

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Faculdade de Farmácia

Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

O papel de BDNF/TrkB em linhagens celulares de tumores femininos

Débora Schoenfeld Prusch

Porto Alegre, junho de 2011.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Faculdade de Farmácia
Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia

O papel de BDNF/TrkB em linhagens celulares de tumores femininos

Débora Schoenfeld Prusch
Trabalho de Conclusão da Disciplina de Estágio Curricular em Farmácia

Prof. Dr. Rafael Roesler

Orientador

Caroline Brunetto de Farias

Co-orientadora

Porto Alegre, junho de 2011.

Dedicado a Márcia, Edson e Júlia, pelo amor,
carinho e dedicação de todos os dias.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e à minha família. Mãe, Pai e Juh, muito obrigada pelo apoio e incentivo totalmente essenciais para essa conquista. Agradeço pelo investimento na minha educação, fundamental para a realização dos meus objetivos, e também por acreditarem no meu potencial e terem construído junto comigo esse início de carreira.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Rafael Roesler por ter me dado a oportunidade de realizar ciência em um laboratório e com pessoas de excelência, por todos os aprendizados de postura profissional, capacidade científica e aplicação dos conhecimentos adquiridos no âmbito tecnológico.

Agradeço às pessoas que construíram esse trabalho junto comigo, Ana e Carol.

E a todos os pesquisadores do Laboratório de Pesquisas em Câncer, em especial, a Carol Nör, Tiago e Mari, pelos aprendizados de todos os dias tanto na carreira científica como nas experiências de todos os dias. Vocês foram e continuam sendo essenciais.

Este artigo foi elaborado segundo as normas do periódico
“Gynecologic Oncology” apresentadas em anexo.

1 **O papel de BDNF/TrkB em linhagens celulares de tumores femininos**

2
3
4 Débora Schoenfeld Prusch^{1,3,4}; Caroline Brunetto de Farias^{1,2,3,4}; Daniela
5 Cornélio^{1,3,4}; Ana Lucia Abujamra^{1,2,3}; Algemir Lunardi Brunetto^{1,2,3}; Gilberto
6 Schwartzmann^{1,2,3,5}; Rafael Roesler^{1,2,3,4}.

7
8
9 (1) Laboratório de Pesquisas em Câncer – Centro de Pesquisa Experimental –
10 HCPA/UFRGS, (2) Instituto do Câncer Infantil do RS, (3) Instituto Nacional de
11 Ciência e Tecnologia Translacional em Medicina (INCT-TM/CNPQ), (4)
12 Laboratório de Neurofarmacologia e Biologia de Tumores Neurais, Departamento
13 de Farmacologia – ICBS/UFRGS, (5) Fundação SOAD.

14
15
16
17
18
19 Autor para correspondência: Dr. Rafael Roesler

20 Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas de Saúde,
21 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rua Sarmiento Leite, 500 (ICBS,
22 Campus Centro/UFRGS) 90050-070 Porto Alegre, RS Brasil.

23 Telefone: +55 51 3308.3183; e-mail: rroesler@terra.com.br.

24

25 **Resumo**

26

27 **Objetivo:** Esse trabalho visou a verificar a expressão do fator neurotrófico
28 derivado de cérebro (BDNF) em linhagens celulares tumorais de câncer de mama,
29 colo do útero e ovário, bem como avaliar o efeito da via BDNF e de seu receptor
30 nesses tipos de tumores.

31 **Métodos:** A expressão de BDNF nas linhagens celulares foi realizada através da
32 técnica de RT-PCR. BDNF humano recombinante e o inibidor de Trk, K252a,
33 foram utilizados nos ensaios de proliferação celular pelo método de MTT.

34 **Resultados:** As três linhagens celulares expressam RNAm para BDNF. O
35 tratamento com BDNF aumentou a proliferação celular das células de câncer de
36 ovário e o inibidor de Trk diminuiu a viabilidade celular dos três tipos de tumores
37 femininos.

38 **Conclusões:** A via de sinalização BDNF/TrkB desempenha um importante papel
39 na sobrevivência celular desses tumores e pode servir como um alvo terapêutico
40 no objetivo de inibir o crescimento tumoral.

41

42

43

44 **Palavras-chave:** Câncer de mama; Câncer de colo do útero; Câncer de ovário;
45 Neurotrofinas; TrkB; BDNF.

46

47

48

49 **Introdução**

50

51 Entre os tumores que ocorrem em mulheres, destacam-se os cânceres de mama,
52 colo do útero e ovário. O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais
53 frequente no mundo. Entre as mulheres é o câncer de maior incidência, sendo
54 seguido do câncer de colo do útero. A cada ano, cerca de 22% dos novos casos
55 de câncer em mulheres são de mama. O câncer de ovário é o tumor ginecológico
56 mais difícil de ser diagnosticado e o de menor chance de cura. O tratamento
57 desses tumores consiste, na maioria das vezes, em ressecção cirúrgica e, em
58 alguns casos, radioterapia e quimioterapia antes e/ou após a cirurgia [1]. No
59 entanto, com a heterogeneidade dos tumores, há a necessidade do entendimento
60 da biologia desses e de suas características a nível molecular para o
61 desenvolvimento de melhores tratamentos a fim de aprimorar a erradicação
62 dessas doenças com terapias que diminuam o volume do tumor e que tornem o
63 tratamento menos agressivo ao paciente [2]. Nesse contexto, esses órgãos
64 femininos são ricos em fatores de crescimento e hormônios que controlam o ciclo
65 menstrual e a gestação na mulher. A superexpressão desses fatores de
66 crescimento e a expressão aberrante ou ativação de seus receptores podem
67 favorecer a progressão do câncer.

