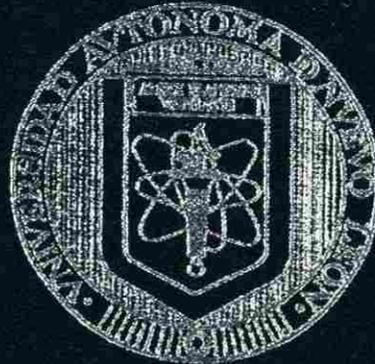


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



SOBRE EXPRESIÓN DE LOS GENES HOX A10
TRANSCRITO 2, A11 Y B13 EN TEJIDOS OVARICOS
CON PATOLOGÍA MALIGNA

POR

Irchele Cuaranta Monroy

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD
EN INMUNOBIOLOGÍA

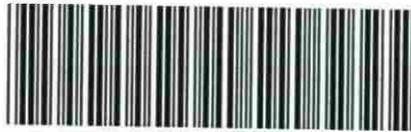
Febrero del 2008

TM
Z5 320
FCB
2008
.CB3

SOBRETON DE LOS CERILES FOX A10
TRAVELERS TRIPPER OVA A1000
OON PATRONA MIAICIA

2008

ICM



1020160577



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**SOBRE-EXPRESIÓN DE LOS GENES *HOX A10* TRANSCRITO 2, *A11* Y *B13*
EN TEJIDOS OVÁRICOS CON PATOLOGÍA MALIGNA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

P r

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
Ixchelt Cuaranta Monroy

®

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA**

Febrero 2008

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**SOBRE-EXPRESIÓN DE LOS GENES *HOX A10* TRANSCRITO 2, *A11* Y *B13*
EN TEJIDOS OVÁRICOS CON PATOLOGÍA MALIGNA**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Ixchelt Cuaranta Monroy

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA**

Febrero 2008

1464452



FONDO
TBSIS
020908

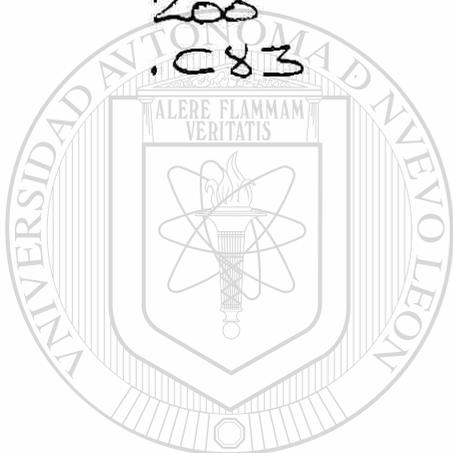
TM

Z5320

FCB

200

.C83



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

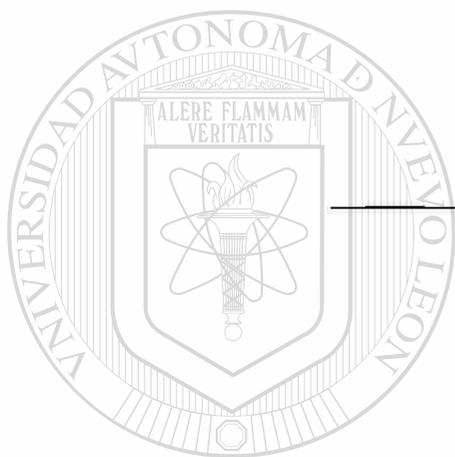


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

20-V -08
Mar'0

**SOBRE-EXPRESIÓN DE LOS GENES *HOX A10* TRANSCRITO 2,
A11 Y *B13* EN TEJIDOS OVÁRICOS CON PATOLOGÍA MALIGNA**

Comité de Tesis



Dra. Diana Reséndez Pérez
Director

Dra. Cristina Rodríguez Padilla
Secretario

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dra. Laura Trejo Ávila
Vocal



U A N L

“Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa”

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Mahatma Gandhi



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

“En el mundo interdependiente de nuestro tiempo, los individuos y las naciones ya no son capaces de resolver por sí mismos muchos de sus problemas. Nos necesitamos los unos a los otros. Necesitamos desarrollar un sentido de responsabilidad universal. Es nuestra responsabilidad individual y colectiva proteger y nutrir a la familia mundial, apoyar a sus miembros más débiles y preservar y cuidar el medio ambiente en el que vivimos.”

Dalai Lama



TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	i
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
NOMENCLATURA	vii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. HIPÓTESIS	3
4. OBJETIVOS	4
4.1. Objetivo General	4
4.2. Objetivos Especificos	4
5. ANTECEDENTES	5
5.1. Ovario normal	5
5.1.1. Anatomía y Fisiología del ovario normal adulto	5
5.1.2. Embriología de las gónadas indiferenciadas	8
5.1.2.1. Desarrollo de las gónadas indiferenciadas	8
5.1.2.2. Cuarta semana de gestación	8
5.1.2.3. Quinta semana de gestación	8
5.1.2.4. Sexta semana de gestación	8
5.1.2.5. Determinación del sexo	9
5.1.2.6. Desarrollo de los ovarios	10
5.2. Cáncer de ovario	11
5.2.1. Epidemiología del cáncer de ovario	11
5.2.2. Diagnóstico clínico	12
5.2.3. Estadificación	12
5.2.4. Diagnóstico histopatológico	13
5.2.4.1. Tumores del epitelio celómico superficial	15
5.2.4.2. Tumores serosos	15



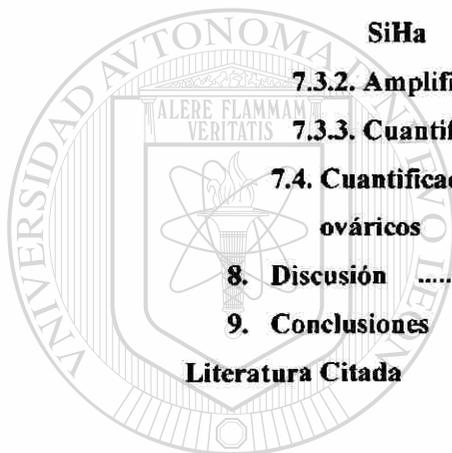
5.2.4.3. Tumores mucinosos	16
5.2.4.4. Tumores endometrioides	17
5.2.4.5. Adenocarcinoma de células claras	18
5.2.4.6. Cistoadenofibroma	18
5.2.4.7. Tumor de Brenner	19
5.3. Marcadores moleculares en carcinoma de ovario	19
5.4. Genes <i>HOX</i>	21
5.4.1. Los genes <i>HOX</i> en patologías no neoplásicas	22
5.4.2. Los genes <i>HOX</i> en patología neoplásica	23
5.4.3. Expresión de genes <i>HOX</i> en el tracto genital femenino ...	23
5.4.4. Los Genes <i>HOX</i> y el ovario normal	25
5.4.5. Los genes <i>HOX</i> y el cáncer de ovario	26
6. MATERIALES Y MÉTODOS	27
6.1. Estandarización de la amplificación de los genes <i>HOX</i>	27
6.1.1. Obtención de líneas celulares y tejido de placenta	27
6.1.2. Aislamiento de los RNA's totales a partir de líneas celulares y tejido de placenta	28
6.1.3. Cuantificación del RNA obtenido	29
6.1.4. Síntesis de los DNAc's a partir de los RNA's totales	29
6.1.5. Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación mediante PCR	29
6.1.6. Amplificación de los genes <i>HOX</i> y β -actina mediante RT- PCR	30
6.1.7. Visualización de los productos amplificados en geles de Agarosa	32
6.2. Amplificación de los genes <i>HOX</i> en tejidos ováricos	33
6.2.1. Colecta de muestras de tejido ovárico	33
6.2.2. Extracción de los RNA's totales a partir de tejido ovárico y síntesis de los DNAc's	33
6.2.3. Amplificación de los genes <i>HOX</i> en tejido ovárico	33



6.3. Cuantificación relativa mediante PCR tiempo real de la expresión de <i>HOXB13</i> en tejidos ováricos	33
6.3.1. Estandarización de la expresión del gen <i>β-actina</i> y <i>HOXB13</i> en línea celular SiHa	38
6.3.2. Validación del método comparativo para cuantificación relativa ($\Delta\Delta CT$)	39
6.3.3. Cuantificación relativa de la expresión del gen <i>HOXB13</i> en tejidos ováricos normales, con patología benigna y maligna	39
6.4. Tipo de estudio y análisis estadístico	40
7. Resultados	41
7.1. Estandarización de la amplificación de los genes <i>HOX</i>	41
7.1.1. Obtención de los RNA's totales a partir de líneas celulares y tejido placentario	41
7.1.2. Amplificación de <i>β-actina</i> mediante RT-PCR	42
7.1.3. Expresión de los genes <i>HOX</i> en las líneas celulares y tejido Placentario	44
7.1.3.1. <i>HOXA7</i>	44
7.1.3.2. <i>HOXA9</i> transcrito 1 y 2	45
7.1.3.3. <i>HOXA10</i> transcrito 1	46
7.1.3.4. <i>HOXA10</i> transcrito 2	47
7.1.3.5. <i>HOXA11</i>	48
7.1.3.6. <i>HOXB7</i>	49
7.1.3.7. <i>HOXB13</i>	50
7.2. Expresión diferencial de los genes <i>HOX</i> en tejido ovárico	51
7.2.1. Aislamiento de los RNA's totales a partir de los tejidos ováricos	51
7.2.2. Amplificación de los genes <i>HOX</i> en los tejidos ováricos	52
7.2.2.1. Expresión de <i>HOXA7</i> en tejidos ováricos	53
7.2.2.2. Transcritos de <i>HOXA9</i> en tejidos ováricos	54
7.2.2.3. Visualización de <i>HOXA10</i> transcrito 1 en tejidos ováricos	55



7.2.2.4. Amplificación de <i>HOXA10</i> transcrito 2 en tejidos ováricos malignos	56
7.2.2.5. Expresión de <i>HOXA11</i> en tejidos ováricos	57
7.2.2.6. Detección de transcritos de <i>HOXB7</i> en ovario	58
7.2.2.7. Amplificación de <i>HOXB13</i> en tejidos ováricos con patología maligna	59
7.3. Cuantificación de la expresión de <i>HOXB13</i> mediante PCR tiempo real	61
7.3.1. Estandarización de la expresión del gen β-actina en las células SiHa	61
7.3.2. Amplificación del gen <i>HOXB13</i> en células SiHa	62
7.3.3. Cuantificación relativa de <i>HOXB13</i> en SiHa	63
7.4. Cuantificación relativa de la expresión de <i>HOXB13</i> en los tejidos ováricos	64
8. Discusión	68
9. Conclusiones	75
Literatura Citada	77



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Diana Reséndez Pérez por aceptarme en su laboratorio, por proporcionarme su apoyo, el equipo y material de laboratorio durante estos dos años y medio durante la realización de la tesis de maestría.

Mi agradecimiento a la Dra. Laura Trejo Ávila por sus acertados comentarios sobre el trabajo de investigación realizado en esta tesis y por haberme permitido utilizar las instalaciones de su laboratorio.

Al Dr. Mario Morales Vallarta y la Dra. María Porfiria Barrón por los consejos otorgados, por la plática amena y por permitirme hacer uso del equipo y material de su laboratorio.

Al Dr. Edgar Mendoza y a la Dra. Lydia Rodríguez por escuchar atentamente mis presentaciones y por sus consejos durante los exámenes tutoriales.

Al Dr. Isaias Badillo por haberme proporcionado muestras de pacientes, por su amabilidad y disposición que fueron una gran contribución para la realización de este trabajo.

A la Dra. Lucía Jara, la Dra. Gabriela Quiroga, y el Dr. Raúl Garza por su tiempo y disposición al coleccionar muestras que fueron de gran utilidad para los ensayos realizados en este trabajo de investigación.

A CONACYT por el apoyo económico para la realización de este trabajo de tesis.

A la M.C. Karina Villanueva, por su amistad, compañía, por todos sus consejos y toda la ayuda que me otorgo durante mi estancia en el Laboratorio, en las clases de maestría, en la realización de esta tesis y en mi estancia en la ciudad de Monterrey.

A Nancy Villareal por su amistad, su confianza y por todo el apoyo que me brindó para los trámites administrativos que contribuyeron para la realización de este trabajo de tesis.

A la M. C. Maribel Luna por enseñarme paso a paso y con paciencia las técnicas de biología molecular que ahora conozco, por supervisar mi trabajo, por escucharme y ayudarme con los aspectos técnicos de los protocolos, por su amistad y por permitirme convivir con Alejandro y Lucía.

Al Dr. Fermín Mar Aguilar por todos los consejos en la realización de la tesis y en la presentación de los seminarios, por su paciencia y por su amistad.



Al M.C. Claudio Rocha (Gemelo bueno) por su paciencia al escucharme por problemas durante la realización de experimentos sin importar la hora, por darme reactivos aunque estuviera trabajando, y por proporcionarme su amistad.

Al resto de mis compañeros de laboratorio por su amistad: A Paco por toda su ayuda para tener material de laboratorio limpio y estéril. A Yenny por su plática tan agradable e interesante, a Alejandra por ayudarme a ver las estrellas, a Delia por mantenerme informada de todo lo que acontecía día a día en Monterrey; a Citlali por su charla amena, a Dianita por las largas conversaciones y por su confianza, a Jeanne por rezar por mí, a Alejandro, Salomé, Carlos, Ángel y perla por su trato cordial.

A los Antiguos miembros del Laboratorio Ricardo y Argentina por haberme brindado su ayuda y considerarme su amiga.

A Ana Dulce por su amistad, a Santiago (Chago) por haberme ayudado para aprender PCR tiempo real, y para utilizar el termociclador, a Manuel por haberme ayudado en los experimentos de PCR tiempo real. A Palomita por hacer mas amenas las noches en el laboratorio.

A todos mis compañeros y compañeras de la maestría, por todo el tiempo que compartimos en clase.

A Karla, Pedro y Emiliano por su cariño y amistad. A todos mis compañeros originarios de SLP que estuvieron haciendo sus estudios aquí en Monterrey, les agradezco su apoyo: Mario, Isela, Sofía y José.

Al Dr. Sergio Sánchez-Armass y su familia por estar al pendiente de mí aunque estaba lejos de SLP.

A mi familia sin ustedes no estaría aquí: a mis Padres Tonantzin y Felipe por haberme enseñado a ser una persona que busca continuamente el conocimiento, a ser perseverante, por apoyarme en todas mis decisiones y por estar tan al pendiente del desarrollo de esta tesis. A mis hermanos Nashelli y Felipe por siempre apoyarme, por su cariño, y por toda su confianza. A mis Abuelos Juana Amalia, Guillermo y María de la Luz por todo su cariño y apoyo, son un fuerte pilar que admiro mucho. A mis cuñados Lupita y Jesús por todo su apoyo. A mis tíos Cuitlahuac, Guillermo, Tonatiuh, Cuauhtémoc, por siempre estar al pendiente de mí, por todo su apoyo y por su cariño. A mis primos Tonantzin, Tonatiuh, Yoalticitl, Cuauhtémoc y Terri por su cariño y por su apoyo moral. A mis tías Lorena y Luz María por su cariño. A mis Suegros por todo su apoyo desde SLP. A las Pelos Pulga, Emiliana y Princesa por su cariño.

A mi esposo Gerardo por su apoyo, por su cariño, por hacerme una persona mejor día a día, que no sólo se ve reflejado en mi trabajo si no en todos los ámbitos de mi vida, gracias por estar conmigo.



LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I. Estadificación para el cáncer epitelial de ovario	13
II. Clasificación de las neoplasias ováricas	15
III. Características de los oligonucleótidos específicos empleados	32
IV. Concentración de Cloruro de Magnesio en las reacciones PCR duplex de los genes <i>HOX</i> y β -actina	33
V. Etapas de la reacción de PCR realizados en el termociclador	33
VI. Pasos de la reacción de PCR tiempo real realizados en el termociclador	38
VII. Definición y características de las variables utilizadas para el análisis estadístico	41
VIII. Cuantificación de los RNA's totales extraídos de los tejidos ováricos	53
IX. Cuantificación relativa del gen <i>HOXB13</i> en muestras de tejido ovárico	66



LISTA DE FIGURAS

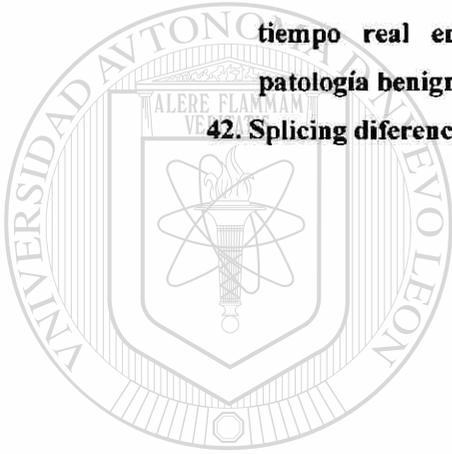
Figura	Página
1. Fotografía microscópica de ovario	7
2. Diagrama esquemático de la ovulación	8
3. Diferenciación gonadal masculina y femenina	10
4. Factores implicados en la diferenciación sexual del aparato genitourinario	11
5. Origen de las diversas neoplasias del ovario y algunos datos sobre su frecuencia y distribución	14
6. Cistoadenocarcinoma seroso	17
7. Cistoadenocarcinoma mucinoso 10X	17
8. Cistoadenocarcinoma mucinoso 40X	18
9. Carcinomas endometrioides	19
10. Tumores de Brenner	20
11. Comparación entre complejos <i>HOX</i> del ratón y el ser humano	23
12. Expresión de los genes <i>HOX</i> en el tracto genital femenino de embriones de ratón	25
13. Resumen de la expresión de los genes <i>HOX</i> en el ovario normal	26
14. Cuantificación de la expresión génica mediante técnicas de PCR tiempo real	35
15. Características de las sondas TaqMan®	36
16. Representación de los datos que se obtienen en el programa Opticon Monitor ® en PCR tiempo real.....	39
17. Extracción de RNA's totales en las líneas celulares y tejido de placenta	42
18. Amplificación del gen <i>β-actina</i> mediante RT-PCR	43
19. Estandarización de la amplificación del gen <i>β-actina</i>	



con la línea celular SiHa mediante gradiente de temperatura	44
20. Amplificación del gen <i>HOXA7</i> en la línea celular SiHa	45
21. Amplificación del gen <i>HOXA9</i> en la línea celular SiHa	46
22. Amplificación del gen <i>HOXA10</i> transcrito 1 en la línea celular MCF-7	47
23. Amplificación de <i>HOXA10</i> transcrito 2 en tejido de placenta	48
24. Amplificación de <i>HOXA11</i> en la línea celular SiHa	49
25. Amplificación de <i>HOXB7</i> en la línea celular SiHa	50
26. Amplificación de <i>HOXB13</i> en los DNac's obtenidos de las células SiHa	51
27. Extracción de RNA's totales en el tejido ovárico	52
28. Amplificación del gen β -actina mediante RT-PCR a partir del tejido ovárico	54
29. Amplificación del gen <i>HOXA7</i> en tejidos ováricos	55
30. Amplificación de <i>HOXA9</i> en tejidos ováricos	56
31. Amplificación de <i>HOXA10</i> transcrito 1 en tejidos ováricos	57
32. Amplificación de <i>HOXA10</i> transcrito 2 en tejidos ováricos	58
33. Amplificación de <i>HOXA11</i> en tejidos ováricos	59
34. Amplificación de <i>HOXB7</i> en tejidos ováricos	60
35. Amplificación de <i>HOXB13</i> en tejidos ováricos	61
36. Expresión diferencial de los genes <i>HOXA7, 9, 10, 11, B7 y B13</i> en tejidos ováricos	62
37. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan para cuantificar la expresión para el gen constitutivo β -actina en los DNac's de las células SiHa ...	63
38. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan para cuatificar la expresión para el gen	



<i>HOXB13</i> mediante RT-PCR tiempo real en los DNAc's de las células SiHa	64
39. Validación del método $\Delta\Delta$CT para la cuantificación relativa de expresión génica de <i>HOXB13</i> mediante PCR tiempo real	65
40. Cuantificación relativa del gen <i>HOXB13</i> mediante PCR tiempo real en tejidos ováricos normales y con patología benigna y maligna	67
41. Cuantificación relativa del gen <i>HOXB13</i> mediante PCR tiempo real en tejidos ováricos normales, y con patología benigna y maligna	68
42. Splicing diferencial de <i>HOXA10</i>	72



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



NOMENCLATURA

%	Por ciento
°C	Grados Celsius
µL	Microlitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNAc	ADN complementario
Abs	Absorbancia
RNA	Ácido ribonucleico
RNAasas	Enzimas que degradan el ARN
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BRCA	Genes <i>Breast Cancer</i>
CA	Antígeno Carcinoembrionario
Cm	Centimetro
C_T	Ciclo umbral o threshold cycle
DEPC	Dietilpirocarbonato
DES	Dietilestilbestrol
dNTPs	Desoxinucleótidos Trifosfato
Dr	Doctor
Dra	Doctora
E.E.U.U.	Estados Unidos de Norteamérica
<i>et al.</i>	en latín, " <i>et alia</i> ", y otros
FAM	6-carboxi-fluoresceina
FDT	Factor determinante de testiculos
Fig	Figura
FIGO	Federación Internacional de Ginecología y obstetricia
FRET	Transferencia de energía de resonancia de Förster o tranferencia de energía de resonancia fluorescente
FSH	Hormona Folículo Estimulante
G	Gramos
GB	Genbank
h	Horas
H₃BO₄	Ácido Bórico
H₂O	Agua
HCl	Ácido clorhídrico
HD	Homeodominio
HEX	Hexacloro-6-carboxi-fluoresceina
HOM-C	Complejo Homeótico



HOX	Genes <i>homeobox</i> en humanos
HOX	Proteínas con homeodominio en humanos
Hox	Genes <i>homeobox</i> en murinos
Hox	Proteínas con homeodominio en murinos
Inc	Incorporation
JOE	2,7-dimethoxyfluorescein-4,5-dichloro, 6-carboxy-fluorescein
KDa	KiloDalton
Kb	Kilobases
KCl	Cloruro de potasio
L	Litro
LH	Hormona Luteinizante
min	Min
M	Concentración Molar
MCF-7	Línea celular de adenocarcinoma ductal infiltrante con receptor de estrógeno positivo
M-CSF	Factor serológico estimulante de colonias de macrófagos
mg	Miligramos
MgCl₂	Cloruro de magnesio
mg/mL	Miligramos por mililitro
MGB	Minor Groove Binder
MilliQ	Agua procesada en filtros MilliQ
mL	Mililitro
mM	Concentración Milimolar
M-MLV	Virus Moloney de la Leucemia Murina
MOSE	Epitelio Superficial de Ovario Murino
MspI	Enzima de restricción de <i>Moraxella species</i>
ng	Nanogramos
NCBI	National Center for Biotechnology Information
nM	nanomolar
OC125	Anticuerpos monoclonales que reconocen determinantes antigénicos del antígeno 125
OMS	Organización Mundial de la Salud
OVCA433	Línea celular derivada de un paciente con cistadenocarcinoma papilar seroso de ovario
OVX	Anticuerpo monoclonal que reconocen determinantes antigénicos de tres líneas celulares de cáncer de ovario
PAX	Paired box
pb	Pares de bases nucleotídicas
pBS	Plásmido BlueScript
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
QBP	Químico Bacteriólogo Parasitólogo
rpm	Revoluciones por minuto



Rn	Nivel de fluorescencia
RNA	Acido Ribonucleico
RT	Transcripción reversa
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa asociada a Transcripción Reversa
ROX	6-carboxi-X-rodamina
s	Segundos
SB	Sodio y Borato
SiHa	Línea celular de carcinoma de cérvix de células escamosas infectadas con el virus de papiloma humano tipo 16
SRY	Región determinante del sexo Y
T	Temperatura
TA	Temperatura de alineamiento del ADN
TAMRA	6-carboxi-tetrametil-rodamina
TET	6-carboxi-tetracloro-fluoresceína
Tm	Temperatura de desnaturalización del ADN
U	Unidades
UANL	Universidad Autónoma de Nuevo León
UV	Rayos Ultravioleta
VIC	2'-cloro-7'-fenil-1,4-dicloro-6-carboxifluoresceína
X	Cromosoma X
XX	Cariotipo femenino
XY	Cariotipo masculino
Y	Cromosoma Y
µL /mL	Microlitros por mililitro
µg	microgramos
ΔC_T	Cambios en el Ciclo umbral o thershold cycle
ΔΔC_T	Cambios en el Ciclo umbral o thershold cycle con respecto a un control
Δ RN	Cambios en el nivel de fluorescencia

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



1. RESUMEN

En México el cáncer de ovario ocupa la tercera causa de enfermedad neoplásica en mujeres; se diagnostica en estados avanzados en la mayoría de las pacientes, por lo que lo hace el cáncer más letal de tipo ginecológico ya que no presenta una lesión precursora y en la actualidad no existen marcadores específicos ni sensibles para su diagnóstico. En los últimos años se ha encontrado que los genes *HOX*, una familia de genes que controlan el patrón de desarrollo del eje craneocaudal en el embrión, se encuentran asociados a neoplasias hematopoyéticas, linfoproliferativas (leucemias y linfomas) y tumores malignos sólidos incluyendo, pulmón, mama, colón, cervicouterino y recientemente ovario. En el cáncer de ovario se ha encontrado la expresión de los genes *HOX: A7, 9, 10, 11, B7* y *B13* relacionados con subtipos del carcinoma epitelial de ovario y con su grado de diferenciación. Debido a que el estudio de los genes *HOXA9, 10, 11* se realizó con modelos animales murinos y en líneas celulares, el objetivo de este proyecto consistió en analizar la expresión *in vivo* de los genes *HOXA7, A9, A10, A11, B7* y *B13* en muestras de tejido de ovario normal, con patología benigna y maligna.

La expresión de los genes *HOXA7, A9, A10, A11, B7* y *B13* se analizó mediante PCR punto final en 17 muestras de tejidos ováricos que incluyeron seis muestras con patología maligna y once muestras de tejido normal (n=5) y patología benigna (n=6). Además, en estas muestras se cuantificó la expresión relativa de *HOXB13* mediante PCR tiempo real. Para llegar a este propósito se llevo a cabo la estandarización de las condiciones de la RT-PCR punto final en las líneas celulares SiHa, MCF-7 y en el tejido de placenta. Asimismo, la estandarización de la amplificación mediante PCR tiempo real del gen *HOXB13* se realizó en la línea celular SiHa. Finalmente, estas condiciones se utilizaron para el análisis de la expresión de los genes *HOX* en tejidos ováricos con y sin patología maligna. Los resultados obtenidos en los tejidos ováricos mostraron que no existen diferencias significativas en la expresión de los genes *HOXA7, A9, A10* transcrito 1 y *B7* en tejidos de ovario con y sin patología maligna. Sin embargo, interesantemente se observó la expresión diferencial en tejidos ováricos con patología maligna comparados con los no malignos de los genes *HOXA10* transcrito 2 (p=0.0427), *HOXA11* (p=0.0427) y *HOXB13* (p=0.0006). La sobre-expresión del gen *HOXB13* se confirmó en las muestras de ovario con patología maligna (p<0.05) mediante PCR tiempo real, lo que permite postular que este gen podría estar involucrado en el desarrollo de neoplasias malignas ováricas.

Estos resultados abren un panorama de la expresión de los genes *HOX in vivo* en cáncer de ovario, para analizar la expresión del gen *HOXB13* en un mayor número de muestras de cáncer de ovario, mediante estrategias que permitan examinar la posibilidad de utilizar a *HOXB13* como biomarcador molecular diagnóstico. Así mismo, se puede analizar la expresión relativa de *HOXA10* transcrito 2 y *HOXA11* con PCR tiempo real en las muestras de tejido ovárico normal, con patología benigna y maligna.



2. INTRODUCCIÓN

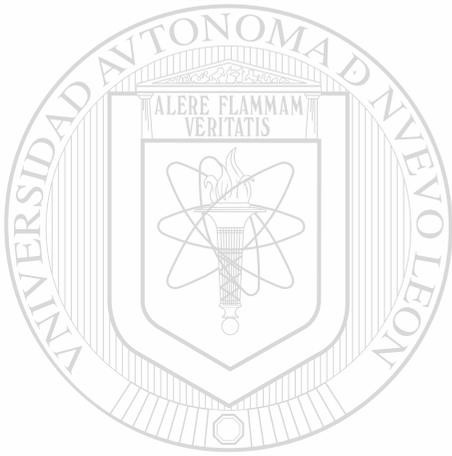
En México nos encontramos ante dos grandes transiciones epidemiológicas: demográfica y en salud, por lo que aún teniendo problemas de salud del tercer mundo, las principales causas de morbimortalidad son patologías del primer mundo, dentro de las cuales encontramos enfermedades cardiovasculares, accidentes, cáncer y enfermedades crónico-degenerativas. En nuestro país el cáncer de ovario ocupa la tercera causa de enfermedad neoplásica en mujeres; éste se diagnostica en estadios avanzados en la mayoría de las pacientes, a diferencia del cáncer de mama y cervicouterino en donde se han establecido normas para el diagnóstico temprano que incrementan la esperanza y la calidad de vida. Actualmente, se dificulta el diagnóstico del cáncer de ovario en las etapas tempranas debido a la falta de marcadores tumorales específicos y sensibles. Además, el diagnóstico y la estadificación del tumor se lleva a cabo mediante ultrasonido vaginal y laparotomía exploradora, y el marcador tumoral que se utiliza para el diagnóstico de cáncer de ovario es el CA125, el cual no es muy útil para el diagnóstico debido a su baja sensibilidad y especificidad. Esto dificulta el diagnóstico oportuno y adecuado que es indispensable para la elección del tratamiento y la respuesta a éste del tumor. El diagnóstico en etapas avanzadas y el pobre pronóstico de las pacientes se debe a la falta de conocimiento acerca del desarrollo a nivel molecular del cáncer de ovario, en los diferentes subtipos histológicos. Debido a lo anterior, el estudio a nivel molecular para dilucidar los mecanismos de desarrollo del cáncer de ovario será de gran importancia, ya que permitirán establecer marcadores moleculares para su diagnóstico temprano así como para mejorar el pronóstico.

