

Importancia del Factor de Crecimiento Nervioso (NGF) en la Función Normal del Ovario y en el Cáncer Ovárico Epitelial

Verónica Tapia P. y Carmen Romero O.

Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva, HCUCh.

RESUMEN

En el ovario normal, la angiogénesis es un proceso finalmente regulado y es fundamental para la función ovárica (esteroidogénesis y ovulación). En el cáncer ovárico epitelial, la angiogénesis se encuentra aumentada y uno de los elementos angiogénicos más importantes en ambos casos es el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF). Por otra parte, el factor de crecimiento nervioso (NGF), también ha sido considerado un factor angiogénico tanto directo como indirecto a través del aumento de VEGF en tejidos no-neuronales, diferentes del ovario. Antecedentes demuestran la expresión de NGF en ovario de mamíferos, incluyendo el ovario humano. Nuestro objetivo fue examinar la relación entre NGF y VEGF en ovario normal y cáncer ovárico epitelial. Nuestros resultados demuestran que en ovario normal, NGF y su receptor específico (trkA), se expresan en células de la granulosa de folículos pre-antrales y antrales, similar a lo descrito para VEGF. Además, NGF aumenta la expresión de VEGF en células de granulosa humana en cultivo. En cáncer ovárico epitelial, NGF y trkA se sobre-expresan en células epiteliales y NGF al activar a su receptor trkA, aumenta la expresión de VEGF en cultivo de explantes de este tejido. Estos resultados demuestran que NGF y trkA podrían estar involucrados a través de la regulación de la expresión VEGF, en la angiogénesis del ovario normal como en cáncer ovárico epitelial.

SUMMARY

In the normal ovary, the angiogenesis is a fundamental and cyclical process that happens in each ovulation. In the epithelial ovarian cancer, the angiogenesis is increased and as it is known, it is essential for the growth of solid tumors. The endothelial growth factor (VEGF) is one of the most important factors in this process. The nerve growth factor (NGF), has been considered as a direct and indirect angiogenic factor through the increase of VEGF expression in non-neuronal tissues, different from the ovary. Previous reports have demonstrated NGF expression in mammals ovary, including the human ovary. Our aim was to examine the relation between NGF and VEGF in normal ovary and epithelial ovarian cancer. Our finding demonstrated that in normal ovary, NGF and its specific receptor (trkA) are expressed in granulosa cells from pre-antrals and antrals follicles, similar to those reported for VEGF. In addition, NGF increases the VEGF expression in human granulosa cells in culture. NGF and trkA are over-expressed in epithelial cells and NGF activates its trkA receptor, increasing VEGF expression in cultured explants of epithelial ovarian cancer. These results show that NGF and trkA could be involved in angiogenesis process in normal ovary and epithelial ovarian cancer.

Recibido 01/04/2006 | Aceptado 17/04/2006

NGF Y OVARIO NORMAL

Se sabe que la familia de las neurotrofinas o neuropéptidos, y en especial el factor de crecimiento nervioso (NGF), son fundamentales para la supervivencia y diferenciación celular en el sistema nervioso central y periférico⁽¹⁻⁵⁾, así como también son importantes para el desarrollo de tejidos no neuronales⁽⁶⁻¹⁰⁾. Estas funciones fueron sugeridas por estudios que demostraron la presencia de receptores de alta afinidad a neurotrofinas en una variedad de tejidos no neuronales, incluyendo el sistema cardiovascular, endocrino, inmune y reproductivo⁽¹¹⁾.

Aunque aún no se conocen todas las funciones que tienen las neurotrofinas en el ovario, hasta ahora está claro que son el soporte trófico de la inervación simpática del órgano y que tienen una importante participación durante dos periodos del desarrollo ovárico que son críticos para la función reproductiva: el desarrollo folicular temprano^(14,15) y la ovulación^(9,16). Las neurotrofinas facilitan el crecimiento folicular temprano, en dos fases secuenciales de este proceso como son: la diferenciación de folículos primordiales a folículos primarios y el crecimiento de estos folículos a folículos secundarios⁽¹⁵⁾. Dichas etapas parecen estar relacionadas con la capacidad del factor de crecimiento nervioso (NGF) para actuar sobre la proliferación tanto en células de la granulosa como en células de la teca⁽¹⁵⁾, así como también, inducir la síntesis de receptores de FSH en células de la granulosa⁽¹⁷⁾. Al ocurrir la primera ovulación, el factor de crecimiento nervioso contribuye a la cascada ovulatoria aumentando la liberación de prostaglandinas E2⁽⁹⁾, disminuyendo la comunicación de las *gap-junction* e induciendo la proliferación de células de la teca en folículos pre-ovulatorios⁽¹⁸⁾.