68 Os receptores tirosina quinases (RTKs, *receptor tyrosine kinase*) são proteínas da
69 superfície celular que constituem os maiores alvos para o tratamento do câncer.
70 Quando ativados por fatores de crescimento, estimulam vias de sinalização
71 intracelular que controlam a sobrevivência e a proliferação celular [3]. TrkA, TrkB e
72 TrkC são receptores quinase relacionados a tropomiosina (Trk, *tropomyosin-*

73 *related receptor kinase*) que fazem parte da família de RTKs [4] e são ativados por
74 membros da superfamília de neurotrofinas. Seus ligantes são o fator de
75 crescimento neural (NGF, *nerve growth factor*), o fator neurotrófico derivado de
76 cérebro (BDNF, *brain-derived neurotrophic factor*) e a neurotrofina-3 (NT-3),
77 respectivamente.

78 O BDNF atua fisiologicamente como fator de crescimento no desenvolvimento do
79 sistema nervoso ao ativar seu receptor TrkB [5,6]. Evidências recentes indicam
80 que a sinalização de Trk pode exercer um importante papel na progressão
81 tumoral. Vários estudos também já mostram uma expressão alterada de Trks em
82 diferentes tipos de tumor, e possíveis correlações entre a expressão do receptor e
83 o prognóstico da doença estão sendo verificadas. Já é relatado que pacientes com
84 neuroblastoma onde os tumores têm níveis aumentados de TrkA e TrkC têm um
85 melhor prognóstico, e em contrapartida, os que têm níveis aumentados de TrkB e
86 seu ligante primário, BDNF, têm um pior prognóstico [7–9]. Evidências que a via
87 de sinalização BDNF/TrkB pode estar envolvida no crescimento celular, metástase
88 e resistência à terapia têm sido recentemente relacionadas a diversos outros tipos
89 de câncer, incluindo tumores de tecidos não-neuronais [9,10]. Altos níveis de
90 expressão de TrkB em tecidos tumorais já são associados com um pior
91 prognóstico em pacientes com câncer de ovário [11].

92 Nesse estudo, nós verificamos se RNAm de BDNF pode ser detectado em
93 linhagens celulares tumorais de câncer de mama, colo do útero e ovário. Também
94 avaliamos o efeito do ligante primário do receptor TrkB, BDNF, bem como o
95 inibidor de Trk, K252a, nestas células. BDNF aumentou a proliferação celular das
96 células de câncer de ovário e o inibidor de Trk diminuiu a proliferação celular dos

97 três tipos de tumores femininos. Isso indica que a via de sinalização BDNF/TrkB
98 pode ter um importante papel na proliferação celular desses tumores e isso pode
99 ter eminentes implicações no tratamento-alvo dessas doenças.

100

101

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

121 **Materiais e Métodos**

122

123 **Cultura celular e Tratamentos**

124 As linhagens celulares MCF-7 (câncer de mama), HeLa (câncer de colo do útero)
125 e OVCAR-3 (câncer de ovário) foram obtidas do *American Type Culture Collection*
126 (Rockville, Maryland, USA). As três linhagens foram plaqueadas em placas de 96
127 poços (TPP) numa densidade de 4×10^3 , 7×10^3 e 7×10^3 células por poço,
128 respectivamente, sendo que seis poços foram utilizados para cada dose,
129 crescidas, em crescimento exponencial, e mantidas em meio *Dulbecco's Modified*
130 *Eagle's Medium* (DMEM; Gibco BRL, Carlsbad, USA; MCF-7 e HeLa) e RPMI
131 1640 (Gibco BRL, Carlsbad, USA; OVCAR-3), contendo 10% (v/v) de soro fetal
132 bovino (FBS; Soral, Campo Grande, Brasil), 0,125% (v/v) de gentamicina, 0,05%
133 (v/v) de ampicilina e 0,1% (v/v) de fungizone.

134 Após 24 horas, com o poço semi-confluyente de células, as culturas foram tratadas
135 com BDNF humano recombinante (1, 10 ou 100 ng/mL; Sigma-Aldrich, St Louis,
136 USA) ou com K252a (10, 100 ou 1000 nM Sigma-Aldrich, St Louis, USA).

137 As doses dos tratamentos foram escolhidas com base em estudos prévios [12].

138 As células foram mantidas em temperatura de 37°C, com umidade relativa mínima
139 de 95% e em atmosfera de 5% de CO₂ no ar.

140

141 **Viabilidade celular – MTT**

142 A viabilidade celular foi avaliada através do reagente *3-(4,5 dimethylthiazol-2-yl)-*
143 *2,5-diphenyl tetrazolium bromide* (MTT; Sigma-Aldrich) 48 horas após o
144 tratamento. 11µl de uma solução 5mg/mL de MTT foi adicionada em cada poço,

145 seguida de uma incubação de 4 horas a 37°C. As placas foram mantidas à
146 temperatura ambiente até estarem completamente secas. 50µl de dimetil sulfóxido
147 (DMSO) foi adicionado a cada poço e a absorbância foi lida a 492 nm em um leitor
148 de placas.