En los últimos años se ha encontrado que los genes *HOX*, una familia de genes homeodominio los cuales controlan el patrón de desarrollo del eje craneocaudal en el embrión, se encuentran asociados a neoplasias hematopoyéticas, linfoproliferativas (leucemias y linfomas) y tumores malignos sólidos incluyendo, pulmón, mama, colón, cervicouterino y recientemente ovario. En el cáncer de ovario se ha encontrado la expresión de los genes *HOX: A7, 9, 10, 11, B7* y *B13* relacionados con subtipos del carcinoma epitelial de ovario y con su grado de diferenciación. Debido a que el estudio de los genes *HOXA9, 10, 11* se realizó con modelos animales murinos el objetivo de este proyecto consistió en analizar la expresión *in vivo* de los genes *HOXA7, A9, A10, A11, B7* y *B13*, en muestras de tejido normal, con patología benigna y maligna de ovario. La amplificación de los genes *HOX* se correlacionará con el diagnóstico histopatológico de los tumores y el análisis de estos resultados nos permitirá correlacionar la expresión génica con la expresión clínica y el probable pronóstico de estos tumores.



2. HIPÓTESIS

Las muestras de tejido ovárico con y sin patología maligna analizadas expresarán los genes *HOXA7*, *9*, *10*, *11*, *B7* y *B13* en correspondencia con el subtipo histológico del tumor y su expresión clínica.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Analizar la expresión *in vivo* de los genes *HOX A7, 9, 10, 11, B7 y B13* en muestras de tejido ovárico con y sin patología maligna.

4.2. Objetivos Específicos

1.- Estandarizar la extracción de RNA y RT-PCR para la amplificación de los genes *HOX* en las líneas celulares y placenta humana utilizados como controles positivos.

2.- Amplificar mediante RT-PCR de la expresión de los genes *HOX A7, 9, 10, 11, B7 y B13* en tejido con patología maligna de ovario.

3.- Detectar la amplificación de la expresión de los genes *HOX A7, 9, 10, 11, B7 y B13* en tejido de ovario sin patología maligna.

4.- Analizar la correlación de la expresión de los genes *HOX* en tejido de ovario con y sin patología maligna.

5.- Estandarización de la cuantificación de la expresión del o los genes *HOX* más relevantes en la línea celular SiHa.

6.- Cuantificación de la expresión del o los genes *HOX* más relevantes en tejido de ovario con y sin patología maligna.

7.- Correlación de la expresión del o los genes *HOX* más relevantes mediante PCR tiempo real y punto final.



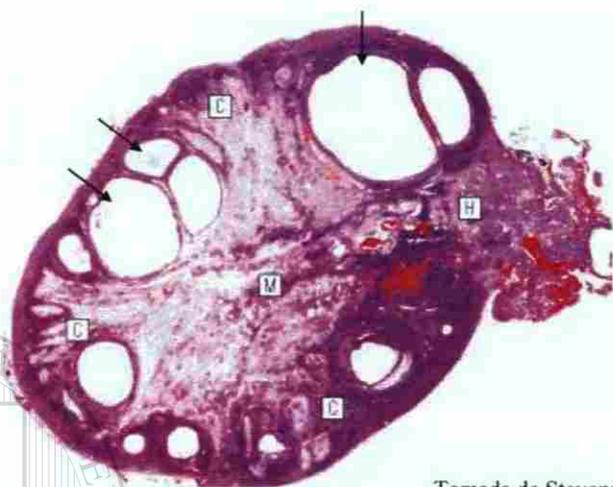
5. ANTECEDENTES

5.1. Ovario normal

5.1.1. Anatomía y Fisiología del ovario normal adulto

En las mujeres nulíparas (que aún no han tenido hijos), los ovarios son unos pequeños órganos ovalados, de color rosa o blanco que miden aproximadamente 3 cm de largo, 1.5 cm de ancho y 1 cm de espesor. La superficie de los ovarios es lisa antes de la pubertad, pero luego por el proceso de ovulación se va deformando (Moore, 1997). Se encuentran situados en las cavidades pélvicas laterales derecha e izquierda y poseen dos funciones principales: 1) Son el origen de los óvulos maduros y 2) Son órganos endócrinos productores de las hormonas esteroides que preparan el endometrio para la concepción y mantienen el embarazo en caso de producirse la fertilización. La superficie del ovario está cubierta por una capa epitelial simple de tipo cúbico o cilíndrico bajo. El epitelio se continúa con el del peritoneo pélvico aunque estas células difieren estructuralmente de las células mesoteliales peritoneales. Las células epiteliales superficiales presentan abundantes microvellosidades superficiales y algunos cilios; son ricas en mitocondrias y presentan pequeñas vesículas de pinocitosis asociadas con la base de algunas microvellosidades. Las células epiteliales superficiales apenas sufren modificaciones durante el ciclo menstrual, pero suelen alargarse durante el embarazo. Además, presenta una membrana basal desarrollada (la túnica albugínea) que separa las células superficiales del tejido ovárico subyacente en el ovario maduro.

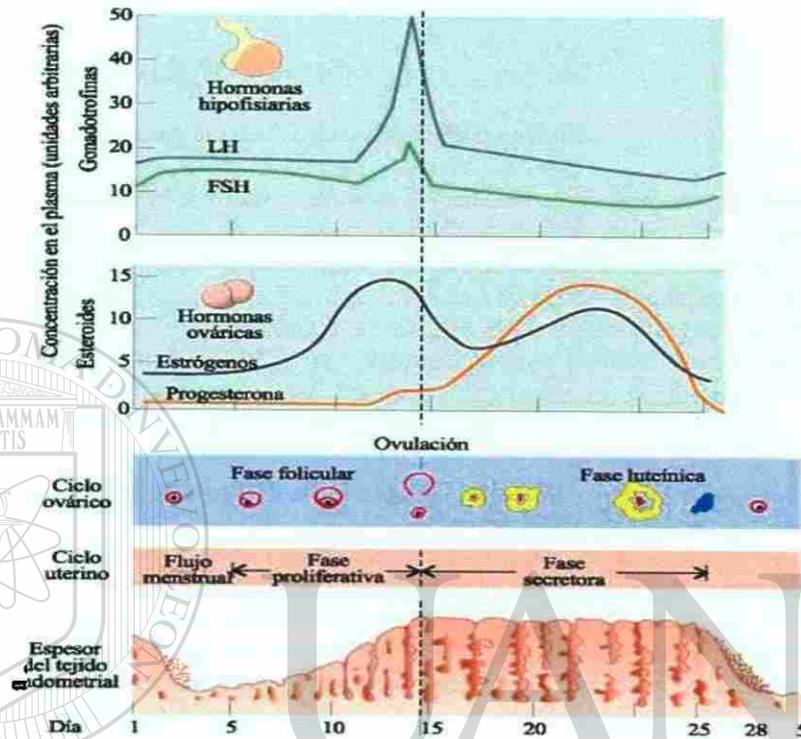
El ovario puede dividirse en tres componentes: hilio, médula y corteza externa (Figura 1). El hilio ovárico es la vía a través de la cual los vasos sanguíneos y linfáticos entran y salen del ovario; además, contiene vestigios del conducto de Wolf embrionario y grupos de células hiliares. La médula del ovario contiene acúmulos de células estromales idénticos a los que forman la mayor parte de la corteza. La corteza ovárica tiene un estroma de sostén y estructuras productoras de gametos y sus derivados. El estroma cortical del ovario tiene las funciones de proporcionar un soporte estructural para los óvulos en desarrollo, da origen a la teca interna y externa alrededor de los folículos en desarrollo y segrega hormonas esteroideas (Stevens, 2006).



Tomada de Stevens 2006

Figura 1. Fotografía microscópica del ovario. Microscopía de luz 10X del ovario que muestra los componentes en los que se divide el ovario: Corteza (C), Médula (M), Hilio (H). La foliculogénesis se lleva a cabo en la corteza en donde se puede observar los espacios quísticos (Flechas).

Como se observa en la Figura 2, la gametogénesis está íntimamente ligada a la secreción hormonal del hipotálamo, hipófisis y del mismo ovario. Al comienzo del ciclo, los niveles de la hormona folículo estimulante o FSH (acrónimo del inglés Follicle-Stimulating Hormone) y la hormona Luteinizante LH (acrónimo del inglés luteinizing hormone) son relativamente elevados, por la caída de los estrógenos y la progesterona al final del ciclo anterior, por lo que estimulan el desarrollo de entre 10 y 20 folículos, que producirán la maduración de un único folículo (dominante), mientras que el resto presentará atresia. Los niveles estrogénicos comienzan a aumentar al ir produciéndose el desarrollo folicular. A medida que el folículo aumenta de tamaño se van produciendo acumulaciones líquidas localizadas entre las células de la granulosa y van confluyendo para dar lugar a una cavidad central llena de líquido que recibe el nombre de antro, y que transforma el folículo primario en un folículo de Graf. Al mismo tiempo, que la maduración folicular, hay un aumento progresivo en la producción de estrógenos por las células de la granulosa del folículo en desarrollo (Fase folicular: días 1-14). Este aumento alcanza un máximo de 18 horas antes de la ovulación.



Tomada de <http://www.educa.aragob.es/iescarin/depart/biogeno/varios/BiologiaCurtis/Seccion%207/7%20-%20Capitulo%2050.htm>

Figura 2. Diagrama esquemático de la ovulación. En esta figura se representan los niveles hormonales de hormonas gonadotróficas y esteroideas, su relación con el proceso de ovulación y el espesor del tejido endometrial y el día del ciclo menstrual en que ocurren estos cambios. El incremento final de la concentración de estradiol es el responsable del aumento en la hormona LH, a las 18 horas de este pico se produce la ovulación.

La ovulación (día 14) se asocia a un crecimiento rápido del folículo, que da paso a su protrusión desde la superficie de la corteza ovárica y a su rompimiento, con extrusión del ovocito y del cúmulo oóforo adherido. Se cree que el incremento final en la concentración de estradiol es el responsable del aumento de LH y del menor grado de FSH en la mitad del ciclo. Antes de la ovulación se observa una caída brusca de los niveles de estradiol y un aumento en la producción de progesterona. La ovulación aparece a las 18 horas del pico de LH. El resto del folículo que queda en el ovario es atravesado por capilares y fibroblastos de la teca y tiene lugar la luteinización de las células de la granulosa y el conjunto de estas estructuras forman el cuerpo luteo (Fase luteínica: días 15-28). Éste es la fuente principal de hormonas esteroideas sexuales, estrógenos y progesterona, secretadas por el ovario en la fase postovulatoria. La



consiguiente caída en los niveles de hormonas esteroideas hace que las concentraciones de gonadotropinas aumenten y se inicie el siguiente ciclo (Drife 2005).

5.1.2. Embriología de las gónadas

5.1.2.1. Desarrollo de las gónadas indiferenciadas

Aunque el sexo cromosómico y genético de un embrión se determina en la fecundación por el tipo de espermatozoide que fecunda al óvulo, las características morfológicas masculinas y femeninas inician su desarrollo a la séptima semana. Los aparatos genitales iniciales en los dos sexos son similares en consecuencia, el periodo inicial del desarrollo genital suele denominarse etapa indiferente del desarrollo sexual. Las gónadas (testículos y ovarios) derivan de tres fuentes: el mesotelio, (epitelio mesodérmico) que recubren la pared posterior del abdomen, el mesenquima subyacente y las células germinales primordiales (Moore 1995).

5.1.2.2. Cuarta semana de gestación

En el inicio de la cuarta semana las células sexuales primitivas esféricas y grandes se observan entre células endodérmicas del saco vitelino, cerca del origen del alantoides. Durante el plegamiento del embrión, se incorpora en éste la parte dorsal del saco vitelino. A medida que ocurre, las células germinales primordiales migran a lo largo del mesenterio dorsal del intestino caudal hacia los rebordes gonadales como se ilustra en la figura 3A (Moore 1995).

5.1.2.3. Quinta semana de gestación

Las etapas iniciales del desarrollo gonadal ocurren durante la quinta semana, cuando se desarrolla un área de epitelio mesodérmico se engruesa el lado medial del mesonefros. La proliferación de este epitelio y del mesénquima subyacente producen un abultamiento en el lado medial del mesonefros, que se conoce como reborde gonadal. Pronto crecen hacia el mesénquima subyacente cordones epiteliales similares a dedos que se denominan cordones sexuales primarios ahora la gónada indiferente consiste en una corteza externa y una médula interna.

En embriones con complejo cromosómico sexual XX, normalmente la corteza de la gónada indiferente se diferencia hacia un ovario y la médula desaparece. En embriones que tienen XY, la médula se diferencia hacia un testículo y la corteza desaparece, con excepción de los remanentes inguinales (Figura 3B).

5.1.2.4. Sexta semana de gestación

En la sexta semana, como se puede observar en la Figura 3C las células germinativas primordiales penetran en el mesénquima subyacente y se unen con los cordones sexuales primarios.

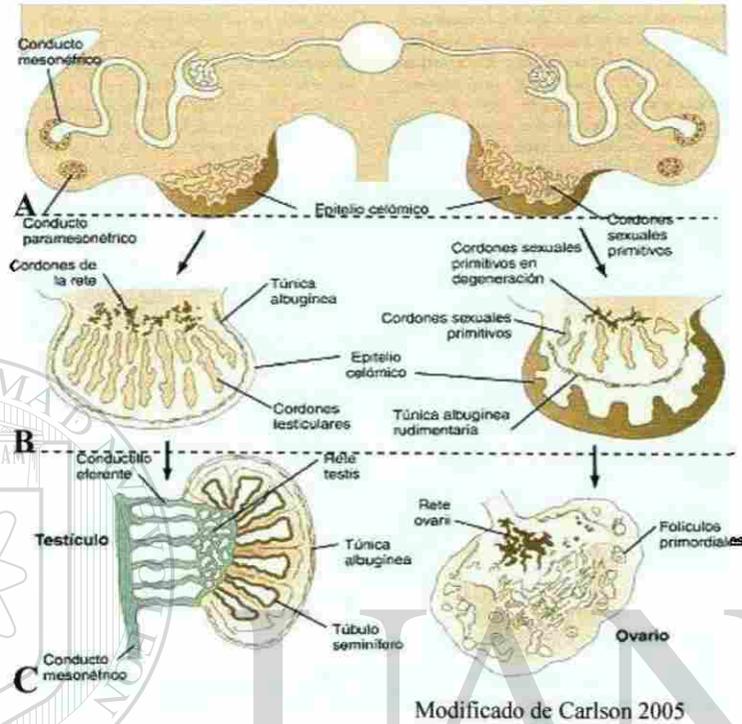
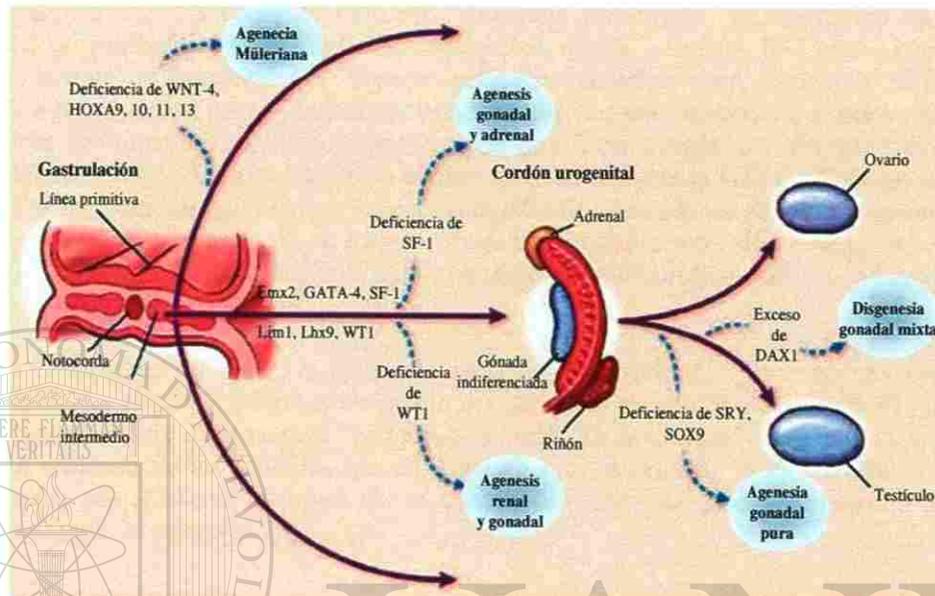


Figura 3.- Diferenciación gonadal masculina y femenina. Este diagrama muestra la morfología de la diferenciación gonadal masculina y femenina en la cuarta, quinta y sexta semana de gestación respectivamente (A, B y C).

5.1.2.5. Determinación del sexo

El sexo cromosómico y genético se establece en la fecundación y depende del espermatozoide que lleva X o Y. Para el desarrollo del fenotipo femenino se requieren los dos cromosomas X. Los diversos genes y regiones del cromosoma X tienen acciones especiales en la determinación del sexo (Moore 1995).

El cromosoma Y tiene un efecto determinante de testículos en la médula de la gónada indiferenciada conocido como Factor Determinante de Testículos (FDT). El FDT es el que motiva la diferenciación testicular. Bajo la influencia de este factor de organización se diferencian los cordones sexuales primarios en túbulos seminíferos. La ausencia de un cromosoma Y origina la formación de un ovario; en consecuencia, el tipo de complejo cromosómico sexual que se establece en la fecundación determina las características de la gónada que se diferencia a partir de la gónada indiferente (Figura 4).



Tomado de MacLaughlin y Donahoe, 2004

Figura 4. Factores implicados en la diferenciación sexual del aparato genitourinario. La figura muestra la diferenciación sexual del aparato genital a partir del producto del gen SRY.

De manera posterior, las gonadas que se desarrollaron establecen el tipo de diferenciación sexual que ocurre en los conductos y genitales externos. La testosterona que producen los testículos fetales es el andrógeno, el cual determina la masculinidad. La diferenciación sexual femenina primaria en el feto no depende de hormonas, incluso ocurre en ausencia de ovarios y al parecer no hay influencia hormonal alguna.

Al parecer la pérdida de un cromosoma X no interfiere con la migración de las células germinativas primordiales hacia los rebordes gonadales, debido a que se observan algunas de estas células en las gónadas fetales de mujeres 45 X, sin embargo, para que se lleve a cabo el desarrollo completo de los ovarios se requieren los dos cromosomas X (Moore 1995).

5.1.2.6. Desarrollo de los ovarios

En embriones femeninos 46 XX, el desarrollo gonadal es lento. Los cromosomas X llevan genes para el desarrollo de ovarios, pero al parecer la organogénesis ovárica tiene un gen autosómico también. De manera histológica, el ovario no se identifica hasta casi la décima semana. Los cordones sexuales primarios no se tornan prominentes pero se extienden hacia el interior de la médula y forman una red ovárica rudimentaria. Normalmente, esta estructura y los cordones sexuales primarios se degeneran y desaparecen.



Durante el periodo fetal temprano los cordones sexuales secundarios, que a menudo se denominan cordones corticales, se extienden del epitelio superficial del ovario en desarrollo hacia el mesénquima subyacente, este epitelio deriva del mesotelio. A medida que los cordones corticales aumentan de tamaño, se incorporan en ellos células germinativas primordiales. Alrededor de la semana 16, estos cordones comienzan a romperse en grupos celulares aislados para constituir folículos primordiales, cada uno de los cuales está formado por una ovogonia que deriva de una célula germinativa primordial rodeada por una capa aislada de células foliculares aplanadas, derivadas a su vez de un cordón cortical. Durante la vida fetal ocurre mitosis activa de ovogonias, por lo que se producen miles de estas células germinales primitivas. Después del nacimiento no se forman ovogonias. Aunque antes de nacer se degeneran muchas de estas, los 2 millones que permanecen se desarrollan hasta constituirse en ovocitos primarios antes del nacimiento.

Después de nacer, el epitelio superficial del ovario se aplanan en una capa de células que se continúa con el mesotelio del peritoneo en el hilio del ovario. El epitelio superficial suele denominarse "epitelio germinal". En la corteza, el epitelio superficial está separado de los folículos por una cápsula fibrosa delgada, la túnica albugínea. A medida que el ovario se separa del mesonefros en regresión, queda suspendido por su mesenterio, el mesoovario.

5.2. Cáncer de ovario

5.2.1. Epidemiología del cáncer de ovario

Los carcinomas ováricos epiteliales constituyen el 80 a 90% de todas las enfermedades malignas del ovario. En Estados Unidos las tasas de incidencia se acercan a 12-15 por 100,000 para mujeres de raza blanca. En México constituye la tercer causa de enfermedad neoplásica maligna, con el 3.8% y 8.8% del total de las neoplasias según el Instituto Nacional de Cancerología de México (Mohar *et al.*, 1997) y el Hospital de Ginecoobstetricia del Centro Médico Nacional de Occidente (Mun *et al.*, 2003) respectivamente. El tipo histológico que predominó fue el tipo seroso con el 51.65% de los casos, seguido del mucinoso con el 23.08%. Además, se reportó que el estadio clínico en el momento del diagnóstico fue en la etapa III para el cáncer de ovario. Estudios epidemiológicos identificaron otros factores de riesgo diferentes de los étnicos, por ejemplo los judíos Ashkenazi, tienen una probabilidad mayor de tener mutaciones en las líneas germinales de BRCA1 o BRCA2 (Cannistra 2004). Otros factores de riesgo que se presentan en el cáncer de ovario son: edad mayor de 60 años, una menarca temprana, menopausia tardía, nuliparidad, infecundidad (Scott *et al.*, 1991), antecedente de cáncer mamario o de colon y antecedente familiar de cáncer ovárico, colónico o mamario, aunque la predisposición genética identificable sólo se presenta en aproximadamente 5% de las mujeres afectadas (Cannistra 2004), fármacos para la infecundidad, disgenesia gonadal. El uso de anticonceptivos orales, el embarazo, y la lactancia son factores los cuales reducen el riesgo del cáncer epitelial de ovario (Scott *et al.*, 1991).



5.2.2. Diagnóstico clínico

El cáncer de ovario presenta síntomas que son inespecíficos en las primeras etapas, es por eso su difícil diagnóstico, generalmente son asintomáticos y a menudo sugieren la presencia de enfermedad abdominal alta. Los pacientes pueden referir dispepsia, plenitud postprandial precoz, distensión abdominal como el resultado de un aumento en la presión abdominal debido a la ascitis, síntomas del sistema urinario y del tracto gastrointestinal debidos a la compresión tumoral o a la invasión cancerosa. Ocasionalmente; algunos pacientes pueden presentar dolor pélvico en etapas tempranas debido a la torsión, rotura y hemorragia ovárica. En la exploración física el 30% de las pacientes tienen hemorragia vaginal, otros signos encontrados son: ascitis manifestada por onda líquida, ausencia de cambios de matidez y masa pélvica (Scott *et al.*, 1991). El diagnóstico oportuno y correcto es muy importante el cual se realiza por medio de ultrasonido transvaginal (Cannistra 2004).

El marcador tumoral que se utiliza en el cáncer de ovario es el CA125 el cual no es sensible ni específico (Zhang *et al.*, 2004), su utilidad real es la vigilancia del tumor postratamiento. Para completar el diagnóstico e iniciar la estadificación se realiza una laparotomía exploradora.

5.2.3. Estadificación

El sistema de estadificación del cáncer de ovario corresponde al descrito por la Federación Internacional de Ginecología y Obstetricia (FIGO) en donde el cáncer se puede encontrar en cualquiera de los cuatro estadios como se observa en la tabla I (Cannistra 2004). El tratamiento es la resección quirúrgica, quimioterapia y radioterapia postquirúrgica (Scott *et al.* 1991).

Tabla I. Estadificación para el cáncer epitelial de ovario (Guía de la FIGO)

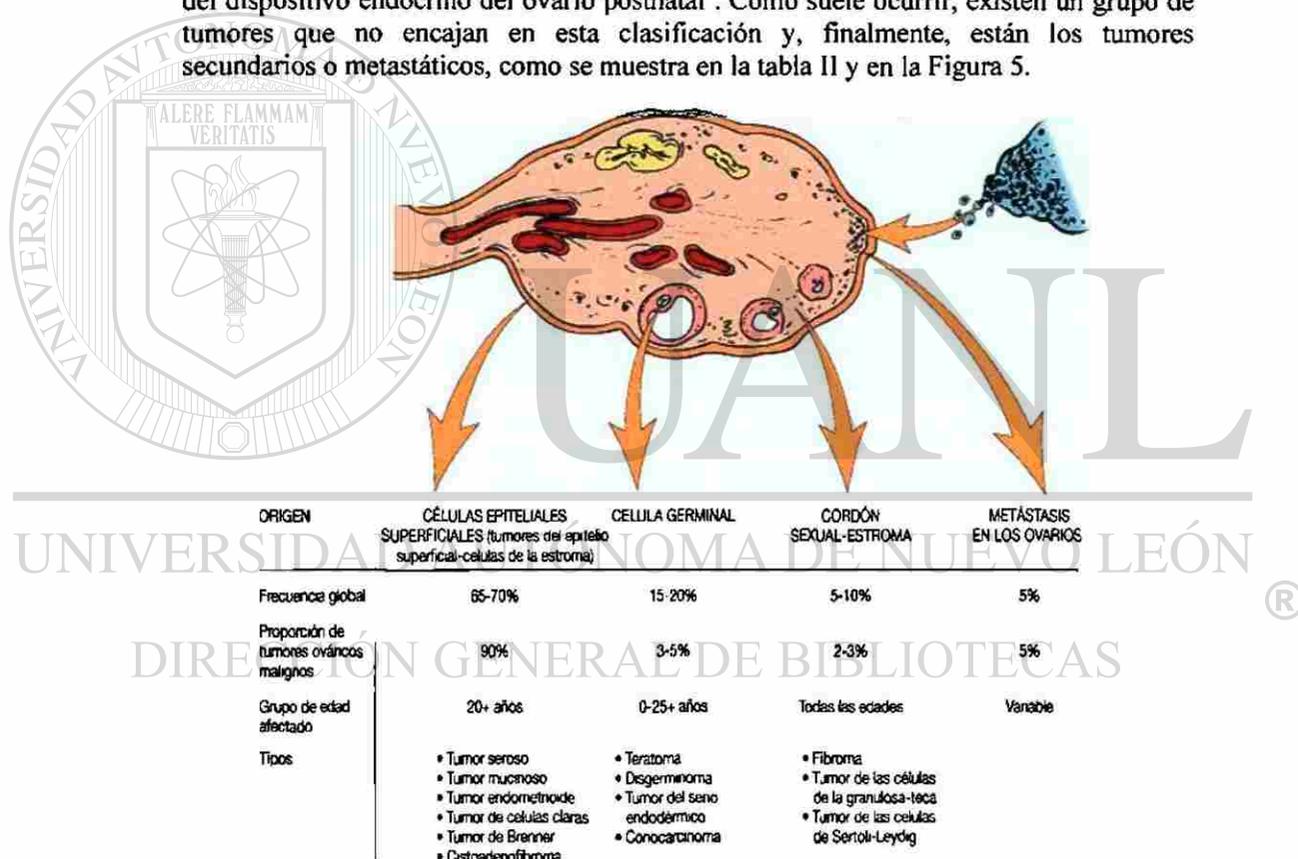
Estadio	Características
I	Tumor limitado al ovario u ovarios
A	Un ovario está involucrado sin ascitis, lavado peritoneal
B	Ambos ovarios están involucrados, sin ascitis, lavado peritoneal positivo, ruptura o localización superficial.
C	Ascitis, lavados peritoneales positivos ruptura o localización superficial
II	Tumor ovárico con extensión pélvica
A	Involucra el útero o las trompas de Falopio
B	Involucra otros órganos pélvicos (recto, vesícula biliar, o la pared pélvica)
C	Extensión pélvica, además de hallazgos indicados para el estadio IC
III	Tumor que involucra el abdomen superior o nódulos linfáticos
A	Enfermedad microscópica afuera de la pelvis, típicamente involucrando el omentum
B	Depósitos menores o iguales a 2 cm de diámetro
C	Depositos mayores a 2 cm de diámetro o cuando se involucran los nodulos
IV	Involucra órganos distantes, incluyendo espacio pleural o parenquimas hepáticos y esplénicos

Modificado de Cannistra 2004



5.2.4. Diagnóstico histopatológico

La pieza quirúrgica obtenida en la resección es sometida a cortes para descripción macroscópica y microscópica del tumor para su diagnóstico histopatológico. Actualmente se cree que los tumores de ovario provienen de uno de los tres tejidos siguientes: 1) del epitelio celómico superficial que, embriológicamente, origina el epitelio de los conductos de Müller, o sea, las trompas de Falopio (células serosas cilíndricas ciliadas), del revestimiento endometrial (células cilíndricas, no ciliadas), o de las glándulas endocervicales (células mucinosas no ciliadas); 2) de las células germinales, que emigran hasta el ovario desde el saco vitelino y que son totipotenciales, y 3) del estroma ovárico, que incluye a los cordones sexuales, que son los precursores del dispositivo endocrino del ovario postnatal. Como suele ocurrir, existen un grupo de tumores que no encajan en esta clasificación y, finalmente, están los tumores secundarios o metastásicos, como se muestra en la tabla II y en la Figura 5.



Tomada de Kumar 2005

Figura 5. Origen de las diversas neoplasias del ovario y algunos datos sobre su frecuencia y distribución. Se muestran los diversos orígenes de las neoplasias de ovario, así como el grupo de edad, la frecuencia del tumor y tipo de tumor.