Todos los procesos descritos previamente, han sido demostrados en roedores. Sin embargo, evidencias recientes demuestran que las neurotrofinas y sus receptores también se encuentran en el ovario fetal humano⁽¹⁹⁾ y que las células de la

granulosa humana secretan otro neuropéptido como es el BDNF, el cual estaría participando en la regulación de la maduración del ovocito⁽²⁰⁾. Resultados encontrados por nuestro grupo demuestran que en ovario humano normal, NGF y su receptor de alta afinidad, *trkA*, se expresan principalmente en células de granulosa de folículos pre-antrales y antrales; encontrándose también en células de la teca de folículos antrales. Junto a estos hallazgos, demostramos que NGF aumenta la expresión de los receptores para FSH, así como también la secreción de estradiol en células de granulosa humana en cultivo⁽²¹⁾.

La expresión de NGF y su receptor *trkA* en células de granulosa en folículos pre-antrales y antrales, coincide con la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)⁽²²⁾, factor angiogénico y potente mitógeno del endotelio vascular y uno de los factores más importantes de la angiogénesis del ovario.

El proceso de angiogénesis ocurre de una manera muy controlada como parte de la función ovárica normal, durante la ovulación. Esto sugiere que, al menos algunas células ováricas, están preparadas para entregar el estímulo paracrino necesario para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

Durante la vida reproductiva, VEGF participa en el crecimiento cíclico de los folículos ováricos así como también en el desarrollo y mantención del cuerpo lúteo. La expresión y secreción de VEGF es inducida vía activación de los receptores tanto de FSH como LH. La expresión y producción de VEGF dentro del ovario es crítica para la función reproductiva normal. Defectos en la angiogénesis pueden contribuir a una variedad de desórdenes incluyendo la anovulación, infertilidad, pérdida de embarazo, síndrome de hiperestimulación ovárica y cáncer ovárico⁽²³⁾.

Ya que, por una parte, la expresión del receptor *trkA* en el ovario ocurre previo a la ovulación⁽⁹⁾, similar a lo que ocurre con VEGF⁽²⁴⁾, se puede

pensar que ambos factores estarían actuando concomitantemente en procesos importantes de la función ovárica y posiblemente en los procesos angiogénicos que ocurren en la fase folicular y lútea del ciclo ovárico. Además, a NGF también se le atribuye estar involucrado en ciertas patologías ováricas, tales como el ovario poliquístico⁽²⁰⁾ al igual que VEGF⁽²⁴⁾.

Cuando se realiza un auto-transplante de los ovarios a un sitio ectópico en la rata, se ha encontrado que éstos rápidamente recuperan la funcionalidad⁽²⁵⁾. Después de las 48 horas de realizado el trasplante de los ovarios, ya muestran una masiva re-vascularización, acompañada de un aumento en la expresión de VEGF, en un proceso dependiente de gonadotrofinas⁽²⁶⁾, y, a los cuatro días de realizado el trasplante, ya recuperan la capacidad de ejercer retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipófisis⁽²⁵⁾.

El NGF, sólo o en combinación con otras moléculas endógenas biológicamente activas, puede producir su acción en células endoteliales y mas probablemente en la actividad angiogénica^(27,28). También se ha sugerido que en neuronas sensoriales periféricas, NGF estimula la producción de VEGF⁽²⁸⁾.

Durante el proceso de neo-vascularización del ganglio cervical superior en ratas recién nacidas, se observó un aumento de la densidad de vasos sanguíneos, cuando los animales fueron tratados con NGF. Este efecto se correlaciona directamente con un aumento en la expresión de VEGF. Estos resultados sugieren que la angiogénesis puede ser regulada indirectamente a través de NGF⁽²⁹⁾.