149

150 **Análise da expressão de RNAm de BDNF por RT-PCR**

151 O RNA total das células humanas MCF-7, HeLa e OVCAR-3 foi extraído usando o
152 reagente TRIzol (Invitrogen, USA) de acordo com as instruções do fabricante, e o
153 transcrito reverso com SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix®
154 (Invitrogen, USA).

155 O primer de BDNF humano foi desenhado de acordo com a sequência do *Gene*
156 *Bank* correspondente: 5'-GCGTGAATGGGCCCAAGGCAGG-3' (*forward*) e 5'-
157 TGTGACCGTCCCGCCCGACATG-3' (*reverse*). Os experimentos de PCR foram
158 feitos com 1.5 mM de MgCl₂, 0.1 µM de cada primer, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 M de
159 betaína (para primer de BDNF), 1U Taq Platinum® (Invitrogen, USA) e 2 µl cDNA
160 da amostra.

161 A expressão de β-actina foi avaliada como controle interno usando os primers 5'-
162 AAAGTGGGACGGTGAAGGTG-3' (*forward*) e 5'-AGAGAAGTGGGGTGGCTTTT-
163 3' (*reverse*). A reação de PCR foi feita em um volume total de 20µL usando uma
164 concentração de 0.04mM de dNTPs, 0.2U Taq polimerase em tampão apropriado,
165 0.3mM de MgCl₂, e 10µmol de cada primer.

166 A amplificação consistiu de 1 minuto de desnaturação inicial a 95°C, seguido de
167 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, anelamento dos primers a 59°C por 30

168 s e extensão a 72°C por 45 s, e seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos.
169 Os produtos de BDNF (362 pb) e de β -actina (190 pb) foram aplicados em um gel
170 de agarose 2% na técnica de eletroforese, corados com brometo de etídio e
171 visualizados com iluminação ultravioleta.

172

173 **Análise Estatística**

174 Os dados estão representados por valores de porcentagem de viabilidade celular
175 +/- erro padrão (EP). A diferença entre os valores foi avaliada por análise de
176 variância de uma via seguida do teste *Tukey post hoc*. Os asteriscos nos gráficos
177 representam diferenças significativas entre o grupo teste e o grupo controle. Nas
178 comparações, foram considerados resultados estatisticamente significativos
179 quando $p < 0,05$.

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192 **Resultados**

193

194 **Expressão de RNAm para BDNF em células de câncer de mama, ovário e** 195 **colo do útero**

196 Foi verificada a expressão de RNAm para BDNF nas linhagens celulares
197 tumorais MCF-7 (mama), HeLa (colo do útero) e OVCAR-3 (ovário) analisadas
198 pela técnica de RT-PCR. As três linhagens celulares apresentaram expressão
199 para BDNF. (Figura 1).

200

201 **Efeito de BDNF nas células de câncer de mama, ovário e colo do útero**

202 A viabilidade celular das três linhagens celulares foi verificada após o tratamento
203 por 48 horas com o ligante do receptor TrkB, BDNF, nas doses de 1, 10 e 100
204 ng/mL, pelo método de MTT.

205 A proliferação celular foi significativamente promovida pelo tratamento com
206 BDNF nas células de câncer de ovário. O tratamento não teve efeito significativo
207 nas células de mama e de colo do útero (Figura 2).

208

209 **Efeito de K252a nas células de câncer de mama, ovário e colo do útero**

210 A viabilidade celular das três linhagens celulares foi verificada após o tratamento
211 por 48 horas com o inibidor de Trk, K252a, nas doses de 10, 100 e 1000 nM, pelo
212 método de MTT.

213 O tratamento com K252a inibiu significativamente o crescimento celular dos três
214 tipos de tumores analisados na maior dose testada (Figura 3).

215

216 **Discussão**

217

218 O fator neurotrófico derivado de cérebro (BDNF) desempenha um importante
219 papel na regulação da sobrevivência, estrutura e função de neurônios do sistema
220 nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP). Além disso, há
221 evidências que TrkB e BDNF estão frequentemente superexpressos em tumores
222 humanos, incluindo tumor de Wilm's, neuroblastomas e ovário, relacionados a um
223 comportamento agressivo e um pior prognóstico do tumor [8, 13-15]. Nesse
224 trabalho verificamos a expressão de BDNF nas linhagens celulares tumorais de
225 câncer de mama (MCF-7), colo do útero (HeLa) e ovário (OVCAR-3), confirmando
226 sua presença nos três tipos de tumor. Mais recentemente, tem sido mostrado o
227 papel do BDNF em promover a proliferação de células tumorais, a sobrevivência e
228 metástase, e também em aumentar a resistência à quimioterapia, emergindo como
229 um novo alvo em diferentes tipos de câncer [9, 10]. Devido à expressão de BDNF
230 nessas células tumorais é importante investigar qual o papel desse fator de
231 crescimento neurotrófico, e se há a ativação de alguma via de sinalização
232 relacionada com a progressão e sobrevivência do tumor.

233 Já é relatado que em algumas linhagens de câncer de ovário (OVCA420 e
234 OVCA429), o silenciamento do receptor TrkB ocasiona um aumento na taxa de
235 apoptose celular e a inibição da migração celular, e a ativação do receptor
236 aumenta as capacidades de migração e invasão das células tumorais [11].
237 Também já foi demonstrado pelo nosso grupo que, com a inibição de Trk, há uma
238 diminuição da proliferação de células de câncer colorretal, mostrando a
239 possibilidade de que a ativação de TrkB por BDNF, seu ligante primário, possa

240 agir como sinal de pró-sobrevivência e proliferação [12]. Nós avaliamos o efeito do
241 fator neurotrófico derivado de cérebro, BDNF, em linhagens celulares de três
242 tumores femininos, mama, colo do útero e ovário. O BDNF aumentou a
243 proliferação das células tumorais de ovário, sugerindo uma possível influência
244 desse fator de crescimento na progressão desse tumor, visto que já foi relatado
245 que a ativação de TrkB com o tratamento de BDNF promove a migração de
246 células tumorais e a habilidade de sobrevivência nesse tumor [16].