Tabla II.- Clasificación de las neoplasias ováricas (Organización Mundial de la Salud de 1993)

Tumores del epitelio de superficie-estroma

Tumores serosos

- Benignos (cistoadenoma)
- Cistoadenoma de malignidad borderline (limitrofe)
- Malignos (cistoadenocarcinoma seroso)

Tumores mucinosos, tipo endocervical y tipo intestinal

- Benignos
- De malignidad limitrofe
- Malignos

Tumores endometrioides

- Benignos
- De malignidad limitrofe
- Malignos
- Epitelial-estroma
- Adenosarcoma
- Tumor mesodermico mixto (mülleriano)
- Tumores de células claras
- Benignos
- De malignidad limitrofe
- Malignos
- Tumores de células transicionales
- Tumor de Brenner
- Tumor de Brenner de malignidad limitrofe
- Tumor de Brenner maligno
- Carcinoma de células transicionales (no de tipo Brenner)

Tumores de los cordones sexuales-estroma

- Tumores de células de la granulosa-estroma
- Tumores de células de la gránulos
- Tumores del grupo tecoma-fibroma
- Tumores de las células de Sertoli-estroma; androblastomas
- Tumor de los cordones sexuales con fúbulos anulares
- Gianandroblastoma
- Tumores de células esteroideas (lipídicas)

Tumores de células germinales

- Teratoma
- Inmaduro
- Maduro (adulto)
- Sólido
- Quístico (quiste dermoide)
- Monodermico (p. ej., estroma del ovario, carcinoide)
- Disgerminoma
- Tumor del saco vitelino (tumor del seno endodermico)
- Tumores mixtos de células germinales

Malignos, no especificados de otro modo

Cáncer metastásico no ovárico (de primario no ovárico)

Datos de la clasificación de la OMS (Cortesía del Dr Robert Scully, Massachusetts General Hospital, Boston, MA) Tomada de Kumar 2005



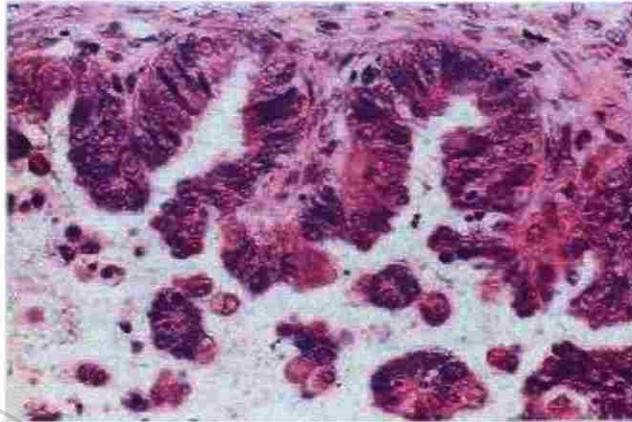
5.2.4.1. Tumores del epitelio celómico superficial

Se han descrito tres tipos principales de tumores de esta clase: serosos, mucinosos y endometrioides. Es frecuente que haya mezcla de esos epitelios en el mismo tumor y las neoplasias formadas por estas tres clases de células van desde los francamente benignos, y los tumores en los límites de la malignidad, hasta los que son claramente malignos. El tamaño y estructura de estos tumores es variable; los elementos de estos tumores pueden ser áreas quísticas (cistoadenomas), áreas quísticas y fibrosas (cistoadenofibromas) y áreas predominantemente fibrosas (adenofibromas). Aunque se denominan epiteliales por su diferenciación, estos tumores proceden del mesotelio celómico y son vestigios muy expresivos de la capacidad de este tejido para evolucionar hacia el epitelio seroso (tubárico), endometriode (endometrio) y mucinoso (cérnix). La razón del predominio de estos tumores en el ovario no se conoce, pero parece tener relación con la incorporación del epitelio celómico a la corteza del ovario para formar los quistes de inclusión mesoteliales. Esta incorporación se produce a través de la formación de adherencias superficiales, de atrofia acompañada de la aparición de pliegues epiteliales y de reparación de los sitios de la ovulación (Kumar 2005).

5.2.4.2. Tumores serosos

Estas neoplasias quísticas frecuentes están tapizadas por células epiteliales altas, cilíndricas y ciliadas y están llenas de un líquido seroso claro como muestra la Figura 6. Aunque el término seroso describe acertadamente el líquido del quiste, se ha vuelto sinónimo del epitelio de tipo tubárico de estos tumores. Las variedades sin grado de malignidad, limítrofe (o bajo potencial maligno), tienen características celulares de malignidad (atipias, mitosis) y muestran mayor o menor grado de proliferación y estratificación, pero no invaden el estroma. Estas neoplasias representan en conjunto el 30%, aproximadamente, de todos los tumores del ovario, alrededor del 75% son benignos o de malignidad limítrofe, y el 25% son malignos (Kumar 2005).

La supervivencia a los cinco años de los tumores limítrofes y malignos que forman una masa circunscrita al ovario es del 100 y del 70 %, respectivamente, mientras que la supervivencia a los 5 años de esos mismos tumores cuando han afectado al peritoneo es alrededor del 90 y del 25 %, respectivamente. Dada su evolución prolongada, los tumores limítrofes se pueden volver a presentar muchos años después, pues la supervivencia a los 5 años no es sinónimo de curación (Kumar 2005).



Tomado de Miliokowski 2001

Figura 6.- Cistoadenocarcinoma seroso. Este tumor citológicamente presenta epitelio el cual reviste los espacios quísticos, está estratificado con proyecciones micropapilares y las células tienen atipia nuclear y existe mitosis.

5.2.4.3. Tumores mucinosos

Los tumores mucinosos representan el 25% aproximadamente, de las neoplasias ováricas. Aparecen principalmente a mediados de la vida adulta. Un 80% son benignos o limitrofes, y alrededor del 15% son malignos. Los tumores mucinosos contienen mayor número de quistes de tamaño variable es raro que afecten a la superficie y la bilateralidad es menos frecuente. Los tumores mucinosos tienen tendencia a producir masas quísticas más grandes. A simple vista aparecen como tumores multiloculares llenos de un líquido gelatinoso y viscoso que es rico en glicoproteínas como se muestra a continuación en la Figura 7.

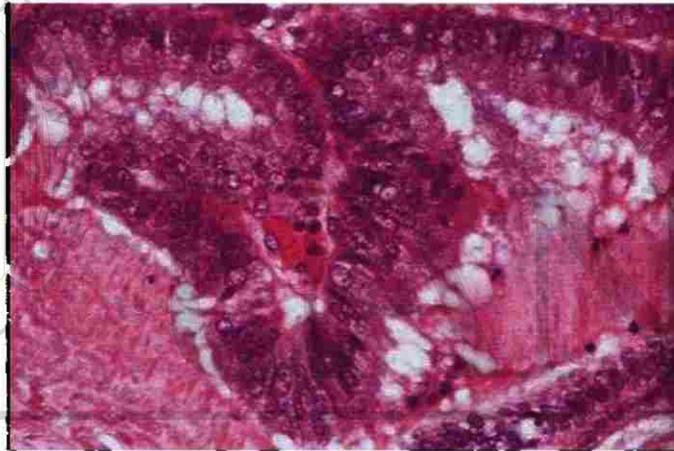


Tomado de Miliokowski 2001

Figura 7. Cistoadenocarcinoma mucinoso 10X. Este es un tumor multilocular con proyecciones papilares que presenta un patrón más complejo que su homólogo benigno.



Histológicamente, los tumores mucinosos benignos se caracterizan por un revestimiento de células epiteliales altas, cilíndricas con mucina en el vértice y sin cilios semejante al epitelio normal del cuello uterino o del intestino como se ilustra en la Figura 8. Los tumores limítrofes muestran un abundante crecimiento de aspecto glandular o papilar con atipias nucleares y estratificación y son asombrosamente parecidos a los adenomas tubulares o adenomas vellosos del intestino. Los cistoadenocarcinomas contienen formaciones más sólidas, con evidentes atipias de las células epiteliales y estratificación, desaparición de la arquitectura glandular y necrosis, su aspecto es análogo al del cáncer de colon. La supervivencia aproximada a los 10 años de los tumores limítrofes en fase 1, de los tumores malignos no invasores, y de los malignos francamente invasores es de más del 95, 90 y 66%, respectivamente (Kumar 2005).

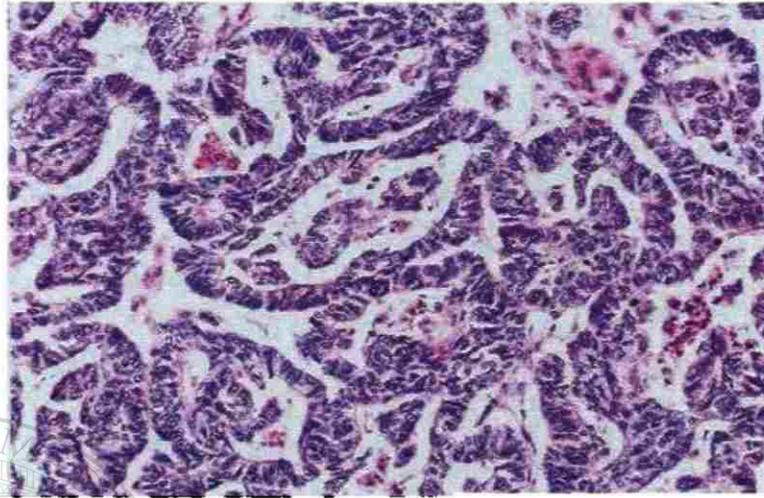


Tomado de Miliokowski 2001

Figura 8. Cistoadenocarcinoma mucinoso 40X. Este tumor histológicamente muestra el epitelio, el cual reviste los espacios quísticos, estratificado, con proyecciones micropapilares y las células con atipia nuclear y mitosis.

5.2.4.4. Tumores endometrioides

Estos tumores constituyen un 20%, aproximadamente, de todos los cánceres del ovario. La mayoría de los tumores endometrioides son carcinomas. Con menos frecuencia, se encuentran formas benignas: cistadenofibromas generalmente. Se distinguen de los tumores serosos y mucinosos por la presencia de glándulas tubulares que tienen gran parecido con las del endometrio benigno o maligno como se aprecia en la Figura 9. Por razones no conocidas, un 15 a 30% de los carcinomas endometrioides se acompañan de un carcinoma endometrial y el pronóstico es relativamente bueno; el 40% afectan a ambos ovarios. La supervivencia a los 5 años es del 40 al 50% (Kumar 2005).



Tomado de Miliokowski 2001

Figura 9. Carcinomas Endometrioides. La histología de este tumor es idéntica a la de los adenocarcinomas del útero. En esta micrografía se puede observar el patrón glandular. Las células que revisten las glándulas están agrandadas, con núcleos pleomórficos e hiper cromáticos grandes.

5.2.4.5. Adenocarcinoma de células claras

El adenocarcinoma de células claras es una variedad poco frecuente de tumor epitelial de la superficie del ovario se caracteriza por grandes células epiteliales de abundante citoplasma claro. Como algunas veces estos tumores se asocian a endometriosis o a carcinoma endometriode del ovario y se parecen al carcinoma de células claras del endometrio, se cree ahora que se forman a partir de los conductos de Müller y que son una variedad del adenocarcinoma endometriode. Los tumores de células claras del ovario pueden ser predominantemente sólidos o quísticos. En la forma tumoral sólida, las células claras se disponen formando láminas o tubos. En la variedad quística, las células neoplásicas tapizan los espacios del quiste. El porcentaje de supervivencia es, aproximadamente, del 50% cuando el tumor está confinado al ovario, sin embargo, estos tumores tienen tendencia a ser agresivos y cuando se propagan más allá del ovario, es excepcional la supervivencia de la paciente a los 5 años (Kumar 2005).

5.2.4.6. Cistoadenofibroma

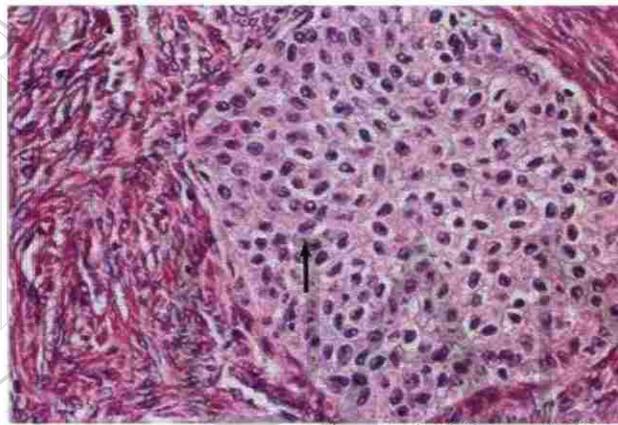
Los cistoadenofibromas son variedades en las que existe una acusada proliferación del estroma fibroso situado bajo el epitelio cilíndrico de revestimiento. Estos tumores benignos suelen ser pequeños y multiloculares y tienen expansiones papilares más bien sencillas y siempre, menos complejas y ramificadas de las que se observan en los cistoadenomas ordinarios. Pueden estar formados por un epitelio mucinoso, seroso, endometriode y de transición (tumores de Brenner). Existen



lesiones limítrofes con atipias celulares y raras formas de carcinoma focal, pero la diseminación metastásica de cualquiera de ellos es sumamente rara (Kumar 2005).

5.2.4.7. Tumor de Brenner

Los tumores de Brenner son adenofibromas poco frecuentes en los que el componente epitelial está formado por nidos de células transicionales semejantes a las que tapizan la vejiga urinaria. Con menos frecuencia, esos nidos contienen microquistes o espacios glandulares revestidos por células cilíndricas secretoras de mucina. Por razones no aclaradas, los tumores de Brenner se encuentran de vez en cuando en los cistoadenomas mucinosos como se muestra en la Figura 10 (Kumar 2005).



Tomado de Miliokowski 2001

Figura 10. Tumores de Brenner. Este tumor se compone de nidos de células epiteliales rodeados por un estroma de células fusiformes. Las células tienen un aspecto escamoso con un citoplasma abundante, eosinófilo. Los núcleos son ovals con hendiduras longitudinales, semejantes a un grano de café (flecha).

5.3. Marcadores moleculares en carcinoma de ovario

Los cambios cualitativos o cuantitativos en la expresión génica en las células tumorales pueden explicar la producción de ciertas moléculas, las cuales pueden ser de utilidad para indicar malignidad en la práctica clínica, tanto en el diagnóstico, como en el seguimiento. La detección de estos marcadores en las muestras de biopsias de tejido maligno puede ser de utilidad para determinar la histogénesis de los tumores, y puede dar un pronóstico e información predictiva relacionada con la biología del tumor.

En el cáncer de ovario los mejores factores pronósticos son el histotipo, grado de diferenciación, y la enfermedad residual después del tratamiento quirúrgico.



Sin embargo, se ha observado que el diagnóstico histopatológico cuidadoso de un tumor maligno de ovario, con una estadificación clínica e histopatológica estricta, no siempre nos da un pronóstico acertado. Sorprendentemente, aún cuando el carcinoma de ovario está asociado a un mal pronóstico, se puede encontrar una diversidad en el comportamiento de los mismos. El diagnóstico de estos tumores que en general se lleva a cabo tardíamente aunado a la observación del comportamiento biológico diferente entre los carcinomas de ovario con el mismo estadio clínico y patológico. Debido a lo anterior el estudio de marcadores moleculares de las biopsias de tumores es altamente relevante para poder correlacionarlos con el pronóstico del tumor y buscar un marcador molecular que ayude a realizar el diagnóstico temprano de esta patología.

El primer marcador serológico probado para el cáncer epitelial de ovario es el CA125 el cual fue descrito por Bast *et al.*, en 1983. El anticuerpo monoclonal murino (OC125) el cual fue utilizado para detectar el antígeno CA125 fue obtenido después de la inmunización con la línea celular OVCA 433 (Bast *et al.*, 1981). Actualmente esta prueba ha evolucionado de tal forma que el antígeno CA 125 es una mezcla de glicoproteínas con un rango de peso molecular de 200-1000 KDa. El antígeno CA125 ha sido un marcador serológico ampliamente utilizado en la clínica, sin embargo, para diagnóstico temprano del cáncer de ovario no es sensible ni específico, en la actualidad su utilidad clínica es en el seguimiento de las pacientes después de la resección quirúrgica del tumor (Rubin *et al.*, 1989).

Sorprendentemente, en estudios subsecuentes en los cuales se han evaluado otros marcadores serológicos para detectar el cáncer de ovario como: CA72-4 (Tamakoshi *et al.*, 1996), el factor serológico estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) descrito por Xu *et al.*, en 1991, el anticuerpo monoclonal OVX1 (Woolas *et al.*, 1991) y el ácido lisofosfatídico (Xu *et al.*, 1998) en combinación con CA125 aumentan la sensibilidad pero disminuye la especificidad en el diagnóstico. Sin embargo, se continúan realizando estudios clínicos con otros potenciales marcadores serológicos para el cáncer de ovario entre los que se encuentran: prostatina (Mok *et al.*, 2001), osteopontina (Kim *et al.*, 2002), inhibina (Robertson *et al.*, 2002) y la Kallikreina (Diamandis *et al.*, 2000).

Dentro de los potenciales marcadores moleculares que se han descrito para el cáncer de ovario se han incluido a los genes HOX, principalmente aquellos que se encuentran expresados en el tracto genital femenino (Naora *et al.*, 2005).



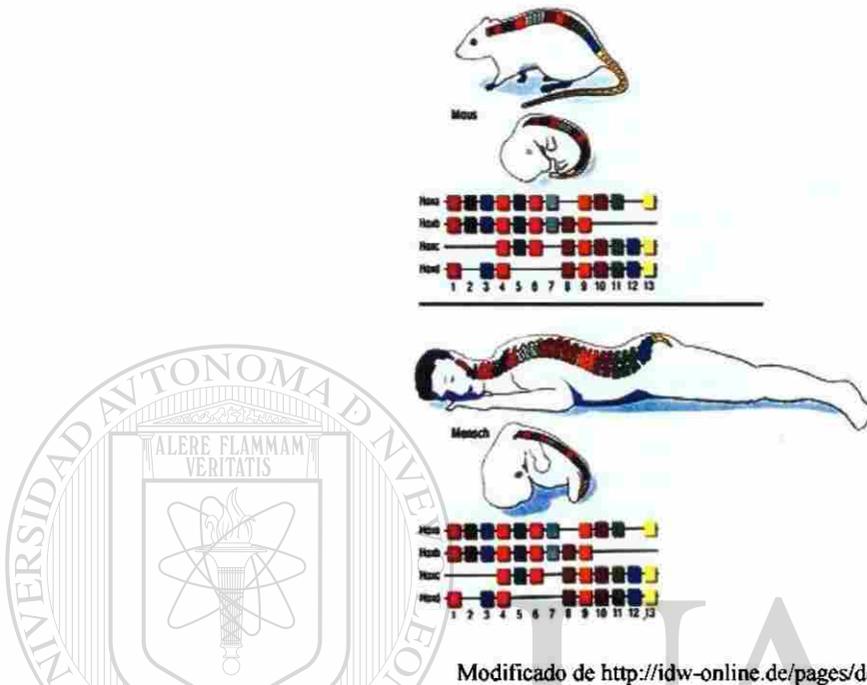
5.4. GENES HOX

Los genes *HOX* codifican para una serie de factores transcripcionales, llamados homeoproteínas, que participan en el desarrollo de los organismos. Las homeoproteínas comparten un dominio de unión al ADN llamado homeodominio (HD) el cual contiene 60 aminoácidos altamente conservados, y en consecuencia reconocen secuencias de unión al ADN muy similares. Sin embargo, estas homeoproteínas exhiben *in vivo* funciones biológicas altamente específicas. Se ha establecido que las homeoproteínas ganan especificidad mediante la cooperación con cofactores, con lo cual incrementan su afinidad de unión al ADN. Estos genes fueron descubiertos en mutantes espontáneos de la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster* en los que se encontró que poseían segmentos del cuerpo duplicados, como dos pares de alas en vez de uno (bithorax) o patas en lugar de antenas (antennapedia). Los genetistas denominaron estos cambios como “transformaciones homeóticas”, en base al término “homeosis”, que describe la transformación de un segmento por uno de estructura homóloga (Grier *et al.*, 2005).

La regulación a nivel molecular de la expresión de los genes blanco por parte de las homeoproteínas aún no se ha clarificado totalmente ya que pocos genes blanco directos se han identificado tanto en invertebrados como en vertebrados. Las proteínas homeóticas se unen a secuencias de 6 pares de bases que contienen el núcleo conservado TAAT que aparece en el genoma de los animales aproximadamente una vez cada mil pares de bases, sugiriendo que existen muchos genes potenciales reconocidos por las homeoproteínas (Grier *et al.*, 2005).

Esta familia de genes es homóloga tanto funcional como estructuralmente al complejo homeótico (HOM-C) de *Drosophila melanogaster*. Los 39 genes que comprenden la familia de genes *HOX* en humanos y ratones están organizados en cuatro complejos genómicos localizados en diferentes cromosomas, *HOXA* en 7p, *HOXB* en 17p, *HOXC* en 12p y *HOXD* en 22p, y cada uno de ellos comprende de 9 a 11 genes acomodados en una secuencia homóloga a la que tienen en el genoma de *D. melanogaster*.

Los genes *HOX* de los vertebrados están muy implicados en la segmentación rostrocaudal del cuerpo y su expresión espaciotemporal tiene lugar según varias reglas muy regulares. Los genes se activan y se expresan de acuerdo a una secuencia estricta en dirección 3'-5' y siguiendo sus posiciones en los cromosomas, como se puede observar en la Figura 11 (Carlson 2005).



Modificado de <http://idw-online.de/pages/de/image9368>

Figura 11.- Comparación entre complejos *HOX* del ratón y el ser humano. Los genes *HOX* se expresan a lo largo del eje craneocaudal en los diferentes vertebrados.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

5.4.1. Los genes *HOX* en patologías no neoplásicas

La Sinpolidactilia fue el primer desorden reportado que es generado por genes *HOX*, y es causado por mutaciones en *HOXD13*. Esta patología se caracteriza por la malformación heredada de los miembros torácicos y pélvicos, que presentan ausencia y/o reproducción de falanges u orjeos. Además, la expresión de *HOXD13* en el tubérculo genital produce la hipospadia (malformación en la que la uretra no alcanza a llegar hasta el glande (Goodman 2002). Las mutaciones en *HOXA13* se asocian con el síndrome “mano-pie-genital” (hand-foot-genital syndrome). La ausencia congénita del pene o del clítoris también, probablemente se deba a las mutaciones en los genes *HOXA13* y *HOXD13* (Carlson 2005). Una mutación en *HOXD10* se asocia con el talo vertical congénito y la enfermedad dental de Charcot-Marie. La expresión alterada de genes *HOX*, en especial de *HOXA11* y *C11*, que es provocada por la exposición *in utero* al ácido valpróico produce el síndrome de valproato fetal, que se asocia a un mayor riesgo de espina bífida, y otras anomalías como defectos del corazón, paladar hendido y anomalías craneofaciales y en las extremidades (Grier *et al.*, 2005). El mecanismo molecular por el que la droga teratogénica dietilestilbestrol (DES), causa



anormalidades anatómicas del tracto reproductor femenino, es mediante la alteración en el patrón de los genes *HOX* durante el desarrollo embrionario, disminuyendo la expresión de *HOXA10* y *A11*, permitiendo así la expresión de *HOXA9* (Block *et al.*, 2000). Estudios recientes de los genes *HOX* y su relación con la implantación del óvulo fecundado en el endometrio, debido a los patrones de expresión de éstos durante el ciclo endometrial, implican la relación de los genes *HOXA10* y *A11* con algunos casos de infertilidad (Taylor 2000b). Además de que en los últimos años en experimentos *in vitro* se ha observado que *HOXA10* es reprimido por la testosterona en líneas celulares endometriales, y confirman la disminución de la expresión de *HOXA10* en biopsias de endometrio de pacientes con ovarios poliquísticos, por lo que se sugiere la implicación de este gen en la bajas tasas de embarazos en mujeres con ovarios poliquísticos que presentan ovulación mediante tratamiento médico (Cermik *et al.*, 2003).

5.4.2. Los genes *HOX* en patología neoplásica

El potencial oncogénico de los genes *HOX* fue observado por primera vez en la leucemia, donde se documentó la sobre-expresión de *HOXA9* y fusión de varios genes del tipo Abd-B con la proteína transformadora NUP98, *HOXA9*, *A11*, *A13*, *C11*, *C13* Y *D13*. A partir de estos estudios se concluyó que muchos, si no todos los genes *HOX* eran potencialmente leucemogénicos y se comenzó a analizar el papel de los genes del desarrollo en otros tipos de cáncer, basados en la hipótesis que los genes que se expresan durante la embriogénesis, pero no en tejido adulto pueden re-expresarse en tejido neoplásico (Grier *et al.*, 2005).

En los tumores sólidos malignos se han detectado tres tipos de anomalías en la expresión de genes *HOX*. En la primera, los genes *HOX* normalmente activos durante el desarrollo embrionario se re-expresan en células neoplásicas, como es el caso en los tumores primarios y líneas celulares de pulmón, cerebro, riñón y mama. En la segunda categoría se encuentran los genes *HOX* que no se expresan durante la embriogénesis, pero sí se expresan en células malignas derivadas, como en el caso de la expresión de *PAX5* en el meduloblastoma, pero no en el cerebelo. La tercera categoría comprende a los genes que son regulados negativamente en células malignas, pero que se expresan normalmente en estado diferenciado, como en el cáncer de colon, donde se pierde la expresión de *CDX2* y *NKX3.1* (Grier *et al.*, 2005).

5.4.3. Expresión de genes *HOX* en el tracto genital femenino

El tracto genital femenino en su totalidad (trompas de Falopio, útero, cérvix y la vagina superior) se desarrolla a partir del tubo paramesonefrico y los genes *HOX* juegan un papel que determina la identidad posicional en este axis. La formación inicial de los conductos paramesonefricos depende de las señales de Wnt (En ausencia de Wnt-4 no se constituirán estos). Wnt-7a, que también interviene en el establecimiento del eje dorsoventral en desarrollo, se expresa en el epitelio de todos los conductos paramesonefricos y se necesita para su desarrollo normal. En fases posteriores, su



expresión quedará limitada al epitelio uterino. De alguna forma parece que Wnt-7a participa en el mantenimiento de la expresión coordinada de los genes *HOX* (de *HOXD10* a *D13*, y también parálogos del grupo *HOXA*), a lo largo del aparato genital femenino. *HOXA9* se expresa en la trompas de Falopio, *HOXA10* en el útero, *HOXA11* en el útero y cérvix y *HOXA12* en la parte superior de la vagina como se ilustra en la Figura 12 (Taylor 2000a).

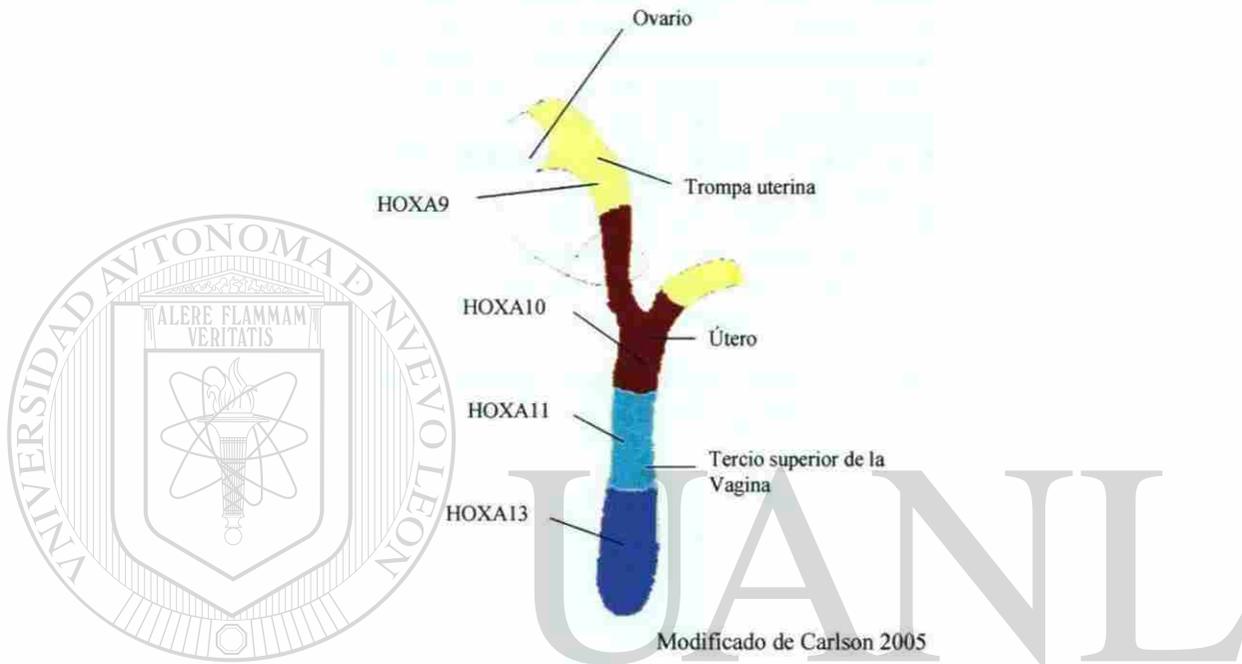


Figura 12. Expresión de los genes *HOX* en el tracto genital femenino de embriones de ratón. El diagrama muestra la expresión de *HOXA10*, *11*, *12* y *13* a lo largo del tracto genital femenino.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En la mayor parte de los tejidos, la expresión de los genes *HOX* termina con el desarrollo, a diferencia de los tejidos que tienen procesos de desarrollo importantes durante la etapa adulta, como es el caso de la médula ósea, las glándulas mamarias y el tracto genital femenino.