Por esta razón, sabiendo que las células de granulosa humana expresan NGF, así como también su receptor de alta afinidad (trkA); nos interesó estudiar si NGF era capaz de regular la expresión de VEGF en estas células en cultivo, encontrando que efectivamente NGF aumenta la expresión de VEGF de una manera autocrina, activando al receptor trkA y las subsecuentes activaciones de la

cascada de señalización de las MAPK – ERK y de PI3K y AKT (resultados no publicados).

Los resultados obtenidos por nuestro grupo sugieren que en ovario humano adulto, NGF estaría involucrado en la angiogénesis normal del ovario, a través de la expresión de VEGF, así como también en la expresión del receptor para FSH y secreción de estradiol, previo a la ovulación.

NGF Y CÁNCER OVÁRICO EPITELIAL

El cáncer ovárico es predominantemente un tumor que se presenta en mujeres mayores y es detectado en etapas avanzadas, ya que es una patología silente, que conlleva a una alta tasa de muerte. El cáncer de ovario es considerado un cáncer de mal pronóstico por su diagnóstico tardío. Los tumores epiteliales rara vez se ven antes de la menarquía, la mayor incidencia ocurre entre los 40 y 70 años. La incidencia de cáncer ovárico se relaciona con la edad y, dado que la tasa poblacional chilena de la tercera edad está aumentando, se espera encontrar un mayor número de pacientes con esta patología, implicando un problema en salud pública.

La patogénesis del carcinoma ovárico aún no está del todo clara. Muchos mecanismos han sido propuestos para explicar su etiología. La teoría de Fathalla, sugiere que repetidas ovulaciones traumatizan el epitelio ovárico, haciendo que estas células sean más susceptibles a los cambios de malignidad⁽³⁰⁾. Sin embargo, no existen evidencias concluyentes que demuestren o avalen dicha teoría. Podría explicarse, en todo caso, por una injuria que el ovario experimenta por cada ovulación y que de esta manera, por factores locales, el epitelio comienza a proliferar en forma descontrolada.

Existen evidencias que demuestran que el cáncer ovárico epitelial surge por expansión clonal de una sola célula progenitora transformada^(31,32). Sin embargo, la serie de eventos involucrados en la iniciación, progresión y metástasis del cáncer

ovárico epitelial, aún no está establecida. No está claro si la malignidad surge de los tumores benignos o tumores *borderline*, o si ellos se desarrollan *de novo* del epitelio superficial del ovario o de los quistes de inclusión epitelial, ya que hay evidencias para ambas alternativas⁽³²⁾. La mayoría de los tumores ováricos malignos son del tipo epitelial (80%) y son altamente angiogénicos.

La angiogénesis, prerequisite para el crecimiento de tumores sólidos después de una etapa corta avascular⁽³³⁾, involucra tanto proliferación⁽³⁴⁾ como migración⁽³⁵⁾ de células del endotelio capilar. Las células endoteliales en tumores humanos proliferan a una velocidad de 50 a 200 veces mayor que aquellas de tejido endotelial adulto normal⁽³⁴⁾.

El proceso angiogénico tiene una importancia teórica en el contexto del cáncer ovárico por dos razones. Primero, el proceso de angiogénesis ocurre de una manera muy controlada como parte de la función ovárica normal, durante la ovulación. Esto sugiere que, al menos algunas células ováricas, están preparadas para entregar el estímulo paracrino necesario para el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos y que, en la transformación, esta capacidad está presente tempranamente en el desarrollo tumoral. Segundo, el gran tamaño característico de los tumores ováricos requiere del proceso de angiogénesis para la sustentación del tumor.

Además de la importancia de la angiogénesis en los procesos tumorales, las células cancerosas se caracterizan por una falta en el control regulatorio del crecimiento celular, en parte a través de las señales generadas por una variedad de receptores de factores de crecimiento, tales como receptores tirosina kinasa. En muchas células, la sobre-expresión de los receptores de neurotrofinas o cambios en la actividad de cascadas intracelulares de transducción de señal, están involucradas en la transformación malignas de las células⁽³⁶⁾.