247 Para avaliar o efeito da inibição do receptor de BDNF, o TrkB, tratamos as células
248 dos três tipos de câncer com o antagonista de Trk, K252a. Verificamos uma
249 inibição do crescimento das três linhagens celulares, demonstrando um efeito anti-
250 proliferativo, sugerindo que a inibição da proliferação celular *in vitro* pode ocorrer
251 pela inibição de TrkB nesses tumores. Esses dados mostram a importância de
252 receptores tirosina quinase e de neurotrofinas no controle da sobrevivência e
253 proliferação do câncer, e indicam a via BDNF/TrkB como potencial alvo
254 terapêutico nesses tumores femininos.

255 Esse trabalho mostrou a expressão de BDNF em células tumorais de mama, colo
256 do útero e ovário. O efeito da via de sinalização BDNF/TrkB foi demonstrado
257 nessas linhagens, com o tratamento do ligante BDNF e do antagonista de Trk,
258 K252a. Resultados importantes de diminuição na viabilidade celular foram obtidos
259 com o tratamento de K252a nessas células, mostrando a importância dessa via na
260 proliferação celular desses tumores. Maiores informações dos papéis de
261 neurotrofinas e RTKs nos mecanismos de sobrevivência do câncer são
262 necessárias para investigar possíveis alvos terapêuticos para esses tipos de
263 tumores femininos.

264 **Agradecimentos**

265 Esse trabalho tem o suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento
266 Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
267 Translacional em Medicina (INCT-TM), Fundação *South American Office for Anti-*
268 *Cancer Drug Development* (SOAD) e Instituto do Câncer Infantil (ICI-RS).

269

270

271

272

273

274

275

276

277

278

279

280

281

282

283

284

285

286

287

288 **Referências**

289

290 [1] Instituto Nacional de Câncer (INCA)

291 (<http://www.inca.gov.br>).

292 [2] Makhoul I, KIWAN E. Neoadjuvant systemic treatment of breast cancer. *J Surg*

293 *Oncol* 2011;103:348–57.

294 [3] Krause DS, Van Etten RA. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *N*

295 *Engl J Med* 2005;353:172-87.

296 [4] Barbacid M. The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol*

297 1994;25:1386-1403.

298 [5] Wong AS, Leung PC. Role of endocrine and growth factors on the ovarian

299 surface epithelium. *J Obstet Gynaecol Res* 2007;33:3-16.

300 [6] Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosc*

301 1996;19:289-317.

302 [7] Nakagawara A, Arima- Nakagawara M, Scavarda NJ, Azar CG, Cantor AB,

303 Brodeur GM. Association between high levels of expression of the TRK gene and

304 favorable outcome in human neuroblastoma. *N Engl J Med* 1993;328:847-54.

305 [8] Nakagawara A, Azar CG, Scavarda NJ and Brodeur GM: Expression and

306 function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol Cell Biol*

307 1994;14:759-67.

308 [9] Thiele CJ, Li Z, McKee AE. On Trk – the TrkB signal transduction pathway is an

309 increasingly important target in cancer biology. *Clin Cancer Res* 2009;15:5962-67.

310 [10] Desmet CJ, Peeper DS. The neurotrophic receptor TrkB: a drug target in anti-

311 cancer therapy? *Cell Mol Life Sci* 2006;63:755-59.

312 [11] Au CWH, Siu MKY, Liao X, Wong ESY, Ngan HYS, Tam KF, Chan DCW,
313 Chan QKY, Cheung ANY. Tyrosine kinase B receptor and BDNF expression in
314 ovarian cancers - Effect on cell migration, angiogenesis and clinical outcome.
315 *Cancer Lett* 2009;281:151-61.

316 [12] de Farias CB, Rosemberg DB, Heinen TE, Koehler-Santos P, Abujamra AL,
317 Kapczinski F, Brunetto AL, Ashton-Prolla P, Meurer L, Bogo MR, Damin DC,
318 Schwarstmann G, Roesler R. BDNF/TrkB content and interaction with Gastrin-
319 Releasing Peptide Receptor blockade in colorectal cancer. *Oncology* 2010;79:430-
320 39.

321 [13] Aoyama M, Asai K, Shishikura T, Kawamoto T, Miyachi T, Yokoi T, Togari H,
322 Wada Y, Kato T and Nakagawara A. Human neuroblastomas with unfavorable
323 biologies express high levels of brain-derived neurotrophic factor mRNA and a
324 variety of its variants. *Cancer Lett* 2001;164:51-60.

325 [14] Eggert A, Grotzer MA, Ikegaki N, Zhao H, Cnaan A, Brodeur GM and Evans
326 AE. Expression of the neurotrophin receptor TrkB is associated with unfavorable
327 outcome in Wilms' tumor. *J Clin Oncol* 2001;19:689-96.

328 [15] Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat*
329 *Rev Cancer* 2003; 3:203-16.