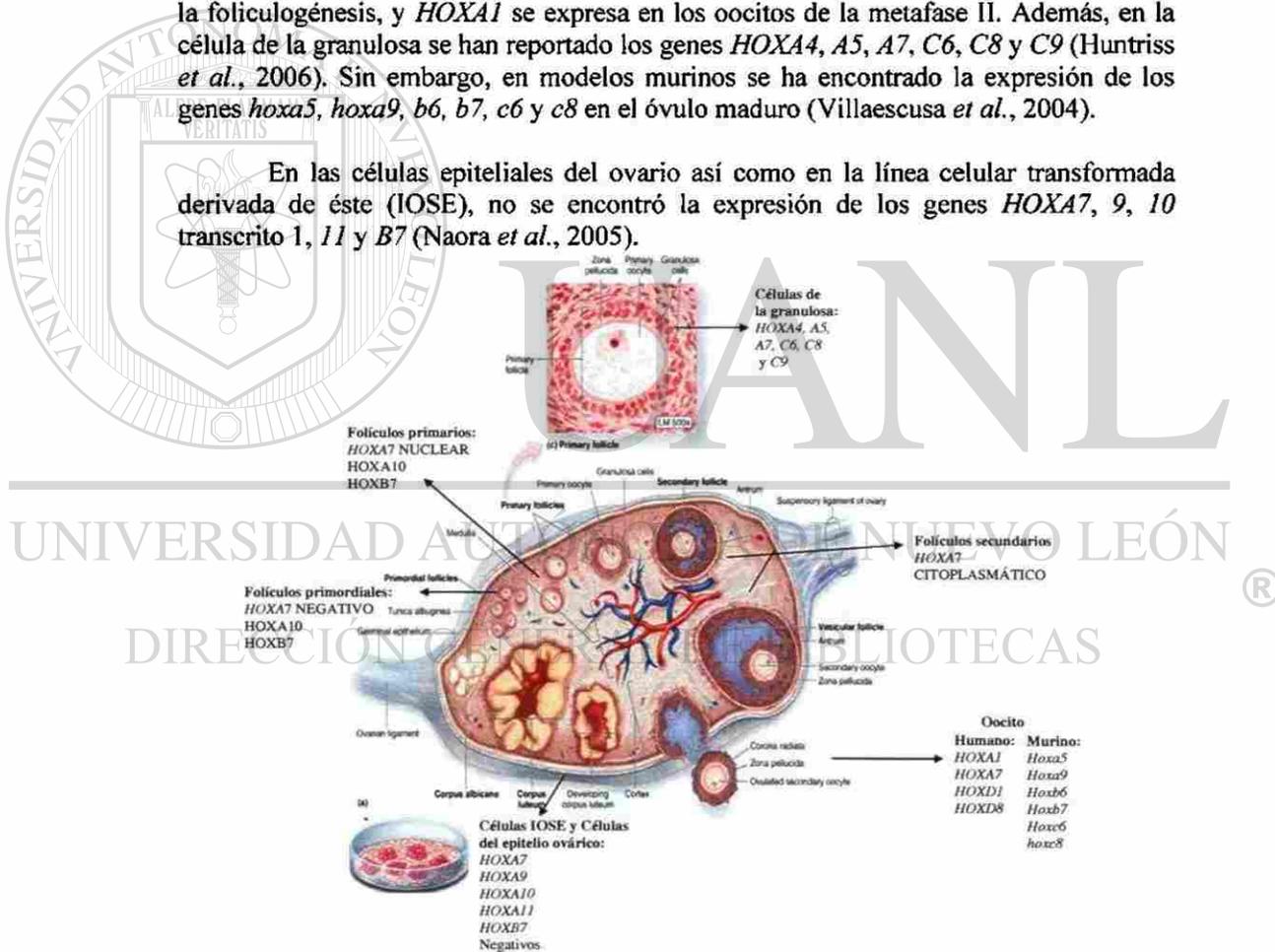
El tracto genital experimenta un proceso de desarrollo continuo durante cada ciclo menstrual y el embarazo. En muchos casos, los procesos de diferenciación, angiogénesis y muerte celular involucrados con el desarrollo endometrial durante los ciclos menstruales están a la par con muchos procesos de desarrollo embrionario. Entonces no es sorprendente, que los genes *HOX* sean expresados en el tracto genital del adulto y dirijan el desarrollo cíclico del endometrio. La expresión de los genes *HOXA9*, *A10*, *A11* y *A13* ha sido encontrada en tejido normal de los adultos en las mismas regiones en las que se encontraban durante el desarrollo embrionario (Taylor 2000a).



5.4.4. Los genes *HOX* en el ovario normal

El análisis de la expresión génica de los genes *HOX* que se ha realizado en las estructuras que forman al ovario como órgano se muestra resumido en la Figura 13. La expresión del gen *HOXA7* se ha encontrado en los folículos ováricos primarios en el núcleo, y en los folículos maduros se ha encontrado en citoplasma, por el contrario, no se encontró en los folículos primordiales. El gen *HOXA7* se expresa en el citoplasma de las células de la teca interna y está ausente en la teca externa. El cambio en la expresión de *HOXA7* de negativo en los folículos primordiales a positivo en los primarios sugiere una relación con la proliferación de las células de la granulosa. *HOXA7* es regulado positivamente por GDF-9 (factor de crecimiento y diferenciación 9), el cual está muy relacionado con foliculogénesis (Ota *et al.*, 2006). *HOXA10* se encuentra expresado en los folículos primordiales y primarios, *HOXB7* se ha encontrado en todas los estadios de la foliculogénesis, y *HOXA1* se expresa en los oocitos de la metafase II. Además, en la célula de la granulosa se han reportado los genes *HOXA4*, *A5*, *A7*, *C6*, *C8* y *C9* (Huntriss *et al.*, 2006). Sin embargo, en modelos murinos se ha encontrado la expresión de los genes *hoxa5*, *hoxa9*, *b6*, *b7*, *c6* y *c8* en el óvulo maduro (Villaescusa *et al.*, 2004).

En las células epiteliales del ovario así como en la línea celular transformada derivada de éste (IOSE), no se encontró la expresión de los genes *HOXA7*, *9*, *10* transcrito 1, *11* y *B7* (Naora *et al.*, 2005).



Modificado de http://academic.kellogg.cc.mi.us/herbrandsonc/bio201_McKinley

Figura 13. Resumen de la expresión de los genes *HOX* en el ovario normal. En la figura se muestra las estructuras que se pueden identificar en el ovario y la expresión de los genes *HOX* en éstas.



5.4.5. Los genes *HOX* en el Cáncer de ovario

El epitelio superficial del ovario es una única capa derivada del mesodermo similar al linaje mesotelial simple de las superficies peritoneales, en contraste los tumores epiteliales de ovario presentan epitelios más especializados e histológicamente más complejos los cuales derivan de los conductos Müllerianos. Estas observaciones llevaron a enfocarse en los tres genes relacionados con la embriología del tracto genital femenino: *HOXA9*, *A10* y *A11*, que regulan la diferenciación de los conductos Müllerianos pero no se encontraron expresados en el epitelio superficial de ovario a pesar de que se expresan en los diferentes subtipos de carcinoma epitelial de ovario de acuerdo con el patrón de diferenciación de los conductos Müllerianos.

La expresión ectópica de *HOXA9* en la línea celular murina MOSE realizada mediante inoculación intraperitoneal a ratones demuestra que semeja al cáncer epitelial seroso de ovario. Por otro lado, la expresión de *HOXA10* y *A11* inducen la morfogénesis de cáncer epitelial de ovario endometriode y mucinoso respectivamente en ratones (Cheng *et al.*, 2005).

En contraste otros genes *HOX* estudiados en el cáncer de ovario son *HOXA7* (Naora *et al.*, 2001b) y *HOXB7*, los cuales se han relacionado más con su agresividad o grado de malignidad que con el tipo histológico del cáncer. *HOXA7* se asocia con una diferenciación mayor, lo que quiere decir una menor atipia celular (Cheng *et al.*, 2005). Por otro lado, *HOXB7* se asocia con una diferenciación menor (mayor agresividad), regulando la expresión del factor de crecimiento de fibroblastos básico, el cual es un potente factor angiogénico y mitógeno (Naora *et al.*, 2001a).

El análisis de la expresión de los genes *HOX* en líneas celulares de cáncer de ovario se llevó a cabo en el año 2006 por Yamashita *et al.*, quienes encontraron en 5 líneas celulares la alta sobre-expresión (mayor de 300 veces) de los genes *HOXA13*, *B7* y *B13*. Se encontraron también la sobre-expresión de los genes *HOXA3*, *A4*, *A7*, *A10*, *B2*, *B3*, *B4*, *B5*, *B6*, *B8*, *C13* y *D13* pero esta no era constante entre las líneas celulares y los valores de sobre-expresión no son tan importantes como los encontrados en los tres genes arriba mencionados.

Debido a que el análisis de la expresión de los genes *HOX* en cáncer de ovario se ha realizado principalmente en modelos murinos y en líneas celulares, en esta tesis se analizó la expresión de los genes *HOXA7*, *A9*, *A10*, *A11*, *B7* y *B13* *in vivo* en humanos para determinar su relación con la presencia de patología maligna en tejido ovárico.



2. INTRODUCCIÓN

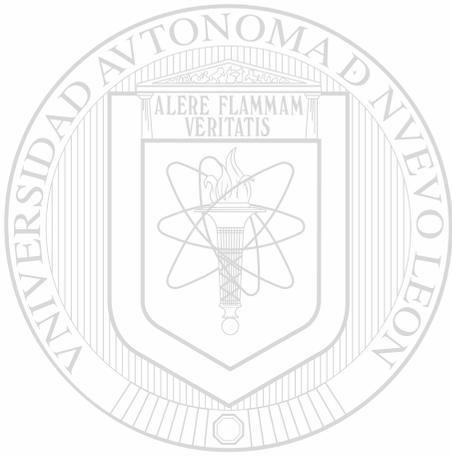
En México nos encontramos ante dos grandes transiciones epidemiológicas: demográfica y en salud, por lo que aún teniendo problemas de salud del tercer mundo, las principales causas de morbimortalidad son patologías del primer mundo, dentro de las cuales encontramos enfermedades cardiovasculares, accidentes, cáncer y enfermedades crónico-degenerativas. En nuestro país el cáncer de ovario ocupa la tercera causa de enfermedad neoplásica en mujeres; éste se diagnostica en estadios avanzados en la mayoría de las pacientes, a diferencia del cáncer de mama y cervicouterino en donde se han establecido normas para el diagnóstico temprano que incrementan la esperanza y la calidad de vida. Actualmente, se dificulta el diagnóstico del cáncer de ovario en las etapas tempranas debido a la falta de marcadores tumorales específicos y sensibles. Además, el diagnóstico y la estadificación del tumor se lleva a cabo mediante ultrasonido vaginal y laparotomía exploradora, y el marcador tumoral que se utiliza para el diagnóstico de cáncer de ovario es el CA125, el cual no es muy útil para el diagnóstico debido a su baja sensibilidad y especificidad. Esto dificulta el diagnóstico oportuno y adecuado que es indispensable para la elección del tratamiento y la respuesta a éste del tumor. El diagnóstico en etapas avanzadas y el pobre pronóstico de las pacientes se debe a la falta de conocimiento acerca del desarrollo a nivel molecular del cáncer de ovario, en los diferentes subtipos histológicos. Debido a lo anterior, el estudio a nivel molecular para dilucidar los mecanismos de desarrollo del cáncer de ovario será de gran importancia, ya que permitirán establecer marcadores moleculares para su diagnóstico temprano así como para mejorar el pronóstico.

En los últimos años se ha encontrado que los genes *HOX*, una familia de genes homeodominio los cuales controlan el patrón de desarrollo del eje craneocaudal en el embrión, se encuentran asociados a neoplasias hematopoyéticas, linfoproliferativas (leucemias y linfomas) y tumores malignos sólidos incluyendo, pulmón, mama, colón, cervicouterino y recientemente ovario. En el cáncer de ovario se ha encontrado la expresión de los genes *HOX: A7, 9, 10, 11, B7* y *B13* relacionados con subtipos del carcinoma epitelial de ovario y con su grado de diferenciación. Debido a que el estudio de los genes *HOXA9, 10, 11* se realizó con modelos animales murinos el objetivo de este proyecto consistió en analizar la expresión *in vivo* de los genes *HOXA7, A9, A10, A11, B7* y *B13*, en muestras de tejido normal, con patología benigna y maligna de ovario. La amplificación de los genes *HOX* se correlacionará con el diagnóstico histopatológico de los tumores y el análisis de estos resultados nos permitirá correlacionar la expresión génica con la expresión clínica y el probable pronóstico de estos tumores.



2. HIPÓTESIS

Las muestras de tejido ovárico con y sin patología maligna analizadas expresarán los genes *HOXA7*, *9*, *10*, *11*, *B7* y *B13* en correspondencia con el subtipo histológico del tumor y su expresión clínica.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo General

Analizar la expresión *in vivo* de los genes *HOX A7, 9, 10, 11, B7 y B13* en muestras de tejido ovárico con y sin patología maligna.

4.2. Objetivos Específicos

1.- Estandarizar la extracción de RNA y RT-PCR para la amplificación de los genes *HOX* en las líneas celulares y placenta humana utilizados como controles positivos.

2.- Amplificar mediante RT-PCR de la expresión de los genes *HOX A7, 9, 10, 11, B7 y B13* en tejido con patología maligna de ovario.

3.- Detectar la amplificación de la expresión de los genes *HOX A7, 9, 10, 11, B7 y B13* en tejido de ovario sin patología maligna.

4.- Analizar la correlación de la expresión de los genes *HOX* en tejido de ovario con y sin patología maligna.

5.- Estandarización de la cuantificación de la expresión del o los genes *HOX* más relevantes en la línea celular SiHa.

6.- Cuantificación de la expresión del o los genes *HOX* más relevantes en tejido de ovario con y sin patología maligna.

7.- Correlación de la expresión del o los genes *HOX* más relevantes mediante PCR tiempo real y punto final.



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Estandarización de la amplificación de los genes *HOX*

6.1.1. Obtención de líneas celulares y tejido de placenta

Las líneas celulares empleadas para la estandarización fueron la línea celular de adenocarcinoma ductal infiltrante con receptor de estrógeno positivo (MCF-7) y la línea celular de carcinoma de cérvix de células escamosas infectadas con el virus de papiloma humano tipo 16 (SiHa). La línea celular MCF-7 fue amplificada amablemente por la Q.B.P. Ana Dulce Hernández Herrera y el Q.B.P. Santiago Saavedra Alonso, de la Unidad de Biología Molecular del Cáncer y Unidad de Virología y cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas a cargo del Dr. Pablo Zapata Benavides y de la Dra. Laura Trejo Ávila respectivamente. La línea celular SiHa fue donada por el Dr. Augusto Rojas, del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la UANL. Ésta línea fue propagada, en la Unidad de Virología y Cáncer del Laboratorio de Inmunología y Virología, por la Q.B.P. Fernanda Thompson.

Para la colecta de la pastilla celular, las células se colocaron en tubos para centrifuga de 50 mL, se centrifugaron a 2,000 rpm por un tiempo de 5 min, se vertió el medio de cultivo y se colocó 10 mL de Buffer PBS 1X, se agitó suavemente, y se centrifugó a 2,000 rpm por 5 min. Se repitió este paso de lavado con buffer PBS, se retiró el sobrenadante, y la pastilla celular se congeló a -70°C (modificado de Sambrook & Russell, 2001).

El tejido de placenta utilizado para la estandarización de las condiciones de amplificación de los genes *HOX* fue colectado y almacenado en RNAlater® (Ambion, Austin, Texas, E.E.U.U.) por el Dr. José Isaías Badillo Almaráz del Hospital General de Zacatecas. El tejido preservado en RNAlater® (Ambion, Austin, Texas, E.E.U.U.) se congeló a -20°C hasta su uso.

6.1.2. Aislamiento de los RNA's totales a partir de líneas celulares y tejido de placenta

La extracción de los RNA's totales se realizó con material libre de RNAasas, como tubos para microcentrifuga certificados, agua DEPC, soluciones disueltas en agua DEPC, recipientes de vidrio, morteros y material quirúrgico hornados a 300°C por 3h, micropipetas reservadas para ese uso y cámaras de electroforesis tratadas con RNAasa Zap (Invitrogen, Carlsbad California, E.E.U.U.). Se usaron guantes para evitar la contaminación con las RNAasas y se trató el área de trabajo con agua DEPC y RNAasa Zap. El agua DEPC se preparó añadiendo 1mL de DEPC 6.9M (diethylpirocarbonato,



Sigma, St. Louis Missouri, E.E.U.U.) en 1 L de agua procesada en filtros MilliQ, se homogenizó por agitación, se incubó a 37°C por un mínimo de 12 h, y se esterilizó por autoclave durante 15 min para hidrolizar el DEPC.

La extracción de los RNA's totales se realizó utilizando el método de "Aislamiento de ARN con Trizol" descrito por Simms y cols. (1993), en donde mediante pipeteo se homogeneizaron los cultivos celulares con Trizol (1 mL trizol/5 a 10×10^6 células; Invitrogen) en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL. Por el contrario, en el caso del tejido de placenta se obtuvo 50 mg, mediante la disección de éste con tijera quirúrgica o bisturí, y se homogenizó con el uso de un mortero. Posteriormente, se transfirió a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL donde se continuó homogenizando mediante pipeteo. Y posteriormente se incubó la solución homogenizada durante cinco min a temperatura ambiente para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se añadió a la solución 0.2 mL de cloroformo a cada tubo por mililitro de Trizol utilizado para la homogenización, se mezcló en vortex vigorosamente durante 15 seg la mezcla resultante se incubó a temperatura ambiente 6 min y se centrifugó a 14 000 rpm a 4°C durante 15 min. Una vez terminada la centrifugación se retiró el tubo gentilmente observando 2 fases, la fase orgánica de color rojo (inferior) es fenol:cloroformo, una interfase y la fase acuosa incolora (superior) donde se encuentran los RNA's totales.

Para la precipitación de los RNA's, se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se agregó 0.5 mL de isopropanol por cada mililitro de Trizol utilizado en la homogenización inicial. Se incubaron las muestras a temperatura ambiente por 5 min y se centrifugaron a 13 200 rpm por 8 min a 4°C y se procedió al lavado de la pastilla de los RNAs, donde se removió el sobrenadante y se mezcló en vortex con 1 mL de etanol 75% por cada mililitro de Trizol empleado en la homogenización inicial. Se centrifugó a 13 200 rpm. Una vez obtenida la pastilla de RNA's, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla de los RNA's a temperatura ambiente de 20 a 25 min, sin permitir que se secase totalmente. Por último, se resuspendió la pastilla en 20 µL de agua DEPC.

La visualización de los RNA's se realizó en geles de agarosa al 0.8% colocados en una cámara de electroforesis horizontal sumergidos en buffer SB 1X. Las muestras de los RNA's fueron mezcladas con 2 µL de jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y fueron depositadas en los carriles del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 100V por 40 min, posteriormente se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a concentración de 5µg/mL durante 10 min. La fotodocumentación de los geles con los RNA's se realizó utilizando un transiluminador de luz UV. Se determinó la calidad de los RNA's, así como su integridad con la presencia de las dos bandas prominentes de los RNA's ribosomales de aproximadamente 5 y 2 kb (28S y 18S, respectivamente).



6.1.3. Cuantificación del RNA obtenido

Para cuantificar la concentración y evaluar la pureza del RNA extraído, se diluyeron los RNA's totales 1:200 en agua libre de RNAasas, en 600 μ L de volumen final, Posteriormente se realizó la lectura de las absorbancias a las longitudes de onda 260 y 280nm en el espectrofotómetro SmartSpec™ plus de Biorad, para calcular la concentración de RNA total se aplicó la fórmula 1:

$$[\text{RNA mg/ml}] = (\text{A260} \times 0.040 \text{ mg/ml} \times \text{B})$$

Fórmula 1

Donde:

A260 = El valor de la absorbancia a la longitud de onda de 260 nm.

B = Factor de dilución.

La pureza de los RNA's en relación a la presencia de proteínas se obtuvo con el cociente de las absorbancias a las longitudes de 260 y 280nm ($\text{A260}/\text{A280}$).

6.1.4. Síntesis de los DNAc's a partir de los RNA's totales

Posterior a la extracción de los RNA's, se llevó a cabo la síntesis de los DNAc's mediante la técnica de "transcripción reversa" (RT) descrita por Gerard *et al.* en 1986. Se realizaron las mismas condiciones utilizadas en la extracción de RNA's para evitar la contaminación por RNAasas, se tomaron hasta 10 μ L del RNA (5 μ g totales), 1 μ L de dNTPs 20 mM, 0.5 μ L de Oligo (dT)₂₃ anclado (0.5 μ g/ μ L; Sigma) y se llevó a un volumen final de 12 μ L con agua libre de nucleasas. Se incubó a 65°C por 5 min y se colocó en hielo. A continuación, se agregaron 4 μ L de buffer de reacción 5X para la enzima transcriptasa reversa del virus Moloney de la leucemia murina (M-MLV, Invitrogen), 2 μ L de DTT 0.1 M, 1 μ L de agua libre de nucleasas, se mezcló suavemente y se incubó 2 min a 37°C, finalmente se añadió 1 μ L de la enzima M-MLV (200 U/ μ L; Invitrogen) y se homogenizó por pipeteo. Posteriormente, se incubó a 37°C por 50 min y para finalizar se inactivó la reacción calentando a 70°C por 15 min.

6.1.5. Diseño de oligonucleótidos específicos para amplificación mediante PCR

Para diseñar los oligonucleótidos específicos que amplifican regiones de los genes β -actina (producto de 276pb), *HOXA7*, *A9*, *A10*, *A11* y *B7* se utilizaron las



secuencias nucleotídicas del National Center for Biotechnology Information (NCBI), y el programa primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000), disponible en línea (<http://frodo.wi.mit.edu/>). El diseño de los iniciadores se realizó de tal forma que incluyera por lo menos un intrón, para poder identificar las amplificaciones debidas a la presencia de DNA genómico. Posteriormente, se realizaron las amplificaciones virtuales con el programa "AmplifX 1.37", para corroborar el peso molecular de los productos amplificados y la presencia de interacciones entre los oligonucleótidos (primers dimers), y finalmente se realizó una búsqueda en el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) para descartar aquellos oligonucleótidos que amplificaran DNAC's no deseados. Por el contrario, para la amplificación de *HOXB13* y β -actina (producto de 414pb) se utilizaron los oligonucleótidos previamente descritos por Cantile *et al.* en el 2003.

A cada oligonucleótido se le determinó la temperatura de fusión (T_m), y la temperatura de alineamiento (TA) usando las fórmulas descritas por Sambrook & Russell (2001) y Rychlik & Rhoads (1989) respectivamente. En la Tabla III se resumen las características de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes empleados en esta tesis.

6.1.6. Amplificación de los Genes *HOX* y β -actina mediante RT-PCR

La amplificación de los genes *HOX* en los ADNc's obtenidos de las líneas celulares y el tejido de placenta se llevó a cabo mediante la metodología modificada de Sambrook & Russell (2001). Todas las reacciones de amplificación se realizaron en volúmenes finales de 25 μ L, con 1 μ L de una dilución 1 a 10 de ADNc, 0.2 mM de dNTPs, buffer (a una concentración de 20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCl), diferentes concentraciones de $MgCl_2$ (de 1.0 a 2.5 mM) y 2.5 U de Taq polimerasa (Invitrogen), en tubos de microcentrifuga de 0.6 mL. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Mastercycler gradient, de Eppendorf.

Para estandarizar la reacción de amplificación, se utilizaron gradientes de temperatura a partir de las temperaturas de alineamiento de los oligonucleótidos empleados buscando la banda de amplificación más intensa. En el caso donde no se obtuvo una amplificación adecuada, se realizó un gradiente de cloruro de magnesio.

Una vez amplificado el gen *HOX* deseado, se continuó con la estandarización de la reacción de PCR dúplex con los oligonucleótidos para β -actina en la misma reacción, usando las condiciones normalizadas para el gen *HOX* empleado. En los casos en los que no se obtuvo amplificación, se llevó a cabo un gradiente de cloruro de magnesio o de temperatura. En la Tabla IV se señalan las condiciones estandarizadas para la amplificación de los genes *HOX* y β -actina mediante PCR dúplex, cabe destacar que la amplificación de todos los PCR dúplex se obtuvieron a la temperatura de alineamiento de 62°C, por lo que la única variable fue la concentración de cloruro de magnesio usada. Así mismo, en la Tabla V se especifican los pasos de la reacción de PCR llevados a cabo en el termociclador así como la temperatura, el tiempo y los ciclos en cada uno de ellos.



Tabla III. Características de los Oligonucleótidos específicos empleados

Oligonucleótidos para β -actina276			GeneBank
Nombre	β actina2765	β actina2763	NM_001101.2
Secuencia	5' CGT GAT GGT GGG CAT GGG 3'	5' ACG TAC ATG GCT GGG GFG TT 3'	
Tm (°C)	71.33	70.30	
TA (°C)	62	61.7	
Oligonucleótidos para <i>HOXA7</i>			
Nombre	HOXA75'ix	HOXA73'ix	NM_006896.3
Secuencia	5' TGC GCC TCC TAC GAC CAA A 3'	5' TCT TCT TCA TCA TCG TCC TCC T 3'	
Tm (°C)	69.71	69.45	
TA (°C)	62.1	62	
Oligonucleótidos para <i>HOXA9</i> transcrito 1 y 2			
Nombre	HOXA95'	HOXA93'	AF010258.1
Secuencia	5' CGT GCA GCT TCC AGT CCA A 3'	5' GTC GAG CCA CCT CGT ACC T 3'	
Tm (°C)	69.71	71.87	
TA (°C)	62.4 y 62	63.1 y 62.7	
Oligonucleótidos para <i>HOXA10</i> transcrito 1			
Nombre	HOXA1071ix5	HOXA1071ix3'	AF040714.1
Secuencia	5' GCA AAG CCT CCG CGG AGA A 3'	5' GGA CGC TGC GGC TAA TCT CTA 3'	
Tm (°C)	71.87	72.79	
TA (°C)	61.4	61.7	
Oligonucleótidos para <i>HOXA10</i> transcrito 2			
Nombre	HOXA10725'New	HOXA103'New	AF040714.1
Secuencia	5' GCA TGA TTC TTG GCC TTT GTT C 3'	5' CAG TTT CAT CCT GCG GTT CT 3'	
Tm (°C)	66.93	66.93	
TA (°C)	61.2	61.2	
Oligonucleótidos para <i>HOXA11</i>			
Nombre	HOXA11ix5'	HOXA11ix3'	NM_005523.5
Secuencia	5' GTC TTC CGG CCA CAC TGA G 3'	5' GAC GAT CAG TGA GGT TGA GCAT 3'	
Tm (°C)	71.87	71.32	
TA (°C)	61.2	61	
Oligonucleótidos para <i>HOXB7</i>			
Nombre	HOXB75'	HOXB73'	NM_004502.3
Secuencia	5' TAT GGG CTC GAG CCG AGT T 3'	5' GGC CTC GTT TGC GGT CAG T 3'	
Tm (°C)	69.71	69.71	
TA (°C)	60.7	60.7	
Oligonucleótidos para <i>HOXB13</i>			
Nombre	HOXB135'	HOXB133'	NM_006361.5
Secuencia	5' CTG GAA CAG CCA GAT GTG TT 3'	5' TTG GCG AGA ACC TTC TTC TC 3'	
Tm (°C)	68.25	68.25	
TA (°C)	61.2	61.2	
Oligonucleótidos para β -actina433			
Nombre	β -act 433 5'	β -act 433 3'	NM_001101.2
Secuencia	5'CGT GAT GGT GGG CAT GGG 3'	5'ACG TAC ATG GCT GGG GTG TT 3'	
Tm (°C)	71.3	70.3	
TA (°C)	62	61.7	



Tabla IV. Concentración de Cloruro de Magnesio en las reacciones PCR duplex de los genes *HOX* y β -actina

Gen	Concentración de MgCl ₂ (mM)
<i>HOXA7</i>	1.5
<i>HOXA9</i> transcrito 1 y 2	1.5
<i>HOXA10</i> transcrito 1	1.5
<i>HOXA10</i> transcrito 2	2.0
<i>HOXA11</i>	2.0
<i>HOXB7</i>	1.5
<i>HOXB13</i>	2.5

6.1.7. Visualización de los Productos Amplificados en Geles de Agarosa

La electroforesis se realizó en geles de agarosa al 1.2 y 2.0% situados en una cámara horizontal sumergidos en buffer SB 1X (0.01M de NaOH, 0.04M H₃BO₄). Se mezclaron 10 μ L de los productos amplificados con 2 μ L de jugo azul 6X (Azul de bromofenol 0.25%, xilencianol 0.25%, glicerol 30%) y se colocaron en los carriles del gel. La electroforesis se llevó a cabo a 150V por 35min, posteriormente los geles se tiñeron en una solución de bromuro de etidio a una concentración de 5 μ g/mL durante 10min. La fotodocumentación de los geles con los productos amplificados se realizó utilizando un transiluminador de luz UV. En los casos en que la banda de amplificación fue muy tenue, se confirmó su presencia mediante el ajuste de los niveles de color en la fotografía del gel, utilizando el programa Adobe Photoshop 7.0.1.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Tabla V. Etapas de la reacción de PCR realizados en el termociclador

Etapas	Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización inicial	1	94	5 min
Desnaturalización	35	94	1 min
Alineamiento		Gradiente o TA	45 seg
Extensión		72	1 min
Extensión final	1	72	10 min



6.2. Amplificación de los Genes *HOX* en Tejidos Ováricos

6.2.1. Colecta de Muestras de Tejido Ovárico

Las muestras de tejido ovárico se obtuvieron del Departamento de Anatomía Patológica y en el Laboratorio Forense del Hospital General de Zacatecas por el Dr. José Isaías Badillo. Así como en el Depto. de Patología del Hospital Christus Muguerza por la Dra. Lucía Jara y la Dra. Gabriela Quiroga bajo la dirección del Dr. Raúl Garza. Las muestras se colectaron en la solución RNAlater® almacenadas a 4°C por un tiempo variable (2 días a 2 semanas) y posteriormente se almacenaron a -20°C. Cuatro de las muestras se preservaron en trizol y el resto se conservó en RNAlater®.

6.2.2. Extracción de los RNA's Totales a partir de Tejido Ovárico y Síntesis de los DNAC's

La metodología utilizada para la extracción de los RNA's totales de los tejidos ováricos fue similar a la realizada para la obtención de los RNA's totales de tejido de placenta. Las muestras almacenadas a -20°C se descongelaron, y se tomaron del tubo contenedor con pinzas (previamente homeadas por 3 h a 300°C), se cortó una cantidad variable de tejido (20-70 mg), se pesó, y se procedió a homogeneizar en mortero con la solución de trizol. A continuación, se continuó con la metodología descrita en los puntos 6.1.2 y 6.1.3. La reacción de transcripción reversa se realizó mediante el mismo método que se expuso en la sección 6.1.4.

