. Detroit, Michigan, USA. Mayo 2015.
- Jornadas científicas del Hospital de Clínicas. Setiembre 2015.
- Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Citología. Setiembre 2015.
- Programa "Calidad de Vida" canal 12. Tema Cáncer de Ovario. Octubre 2015.
- Programa 37 grados. TV Ciudad. Tema Cáncer de Ovario. Octubre 2015.

6) En caso de haber enfrentado dificultades en el desarrollo del proyecto de investigación, realice una breve descripción de las mismas.

La principal dificultad enfrentada fue la imposibilidad de acceder a los equipos automatizados que se utilizan en la rutina de diagnóstico del Hospital de Clínicas por incompatibilidad de disponibilidades horarias. Esto nos llevó a la determinación de realizar las inmunohistoquímicas en la EUTM (Escuela Universitaria de Tecnología Médica del Hospital de Clínicas) en donde se nos brindó el espacio para el desarrollo de este proyecto, con el debido aumento de trabajo y tiempo dado que se debió trabajar en forma manual. No obstante fue de esta manera que se comprobó que los resultados obtenidos, si bien llevan más tiempo, resultan más claros y prolijos que los obtenidos mediante automatización. Esto llevó a que el trabajo pertinente se desarrollará en más tiempo que el previsto.

Como aspecto positivo se resalta la gran experiencia del trabajo con un grupo multidisciplinario de profesionales de la salud (preparación no brindada por Facultad de Química) donde se incluyen ginecólogos, oncólogos, anatomopatólogos, técnicos en anatomía patológica, entre otros. Los mismos aportan su vasta experiencia y conocimientos en pro de este proyecto generando así una completa integración del conocimiento en esta área.

Otro inconveniente a destacar fue que si bien durante la primera parte del trabajo todo el grupo pudo disponer de tiempo equivalente para dedicarle al proyecto, sobre la mitad del periodo, por problemas personales (mayor carga de horario de las materias, comienzo laboral de dos de las estudiantes) el grueso del trabajo recayó fundamentalmente en dos de las cuatro participantes del equipo.

- 7) **En base a su experiencia de trabajo en equipo en el marco de este Programa, le solicitamos que realice sugerencias o comentarios para ser tomados en cuenta en futuras ediciones del mismo.**

La experiencia en su conjunto fue valiosa, permitiéndonos incursionar en un tema de investigación científica de alto interés. El grupo de trabajo funcionó satisfactoriamente pero por lo descrito anteriormente los objetivos planteados se lograron cumplir gracias a una alta dedicación de esfuerzo por parte de dos integrantes del equipo básicamente. Los resultados obtenidos nos permitieron incluso participar en presentaciones en seminarios y congresos algo que para nosotros como estudiantes y en nuestra carrera, era impensable al momento de plantear la propuesta.

Nuestra única objeción sería que en lo posible se acortaran los tiempos desde el momento de la presentación del grupo y su propuesta al programa, hasta la aceptación del trabajo dado que como estudiantes nuestras realidades en disponibilidades de tiempo son poco predecibles a largo plazo, lo que hace que quizás se dificulte el cumplir con los compromisos asumidos (eso fue lo que nos pasó precisamente). Aun así el grupo pudo manejar esta situación y resolver el trabajo con resultados satisfactorios que de confirmarse pueden ser la base de una nueva línea de investigación.

Agradecimientos:

- A la Dra. Grazzia Rey por facilitarnos la inserción en los diferentes Departamentos del Hospital de Clínicas.

- A los Dres. Fernando Rodríguez y Fernando Taranto por estar en permanente contacto y permitirnos asistir a las intervenciones quirúrgicas de las pacientes con diagnóstico de tumor de ovario, pedir consentimiento informado y obtener las muestras de interés.

- A las Dras. Isabel Robinson, Julia Bernachín y Gisele Acosta por permitirnos acceder al material de Anatomía Patológica de las pacientes (informes) y por discutir con nosotros los casos para poder tener un diagnóstico adecuado de cada paciente.

- Al personal de Archivo del Hospital de Clínicas que nos permitieron acceder a las Historias de las pacientes que conformaron nuestro panel de estudio.

- A los integrantes del Laboratorio de Biotecnología del Polo Tecnológico por prestar sus instalaciones y asesorarnos en la discusión de los experimentos realizados y los resultados obtenidos.

8) Resumen publicable:

“Detección de MMPs y receptores de colágeno en tejidos provenientes de patologías benignas y malignas de ovario”.

Luciana Oliveri, Antonella Long (*), Belén Estevez, Fernanda Delfino.

Docente orientador: Marta Marco

Facultad de Química.

El cáncer de ovario (CAO) constituye la quinta causa de muerte entre los cánceres en mujeres y tiene el mayor índice de mortalidad entre las enfermedades ginecológicas malignas, por su naturaleza asintomática en las primeras fases de la enfermedad y la falta de un diagnóstico precoz, detectándose por lo general en las fases tardías en donde la supervivencia no excede los 5 años de sobrevida postdiagnóstico.

El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la presencia de dos familias de proteínas relevantes en la interacción de los tumores sólidos con la matriz extracelular: proteasas que digieren MEC, denominadas MMPs y Receptores de colágeno, DDRs.

Se estudiaron un total de 65 casos de tumoraciones de ovario (20% malignas) de la población de pacientes del Hospital de Clínicas.

Sobre esos tejidos tumorales se estudió presencia o ausencia de las moléculas anteriormente citadas por inmunohistoquímica, mRNA e inmunoblot.

Los resultados demostraron la presencia de DDR1 en el 100% de los tumores malignos estudiados encontrando diferencias acorde al estado de diferenciación. DDR2 resultó negativo en todos los casos.