330 [16] Qiu L, Zhou C, Sun Y, Di W, Scheffler E, Healey S, Kouttab N, Chu W, Wan Y.
331 Crosstalk between EGFR and TrkB enhances ovarian cancer cell migration and
332 proliferation. *Int J Oncology* 2006;29:1003-11.

333

334

335

336 **Legendas das figuras**

337

338 Fig. 1. Expressão de RNAm para BDNF por RT-PCR.

339 As linhagens celulares de câncer de colo do útero, mama e ovário,
340 respectivamente, expressam RNAm para BDNF. O RNA foi extraído das células
341 e a técnica de RT-PCR foi realizada conforme descrito nos Materiais e Métodos.

342 Um transcrito de tamanho de 362pb representa um fragmento de BDNF que foi
343 identificado nas três linhagens celulares.

344

345 Fig. 2. Efeito de BDNF em células de câncer de colo do útero (HeLa), mama
346 (MCF-7) e ovário (OVCAR-3).

347 O BDNF não afetou a viabilidade celular de HeLa (a) e de MCF-7 (b) e aumentou
348 a proliferação das células OVCAR-3 (c). O tratamento com diferentes doses de
349 BDNF foi realizado conforme descrito nos Materiais e Métodos. A proliferação
350 celular foi verificada pelo método MTT 48h depois do tratamento. Os dados são
351 mostrados em porcentagem de viabilidade celular de 3 experimentos diferentes,
352 cada um repetido seis vezes. * $p < 0,05$ comparado às células do controle.

353

354 Fig. 3. Efeito de K252a em células de câncer de colo do útero (HeLa), mama
355 (MCF-7) e ovário (OVCAR-3).

356 O inibidor de Trk reduziu a proliferação das células HeLa (a), MCF-7 (b) e
357 OVCAR-3 (c). O tratamento com diferentes doses do inibidor de Trk K252a foi
358 realizado conforme descrito nos Materiais e Métodos. A proliferação celular foi
359 verificada pelo método MTT 48h depois do tratamento. Os dados são mostrados

360 em porcentagem de viabilidade celular de 3 experimentos diferentes, cada um
361 repetido seis vezes. ** $p < 0,01$ comparado às células do controle.