6.2.3. Amplificación de los Genes *HOX* en Tejido Ovárico

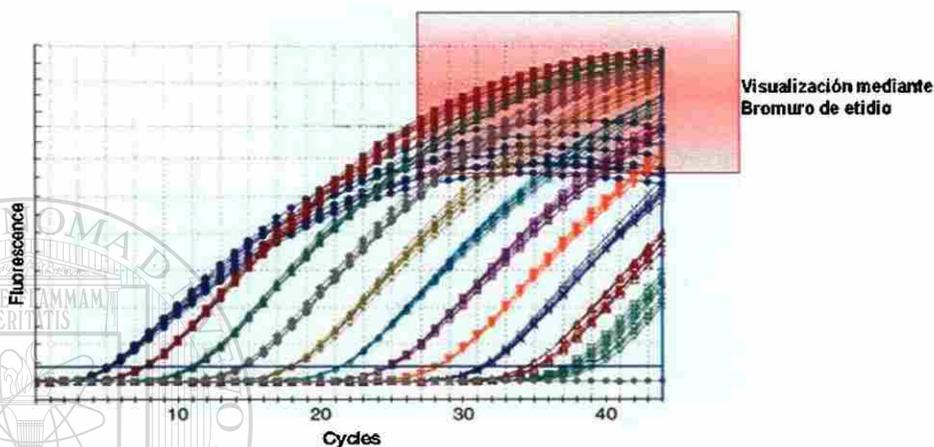
La amplificación de los genes *HOX* los DNAC's del tejido ovárico se llevó a cabo como se describe en el punto 6.1.6. En cada reacción se incluyó un ensayo sin DNAC como testigo negativo y otro ensayo con el DNAC de las líneas celulares o el tejido de placenta, como control positivo de la reacción de PCR.

6.3. Cuantificación relativa mediante PCR tiempo real de la expresión de *HOXB13* en Tejidos Ováricos

En la Figura 14 se muestra que los sistemas de cuantificación por PCR tiempo real se caracterizan por detectar la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de una reacción y no por medir la cantidad de un producto de PCR generado tras un número determinado de ciclos, como ocurre en el PCR punto final. Por lo tanto, cuanto mayor sea el número de copias inicial del producto amplificado se detectará un incremento en la fluorescencia, como consecuencia del acumulo de productos de PCR. De esta forma es posible realizar la cuantificación del DNA o RNA de una forma más exacta y reproducible (Heid *et al.*, 1996).



Los ensayos que se realizan mediante PCR tiempo real se dividen en dos grandes grupos: sistemas no específicos y sistemas específicos, los primeros detectan la presencia o ausencia de productos amplificados, pero no proporcionan información sobre la identidad de los productos generados (por ejemplo: SYBR® Green), es decir, que se pueden producir falsos positivos en el caso de la amplificación de productos de PCR inespecíficos o dímeros de oligonucleótidos (Wittwer *et al.*, 1997).



Modificado de Nolan *et al.*, 2006

Figura 14. Cuantificación de la expresión génica mediante las técnicas de PCR tiempo real. Se cuantificó la amplificación de un producto de PCR durante el desarrollo de la reacción en contraste con la reacción de PCR punto final que sólo podemos estimar la cantidad de un producto de PCR generado después de un número determinado de ciclos (recuadro rojo).

Por otro lado, los sistemas específicos emplean diversos tipos de sondas fluorescentes (Taqman®, “molecular beacons” y “scorpions”) que hibridan específicamente en la secuencia blanco (Livak *et al.*, 1995). La Figura 15 muestra que la sonda Taqman® es un oligonucleótido que contiene fluorocromos en los dos extremos y que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR (Lee *et al.*, 1993). El fluorocromo situado en el extremo 5’ se denomina reportero y el del extremo 3’ recibe el nombre de inhibidor. Cuando la sonda, que se incluye en la reacción de PCR conjuntamente con los cebadores está íntegra, la proximidad del reportero y del inhibidor provoca un fenómeno denominado FRET (transferencia de energía de resonancia de Förster o transferencia de energía de resonancia fluorescente) que se traduce en la anulación de la fluorescencia de la sonda (Cardillo *et al.*, 1988). En el curso de la PCR, la sonda se une a su secuencia blanco cuando esta se encuentra presente en la reacción. Durante la extensión de la cadena, la actividad 5’ exonucleasa de la enzima Taq DNA polimerasa, permite eliminar nucleótidos específicamente desde el extremo 5’ de una cadena de ácido nucleico (Holland *et al.*, 1991), provocando la liberación del reportero del extremo 5’ de la sonda, que al separarse del inhibidor comienza a emitir fluorescencia. La acumulación de los productos de PCR se cuantifica monitorizando el aumento de fluorescencia por la liberación del fluorocromo reportero. El proceso de hibridación y corte no interfiere con la acumulación exponencial del producto amplificado. A medida que aumenta el número de copias del producto,

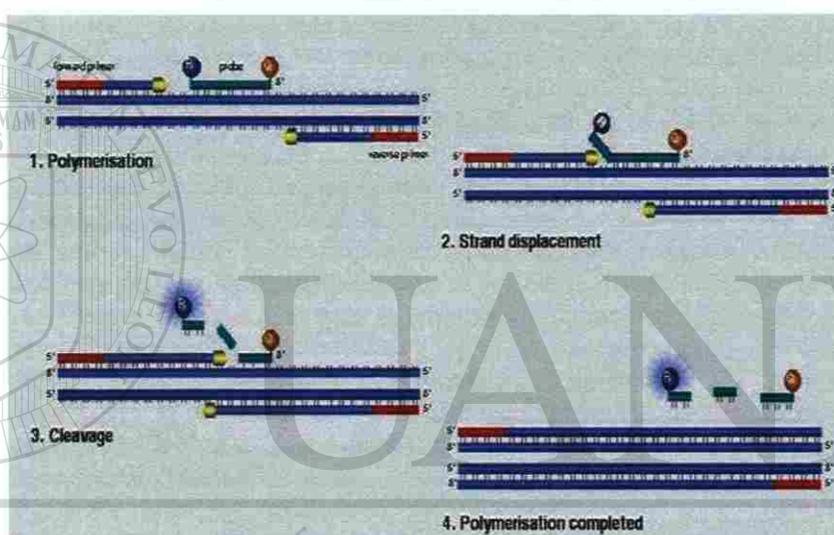


aumenta el número de moléculas de sonda que hibridan en su secuencia blanco y cada reportero se separa de su respectiva sonda, por lo que la intensidad de la fluorescencia es proporcional a la cantidad del amplicón generado. Como la sonda sólo se corta si hibrida en la secuencia blanco, la fluorescencia generada procede exclusivamente de la amplificación específica de los productos de PCR.

A



B



Modificado de <http://cgr.otago.ac.nz/slides/TAQMAN>.

Figura 15. Características de las Sondas Taqman®. A) La sonda Taqman® es un oligonucleótido que es capaz de hibridar en regiones internas y específicas de los productos de PCR. Esta sonda contiene dos fluorocromos, uno situado en el extremo 5' que se llama reportero (R) y el del extremo 3' recibe el nombre de inhibidor (Q). B) Durante el curso de la PCR, la sonda se une a su secuencia blanco, y cuando se lleva a cabo la extensión de la cadena, la actividad 5' exonucleasa de la enzima Taq DNA polimerasa, provoca la liberación del reportero del extremo 5' de la sonda, que al separarse del inhibidor comienza a emitir fluorescencia.

Los fluorocromos comúnmente utilizados para PCR tiempo real son: 6-FAM™ (6-carboxy-fluorescein), VIC™ (2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein), TET™ (6-carboxi-tetrachloro-fluoresceina), JOE™ (2,7-dimethoxy-4,5-dicloro,6-carboxi-fluoresceina) y HEX™ (hexacloro-6-carboxi-fluoresceina). En el extremo 3', se utiliza TAMRA™ (6-carboxi-tetrametil-rhodamina) como inhibidor. Como referencia interna de las reacciones se emplea ROX™ (6-carboxy-X-rhodamine) que sirvió para



normalizar las reacciones, evitando fluctuaciones en la fluorescencia de las reacciones réplicas por errores en el pipeteo o evaporación de las muestras. La señal generada por la referencia interna no depende de la cantidad de producto de PCR generado.

Además las sondas Taqman® MGB presentan dos características innovadoras: 1) incorporan una molécula llamada MGB (del acrónimo en inglés, minor groove binder) que se une al surco menor del DNA, lo cual incrementa la estabilidad y especificidad de la hibridación de la sonda (Afonina *et al.*, 1997; Kutuyavin *et al.*, 1997), y 2) emplean un inhibidor no fluorescente.

El MGB es una molécula pequeña, con forma de media luna, que encaja en el surco menor del DNA de doble cadena. En las sondas Taqman®-MGB, el grupo MGB va unido al extremo 3', junto al inhibidor. Cuando la sonda hibrida, la molécula MGB estabiliza la unión pegándose al surco menor de la doble cadena de DNA generada entre la sonda y la secuencia blanco. Esta característica ha permitido el diseño de sondas de menor tamaño, con una longitud comprendida entre 13 y 20 pb, la mitad que una sonda estándar. Por otra parte, las sondas Taqman® MGB usan un inhibidor no fluorescente, también conocido como inhibidor oscuro. Este inhibidor no fluorescente es una molécula que actúa como un aceptor de transferencia energética de un inhibidor, pero que no emite señal fluorescente detectable por sí misma. La ventaja es que se emite una señal con menor fondo fluorescente procedente de la reacción, mejorando la discriminación y facilitando la interpretación de los datos. El inhibidor no fluorescente proporciona buenos resultados cuando se emplea con cualquiera de los fluorocromos reporteros más comunes (FAM™, VIC™, TET™). Las principales ventajas de las sondas MGB cuando se emplean en PCR cuantitativo en tiempo real, se deben a su mayor especificidad de hibridación y a su pequeño tamaño. Esto permite una mayor discriminación, que facilita el diseño de ensayos y la reducción del tamaño del amplicón, lo que mejora la fiabilidad del ensayo.

Cada reacción de PCR tiempo real se preparó adicionando los DNAs a partir de 250 ng de RNA total de las muestras llevándolo a un volumen total de 10 µL, el cual contiene 5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems California, E.E.U.U.), 0.5 µL de la mezcla de oligonucleótidos y sonda Taqman 200nM (Applied Biosystems, Foster city, California, E.E.U.U.) y 4.5 µL de H₂O libre de RNAsas. Las reacciones se llevaron a cabo en tubos de microcentrifuga de 200 µL, los cuales fueron colocados en el termociclador DNA Engine cycler con la unidad de detección de fluorescencia para tiempo real Chromo4 (Biorad, Hercules, California, E.E.U.U.), bajo las condiciones especificadas en la tabla VI. El calentamiento inicial durante 10 minutos a 95°C se debe a la utilización del sistema de inicio en caliente (*hot start*) con el fin de reducir la formación de productos no específicos. La enzima *AmpliTaq Gold*® DNA polimerasa es una de las más empleadas en los ensayos de PCR tiempo real y está diseñada para permanecer inactiva hasta que se calienta a 95°C durante 10 minutos, por lo que no es necesario conservarla en hielo.

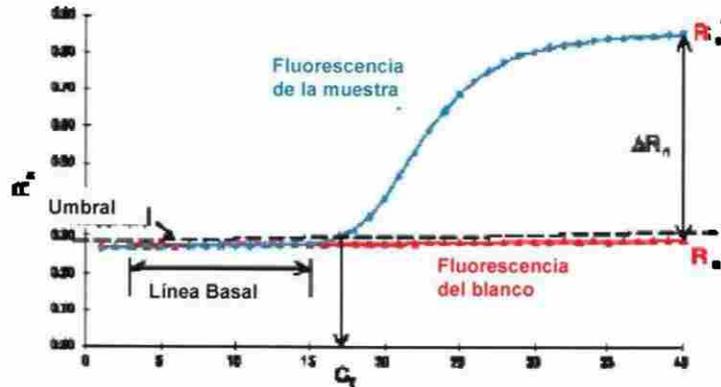


Tabla VI. Pasos de la reacción de PCR tiempo real realizados en el termociclador

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1 ciclo	95	10 min
40 ciclos	95	15 seg
	60	1 min

La reacción de PCR consta habitualmente de 3 etapas: desnaturalización de la doble cadena de DNA, unión específica de los cebadores a las cadenas sencillas de DNA y extensión del producto amplificado mediante la incorporación de los nucleótidos presentes en la solución, en contraste con la técnica de PCR cuantitativo que emplea dos etapas, debido al pequeño tamaño de los fragmentos generados, no es necesario añadir una tercera etapa a 72°C para extender la cadena de amplificación de DNA, ya que el tiempo invertido en pasar entre las fases de unión de los cebadores a 60°C y de desnaturalización a 95°C es suficiente para copiar la secuencia blanco.

La Figura 16 muestra los datos obtenidos en el detector de fluorescencia Cromo4 y que fueron graficados usando el programa Opticon Monitor™ 3.1 (Biorad, Hercules, California, E.E.U.U.). En los ciclos iniciales de la PCR, donde existen muy pocos cambios en la señal de fluorescencia y esta zona define la línea basal del gráfico de amplificación. El umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar producto de PCR acumulado. Esta línea debe situarse por encima de la línea basal y dentro de la zona en la que se produce la fase exponencial de la reacción. El parámetro C_T (ciclo umbral o *threshold cycle*) se define como la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral. El valor del C_T se obtiene cuando la reacción está en la fase exponencial y ningún componente de la reacción está limitado, por lo que los valores de C_T obtenidos son muy reproducibles en reacciones con el mismo número de copias iniciales. Por el contrario, la cantidad de producto de PCR acumulado al final de la reacción es muy sensible a pequeñas variaciones en los componentes de la reacción. El programa Opticon Monitor™ analiza los datos calculando la contribución de cada componente fluorescente al experimento. En los ciclos iniciales de la PCR, apenas hay cambios en la señal de fluorescencia (ΔR_n). Esta zona define la línea basal del gráfico de amplificación. La línea umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar producto de PCR acumulado. Esta línea debe situarse por encima de la línea basal y dentro de la zona en la que se produce la fase exponencial de la reacción (que es lineal en la transformación logarítmica del gráfico), y en donde la eficiencia de la reacción de PCR debe ser de 90 a 110%.



Modificado de <http://dna-9.int-med.uiowa.edu/realtime.htm>

Figura 16. Representación de los datos que se obtienen en el programa Opticon Monitor® en PCR tiempo real. La línea basal del gráfico de amplificación se refiere a los ciclos iniciales de la PCR en los que hay muy pocos cambios en la señal de fluorescencia. El umbral indica el nivel de fluorescencia a partir del cual se comienza a detectar el producto de PCR acumulado. El parámetro C_T (ciclo umbral o *threshold cycle*) es definido como la fracción del número de ciclo en el que la fluorescencia sobrepasa la línea umbral. El R_n es el nivel de fluorescencia, las abreviaturas R_{n+} y R_{n-} se refieren al nivel de fluorescencia de la muestra y del blanco respectivamente.

6.3.1. Estandarización de la expresión del gen β -actina y *HOXB13* en la línea celular SiHa.

Se realizó una curva estándar para determinar la concentración de los DNAc's óptima en la reacción de amplificación. Los DNAc's extraídos de la línea celular SiHa (sección 6.1.4), fueron obtenidos por duplicado a partir de: 250, 125, 75 y 37.5ng/ μ L de RNA's totales. Las condiciones de amplificación son las mismas que las indicadas en la sección anterior, los oligonucleótidos y la sonda Taqman® utilizados fueron diseñados y sintetizados por Applied Biosystems, la sonda Taqman® tiene MGB y está marcada con los fluoróforos reporteros VIC™ y FAM™ (β -actina y *HOXB13* respectivamente) y el inhibidor sin fluorescencia. La línea de tendencia de la gráfica muestra la escala logarítmica de las concentraciones de RNA y de los valores de C_T en el umbral 0.03, cuya pendiente refleja la eficiencia de la reacción de PCR. La eficiencia de la reacción de amplificación se obtiene usando las siguientes fórmulas:

$$E = 10^{\left[\frac{-1}{\text{pendiente}} \right]}$$

Fórmula 2

La eficiencia en por ciento es igual a:

$$1 - E \times 100$$

Fórmula 3

La eficiencia obtenida debe de encontrarse en un rango de 90-110% para poder realizar una cuantificación relativa.



6.3.2. Validación del método comparativo para cuantificación relativa ($\Delta\Delta C_T$)

El método comparativo $\Delta\Delta C_T$ descrito por Applied Biosystems asume que la eficiencia de amplificación es igual y óptima, es decir del 100%, para los genes de referencia (*β -actina*) y blanco (*HOXB13*), en muchos casos no se puede obtener, además de que se requiere la optimización de la reacción, el uso de reactivos y tiempo. Por lo que Pfaffl en el año 2001 propone una fórmula alterna en donde incluye las eficiencias de amplificación para los genes de referencia y blanco, posteriormente MultiD Analyses AB ® en su programa Genes Light Ver 4.3.2 sugiere normalizar los valores de C_T obtenidos con la eficiencia de las reacciones de PCR de los genes blanco y de referencia, mediante la fórmula 4:

$$C_{TE} = 100\% = C_{TE} \frac{\log(1+E)}{\log(2)}$$

Fórmula 4

Posteriormente se obtiene el ΔC_T para cada uno de las concentraciones de RNA obtenidas en las secciones 6.3.1 y 6.3.2 con la fórmula 5:

$$\Delta C_T = C_{T\text{referencia}} - C_{T\text{blanco}}$$

Fórmula 5

La pendiente de la línea de tendencia que se obtiene graficando el ΔC_T contra la concentración de RNA, debe de ser menor a 0.1 para validar que el ΔC_T no varía con respecto a la concentración de DNAc.

6.3.4 Cuantificación relativa de la expresión del gen *HOXB13* en tejidos ováricos normales, con patología benigna y maligna

Se realizó la amplificación mediante PCR tiempo real de los DNAc's (obtenidos de 250 ng/mL de RNA totales) obtenidos de las muestras de tejidos ováricos, con la metodología ya mencionada en la sección 6.2.2, tanto de *β -actina* (gen referencia) como de *HOXB13* (gen blanco). Los C_T 's obtenidos fueron normalizados por la eficiencia de la reacción de PCR tanto en el gen referencia como en el blanco (Fórmulas 4 y 5), y se obtuvieron los ΔC_T para cada muestra. Posteriormente, se realizaron los cálculos matemáticos para la obtención de la cuantificación relativa de *HOXB13* (Fórmulas 6 y 7).

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T\text{calibrador}} - \Delta C_{T\text{muestra}}$$

Fórmula 6

Expresión de *HOXB13*
relativa a muestra normal
de ovario

Fórmula 7



6.4. Tipo de Estudio y Análisis Estadístico

El tipo de estudio que fue llevado a cabo es transversal, descriptivo y observacional. La expresión mediante PCR punto final de los genes *HOXA7*, *A9*, *A10*, *A11*, *B7* y *B13*, el tipo de tejido analizado (normal, patología benigna y maligna), y la expresión relativa del gen *HOXB13* mediante PCR tiempo real fueron las variables analizadas (Tabla VII).

Los datos se sometieron a pruebas de estadística descriptiva y exploratoria, y los datos cuantitativos se presentan en el texto como las medias \pm desviación estándar y en las Figuras como las medias \pm desviación estándar ó límites de confianza. Se comprobaron los requisitos de normalidad mediante el estadístico D con la prueba de Kolmogorov-Smirnov tanto para distribución normal y normal logarítmica. Para probar la igualdad de las medias se utilizó un análisis de varianza, y en aquellos casos en donde la hipótesis nula fue rechazada se aplicó la prueba de contrastes HSD (diferencia honesta significativa) de Tukey para probar cuáles medias fueron diferentes. En los casos en los que solamente se compararon dos medias se realizó la prueba de t-student. Para la comparación de las variables ordinales dicotómicas se realizó la prueba exacta de Fisher. Se mantuvo el nivel global de α de todas las comparaciones en 0.05. El análisis estadístico se llevó a cabo en el paquete JMP® (SAS Institute Inc., Cary, California del Norte, E.E.U.U.).

Tabla VII. Definición y características de las variables utilizadas para el análisis estadístico

Variable	Tipo	Medición	Escala	Operacionalización
Expresión por punto final de los genes				
<i>HOXA7</i>	Cualitativo	La presencia o ausencia de una banda correspondiente a la expresión del gen	Ordinal dicotómica	1) Encendido 2) Apagado
<i>HOXA9</i> transcrito 1				
<i>HOXA9</i> transcrito 2				
<i>HOXA10</i> transcrito 1				
<i>HOXA10</i> transcrito 2				
<i>HOXA11</i>				
<i>HOXB7</i>				
<i>HOXB13</i>				
Cuantificación de la expresión relativa de <i>HOXB13</i>	Cuantitativo	Expresión de <i>HOXB13</i> relativa a una muestra normal de ovario	Discreta	Valores en escala normal y en escala logarítmica
Tipo de tejido para estudios con PCR tiempo real	Cualitativo	Evaluación microscópica del tejido ovarico	Ordinal	1) Tejido normal 2) Tejido con patología benigna 3) Tejido con patología maligna
Tipo de tejido para estudios con PCR punto final	Cualitativo	Evaluación microscópica del tejido ovarico	Ordinal dicotómica	1) Tejido con histopatología maligna 2) Tejido sin histopatología maligna



7. RESULTADOS

7.1. Estandarización de la amplificación de los genes *HOX*

Para estandarizar la amplificación de los genes *HOXA7*, *A9*, *A10*, *A11*, *B7*, *B13* mediante PCR en los tejidos de ovario se eligieron las líneas celulares SiHa, MCF-7 y tejido de placenta en donde se expresan éstos genes de acuerdo en lo descrito previamente por Alami *et al.*, (1999), Chu *et al.*, (2004) y Sarno *et al.*, (2006) respectivamente.

7.1.1. Obtención de los RNA's totales a partir de líneas celulares y tejido placentario

El aislamiento de los RNA's totales de los paquetes celulares de las líneas SiHa y MCF-7 y de tejido de placenta humana preservado en *RNAlater*® se llevó a cabo mediante el método de Trizol descrito previamente en la metodología.

La Figura 17 muestra los resultados obtenidos en la extracción de los RNAs totales con una buena calidad electroforética ya que se puede observar de manera definida las bandas de los RNA ribosomales 28 S y 18 S que indican la integridad del RNA de las líneas celulares así como del tejido de placenta. La concentración de los RNA's obtenidos corresponden a 0.8, 0.6 y 2.25 mg/mL (para SiHa, MCF-7 y tejido de placenta respectivamente). La relación de absorbancia a las longitudes de onda 260/280 corresponde a 2.1 en las tres muestras lo que indica una buena cantidad y pureza de los RNA's totales extraídos.

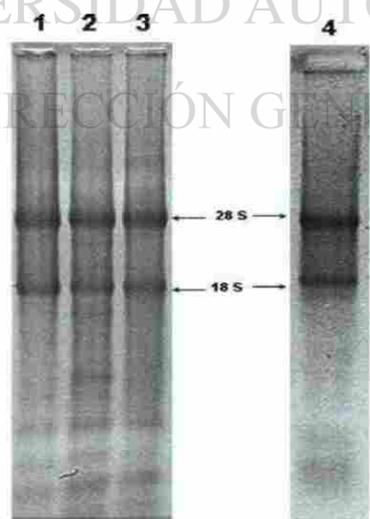


Figura 17. Extracción de RNA's totales en las líneas celulares y tejido de placenta. Los RNA's totales obtenidos por el método de Trizol se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%, SiHa (carriles 1 y 2), MCF-7 (carril 3) y tejido de placenta humana (carril 4). Se puede observar de manera definida las bandas 28 S y 18 S de los RNA ribosomales que indica la integridad del RNA, tanto en las líneas celulares y en el tejido conservado en *RNAlater*®. Cada carril contiene aproximadamente 1 µg de RNA's totales.

7.1.2. Amplificación de β -actina mediante RT-PCR



Los RNA's totales obtenidos de las células SiHa, MCF-7 y el tejido de placenta fueron utilizados para la síntesis de los DNAc's mediante transcripción reversa y posteriormente se realizaron las amplificaciones de los genes *HOX* mediante reacciones de PCR como se especifica en materiales y métodos. Los oligonucleóticos fueron diseñados para que reconocieran específicamente a las secuencias nucleotídicas blanco (obtenidas en el Gene Bank) y con una estabilidad del 100%, además se descartó la presencia de dímeros de oligonucleótidos y de productos amplificados inespecíficos mediante la amplificación virtual. La presencia de productos amplificados inespecíficos se minimizó utilizando el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), ya que los oligonucleótidos que reconocieran secuencias de otros genes fueron eliminados. Los pesos moleculares de los productos amplificados del gen β -actina fueron obtenidos mediante amplificaciones virtuales usando el programa AmplifX 1.37.

Se realizó la amplificación del gen constitutivo β -actina para corroborar la calidad de los RNA's totales obtenidos, así como para analizar la eficiencia de la reacción de retrotranscripción. El producto amplificado obtenido de 414pb corresponde al tamaño esperado para β -actina (Fig. 18A) en todas las reacciones de transcripción reversa como se muestra en la Figura 18B.

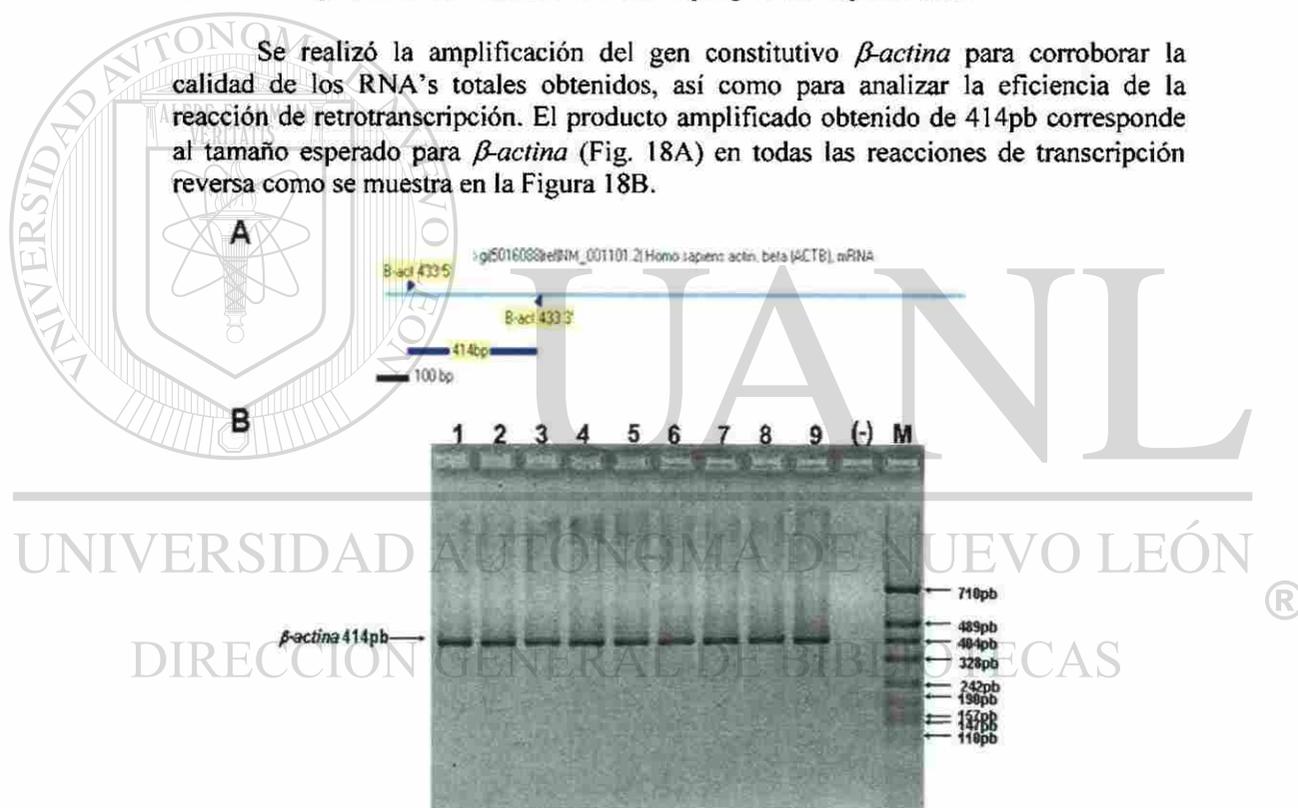


Figura 18. Amplificación del gen β -actina mediante RT-PCR. Los RNA's totales obtenidos de las células SiHa, MCF-7 y de tejido de placenta fueron utilizados para sintetizar los DNAc's a través de transcripción reversa y posteriormente para la amplificación del gen β -actina. La electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestra la amplificación de una banda de 414pb que corresponde a β -actina de las células SiHa (carriles 1-3), MCF-7 (carriles 4-6) y de tejido de placenta (carriles 7-9) con condiciones de 55°C de temperatura de alineamiento y una concentración de 1.5mM de $MgCl_2$. El carril (-) contiene a la reacción de PCR sin DNAc blanco y el carril marcado con M es el marcador de peso molecular pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I.



Para utilizar β -actina en reacciones de PCR duplex se diseñaron oligonucleótidos que permitieron amplificar un producto de 276pb (Figura 19A). La estandarización de la amplificación de β -actina con los DNAc's obtenidos de la línea celular SiHa, en donde se realizó un gradiente de temperatura de 60 hasta 66°C. La amplificación mostró la banda esperada de 276pb correspondiente a β -actina con la misma intensidad en todas las temperaturas. De la misma manera, se puede destacar que los oligonucleótidos permiten diferenciar presencia de DNA genómico de β -actina con una banda de 710pb (Figuras 19By C).