Algunos autores sugieren que la interacción NGF con su receptor específico *trkA* puede estar involucrada en

el crecimiento de ciertos carcinomas no neuronales. Es así como se ha demostrado una sobre-expresión de los receptores de neurotrofinas en cánceres de diferentes tejidos, tales como: tiroides^(37,38), pulmón⁽³⁹⁾, esófago⁽⁴⁰⁾, próstata^(41,42), mama⁽⁴³⁾ y también en cáncer de ovario^(44,45) donde la expresión de los receptores de NGF (*trkA*) fueron detectados en un 82% en tumores sólidos de origen epitelial⁽³⁴⁾.

Para el caso del carcinoma ovárico, la expresión de los receptores de neurotrofinas puede tener una relevancia biológica más que pronóstica, aún no caracterizada⁽⁴⁴⁾; sin embargo, son escasos los trabajos realizados en relación con la participación de las neurotrofinas y sus receptores en este tipo de cáncer, para llegar a una conclusión válida.

El componente crítico de la angiogénesis es la producción autocrina y paracrina del factor de crecimiento de endotelio vascular VEGF⁽²⁴⁾, tanto en tejido normal como en tejido patológico.

En mamíferos se han detectado cinco isoformas de VEGF, producto de *splicing* alternativo del gen: VEGF121, VEGF145, VEGF165, VEGF189 y VEGF206^(46,47). Los transcritos que codifican para VEGF121, VEGF165 y VEGF189 son detectados en la mayoría de las células y tejidos que expresan el gen VEGF, donde la especie molecular predominante es VEGF165. Por el contrario VEGF206 es una forma rara y ha sido descrita sólo en hígado fetal humano^(47,48,49). Se ha encontrado que VEGF189 y VEGF206 se unen a heparina y en su mayoría son secuestrados en la matriz extracelular. Por otro lado, VEGF121, VEGF145 y VEGF165 son secretadas; sin embargo, una fracción importante de VEGF165 permanece unida a la superficie celular y a la matriz extracelular⁽⁵⁰⁾.

Se ha demostrado, predominantemente, la expresión del mRNA de las isoformas VEGF121 y VEGF165, en ovario normal y cáncer ovárico epitelial^(51,52,53). Los RNAm para estas isoformas se encuentran sobre-expresados en la mayoría de los tumores humanos, incluyendo, los tumores ováricos.

cos^(51,52) y, al correlacionar la expresión de VEGF con las características del tumor, se ha encontrado que VEGF165 está elevado en todos los estados de carcinoma ovárico, según tipo histológico⁽⁵¹⁾. En un estudio realizado en líneas celulares de carcinoma ovárico y tumores ováricos en diferentes estadios, demostraron también una mayor predominancia de las isoformas de VEGF121 y VEGF165; sin embargo, la isoforma VEGF189 fue encontrada en dos líneas celulares de seis estudiadas, y en algunos casos de cáncer ovárico en estados III y IV, es decir más avanzados⁽⁵³⁾.

Resultados de nuestro grupo, muestran que tanto en tejido ovárico normal como en cáncer ovárico epitelial, se encuentran niveles de RNAm de tres isoformas del VEGF (VEGF121, VEGF165 y VEGF189). Al comparar la expresión de estas isoformas en ambos tejidos, se encuentra un aumento significativo de los niveles del RNAm de VEGF165 y VEGF189 en cáncer ovárico epitelial⁽⁵⁴⁾. Más aún, al estudiar la expresión de VEGF por efecto de NGF en cultivos de explantes de cáncer ovárico epitelial, encontramos que NGF produce un aumento significativo tanto de los niveles del RNAm como de la proteína de las tres isoformas antes mencionadas⁽⁵⁴⁾. Este efecto fue inhibido por inmuno-bloqueo de NGF y por un inhibidor de tirosina kinasa (K_{252a}), indicando que la regulación de la expresión de VEGF en cáncer ovárico epitelial por acción de NGF, es específica y mediada por activación de su receptor trkA.