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

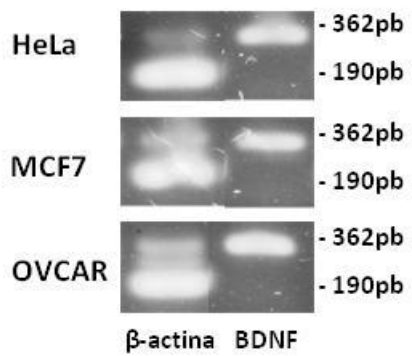
381

382

383

384 **Figuras**

385



386

387 Fig. 1.

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

398

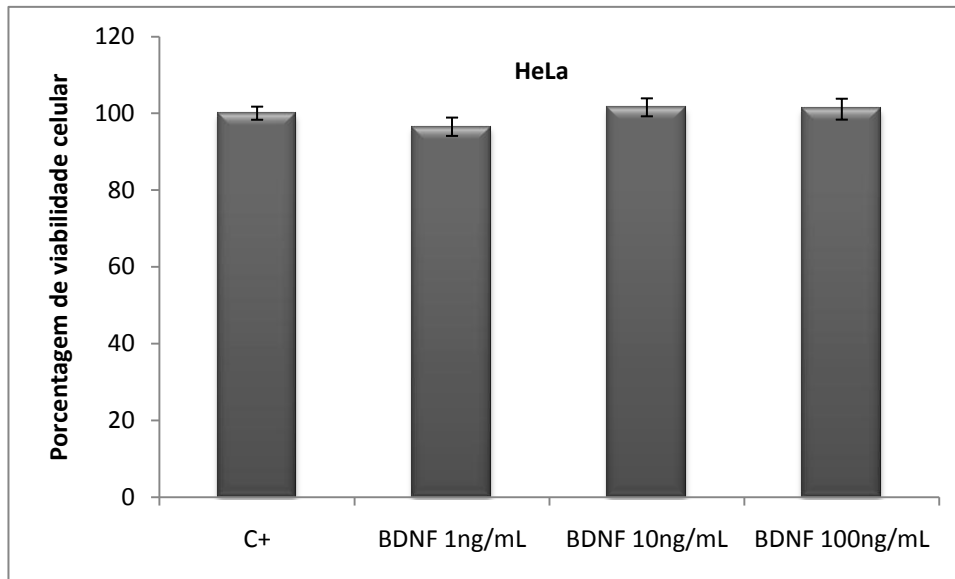
399

400

401

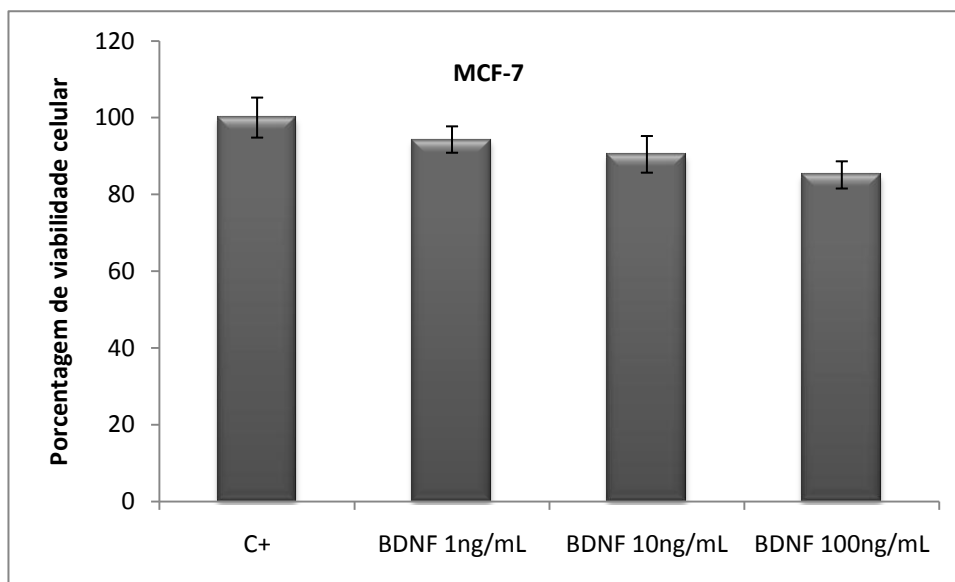
402

403 a.



404

405 b.