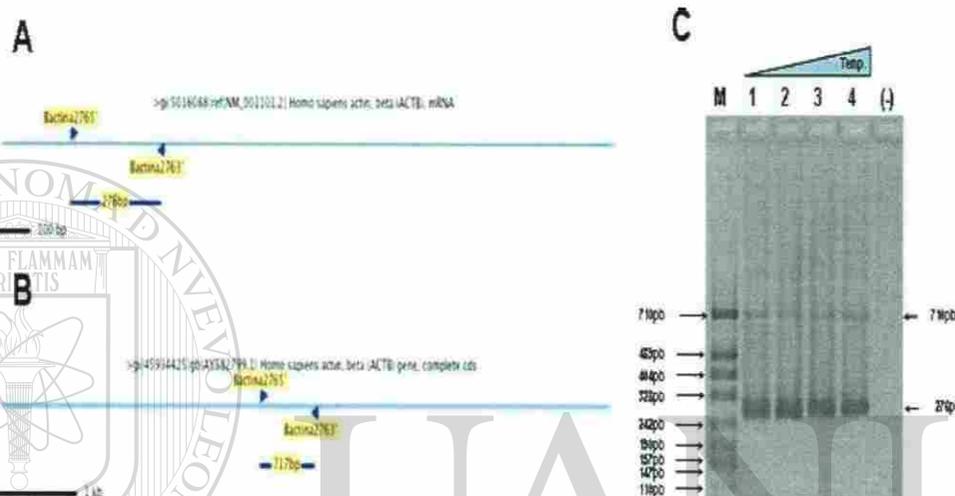


Figura 19. Estandarización de la amplificación del gen β -actina con la línea celular SiHa mediante gradiente de temperatura. A y B) Los diagramas muestran las amplificaciones de PCR virtuales con los oligonucleótidos β actina2765' y β actina2763' (señalados con flechas) usando el programa de AmpliX 1.37. Las secuencias de DNA (marcadas con líneas azules) obtenidas del Gene bank para DNAc en A y DNA genómico en B. Los oligonucleótidos usados reconocen a la secuencia blanco específicamente con una estabilidad del 100% amplificando un producto de 276pb en el caso de la secuencia codificante por los DNAc's y de 710pb en la secuencia genómica. C) La reacción de PCR a partir de los DNAc's obtenidos de las células SiHa muestra en gel de agarosa al 1.2% el gradiente de temperatura para la amplificación de una banda de 276pb de β -actina (carriles 1-4) con las temperaturas de alineamiento de 60°C, 62°C, 64°C, 66°C respectivamente usando una concentración de 1.5mM de $MgCl_2$. La amplificación de la banda de 710pb incluye un intrón lo cual nos permite diferenciar la amplificación de los DNacs y del DNA genómico. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNac blanco y el carril marcado con M muestra el marcador de peso molecular pBS sk digerido con la enzima de restricción *Mso* I.

La amplificación de β -actina en los DNAc's obtenidos de las líneas celulares y del tejido mostró una buena intensidad en la banda que indica la calidad óptima de las extracciones de RNA. Debido a la alta intensidad de las bandas de amplificación obtenidas, se realizaron diluciones 1/10 de estos DNAc's para la obtención de la banda visible de β -actina.



7.1.3. Expresión de los genes *HOX* en las líneas celulares y tejido placentario

7.1.3.1. *HOXA7*

La amplificación de *HOXA7* mostró la banda de 431pb la cual corresponde a la esperada en la amplificación virtual (figura 20A). La banda de amplificación en la figura 20C presentó una mayor intensidad a la temperatura de alineamiento de 62°C, por lo que la reacción de PCR duplex se realizó con esta temperatura (figura 20D). El producto amplificado virtual de *HOXA7* a partir del DNA genómico es de 1373pb (Figura 20B) y no fue detectado en las muestras de RNA indicando la ausencia de DNA genómico en la preparación. Debido a la adecuada intensidad de la amplificación de *HOXA7* y β -actina en el PCR duplex no fue necesario el ajuste de otros parámetros de la reacción de PCR.

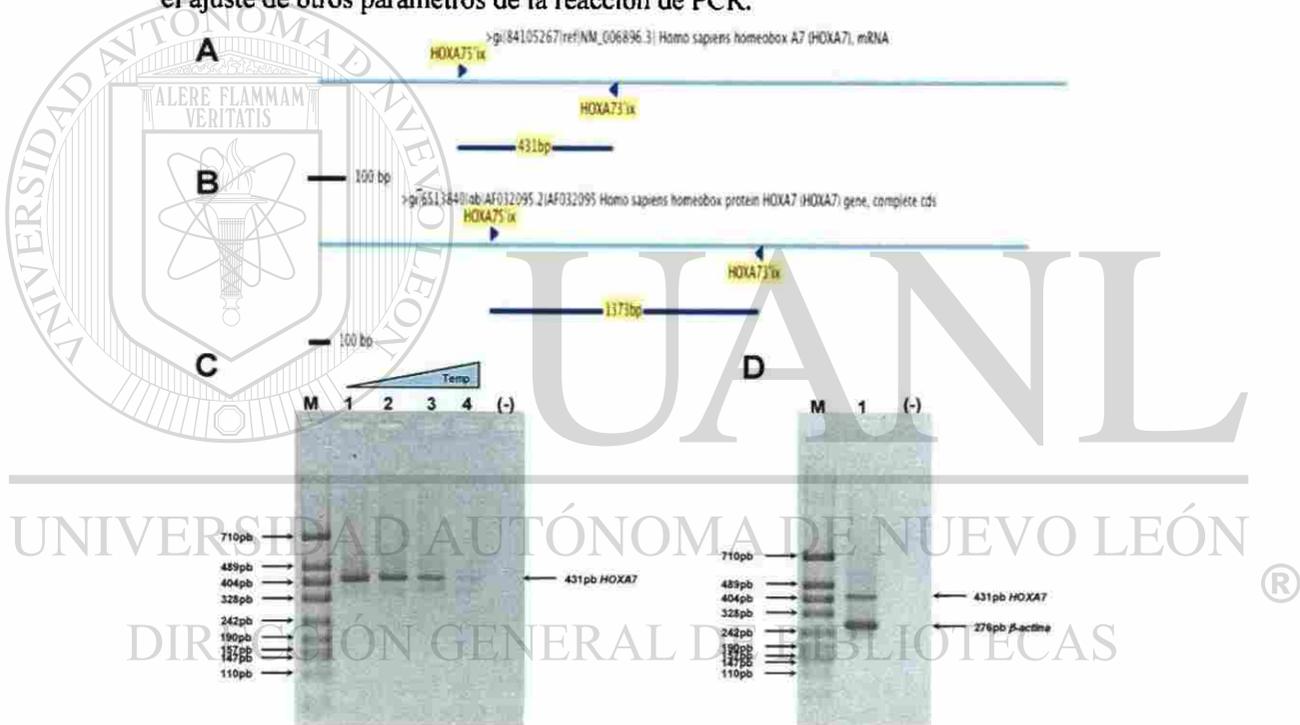


Figura 20. Amplificación del gen *HOXA7* en la línea celular SiHa. A y B) Las amplificaciones virtuales se realizaron utilizando el programa AmplifX 1.37 con los DNA's de las secuencias obtenidas del gene bank A) DNAc y B) DNA genómico. Los oligonucleótidos HOXA75'ix y HOXA73'ix usados reconocen a la secuencia blanco con una estabilidad del 100% amplificando una banda de 431pb y 1373pb respectivamente. C) La amplificación de *HOXA7* mediante PCR a partir de los DNAc's obtenidos de la línea celular SiHa muestra el gel de agarosa al 1.2% con el gradiente de temperatura para la amplificación de la banda de 431pb. Los carriles 1 al 4 corresponden a las temperaturas de alineamiento 60°C, 62°C, 64°C y 66°C respectivamente con una concentración de 1.5mM de MgCl₂. D) La amplificación mediante PCR duplex de *HOXA7* y β -actina muestra dos bandas esperadas de 431pb y 276pb con una concentración de 1.5 mM de MgCl₂ y con 62°C de temperatura de alineamiento (carril 1). Los carriles (-) contienen al testigo negativo de la reacción de PCR y los carriles marcados con M muestra el marcador de peso molecular plásmido pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I.



7.1.3.2. *HOXA9* transcritos 1 y 2

Los oligonucleótidos específicos diseñados para la amplificación de *HOXA9* permiten la detección de dos transcritos como se puede observar en las ampliificaciones virtuales en las figuras 21A y B, así mismo la detección del DNA genómico con la banda de 1584pb (Fig. 21C). Los resultados de la amplificación de *HOXA9* en la figura 5D muestran las bandas de 567 y 394pb correspondientes a los transcritos 1 y 2 respectivamente. Esta amplificación se obtuvo con una mayor intensidad a la temperatura de 62°C usando un gradiente desde temperatura 62 a 66°C. Por el contrario, se realizó un gradiente de $MgCl_2$ para estandarizar la reacción de PCR duplex con el control interno β -actina que mostró la amplificación de los tres productos con una concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$. En los dos casos el producto amplificado resultante también permitió la detección del DNA genómico de 1584pb (Figuras 21D, E).

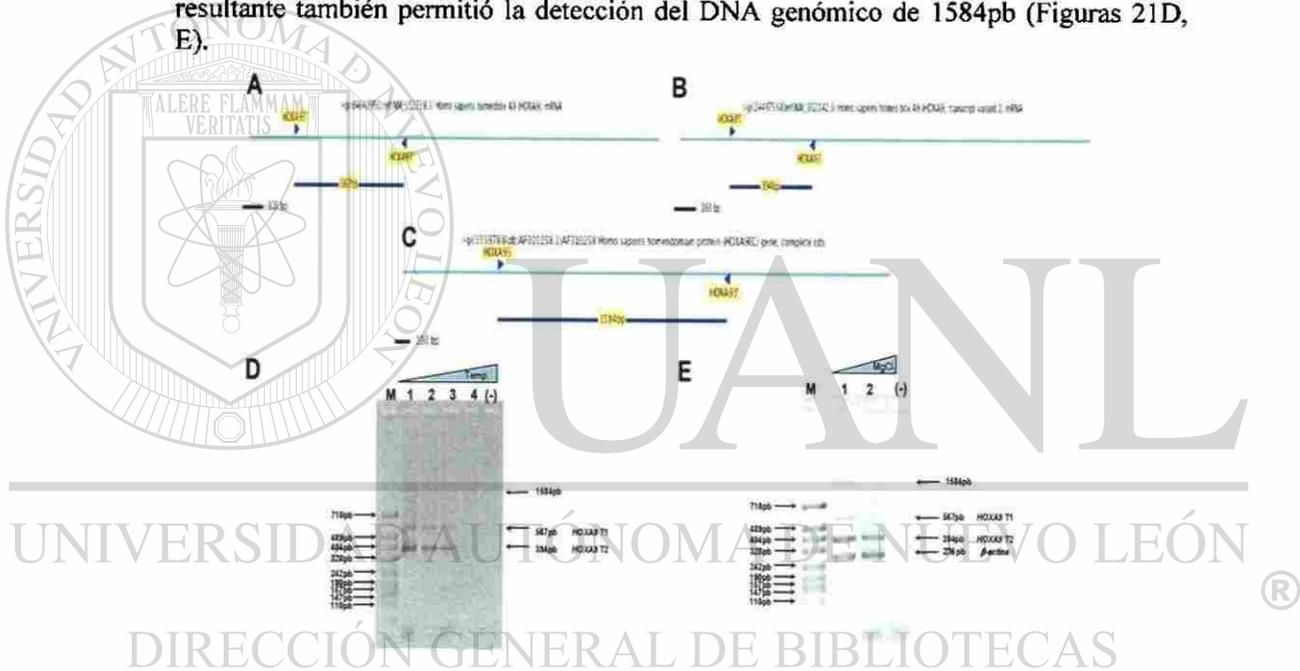


Figura 21. Amplificación de *HOXA9* en la línea celular SiHa. Las ampliificaciones virtuales muestran como líneas azul cielo las secuencias codificantes de los transcritos *HOXA9* (A y B) y los genes en la secuencia del DNA genómico (C). Las secuencias fueron obtenidas del Gene Bank (parte superior de cada secuencia) y se diseñaron dos oligonucleótidos específicos (*HOXA95'* y *HOXA93'*) que amplifican las dos bandas de 567 y 394pb (A y B), que corresponden al transcrito 1 y al transcrito 2 respectivamente. Así mismo, los primers amplifican el gen de 1584pb en el DNA genómico (C). La amplificación de *HOXA9* muestra el transcrito 1 de 567pb y el transcrito 2 de 394pb a partir de los DNAs obtenidos de las células SiHa (D) usando un gradiente de temperatura. Los carriles 1 al 4 corresponden a las temperaturas de alineamiento 62, 64, 66 y 68°C con una concentración de 1.5mM de $MgCl_2$. (E) La amplificación por PCR duplex muestra las bandas de 567pb y de 394pb de los transcritos 1 y 2 de *HOXA9* y β -actina de 276pb de los DNAs obtenidos de las células SiHa, usando 62°C como temperatura de alineamiento con 1.5 mM $MgCl_2$ (carril 1) y con 2.0 mM $MgCl_2$ (carril 2). Los carriles (-) corresponden al testigo negativo de la reacción de PCR y los carriles marcados con M muestra el marcador de peso molecular el plásmido pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I.



7.1.3.3. *HOXA10* transcrito 1

El transcrito 1 del gen *HOXA10* contiene una secuencia de 192pb que amplificaron los oligonucleótidos específicos descritos en Materiales y Métodos como se muestra en la amplificación virtual en la Figura 22A. Estos oligonucleótidos diseñados también permitieron la amplificación de un producto de 1366pb al tener como templado DNA genómico como lo muestra la amplificación virtual realizada en el programa AmplifX 1.37 en la Figura 22B. En el gradiente de $MgCl_2$ (Figura 22C), la concentración óptima para la amplificación de *HOXA10* es de 1.5mM mientras que en la reacción de PCR duplex con los DNAc's obtenidos de la línea celular MCF-7, es de 1.0 mM (Fig. 22D).

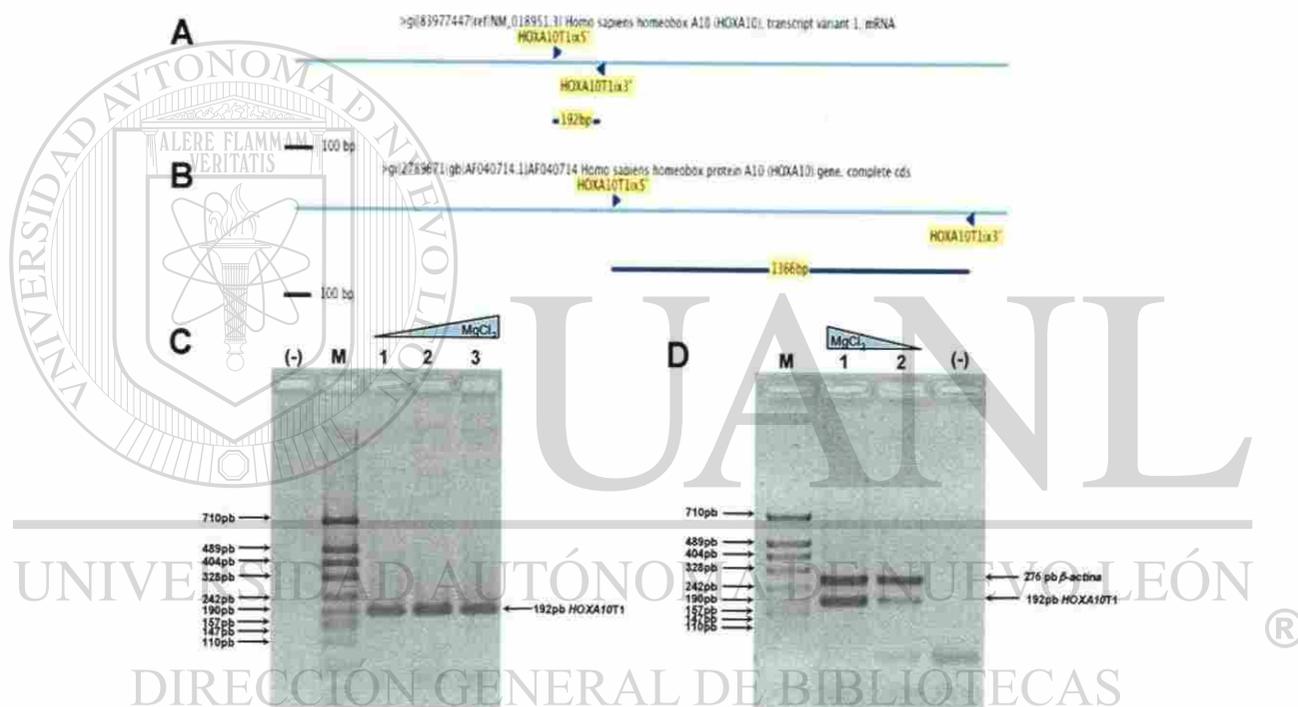


Figura 22. Amplificación de *HOXA10* transcrito 1 en la línea celular MCF-7. A y B) Las amplificaciones virtuales con los oligonucleótidos HOXA10T1x5' y HOXA10T1x3' se realizaron en el programa AmplifX 1.37 usando el DNA blanco que corresponde a la secuencia codificante (A) y al DNA genómico (B) de *HOXA10* transcrito 1 (acceso al gene bank NM_018951.3 y AF040714 respectivamente). Se muestra la amplificación de un producto de 192pb para la secuencia codificante y un producto de 1366pb para el DNA genómico. (C) El gel de agarosa al 1.2% muestra el gradiente de $MgCl_2$ para la amplificación de *HOXA10* transcrito 1 de 192pb a partir de los DNAc's obtenidos de las células MCF-7 los carriles 1, 2 y 3 corresponden a las concentraciones de $MgCl_2$: 1.0 mM, 1.5 mM y 2.0 mM respectivamente a una temperatura de 62°C. D) La amplificación de *HOXA10* transcrito 1 de 192pb y β -actina de 276pb por PCR duplex de los DNAc's obtenidos de las células MCF-7 se realizó con 62°C de temperatura de alineamiento y concentraciones de 1.0 mM (carril 1) y 1.5 mM $MgCl_2$ (carril 2). Los carriles (-) contienen al testigo negativo de la reacción de PCR sin DNac blanco y los carriles marcados con M muestra el marcador de peso molecular el plásmido pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I.



7.1.3.4. *HOXA10* transcrito 2

En la Figura 23A se indica la amplificación virtual de 430pb llevada a cabo con los oligonucleótidos diseñados en la secuencia codificante para el transcrito 2 de *HOXA10*, de forma contraria el DNA genómico de *HOXA10* no muestra amplificación con estos cebadores (Figura 23B). La banda de amplificación 430pb en los DNAc's obtenidos del tejido de placenta se detectó con mayor intensidad en la concentración de 2.0 mM de $MgCl_2$, tanto en el PCR monoplex como duplex con el control interno β -actina (Fig. 23C y D respectivamente).

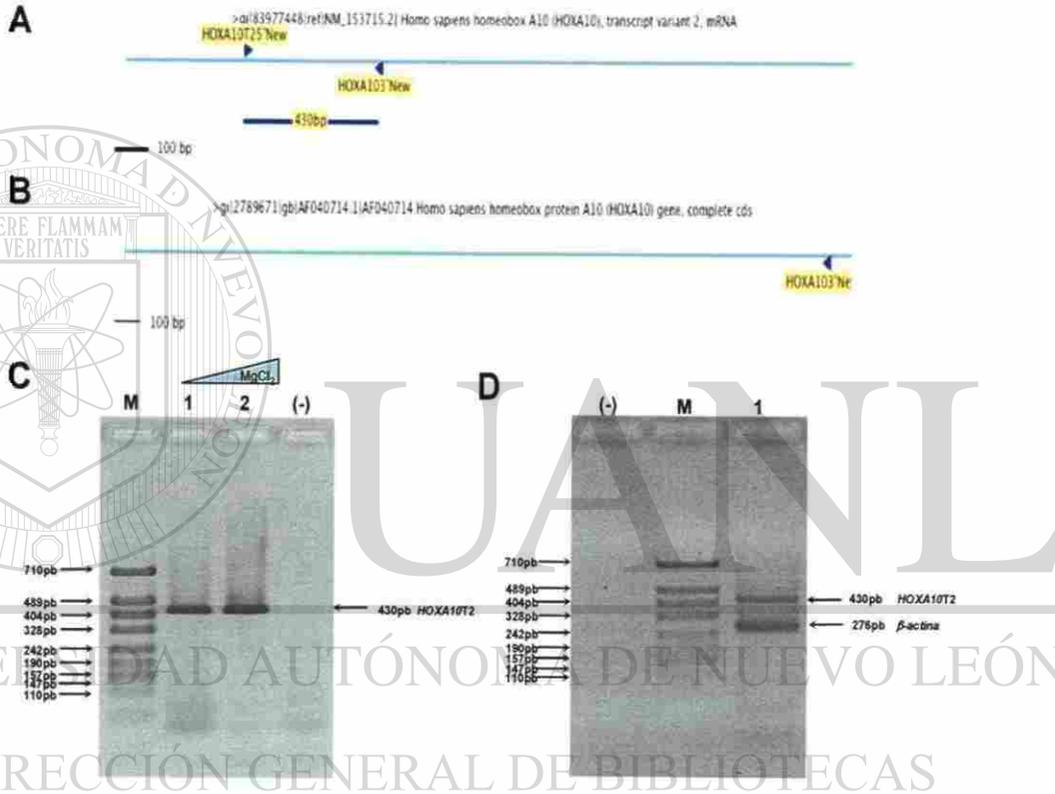


Figura 23. Amplificación de *HOXA10* transcrito 2 en tejido de placenta. Las amplificaciones virtuales se llevaron a cabo utilizando los oligonucleótidos HOXA10T25'New y HOXA103'New con el DNA blanco representado con líneas azules de la secuencia codificante (A) y el DNA genómico de *HOXA10* transcrito 2 (B). Los oligonucleótidos reconocen específicamente y con una estabilidad del 100% amplificando un producto de 430pb para el DNAc y no amplifican en el DNA genómico. B) La amplificación de *HOXA10* transcrito 2 en los DNAc's obtenidos del tejido de placenta muestra el gel de agarosa al 1.2% con un gradiente de $MgCl_2$ para la amplificación del transcrito de 430pb (carriles 1 y 2) que corresponden a la concentración de $MgCl_2$ 1.5 mM y 2.0 mM respectivamente con una temperatura de alineamiento de 62°C. C) La amplificación de *HOXA10* transcrito 2 de 430pb y β -actina de 278pb se obtuvo con PCR duplex a 62°C y con 2.0mM $MgCl_2$. Los carriles (-) se refieren a la reacción de PCR sin DNac blanco y los carriles marcados con M muestra el marcador de peso molecular el plásmido pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I.



7.1.3.5. *HOXA11*

En el programa AmplifX se llevaron a cabo las ampliaciones virtuales de *HOXA11* utilizando los cebadores específicos diseñados, los cuales flanquean la secuencia del gen *HOXA11* amplificando un producto de 179pb en la secuencia codificante y un producto de 1591pb en la secuencia de DNA genómico como se observa gráficamente en las Figuras 24A y B respectivamente. La amplificación de la banda de 179pb en la Figura 24C muestra la mayor intensidad de la banda de expresión de *HOXA11* a la temperatura de 62°C por lo que se utiliza esta temperatura para la reacción de PCR duplex con β -actina (Figura 24D). Estos oligonucleótidos no detectaron la presencia de DNA genómico en los DNAc's de SiHa.

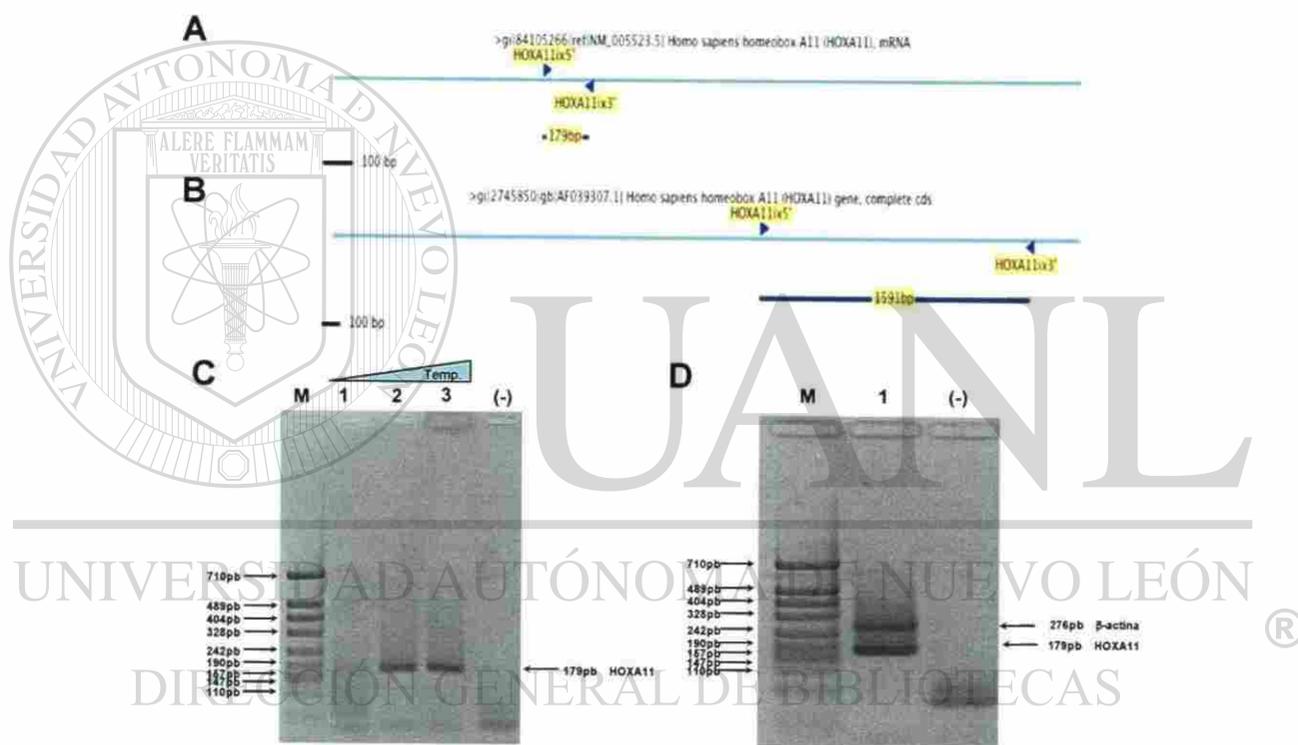


Figura 24. Amplificación de *HOXA11* en la línea celular SiHa. Los diagramas en A y B muestran las ampliaciones virtuales utilizando los oligonucleótidos HOXA11ix5' y HOXA11ix3' usando el programa AmplifX 1.37 con el DNA blanco de la secuencia codificante (acceso al gene bank NM_005523.5) y del DNA genómico (acceso al gene bank AF039307.1) del gen *HOXA11*. Los oligonucleótidos amplifican un producto de 179pb en la secuencia de DNAc y de 1591pb para el DNA genómico. C) A partir de los DNAc's obtenidos de las células SiHa se muestra un gradiente de temperatura para la amplificación de la banda de 179pb, las temperaturas de alineamiento usadas fueron: 60°C, 62°C y 64°C en los carriles 1 al 3 respectivamente con una concentración de 1.5 mM de MgCl₂. D) La amplificación de *HOXA11* de 179pb y β -actina de 276pb mediante PCR duplex se obtuvieron usando una temperatura de alineamiento de 62°C con 1.5mM MgCl₂. Los carriles (-) se refieren a la reacción de PCR sin DNAc blanco y los carriles marcados con M muestra el marcador de peso molecular el plásmido pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I.



7.1.3.6. *HOXB7*

La banda esperada de 190pb para la secuencia codificante de *HOXB7* se muestra en la amplificación virtual (Fig. 25A) y la banda de 2613pb en la amplificación virtual del DNA genómico (Fig. 25B). La estandarización de la amplificación de *HOXB7* se logró realizando un gradiente de temperatura de alineamiento desde 62 hasta 68°C a partir de los DNAc's obtenidos de la línea celular SiHa. La temperatura de alineamiento óptima como se puede observar en la Figura 25C es de 62°C. De igual manera se pueden observar en la Figura 25D los productos amplificados duplex de 276pb y de 190pb correspondientes a β -actina y *HOXB7* respectivamente. Estos oligonucleótidos no detectaron la presencia de DNA genómico en los DNAc's de SiHa.