Prácticamente, no existe información respecto de la expresión del receptor trkA en células del epitelio superficial de ovario normal, sin embargo existen dos estudios^(6,55) realizados con un número pequeño de muestras, donde no encuentran expresión de este receptor en este tipo de epitelio. Nuestro grupo, al realizar la detección de NGF y trkA por inmunohistoquímica en un número mayor de muestras de ovario normal, encontró una leve detección de NGF y una muy leve para trkA en el epitelio de la superficie del ovario normal en el 10% de los casos estudiados⁽⁵⁴⁾. Además, también hemos encontrado una alta expresión de NGF y trkA en el epitelio de tejidos de cáncer ovárico epitelial, similar a lo encontrado en la literatura^(34,45).

Por tanto, el hecho de encontrar una leve presencia de NGF y trkA en epitelio de la superficie del ovario y una muy alta expresión tanto del neuropéptido como de su receptor de alta afinidad en células epiteliales en tejido de cáncer ovárico epitelial; y que NGF, por activación del receptor trkA, produce un aumento en la expresión de VEGF en tejido de cáncer ovárico epitelial, nos permite especular, que tanto la expresión de NGF como la del receptor trkA en epitelio normal de la superficie del ovario, podrían ser eventos tempranos en la tumorigénesis y en la angiogénesis del cáncer ovárico epitelial.

REFERENCIAS

1. Chao MV. Neurotrophin receptors: A window into neuronal differentiation. *Neuron* 1992; 9: 583-93.
2. Eide FF, Lowenstein DH, Reichardt LF. Neurotrophin and their receptors: current concepts and implications for neurologic disease. *Exp Neurol* 1993; 121: 200-14.
3. Kaplan DR, Stephens RM. Neurotrophin signal transduction by the trk receptor. *J. Neurobiol* 1994; 25: 1404-17.
4. Maness LM, Kastin AJ, Weber JT, Banks WA, Beckman BS, Zadina JE. The neurotrophins and their receptors: structure, function, and neuropathology. *Neuroscience Biobehav Rev* 1994; 18: 143-59.
5. Ernfors P, Wetmore C, Olson L, Persson H. Identification of cells in rat brain and peripheral tissues expressing mRNA for members of the nerve growth factor family. *Neuron* 1990; 5: 511-26.
6. Shibayama E, Koizumi H. Cellular localization of the trk neurotrophin receptor family in human non-neuronal tissues. *Am J Pathol* 1996; 148: 1807-18.
7. Hallböök F, Ibañez CF, Persson H. Evolutionary studies of the nerve growth factor family reveal a novel member abundantly expressed in *Xenopus* ovary. *Neuron* 1991; 6: 845-58.
8. Lara HE, Hill DF, Katz KH, Ojeda SR. The gene encoding nerve growth factor is expressed in the immature rat ovary: Effect of denervation and hormonal treatment. *Endocrinology* 1990; 126: 357-63.
9. Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Dees WL, Lara HE, Ojeda SR. A role for *trkA* nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. *Endocrinology* 1996; 137: 198-209.
10. Dissen GA, Hirshfield AN, Malamed S, Ojeda SR. Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: Changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology* 1995; 136: 4681-92.
11. Tessarollo L. Pleiotrophic functions of neurotrophins in development. *Cytokine Growth Rev* 1998; 9: 125 -37.
12. Lara HE, Dissen GA, Leyton V, Paredes A, Fuenzalida H, Fiedler JL, Ojeda SR. An increased intraovarian synthesis of nerve growth factor and its low affinity receptor is a principal component of steoir-induced polycystic ovary in the rat. *Endocrinology* 2000; 141: 1059-72.
13. Dissen GA, Lara HE, Leyton V, Paredes A, Hill DF, Costa ME, Martínez-Serrano A, Ojeda SR. Intraovarian excess of nerve growth factor increases androgen secretion and disrupts estrous cyclicity in the rat. *Endocrinology* 2000; 141: 1073-82.

14. Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 1997; 138: 3320-9.
15. Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN, Ojeda SR. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. *Endocrinology* 2001; 142: 2075-86.
16. Lara HE, McDonald JK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 1990; 126: 364-75.
17. Romero C, Paredes A., Dissen GA, Ojeda SR. Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology* 2002; 143: 1485-94.
18. Mayerhofer AD, Dissen GA, Hill DF, Mayerhofer D, Garfield RE, Costa ME, Skinner MK, Ojeda SR. Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. *Endocrinology* 1996; 137: 5662-70.
19. Anderson RA, Robinson LL, Brooks J, Spears N. Neurotrophins and their receptors are expressed in the human fetal ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 890-7.
20. Seifer DS, Feng BO, Sheldon RM, Chen S, Dreyfus F. Brain-derived neurotrophic factor: a novel human ovarian follicular protein. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87: 655-9.
21. Salas C, Julio-Pieper M, Valladares M, Pommer R, Vega M, Mastronardi C, Kerr B, Ojeda SR, Lara HE, Romero C. Nerve growth factor-dependent activation of trkA receptors in the human ovary results in synthesis of FSH receptors and estrogen secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 2396-403.
22. Ferrara N, Frantz G, LeCouter J, Dillard-Telm L, Pham T, Draksharapu A, Giordano T, Peale F. Differential expression of the angiogenic factor genes vascular endothelial growth factor (VEGF) and endocrine gland-derived VEGF in normal and polycystic human ovaries. *Am J Pathol* 2003; 162: 1881-93.
23. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertil Steril* 2000; 74: 429-38.
24. Hazelton DA, Hamilton TC. Vascular endothelial growth factor in ovarian cancer. *Curr Oncol Rep* 1999; 1: 59-63.
25. Lara HE, Dees WL, Hiney JK, Dissen GA, Rivier C, Ojeda SR. Functional recovery of the developing rat ovary after transplantation: contribution of the extrinsic innervation. *Endocrinology* 1991; 129: 1849-60.

26. Dissen GA, Lara HE, Fahrenbach WH, Costa ME, Ojeda SR. Inmature rat ovaries become revascularized rapidly after autotransplantation and show a gonadotropin-dependent increase in angiogenic factor gene expression. *Endocrinology* 1994; 134: 1146-54.
27. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial factor stimulates Schwann cell invasion and neovascularization of acellular nerve grafts. *Brain Research* 1999; 846: 219-28.
28. Samii A, Unger J, Lange W. Vascular endothelial growth factor expression in peripheral nerves and dorsal root ganglia in diabetic neuropathy in rats. *Neuroscience letters* 1999; 262: 159-62.
29. Calza L, Giardino L, Giuliani A, Aloe L, Levi-Montalcini R. *PNAS* 2001; 98: 4160-5.
30. Fathalla MF. Incessant ovulation - a factor in ovarian neoplasia? *Lancet* 1971; 2(7716): 163.
31. Jacobs IJ, Kohler MF, Wiseman RW, Marks JR, Whitaker R, Kerns BA, Humphrey P, Berchuck A, Ponder BA, Bast RCJ. Clonal origin of epithelial ovarian carcinoma: analysis by loss of heterozygosity, p53 mutation, and X-chromosome inactivation. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1793-8.
32. Mok CH, Tsao SW, Knapp RC, Fishbaugh PM, Lau CC. Unifocal origin of advanced human epithelial ovarian cancers. *Cancer Res* 1992; 52: 5119-22.
33. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Nat Cancer Inst* 1990; 82: 4-6.
34. Denekamp J and Hobson B. Endothelial cell proliferation in experimental tumours. *Br J Cancer* 1982; 46: 711-20.
35. Folkman J. Angiogenesis and its inhibitors. In: V.T. DeVita, S. Hellman, and S.A. Rosenberg (eds), *Important Advances in Oncology: Part I*, pp 42-62, Philadelphia: J.B. Lippincott. 1985
36. Nakagawara A. Trk receptor tyrosine kinase: a bridge between cancer and neural development. *Cancer Letters* 2001; 169: 107-14.
37. Mc Gregor LM, Mc Cune BK, Graff JR, McDowell PR, Romans KE, Yancopoulos GD, Ball DW, Baylin SB, Nelkin BD. Roles of trk family neurotrophins receptors in medullary thyroid carcinoma development and progression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 4540-5.
38. Borganzone I, Pierotti MA, Mondellini P, Manenti G, Donghi R, Pilotti S, Grieco M, Santoro M, Fusco A et al. High frequency of activation of tyrosine kinase oncogenes in human papillary thyroid carcinoma. *Oncogene* 1989; 4: 1457-62.