406

407

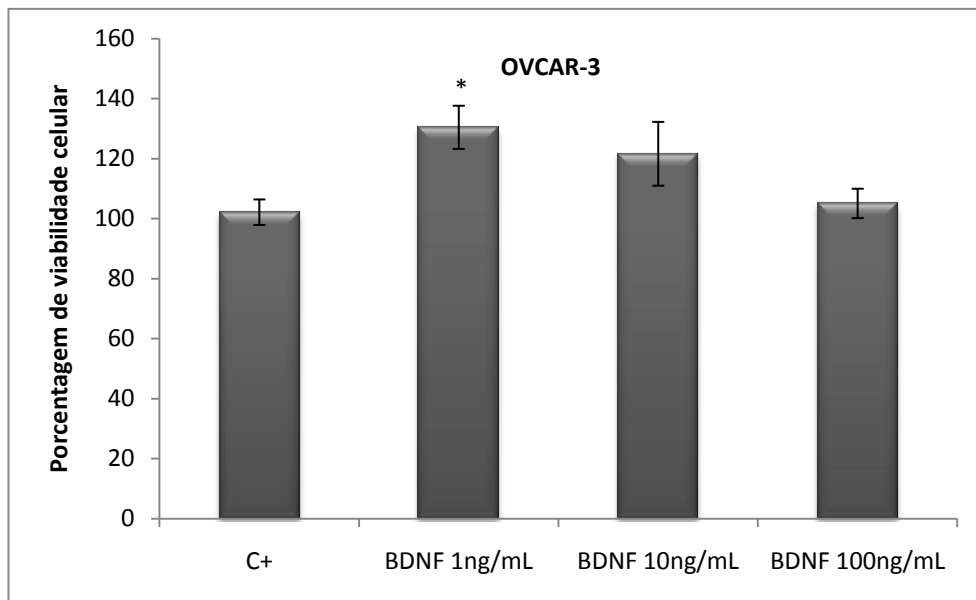
408

409

410

411

412 C.



413

414 Fig. 2.

415

416

417

418

419

420

421

422

423

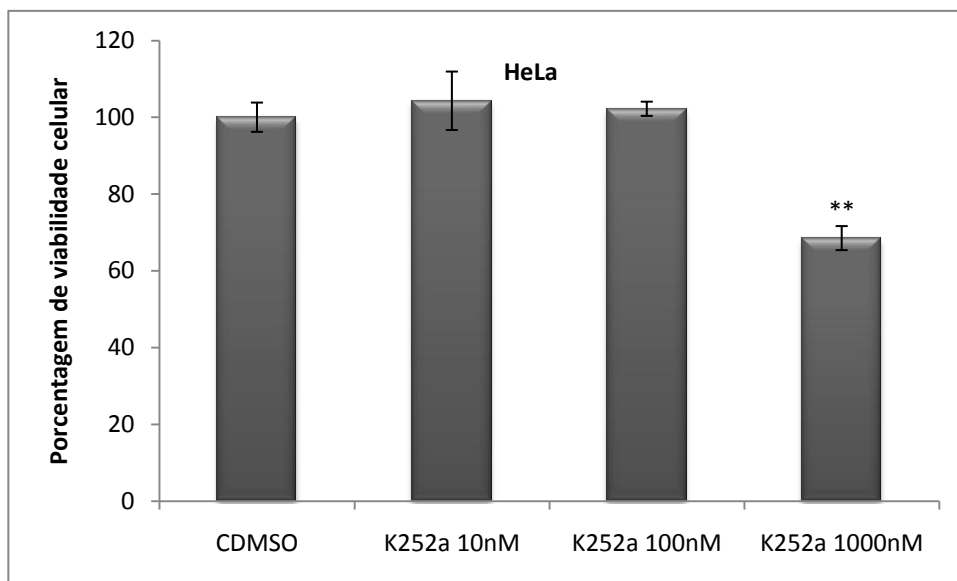
424

425

426

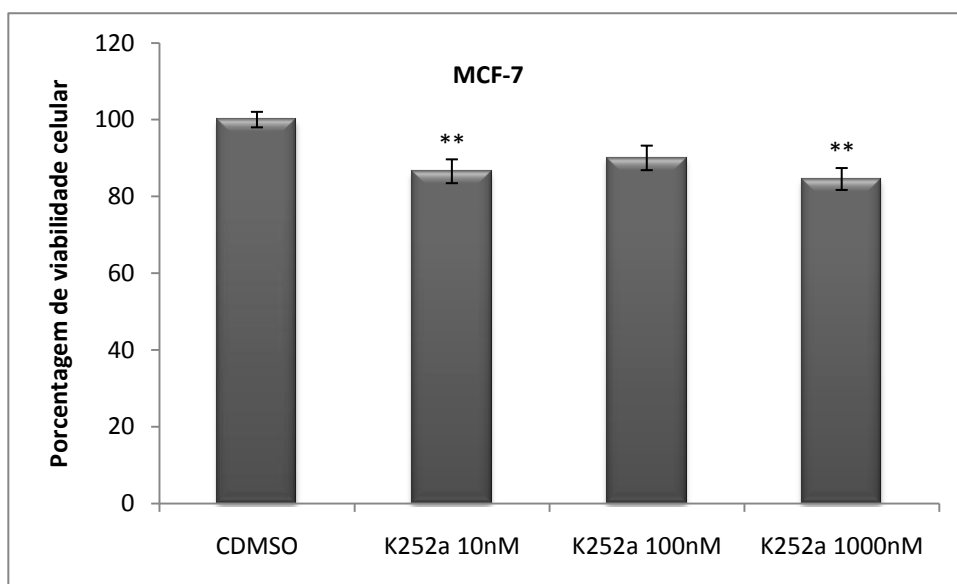
427

428 a.



429

430 b.



431

432

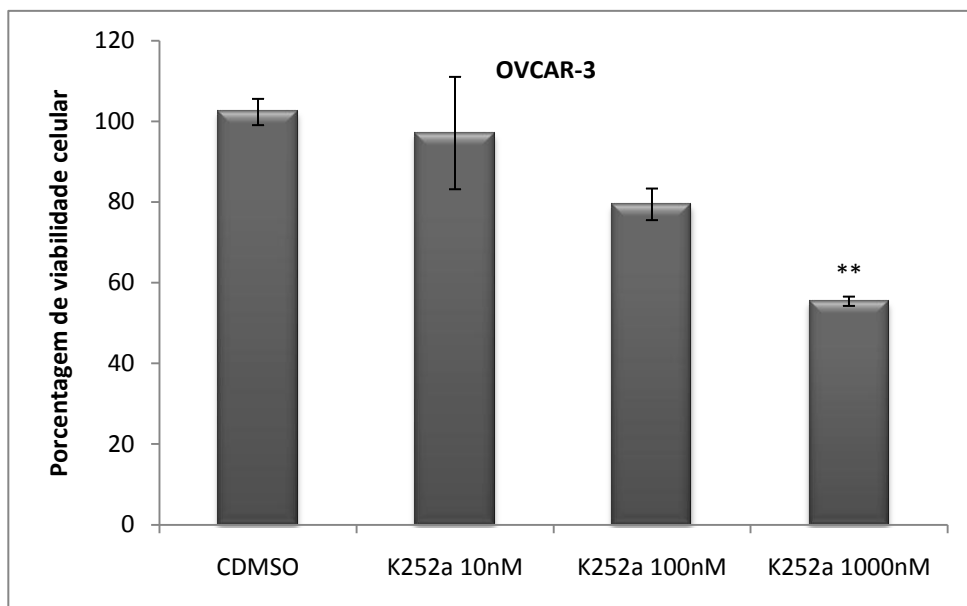
433

434

435

436

437 c.



438

439 Fig. 3.



CHECK LIST FOR AUTHORS

Required Submission Criteria

Order of Submission

The order of your new submission should be as follows:

- 1) Cover Letter
- 2) Conflict of Interest Forms
- 3) Manuscript File (should include title page, abstract, full manuscript body text, conflict of interest statement, references, and table and figure legends)
- 4) All Regular Tables (in order of citation within the manuscript text)
- 5) All Regular Figures (in order of citation within the manuscript text)
- 6) All Supplementary Materials
- 7) Research Highlights

General

The limitation on the **number of authors** has been observed. If not, detailed information on each author's contribution to the manuscript is outlined in the cover letter. Original Research Reports have a limit of 10 authors, while Reviews and Case Reports have a limit of 5, Rapid Communications and Letters to the Editor have a limit of 3. If you have more than the limited number of authors, you must provide justification in your cover letter. The justification should include a detailed list of each author's contribution to the article. If the handling editor feels that the number of authors is excessive, you may be asked to remove authors from the submission. Please note that if you add authors (beyond the limitation) at the revision stage, justification must be provided as well as a signed conflict of interest form for each new author. After your article is accepted, you may not add authors to the manuscript without prior approval from the editorial office. To determine authorship of manuscripts submitted to *Gynecologic Oncology*, please use the following criteria provided by the "Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals" (available from Secretariat Office, American College of Physicians, Independence Mall West, Sixth Street at Race, Philadelphia, PA 19106-1572).

Suggest at least **two potential reviewers** who are experts in the field and provide reviewer's full name and current functioning email addresses for each.

Provide a **cover letter** that outlines the significance of the findings, the contribution of the individual authors, and any other information pertinent to the review and publication of the manuscript. If your paper has more than the allowed number of authors for the article type, your cover letter should also provide detailed information regarding each author's contribution to the article. All financial support should also be stated in the cover letter.