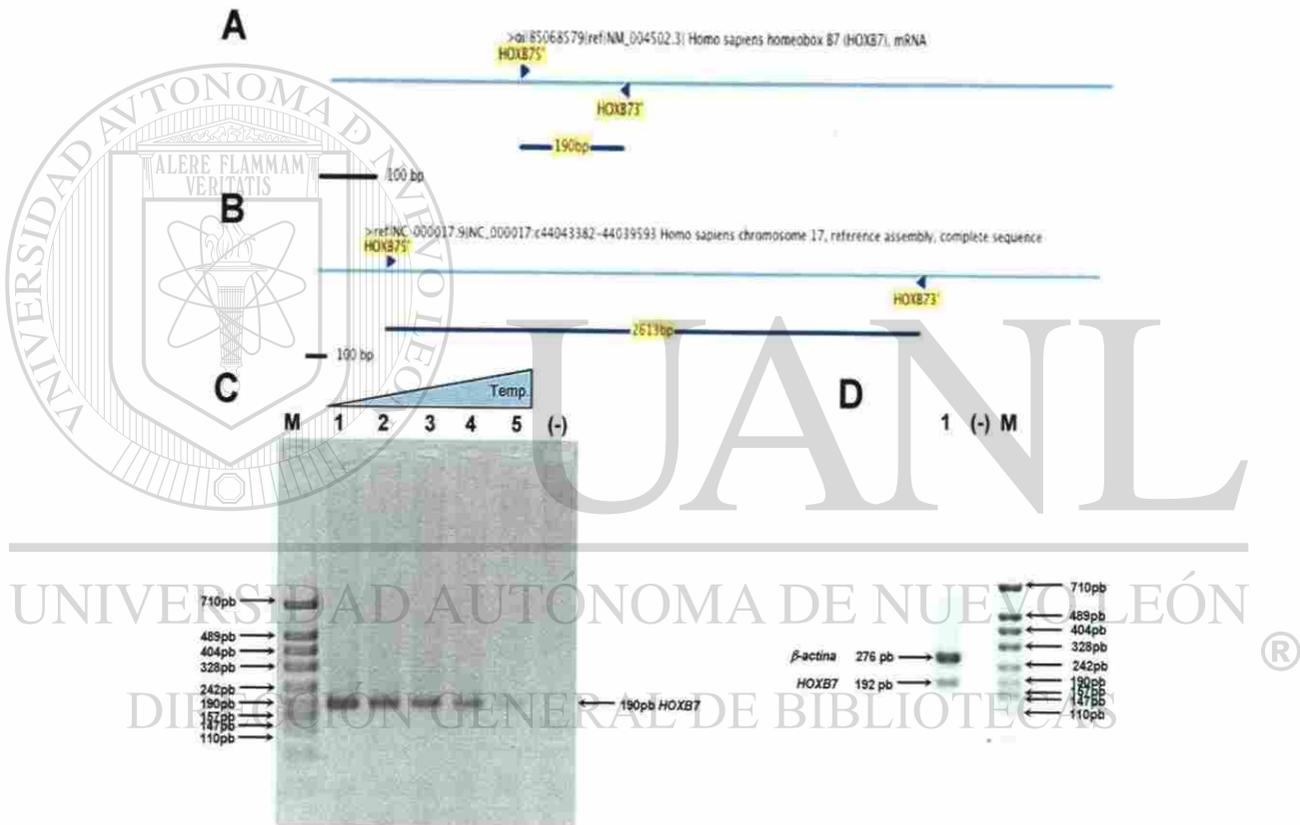


Figura 25. Amplificación de *HOXB7* en la línea celular SiHa. A y B) Los diagramas muestran las amplificaciones virtuales con los oligonucleótidos HOXB75' y HOXB73' usando el programa AmplifX 1.37 y el DNA blanco de la secuencia del DNAc de *HOXB7* (A) y del DNA genómico (B). Los oligonucleótidos reconocen específicamente con una estabilidad del 100% amplificando un producto de 190pb en la secuencia codificante y 2613pb en el DNA genómico. (B) La amplificación de *HOXB7* de 190pb a partir de los DNAc's obtenidos de las células SiHa se muestra en los carriles 1 al 5. Las temperaturas de alineamiento usadas: 62°C, 64°C, 66°C y 68°C (carriles 1 al 5 respectivamente) con una concentración de 1.5 mM de MgCl₂. (C) La amplificación de *HOXB7* de 190pb y β -actina de 276pb por PCR duplex fue obtenida a 62°C de temperatura de alineamiento y con una concentración de 1.5mM MgCl₂. Los carriles (-) contienen al testigo negativo de la reacción de PCR y los carriles marcados con M muestra el marcador de peso molecular el plásmido pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I.



7.1.3.7. *HOXB13*

Los oligonucleótidos diseñados *HOXB135'* y *HOXB133'* reconocen específicamente y con una estabilidad del 100% la secuencia blanco de *HOXB13* amplificando un producto de 300pb en la secuencia codificante y de 1249pb en el DNA genómico, como se muestra en las ampliificaciones virtuales de las Figuras 26A y B respectivamente. La amplificación en la Figura 26C muestra la banda de 300pb obtenida mediante PCR a partir de los DNAc's de la línea celular SiHa a 62°C de temperatura de alineamiento y con 1.5mM de $MgCl_2$. La amplificación *HOXB13* de 300pb y β -actina de 276pb mediante PCR duplex se muestra en la Figura 26D, con una mejor amplificación de ambas bandas usando una concentración de $MgCl_2$ de 2.5 mM. No se detectó la presencia del DNA genómico de SiHa en la preparación de los RNA's totales.

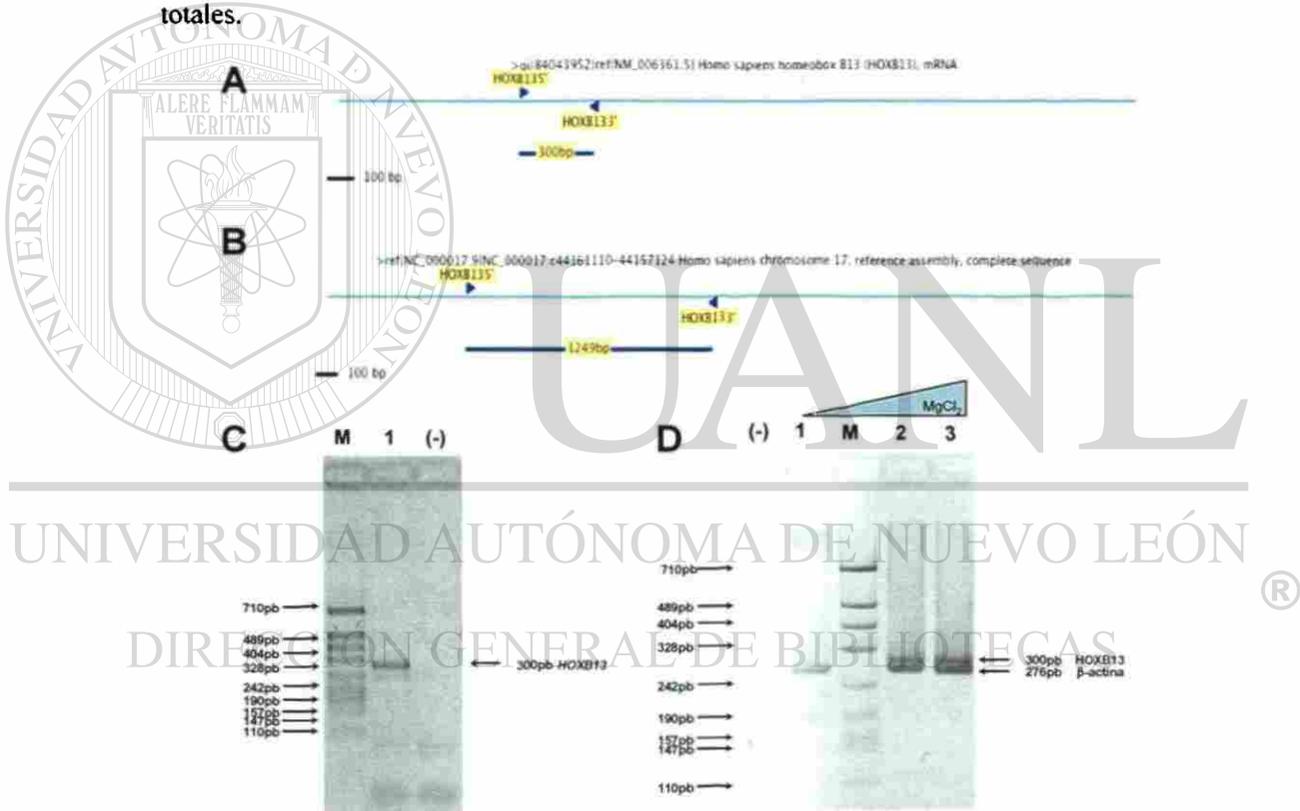


Figura 26. Amplificación de *HOXB13* en los DNAc's obtenidos de las células SiHa. A y B) Se muestran los diagramas de las ampliificaciones virtuales con los oligonucleótidos *HOXB135'* y *HOXB133'* utilizando el programa AmplifX 1.37 y el DNA blanco de las secuencias del DNAc (A) y el DNA genómico de *HOXB13* (B). Los oligonucleótidos amplifican un producto de 300pb en el DNAc y 1249pb en el DNA genómico. C) La amplificación de *HOXB13* a partir de los DNAc's obtenidos de las células SiHa muestra la banda de 300 pb (carril 1) a 62 C de temperatura de alineamiento con 1.5 mM de $MgCl_2$. (D) La amplificación de *HOXB13* de 300pb y β -actina de 276pb mediante PCR duplex se realizó a 62 C con 1.5mM, 2.5mM y 3.5mM de $MgCl_2$ (carriles 1 a 3 respectivamente). Los carriles (-) se refieren al testigo negativo de la reacción de PCR y los carriles marcados con M muestra el marcador de peso molecular el plasmido pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I.



Los resultados descritos anteriormente muestran la estandarización exitosa de la amplificación de los genes *HOXA7*, *9*, *11*, *B7* y *B13* en las líneas celulares SiHa y MCF-7 y en el tejido de placenta, usando un PCR duplex, que incluyen β -actina en la misma reacción para validar los resultados de la expresión de los genes *HOX*.

7.2. Expresión diferencial del los genes *HOX* en tejido ovárico

Una vez estandarizada la expresión de los genes *HOX* mediante PCR duplex con β -actina, en las líneas celulares y tejido de placenta, se realizó la extracción de los RNA's totales de las muestras de tejidos ováricos, para analizar la detección de expresión de los genes *HOXA7*, *9*, *10*, *11*, *B7* y *B13*.

7.2.1. Aislamiento de los RNA's totales a partir de los tejidos ováricos

El aislamiento de los RNA's totales de los tejidos ováricos normales, con patología benigna y maligna ya sea preservados en RNAlater® o en Trizol se llevó a cabo usando el método de trizol descrito previamente en Materiales y Métodos.

Los resultados obtenidos muestran una adecuada extracción de los RNA's totales en la calidad de los mismos ya que se puede observar de manera muy definida las bandas 28 S y 18 S de los RNA ribosomales que indican la buena integridad del RNA en los tejidos preservados en RNAlater®, como se presenta en la Figura 27 (carriles 3 al 6). Por otro lado, los RNA's totales obtenidos a partir de los tejidos conservados en Trizol muestran una menor integridad como se muestra en los carriles 1 y 2. Solamente cuatro muestras de 17 procesadas fueron conservadas en Trizol como se muestra en la Tabla VIII. La concentración y la pureza obtenida de los RNA's totales extraídos de los tejidos ováricos muestra alta variabilidad en concentración desde 0.08 a 6.8 mg/mL con una Abs 260/280 de 1.13 a 2.4 que muestra en la mayoría de los casos una buena pureza de los RNA's obtenidos.

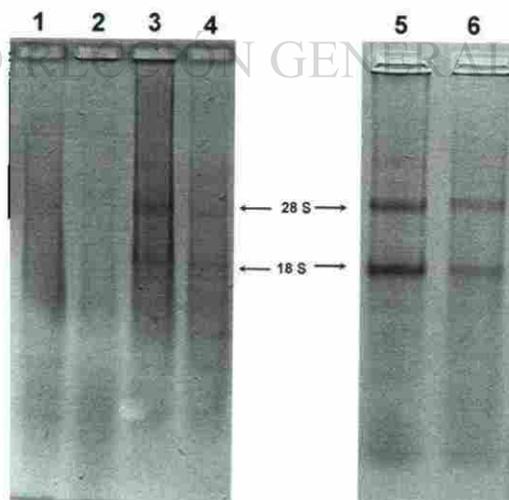


Figura 27. Extracción de RNA's totales en el tejido ovárico. Los RNA's totales obtenidos por el método de Trizol se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8%, ovario normal (carriles 1 y 2), cáncer de ovario (carriles 3 y 4) y patología benigna de ovario (carriles 5 y 6). Las muestras de tejido ovárico en los carriles 1 y 2 fueron preservadas en Trizol (Invitrogene) en cambio las muestras de los carriles 3 a 6 fueron conservadas en RNAlater® (Ambion) en donde se puede observar de manera definida las bandas de los RNA ribosomales 28 S y 18 S que indica la mejor integridad de los RNA's obtenidos. Cada carril contiene aproximadamente 1 μ g de RNA's totales.



Tabla VIII. Cuantificación de los RNA totales extraídos de los tejidos ováricos

Muestra de tejido ovárico	Solución conservadora	Cantidad de tejido procesado (mg)	Concentración mg/ml	Pureza Abs 260/280
1N	Trizol	11	0.304	2.3
2N	Trizol	20	0.7744	2.4
3N	Trizol	20	1.7432	2.2
4N	RNAlater®	30	0.2188	2
5N	RNAlater®	10	0.7937	1.63
6B	RNAlater®	20	0.8776	2.1
7B	RNAlater®	50	0.7079	1.75
8B	RNAlater®	50	0.080	1.25
9B	RNAlater®	20	0.558	1.13
10B	RNAlater®	20	0.9184	1.46
11B	RNAlater®	30	0.2896	1.23
12T	Trizol	14	0.3088	2
13T	RNAlater®	20	1.4072	2
14T	RNAlater®	70	1.7311	1.59
15T	RNAlater®	90	0.6222	1.74
16T	RNAlater®	70	0.536	1.43
17T	RNAlater®	40	6.804	1.75

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

7.2.2. Amplificación de los genes *HOX* en los tejidos ováricos

Los RNA's totales obtenidos del tejido ovárico normal, con patología benigna y maligna se utilizaron para la síntesis de los DNAc's mediante transcripción reversa. Se realizó la reacción de PCR para la amplificación del gen *β-actina* a partir de los DNAc's obtenidos de tejidos ováricos con la finalidad de corroborar la eficiencia de la reacción de retrotranscripción de cada uno de los tejidos procesados. Los resultados en la Figura 28 corroboran la adecuada amplificación de una banda de 276pb que corresponde al gen de *β-actina* obtenida de los tejidos ováricos en comparación a la que se encuentra en los DNAc's diluidos 1/10 de la línea celular SiHa (+), los cuales fueron utilizados como control positivo de la reacción.

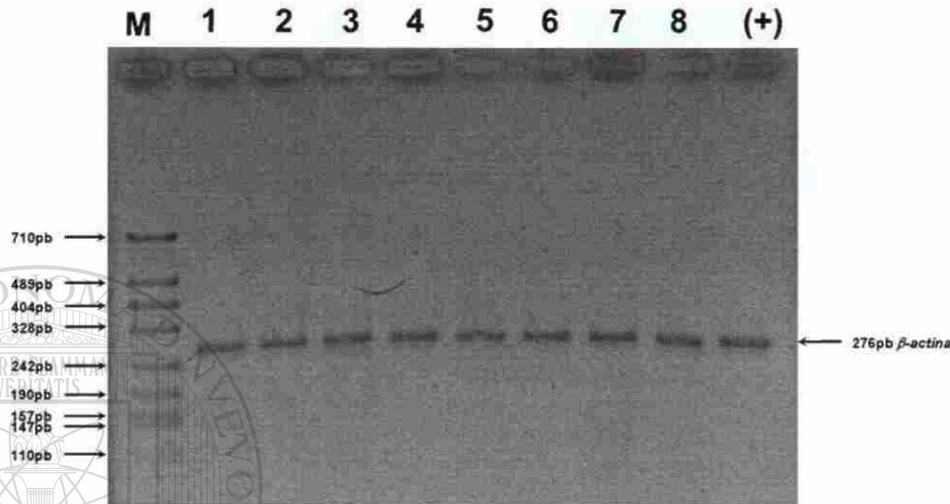


Figura 26. Amplificación del gen β -actina mediante RT-PCR a partir del tejido ovárico. Los RNA's totales obtenidos del tejido ovárico fueron utilizados para sintetizar los DNAc's a través de transcripción reversa y posteriormente con la reacción de PCR para la amplificación del gen β -actina. La electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestra la amplificación de una banda de 276pb que corresponde a β -actina a partir de los DNAc's obtenidos de tejido ovárico normal, con patología benigna y maligna. El carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizado como testigo positivo. El carril marcado con M es el marcador de peso molecular pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

7.2.2.1. Expresión de *HOXA7* en tejidos ováricos

La expresión de una banda de 431pb que corresponde a *HOXA7*, como se observa en la Figura 29, se detecta en cuatro muestras normales, en dos muestras de tejido con patología benigna y en cuatro de las muestras de tejido ovárico con patología maligna. La amplificación de β -actina se observa en todas las muestras confirmando la integridad de los DNAc's provenientes de los tejidos ováricos, además se presentan los controles positivos y negativos de la reacción de PCR para descartar errores técnicos durante la misma. La expresión diferencial de *HOXA7* entre los tejidos ováricos con y sin patología maligna no es estadísticamente significativa ($p=1$).

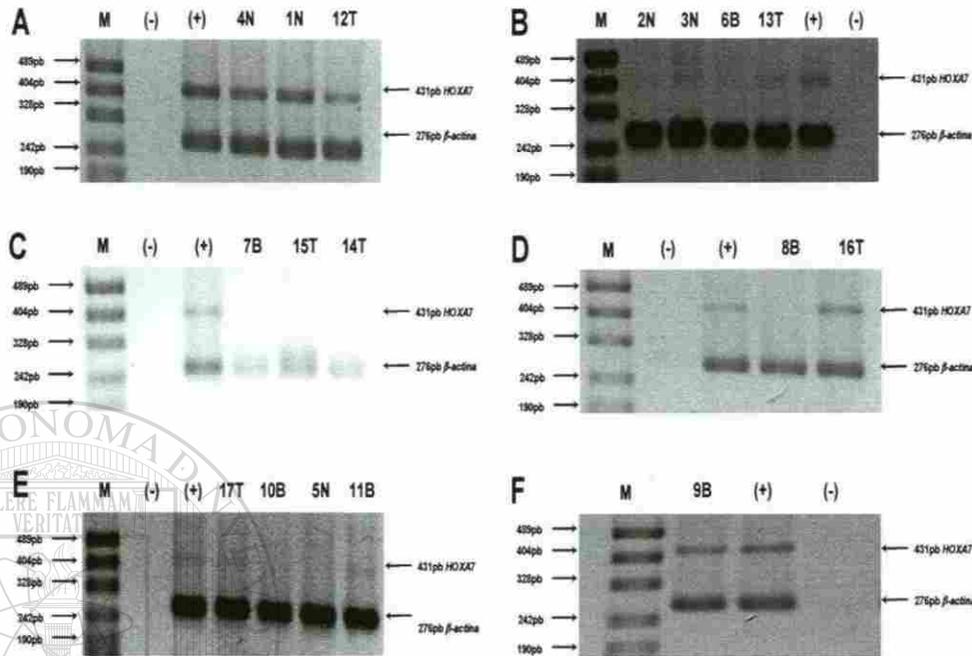


Figura 29. Amplificación del gen *HOXA7* en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestran la amplificación de *HOXA7* en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones descritas en la estandarización. La expresión de *HOXA7* con la banda de amplificación de 431pb se observa en las muestras de tejidos normales 1N a 4N, de tejido con patología benigna 9B y 11B y con patología maligna 12T, 13T, 16T y 17T. Todas las amplificaciones de *HOXA7* se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen *β-actina*. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAC's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAC's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

7.2.2.2. Transcritos de *HOXA9* en tejidos ováricos

En la Figura 30 se muestra la detección de *HOXA9* transcrito 1 con la banda de amplificación de 567pb en dos muestras normales, en una muestra de tejido con patología benigna y en dos muestras de tejido ovárico con patología maligna. Así mismo, se muestra la expresión de *HOXA9* transcrito 2 con la banda de amplificación de 394pb en cuatro muestras de tejido ovárico normales, en cuatro muestras con patología benigna y en las cuatro muestras con patología maligna. No se encontró diferencia significativa ($p=1$) en la expresión de los transcritos de *HOXA9* en los tejidos ováricos analizados.

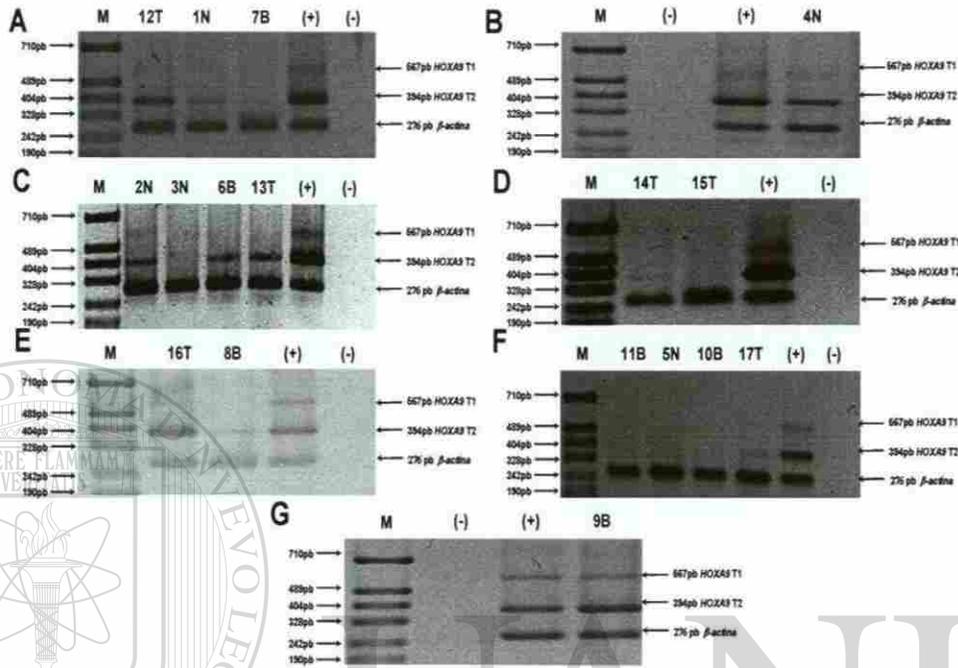


Figura 30. Amplificación de *HOXA9* en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestran la amplificación de *HOXA9* transcritos 1 y 2 en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones estandarizadas previamente. La expresión de *HOXA9* transcrito 1 con la banda de amplificación de 567pb se observa en la muestra de tejidos normal 2N y 4N, en la muestra de tejido con patología benigna 9B y con patología maligna 12T y 16T. Así mismo, se muestra la expresión de *HOXA9* transcrito 2 con la banda de amplificación de 394pb en las muestras de tejido ovárico normales 1N, 2N, 4N y 5N, con patología benigna 6B, 8B, 9B y 11B y con patología maligna 12T, 13T, 14T, 15T y 17T. Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen β -actina. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

7.2.2.3. Visualización de *HOXA10* transcrito 1 en tejidos ováricos

La electroforesis en gel de agarosa al 1.2% en la Figura 31 muestra la amplificación de *HOXA10* transcrito 1 en los tejidos ováricos con la banda de 192pb en todas las muestras normales, en cinco muestras de tejido con patología benigna y en cinco muestras de tejido ovárico con patología maligna. No se encontró una diferencia significativa de la expresión de este gen entre el de tejido ovárico maligno y no maligno.

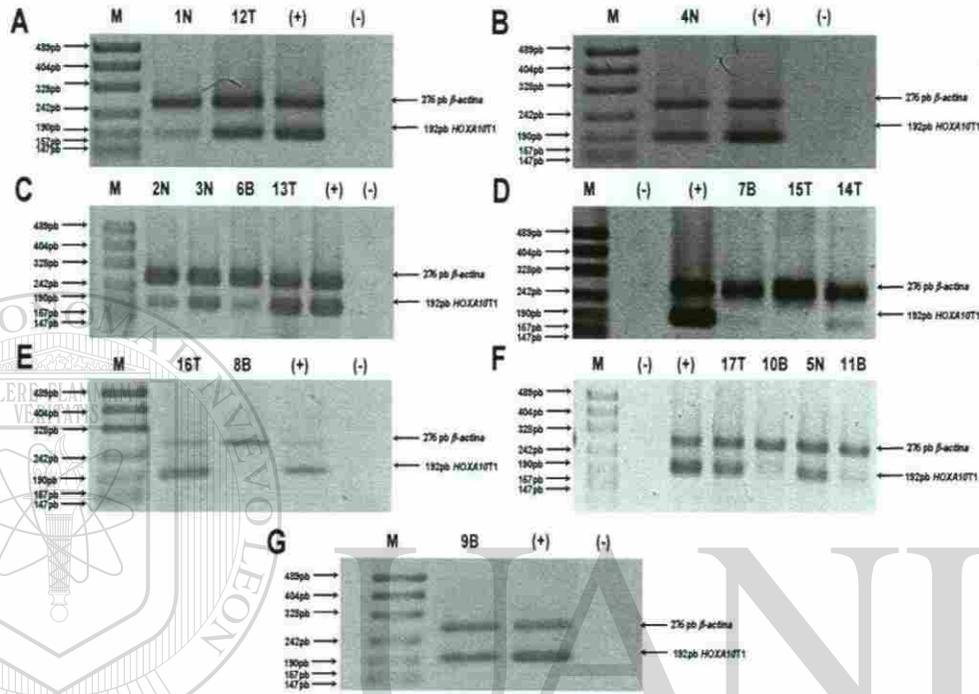


Figura 31. Amplificación de *HOXA10* transcrito 1 en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestran la amplificación de *HOXA10* transcrito 1 en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones estandarizadas previamente. La expresión de *HOXA10* transcrito 1 con la banda de amplificación de 192pb se observa en todas las muestras de tejidos normales 1N al 5N, con patología benigna 6B, 7B, 9B, 10B y 11B y con patología maligna 12T, 13T, 14T, 16T y 17T. Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen β -actina. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

7.2.2.4. Amplificación de *HOXA10* transcrito 2 en tejidos ováricos malignos

Los gels de agarosa al 1.2% en la Figura 32 muestran la amplificación de *HOXA10* transcrito 2 en tres muestras normales, en dos muestras de tejido con patología benigna y en todas las muestras de tejido ovárico con patología maligna. La expresión diferencial de este transcrito es estadísticamente significativa ($p=0.0427$), detectándose su expresión preferentemente en tejidos con patología maligna.

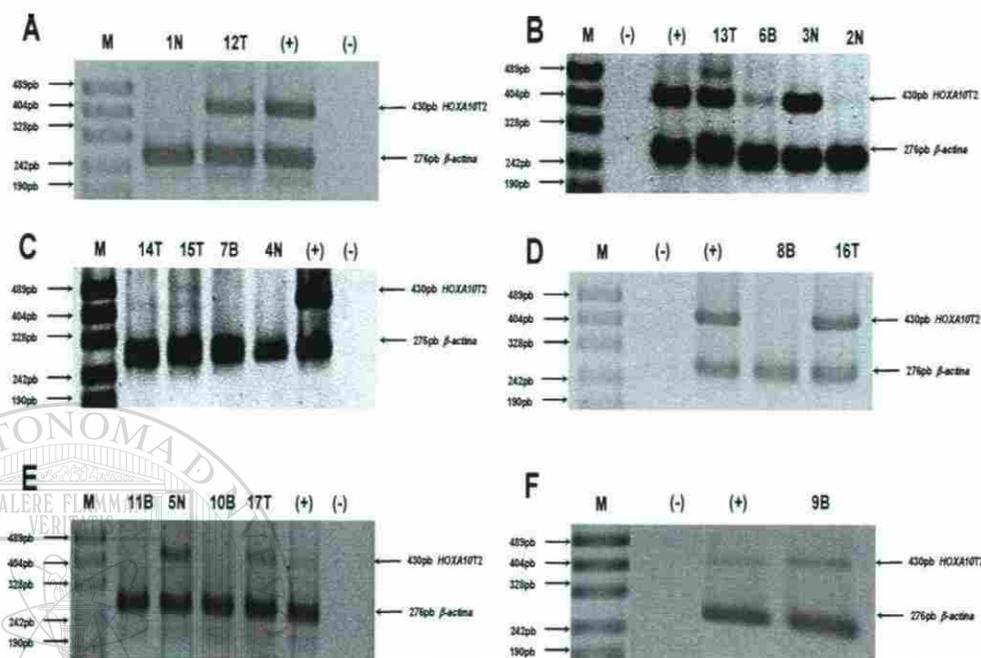


Figura 32. Amplificación de *HOXA10* transcritos 2 en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestran la amplificación de *HOXA10* transcritos 2 en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones de estandarización. La expresión de *HOXA10* transcritos 2 con la banda de amplificación de 430pb se observa en las muestras de tejido ovárico normales 2N, 3N y 5N, con patología benigna 6B y 9B y con patología maligna del 12T al 17T. Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen β -actina. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

7.2.2.5. Expresión de *HOXA11* en tejidos ováricos

La amplificación de *HOXA11* en tejido ovárico realizada de acuerdo a las condiciones estandarizadas se observa en la Figura 33, la cual muestra la expresión de *HOXA11* con la banda de amplificación de 179pb en tres muestras normales, en dos tejidos con patología benigna y en todas las muestras de tejido ovárico con patología maligna. Es decir que la diferencia de expresión entre los tejidos ováricos es estadísticamente significativa ($p=0.0427$), presentando una tendencia en la expresión de este gen en los tejidos ováricos con patología maligna.

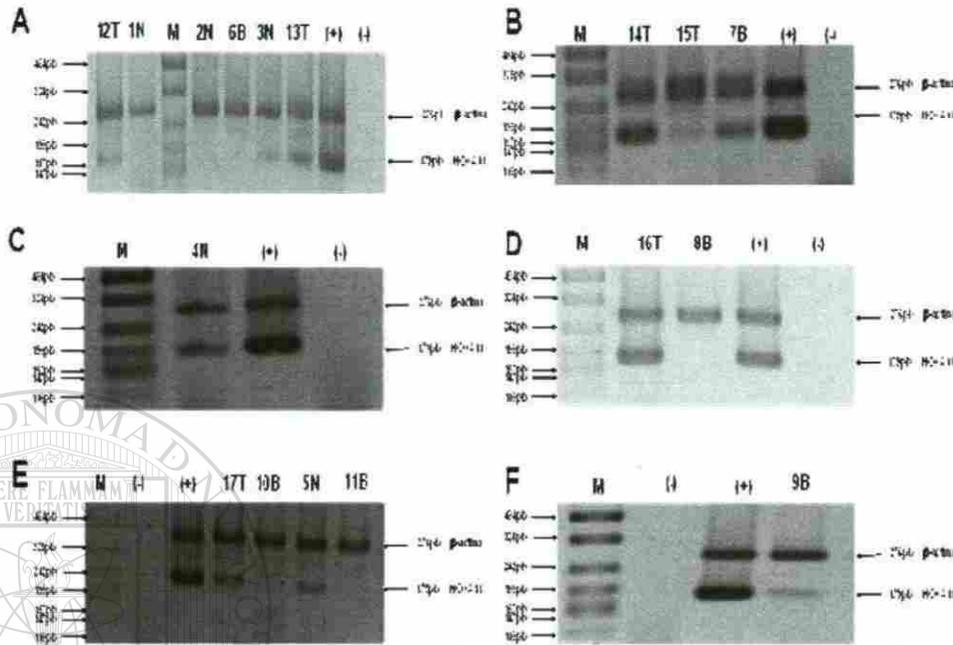


Figura 33. Amplificación de *HOXA11* en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestran la amplificación de *HOXA11* en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones de estandarización. La expresión de *HOXA11* con la banda de amplificación de 179pb se observa en las muestras de tejido ovárico normales 3N, 4N y 5N, con patología benigna 7B y 9B y en todas las muestras con patología maligna (12T al 17T). Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen β -actina. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNase's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNase's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

7.2.2.6. Detección de transcritos de *HOXB7* en ovario

La Figura 34 muestra la expresión de *HOXB7* con la banda de amplificación de 190pb en todas las muestras normales (1N al 5N), en cinco muestras de tejido con patología benigna y en todas las muestras de tejido ovárico con patología maligna. No se observa una diferencia en la expresión de este gen en los tejidos ováricos normales y patológicos.