En cuanto a las MMPs se encontró una alta expresión de MT5 y MT1MMP mientras que de las solubles MMP2 se encontró en todos los casos malignos. Los benignos fueron negativos en el 100% de los casos.

Este proyecto pretende aportar al estudio de la biología de los tumores malignos de ovario, tratando de detectar moléculas de interés como blancos terapéuticos sugiriendo un posible futuro uso en la clínica.

9) En la siguiente tabla ingrese la información solicitada en relación a los **equipos y la bibliografía adquiridos con fondos del PAIE**. Recuerde que debe entregar todos los ítems adquiridos en los dos rubros antes mencionados, para que éstos formen parte del acervo de su institución y puedan ser utilizados por equipos financiados en posteriores ediciones de este programa.

EQUIPOS	
cantidad	NO CORRESPONDE

BIBLIOGRAFÍA	
cantidad	NO CORRESPONDE

Programa de Apoyo a la				
-------------------------------	--	--	--	--

Investigación de Estudiantes Universitarios				
Responsable:	Marta Marco			
E-mail:	marco.marta3@gmail.com			
Saldo Inicial 2015 (\$):		27500		
PRODUCTO	CANTIDAD	PRECIO (\$)	FECHA	Registro
MMP7 Human Elisa Kit	1	27059	24/06/2015	O/C 234
Caja de guantes descartables	2	290	05/11/2015	1384
Marcador pizarra negra	1	38	05/11/2015	1384
Caja de guantes S	1	125	12/11/2015	1411
Total de gastos en Depósito(\$):		27512		
Saldo (\$):		-12		

Desde el 1/12/2015 y hasta el 15/12/2015 se deberá entregar a los Ayudantes I+D de los Servicios lo siguiente:

- *Un CD con el **informe final** en formato .odt o .pdf. Y con el **póster** en su versión digital en formato .jpg o .pdf*
- *Equipos y bibliografía adquiridos con fondos del PAIE (declarados en la lista conformada en el ítem 8 de este documento)*



.....
FIRMA DEL ESTUDIANTE RESPONSABLE

Estudiante Antonella Long

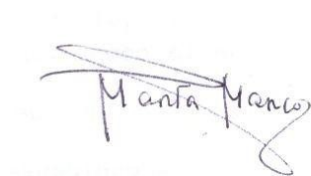
Se solicita al **docente orientador** que brinde una **opinión general acerca del desempeño de su equipo de estudiantes** durante el transcurso de la investigación y que evalúe en forma breve los **resultados** expuestos a través de este informe y el contenido de su **resumen publicable**. (máx 200 palabras)

Comentarios del docente orientador:

El objetivo general de este trabajo contempló (a mi entender) dos aspectos claves en la formación del estudiante de la Facultad de Química: a) introducirlos en el área de la investigación científica, y b) trabajar en el contexto de un grupo multidisciplinario y multicéntrico excediendo los límites de la propia Facultad (situación a la que no se les prepara durante el transcurso de la carrera), interrelacionándose directamente con médicos y con pacientes, realizando incluso tareas de divulgación y de extensión. El grupo aceptó el desafío con entusiasmo y gran responsabilidad, logrando avanzar en los comienzos de forma equilibrada como grupo teniendo resultados a nivel de la obtención de muestras, interacción con los médicos y realización y valoración de las inmunohistoquímicas tanto de tejidos sanos como patológicos muy interesantes. Posteriormente, problemas personales individuales llevaron a que sobre la marcha dos de las estudiantes tuvieran que mermar su disponibilidad horaria, (hecho que se vincula también con los tiempos que transcurren desde la escritura de la propuesta original hasta que es llevada a la práctica). Esto hizo que el proceso final del trabajo fuera desigual en esfuerzo pero no por eso menos meritorio. Los resultados obtenidos a partir de los experimentos del objetivo final aportan en cuanto al conocimiento significativo de la expresión de estas moléculas de interés en los diferentes casos de CAO así como en su estadio. El hecho de encontrar también al receptor de colágeno DDR1 que se expresa como molécula entera y clivada sobre la superficie celular sugiere también, además de un rol biológico relevante, la posibilidad de usarla como molécula marcadora de diagnóstico.

Por todo lo antedicho, considero que es justo mencionar el esfuerzo realizado por la Estudiante Antonella Long la cual a mi entender debe considerarse la estudiante referente final del proyecto, debido a su participación constante y sostenida durante todo el periodo de trabajo así como su gran responsabilidad, apoyada por la Bach. María Belén Estevez, sin desmerecer en absoluto por esto la labor del resto del grupo, que como dije en un principio, en el primer tramo fue equitativa y pareja, siendo los resultados obtenidos durante ese tiempo original e innovador, si bien posteriormente disminuyeron la carga de dedicación horaria al trabajo aquí presentado.

En suma, este trabajo en su conjunto, pretende aportar a la promoción de la participación en actividades de investigación por parte de estudiantes de grado. Sugerimos comenzar a incursionar en una nueva área de trabajo de enorme impacto e interés social en la actualidad (no solo en nuestro país), que permite que estudiantes y profesionales de formaciones diferentes y complementarias interaccionen, formando así un grupo multidisciplinario para abordar un tema tan complejo como es el cáncer de ovario y que necesita por tanto de una visión básica, tecnológica y una clínica para poder resolver las grandes interrogantes que plantea. Consecuente a lo citado anteriormente se contribuirá a mejorar y fortalecer los vínculos químico-médicos que hoy en día están poco consolidados.

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Marta Marco'. The signature is stylized with a large, sweeping initial 'M' and a long, horizontal stroke extending to the right.

.....
FIRMA DEL DOCENTE
ORIENTADOR