Conflict of Interest Forms for all authors are signed and included with the submission. Please note that manuscript will not be seen by editors or reviewers until all conflict of interest forms are included with the submission. Forms may be downloaded here: http://www.elsevier.com/framework_products/promis_misc/Gynecologic%20Oncology%20Conflict%20of%20Interest%20Policy%20Form.pdf

A **Conflict of Interest statement** is included in the main manuscript file and appears before the reference listing

Pages are numbered consecutively

Lines are numbered consecutively All line numbers should be provided on the left margin of the page, and each and every line should be numbered. Please number all pages continuously and do not restart the line numbering on each page. You may add line numbers in Microsoft Word by clicking on “File”, select “Page setup”, select the “Layout” tab, click on the “Line Numbering” button, check the “Add Line Numbering” box, and select “Continuous”

Lines are double-spaced

Word count / table & figure limitations are observed both on the abstract and on the manuscript text.

MANUSCRIPT LENGTH AT A GLANCE

Article Type	Abstract Length (words)	Manuscript Length (words)	Tables and/or Figures*	Supplemental Material
Original Research	250	3000	6	No Limit
Rapid Communication	250	2000	6	No Limit
Review	300	4500	6	No Limit
Editorial	N/A	1600	N/A	No Limit
Clinical Commentary	N/A	1600	N/A	No Limit
Letter to the Editor	N/A	N/A	N/A	No Limit
Case Report	NA	800 (4 refs max)	1	No Limit

*A combination of figures and/or tables is permissible.

The manuscript is **written in clear and proper English**.

Research Highlights should be between 2-3 bullet points and should be no more than 85 characters including spaces for each bullet point provided in a separate file.

All files are presented in the **proper order**. Files should be ordered according to the number which appears next to the file description on the “Attach Files” screen.

Title page

Every submission must include a title page as the **first page of the manuscript file** (please note: not the system generated built PDF, but rather the Microsoft Word document or RTF file that you upload to your submission). Please note that the corresponding author listed on your title page must match the corresponding author entered in our systems; should this information conflict, we reserve the right to contact either or both authors for correspondence.

Includes **full title** of manuscript.

Includes **all author names** in the style and order to be published.

All **current author affiliations** are provided.

The **corresponding author** is denoted.

The current postal address, telephone number, fax number, and **functioning email address** is provided for the corresponding author.

If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a **"Present address"** (or **"Permanent address"**) may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes

Abstract

- Word count** limitations are observed.
- For case reports and letters to the editor, an **abstract is not necessary**.
- For original research reports, reviews, and rapid communications, a **structured abstract** is required. The abstract must be divided into the following sections: Objective, Methods, Results, and Conclusions.

References

- References are cited in text by **number in order of appearance**.
- All references provided in the reference listing have been **cited within the text** of the manuscript.
- References should be cited in the text by Arabic numerals in square brackets, [1], [2], etc., in order of appearance and follow the **Vancouver Style** (http://www.library.uwa.edu.au/education_training_and_support/guides/citing_your_sources_-_vancouver_style). Only articles that have been published or are in press should be included in the references. Unpublished results or personal communications should be cited as such in the text. [1] Ostor AG, Duncan A, Quinn M, Rome R. Adenocarcinoma in situ of the uterine cervix: an experience with 100 cases. *Gynecol Oncol* 2000;79:207-10. [2] Hay R. Atlas of human tumor cell lines. San Diego: Academic Press; 1994. [3] DiSaia PJ, Creasman WT. The adnexal mass and early ovarian cancer. In: DiSaia PJ, Creasman WT, editors. *Clinical gynecologic oncology*. 5th ed. St. Louis: Mosby-Year Book;1997. p. 253-61. [4] Breast Cancer Information Core (BIC) databases (http://www.nhgri.nih.gov/Intramural_research/Lab_transfer/Bic/).

Tables and Figures

- Table and figure limitations** are observed. Any excess tables or figures are supplied as supplementary materials.
- Please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> for **additional instructions**
- All figures are provided in EPS, TIFF, JPEG, or PDF **file format** and all tables are provided in DOC or RTF file format.
- All figures pass system **quality check** on the “QC Check” screen and are provided in high-resolution.
- All tables and figures are **labeled and files are named** according to the order of appearance in the manuscript.
- Each table or figure has an **accompanying legend**. Labels on legends should match labels on figures or tables. All table and figure legends should be provided in a list in the order of appearance of citation within the manuscript text. This list should appear at the end of your manuscript file (not in a separate file) after your reference listing. Please ensure that the label on each legend matches the label on the corresponding figure. Legends for supplementary figures should be labeled “S1”, “S2”, etc.
- Neither tables nor figures are embedded in the manuscript text. Figures should be provided in a **separate file**, while tables may be presented either in a separate file or at the end of your manuscript file.
- All figures and tables are **readable and appear in full** in the system built PDF. Nothing should be cut off from the edge of the page or be otherwise unreadable.
- If, together with your accepted article, you submit **usable color figures** then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color on the Web (e.g.,

ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color in print or on the Web only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions> Please note: Because of technical complications which can arise by converting color figures to "gray scale" (for the printed version should you not opt for color in print) please submit in addition usable black and white versions of all the color illustrations.

Supplementary Materials

All supplementary materials must be provided in **separate files**. Supplementary materials are intended for **online publication only** and will not be published in print. Like regular figures and tables, supplementary materials are subject to a quality check to ensure that they are publishable. Supplementary figures and tables should be labeled "S1", "S2", etc.

Research Highlights

For all article types except Letters to the Editor and Editorials **research highlights are required**. The research highlights are 2-3 bullet points (less than 85 character including spaces for each bullet point) which is not identical to the article title or the full abstract.