39. Oelmann E, Srete L, Schuller I, Serve H, Koenigsmann M, Wiedenmann B, Oberberg D, Reufi B, Thiel E, Berdel WE. Nerve growth factor stimulates clonal growth of human lung cancer cell lines and a human glioblastoma cell line expressing high-affinity nerve growth factor binding sites involving tyrosine kinase signaling. *Cancer Res* 1995; 55: 2212-9.
40. Zhu Z. W, Friess H, Wang L, Di Mola F F, Zimmermann A, Buchler MW. Down-regulation of nerve growth factor in poorly differentiated and advanced human esophageal cancer. *Anticancer Res* 2000; 20: 125-32.
41. Sortino MA, Condorelli F, Vancheri C, Chiarenza A, Bernardini R, Consoli U Canonico PL. Mitogenic effect of nerve growth factor (NGF) in LNCaP prostate adenocarcinoma cells: role of the high and low affinity NGF receptors. *Mol Endocrinol* 2000; 14: 124-36.
42. Djakiew D, Pflug B, Onoda M. Stromal-epithelial paracrine interactions in the neoplastic rat and human prostate. *Adv Exp Med Biol* 1993; 330: 185-202.
43. Tagliabue E, Castiglioni F, Ghirelli C, Modugno M, Asnaghi L, Somenzi G, Melani C, Menard S. Nerve growth factor cooperates with p185^{HER2} in activating growth of human breast carcinoma cells. *J Biol Chem* 2000; 275: 5388-94.
44. Davison B, Lazarovici P, Ezersky A, Nesland JM, Berner A, Risberg B, Trpé CG, Kristensen GB, Goscinski M, Van de Putte G and Reich R. Expression levels of the nerve growth factor receptors trkA and p75 in effusions and solid tumor of serous ovarian. *Clinical Cancer Research* 2001; 7: 3457-64.
45. Koizumi H, Morita M, Mikami S, Shibayama E and Uchikoshi T. Immunohistochemical analysis of trkA neurotrophin receptor expression in human non-neuronal carcinoma. *Pathol Int* 1998; 48: 93-101.
46. Tisher E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA. The human gene for vascular endothelial growth factor multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 1991; 266: 11947-54.
47. Ferrara N, Daves-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocrine Review* 1997; 18: 3-25.
48. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Review* 1992; 13: 18-31.
49. Geva E, Jaffe RB. Role of vascular endothelial growth factor in ovarian physiology and pathology. *Fertility and Sterility* 2000; 74: 429-38.
50. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential disposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 1993; 4: 1317-26.

51. Fujimoto J, Sakaguchi H, Hirose R, Ichigo S, Tamaya T. Biological implications of the expression of vascular endothelial growth factor subtypes in ovarian carcinoma. *Cancer* 1998; 83: 2528-33.
52. Otani N, Minami S, Yamoto M, Shikone T, Otani H, Nishiyama R, Otani T, Nakano R. The vascular endothelial growth factor/fms-like tyrosine kinase system in human ovary during the menstrual cycle and early pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3845-51.
53. Stimpff M, Tong D, Fashing B, Schuster E, Obermair A, Leodolter S, Zeillinger R. Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Cancer Research* 2002; 8: 2253-9.
54. Campos X, Muñoz Y, Selman A, Yazigi R, Moyano L, Weinstein-Oppenheimer C, Lara HE, Romero C. Nerve growth factor and its high-affinity receptor trkA participate in the control of vascular endothelial growth factor expression in epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2006 (Epub ahead of print).
55. Chesa PG, Rettig WJ, Thomsom TM, Old LJ, Melamed MR. Immunohistochemical analysis of nerve growth factor receptor expression in normal and malignant human tissues. *J Histochem Cytochem* 1988; 36: 383-9.

CONTACTO

Dra. Carmen Romero Osses
Laboratorio de Endocrinología y Biología Reproductiva
Hospital Clínico Universidad de Chile
Santos Dumont 999, Santiago, Chile
Fono: 978 8305
Fax: 737 4555
E-mail: cromero@redclinicauchile.cl