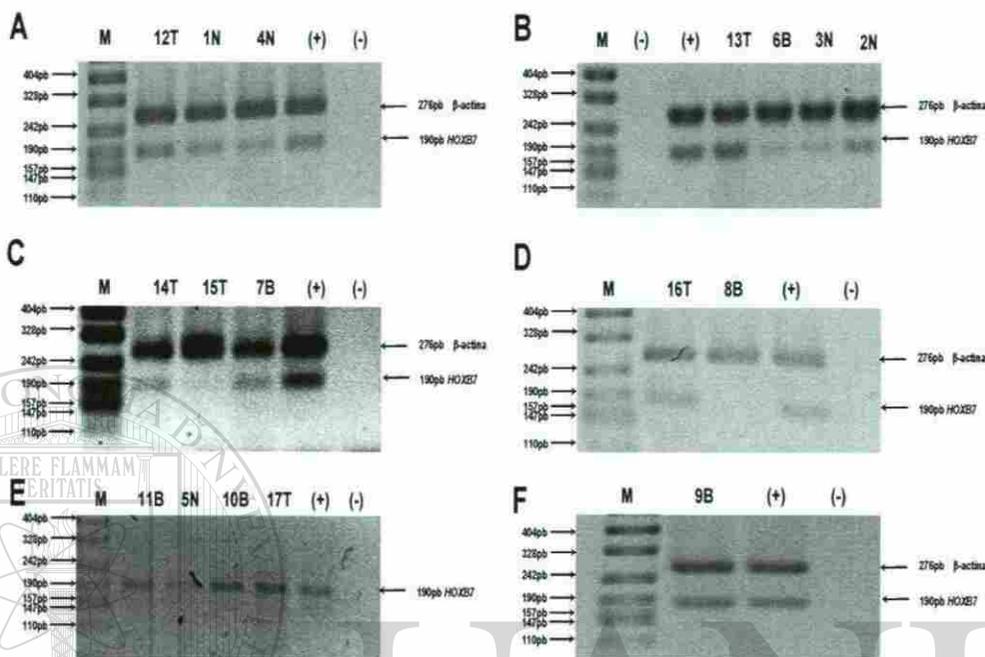


Figura 34. Amplificación de *HOXB7* en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 1.2% muestran la amplificación de *HOXB7* en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones de estandarización. La expresión de *HOXB7* con la banda de amplificación de 190pb se observa en todas las muestras de tejido ovárico normales (1N al 5N), con patología benigna 6B, 7B, 9B, 10B y 11B y en todas las muestras con patología maligna (12T al 17T). Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen β -actina. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado PBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

7.2.2.7. Amplificación de *HOXB13* en tejidos ováricos con patología maligna

Los geles de agarosa al 2.0% en la Figura 35 muestran la amplificación de *HOXB13* en tejido ovárico y en la línea celular SiHa utilizada como control positivo. La expresión de *HOXB13* con la banda de amplificación de 300pb no se detectó en ninguna de las muestras normales (1N al 5N), pero se expresa en una muestra de tejido con patología benigna y en todas las muestras de tejido ovárico con patología maligna (12T al 17T). Estos resultados muestran una clara tendencia de la expresión del gen *HOXB13* en los tejidos con patología maligna ($p=0.0006$).

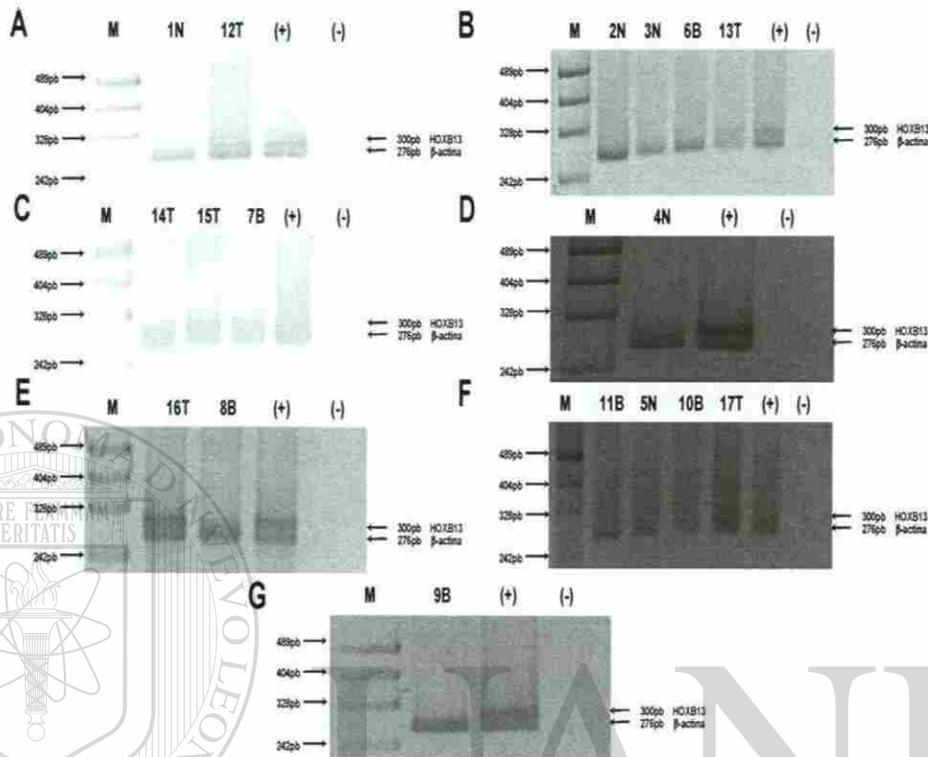


Figura 35. Amplificación de *HOXB13* en tejidos ováricos. Las electroforesis en gel de agarosa al 2.0% muestran la amplificación de *HOXB13* en tejido ovárico de acuerdo a las condiciones de estandarización. La expresión de *HOXB13* con la banda de amplificación de 300pb no se observa en ninguna de las muestras de tejido ovárico normales (1N al 5N), pero se observa en la muestra de tejido con patología benigna 7B y en todas las muestras con patología maligna (12T al 17T). Todas las amplificaciones se realizaron mediante PCR duplex con el control interno de 276pb del gen β -actina. El carril (-) contiene la reacción de PCR sin DNAc's blanco y el carril (+) contiene la amplificación de los DNAc's de SiHa utilizados como testigos positivos. El marcador de peso molecular utilizado pBS sk digerido con la enzima de restricción *Msp* I se encuentra en el carril M.

En resumen la expresión de los genes *HOXA7*, *9*, *10*, *11*, *B7* y *B13* en los tejidos ováricos normales, con y sin patología maligna analizados en esta tesis (Figura 36) muestra que los genes *HOXA10* transcrito 2, *A11* y *B13* presentan una diferencia significativa en la expresión de los tejidos no malignos en comparación con los malignos. La expresión preferencial de los genes *HOXA10* transcrito 2 y *HOXA11* en los tejidos ováricos malignos fue estadísticamente significativa ($p=0.0427$). De estos tres genes, la diferencia significativa más evidente la podemos observar en el gen *HOXB13* ($p=0.0006$), por lo que se decidió realizar la cuantificación relativa de *HOXB13* mediante PCR tiempo real para determinar de una forma más precisa los resultados obtenidos.

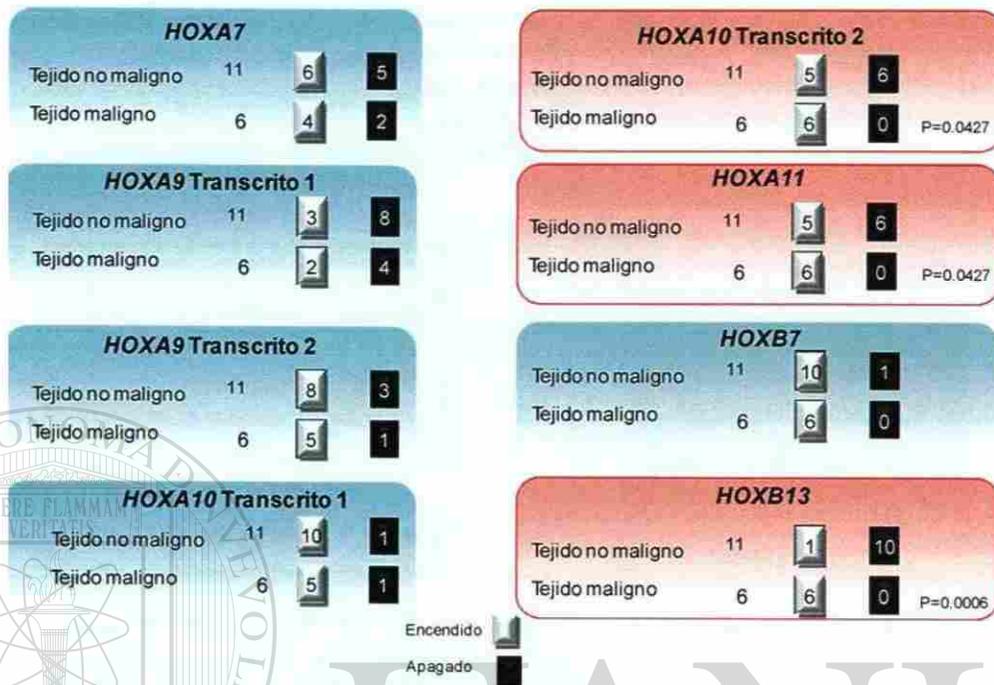


Figura 36. Expresión diferencial de los genes *HOXA7*, *9*, *10*, *11*, *B7* y *B13* en tejidos ováricos. En la tabla se muestra un resumen de la expresión de los genes *HOX* analizados en el tejido ovárico no maligno (muestras normales y con patología benigna) y maligno (muestras con patología maligna). Se encontró una expresión diferencial significativa en la expresión de *HOXA10* transcrito 2, *A11* y *B13* entre los tejidos ováricos no malignos y malignos analizados (cuadro rojo).

7.3. Cuantificación de la expresión de *HOXB13* mediante PCR tiempo real

Para cuantificar la expresión de *HOXB13* en las muestras de tejido ovárico, se realizó la estandarización de la reacción de PCR tiempo real del gen *HOXB13* y de β -actina con los DNAc's previamente obtenidos de la línea celular SiHa.

7.3.1. Estandarización de la expresión del gen β -actina en células SiHa

Para la estandarización de la cuantificación de la expresión de β -actina mediante PCR tiempo real se realizó una curva estándar que permite determinar la eficiencia de la reacción de amplificación con los oligonucleótidos limitados de β -actina marcados con sondas Taqman® y con el fluoróforo VIC (Applied Biosystems). La Figura 37A muestra la amplificación de β -actina en los DNAc's de las células SiHa mediante la acumulación de fluorescencia por los productos amplificados de una región del transcrito de β -actina. En la Figura 37B se muestra la eficiencia de la reacción de PCR con las condiciones usadas en la pendiente de una regresión lineal de los C_T obtenidos y del logaritmo en base 10 de las concentraciones de RNA's totales a partir de los cuales se sintetizaron los



DNAc's contenidos en la reacción de PCR. La pendiente obtenida es de -3,488 y mediante la fórmula $E = 10^{[-1 \text{ pendiente}]}$ se obtuvo la eficiencia (E)=1.935. Esta eficiencia fue considerada adecuada ya que la recomendada para llevar a cabo adecuadamente el análisis de los datos de expresión génica relativa puede variar en un rango del 90-110% (Nolan *et al.*, 2006). Debido a que la eficiencia obtenida del 93.5% con los iniciadores para β -actina usados en la reacción de PCR, no fue necesario la optimización de la reacción.

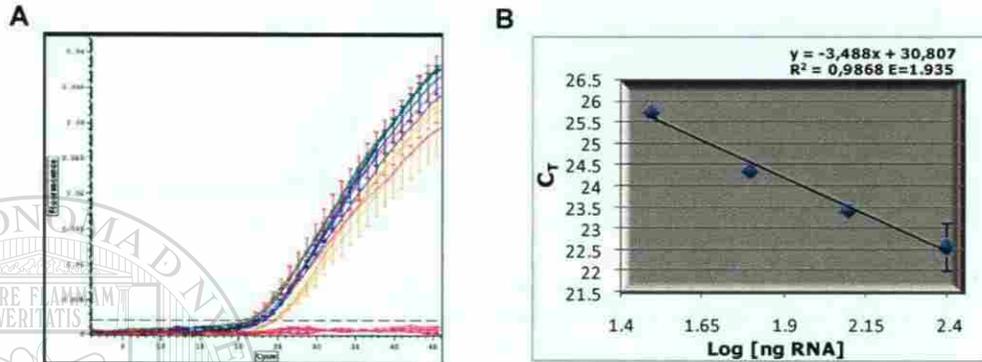


Figura 37. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan® para cuantificar la expresión para el gen constitutivo β -actina en los DNAc's de las células SiHa. Se realizó una curva de calibración utilizando diluciones seriadas por duplicado de los DNAc's de la línea celular SiHa con los oligonucleótidos para el gen β -actina usando en el termociclador Chromo 4™. A) Curvas de amplificación del gen β -actina obtenidas en el programa Opticon Monitor™ a partir de las concentraciones de 250, 125, 75, 37.5 y 0 ng (control negativo) de los RNA's totales obtenidos de la línea celular SiHa. B) Curva estándar donde se grafica el C_T contra el logaritmo de la concentración de RNA's en cada dilución (se muestra el promedio y la desviación estándar de cada duplicado). La ecuación de la línea de regresión, el valor de R² y la eficiencia (E) se indican en la parte superior de la gráfica. La eficiencia (E=1.935) fue calculada a partir de la fórmula $E = 10^{[-1 \text{ pendiente}]}$ y la eficiencia en por ciento $1-E \times 100$ es igual a 93.5%.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

7.3.2. Amplificación del gen *HOXB13* en células SiHa

La estandarización de *HOXB13* se llevo a cabo con una curva estándar para determinar la eficiencia de la reacción de PCR con los oligonucleótidos de *HOXB13* marcados con sondas Taqman® y con el fluoróforo FAM. La Figura 38A muestra las curvas de amplificación del gen *HOXB13* en los DNAc's de las células SiHa obtenidas en el termociclador Cromo 4™ y graficadas por el programa Opticon Monitor™. La curva estándar se realizó con diluciones seriadas de 1/2 de los DNAc's y para evaluar la eficiencia de la reacción de PCR en éstas condiciones se obtuvo la pendiente en la línea de tendencia de una regresión lineal de los C_T obtenidos en cada reacción de PCR y del logaritmo en base 10 de las concentraciones de RNA total a partir de las cuales fue sintetizado el DNAc contenido en la reacción como se observa en la Figura 38B. La pendiente obtenida mostró una eficiencia del 92%, que se encuentra dentro del rango especificado para realizar la cuantificación de la expresión génica sin la necesidad de optimizar ninguno de los componentes de la reacción de PCR.

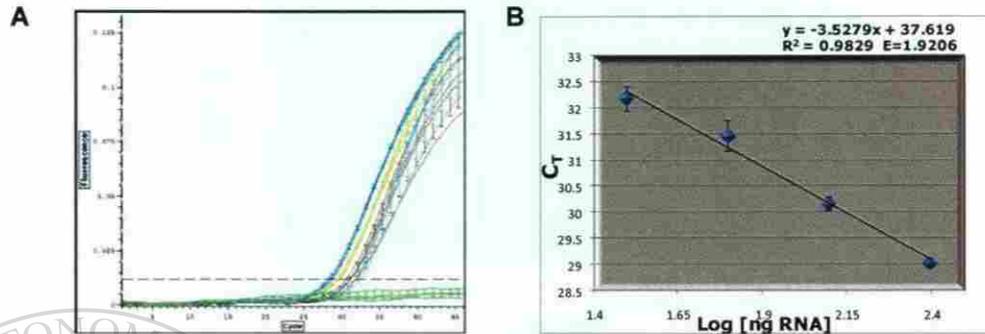


Figura 38. Eficiencia de los oligonucleótidos marcados con sondas TaqMan® para cuantificar la expresión para el *HOXB13* mediante RT-PCR tiempo real en los DNAc's de las células SiHa. La curva estándar se llevó a cabo con diluciones seriadas de los DNAc's de la línea celular SiHa con los oligonucleótidos para la amplificación del gen *HOXB13* en el termociclador Chromo 4™. A) Las curvas de amplificación del gen *HOXB13* se obtuvieron usando el programa Opticon Monitor™ a partir de las concentraciones de 250, 125, 75, 37.5 y 0 ng (control negativo) de los RNA's totales de la línea celular SiHa a partir del cual se sintetizaron los el DNAc's. B) La gráfica muestra el C_T contra el logaritmo de la concentración de los RNA's en cada dilución (promedio y desviación estándar de cada duplicado). La ecuación de la línea de regresión, el valor de R² y la eficiencia (E) se muestran en la parte superior de la gráfica. La eficiencia (E=1.9206) fue calculada a partir de la fórmula $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ y la eficiencia en por ciento 1-Ex100 es igual a 92%.

7.3.3. Cuantificación relativa de *HOXB13* en SiHa

Los valores de los C_T obtenidos en cada una de las curvas estándar fueron corregidos de acuerdo a la fórmula 4 (ver Materiales y Métodos), para realizar la normalización de acuerdo a la eficiencia de amplificación para cada gen. Posteriormente, se obtuvo el $\Delta\Delta C_T$, restando los C_T's de la amplificación del gen *β-actina* a los valores de C_T obtenidos de la amplificación del gen *HOXB13*. La Figura 39 muestra los resultados de los $\Delta\Delta C_T$ con la concentración de los RNA's totales en ng a partir de los cuales se sintetizaron los DNAc's utilizados en la reacción de PCR. La pendiente obtenida ($6E^{-05}$) corresponde al valor de la sugerida para la validación de éste método (menor o igual a 0.1), que indica que la diferencia en la expresión entre el gen de referencia (*β-actina*) y el gen problema (*HOXB13*) no presenta variaciones significativas en diferentes concentraciones de los DNAc's.

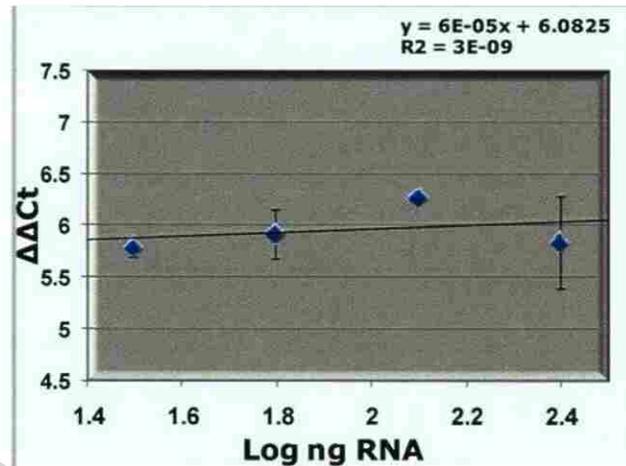


Figura 39. Validación del método $\Delta\Delta C_T$ para la cuantificación relativa de expresión génica de *HOXB13* mediante PCR tiempo real. A los C_T obtenidos para las curvas estándar del gen *HOXB13* se les restaron los C_T obtenidos para el gen β -actina (previamente normalizados por la eficiencia de la reacción de PCR para cada gen) obteniendo así el ΔC_T para cada una de las concentraciones de los RNA's totales a partir de la cual se realizó la RT-PCR. La gráfica muestra el $\Delta\Delta C_T$ contra el logaritmo de la concentración de RNA en cada dilución (promedio y desviación estándar de cada duplicado) y se indica en la parte superior de la gráfica la ecuación de la línea de regresión y el valor de R^2 .

7.4. Cuantificación relativa de la expresión de *HOXB13* en los tejidos ováricos

La cuantificación de la expresión de PCR tiempo real del gen *HOXB13* y el gen β -actina se realizó mediante los DNAs de los tejidos ováricos previamente obtenidos para la amplificación de los genes *HOX* mediante PCR punto final.

La cuantificación relativa del gen *HOXB13* se realizó mediante la amplificación de PCR tiempo real de los genes *HOXB13* y β -actina en los tejidos ováricos normales (n=5), con patología benigna (n=6), y con patología maligna (n=6). Una vez obtenidos los valores de C_T para cada reacción se llevó a cabo la normalización de éstos valores y se aplicó la fórmula del método $\Delta\Delta C_T$ previamente validado para estas condiciones utilizando como valor calibrador el $\Delta\Delta C_T$ de la muestra de tejido ovárico normal 5N que se comprobó mediante examen microscópico como ovario normal (comunicación personal del Dr. Raúl Garza Garza). Lo anterior permitió obtener la cuantificación relativa de expresión de *HOXB13* que representa el número de veces más que se encuentra aumentada la expresión con respecto al calibrador. La Tabla IX muestra la cuantificación de los resultados obtenidos de la expresión de *HOXB13* en escala normal y logarítmica. Debido a la diferencia en la magnitud de los resultados en la expresión de *HOXB13* relativa a la muestra normal de ovario se decidió utilizar los datos en escala logarítmica base 10 para una mejor cuantificación y análisis de los datos.

El análisis de la cuantificación de la expresión de *HOXB13* en los tejidos ováricos normales en la Figura 40A en escala logarítmica muestra una diferencia clara



en los valores obtenidos en los tejidos ováricos y benignos con la excepción de la muestra de tejido ovárico benigno 7B que muestra valores definitivamente en el rango de los obtenidos en las muestras de tejido ovárico con patología maligna.

Interesantemente, estos valores de cuantificación de los transcritos de *HOXB13* mediante tiempo real corresponden predominantemente con los resultados obtenidos mediante PCR tiempo final. Inclusive muestran la expresión positiva de *HOXB13* en una sola muestra de tejido benigno (Figura 40B) que corresponde efectivamente a la misma muestra 7B. Por otro lado, la comparación de los niveles de expresión de *HOXB13* en las muestras de tejido maligno (12T, 16T y 17T) presentan valores en los límites de las muestras con patología no maligna. No obstante, la Figura 24C muestra que cuando se realiza la prueba estadística de t-student en los resultados de la cuantificación relativa de *HOXB13* y los obtenidos mediante PCR punto final de *HOXB13*, fue negativa y positiva con una diferencia estadísticamente significativa ($p=0.0001$). Esto indica objetivamente la relación que mantienen los resultados obtenidos en la expresión diferencial de *HOXB13* mediante PCR punto final y la cuantificación del transcrito de *HOXB13* mediante PCR tiempo real.

Por otro lado, en la Figura 41A se muestran los promedios y las desviaciones estándar de los valores en escala logarítmica de la cuantificación relativa de *HOXB13* para cada tipo de tejido ovárico analizado (normal, patología benigna y maligna). El análisis estadístico en la Figura 41B muestra claramente que existe un aumento en la expresión relativa de *HOXB13* en muestras de tejido ovárico con cáncer en comparación con tejidos ováricos normales y con patología benigna ($p<0.05$).

Tabla IX. Cuantificación Relativa del gen *HOXB13* en muestras de tejido ovárico

Muestra de tejido ovárico	Expresión de <i>HOXB13</i> relativa a muestra normal de ovario (Escala normal)	Escala logarítmica: Expresión de <i>HOXB13</i> relativa a una muestra normal de ovario (Escala logarítmica)
1N	84 7795±0 7483	1 9283±0 0038
2N	24 679 1±1 4792	1 3919±0 0260
3N	49 996 1±1 8348	1 6988±0 0159
4N	11 414 1±0 9320	1 0567±0 0355
5N	1 0191±0 2779	0 0000±0 0000
6B	0 6282±0 1988	0 2130±0 1397
7B	2314 6704±515 2552	3 3590±0 0975
8B	86 1265±48 9172	1 8969±0 2614
9B	0 3290±0 0377	0 4842±0 0499
10B	19 3095±4 4366	1 2799±0 1007
11B	10 568 1±2 0183	1 0200±0 0835
12T	102 2466±3 0811	2 0096±0 0131
13T	1015 5514±78 7351	3 0060±0 0337
14T	712 7877±453 9923	3 8037±0 2979
15T	4985 6145±228 1554	3 6975±0 0199
16T	76 3892±1 73423	1 8829±0 0098
17T	122 54618±17 1107	2 0862±0 0608



A Cuantificación relativa de la expresión de *HOXB13* mediante PCR tiempo real



B Expresión de *HOXB13* en tejido ovárico mediante PCR punto final

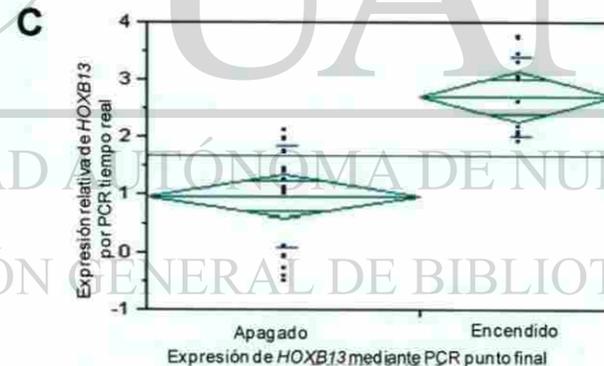


Figura 40. Cuantificación relativa del gen *HOXB13* mediante PCR tiempo real en tejidos ováricos normales, y con patología benigna y maligna. la cuantificación de la expresión génica de *HOXB13* se realizó mediante PCR tiempo real de los genes β -actina y *HOXB13* por duplicado en los DNAc's obtenidos de los tejidos de ovario, usando el método $\Delta\Delta C_T$. A) Las barras muestran la cuantificación de la expresión génica de *HOXB13* (media y desviación estándar) en escala logarítmica en las muestras de tejidos ováricos normales (azul), con patología benigna (naranja) y maligna (rojo). B) Resumen de la expresión de *HOXB13* en muestras de tejido ovárico utilizando PCR punto final. C) La grafica muestra que los valores de la cuantificación relativa (escala logarítmica) de *HOXB13* en el apagado y encendido de muestras apagadas de *HOXB13* son menores significativamente ($p < 0.0001$) que las muestras con este gen encendido.

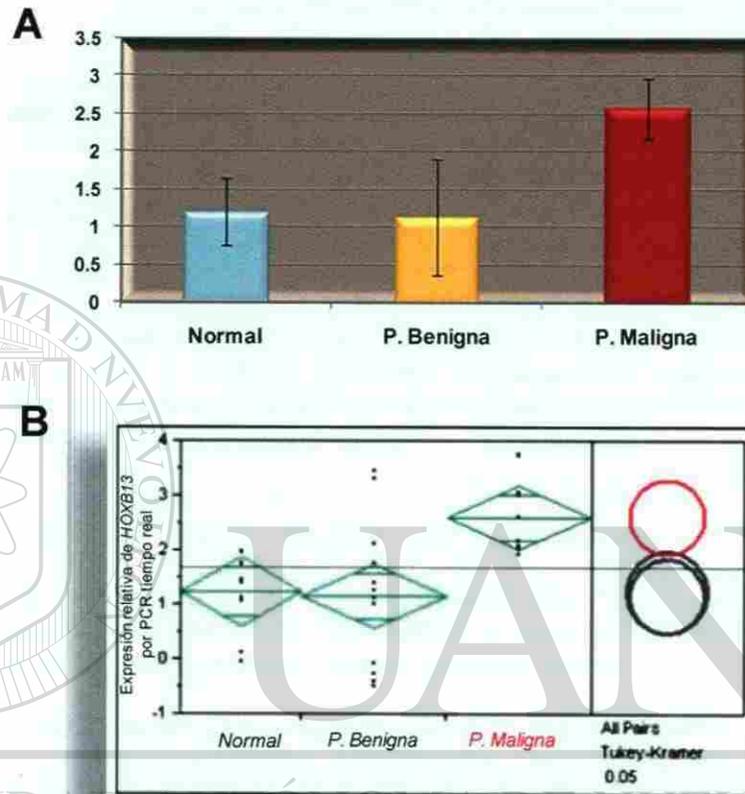


Figura 41. Cuantificación relativa del gen *HOXB13* mediante PCR tiempo real en tejidos ováricos normales, y con patología benigna y maligna. La cuantificación de la expresión génica de *HOXB13* se realizó mediante PCR tiempo real de los genes β -actina y *HOXB13* por duplicado en los DNAs obtenidos de los tejidos de ovario usando el método $\Delta\Delta C_T$. A) Las barras muestran la cuantificación de la expresión génica de *HOXB13* (media y límites de confianza) en escala logarítmica en los tejidos ováricos normales, y con patología benigna y maligna. B) La prueba de contrastes de HSD (diferencia honesta significativa) de Tukey mostró diferencia significativa en la cuantificación relativa de *HOXB13* entre el tejido maligno y los tejidos normales y con patología benigna ($p < 0.05$).



8. DISCUSION

En esta tesis se analizó la expresión de los genes *HOXA7*, *A9*, *A10*, *A11*, *B7* y *B13* mediante PCR punto final en 17 muestras de tejidos ováricos que incluyeron 6 muestras con patología maligna y once muestras de tejido normal (n=5) y patología benigna (n=6). Además, se cuantificó la expresión relativa de *HOXB13* mediante PCR tiempo real. Para llegar a este propósito, se llevó a cabo la estandarización de la RT-PCR punto final en las líneas celulares SiHa, MCF-7 y en el tejido de placenta, así como la estandarización de la amplificación mediante PCR tiempo real del gen *HOXB13* en la línea celular SiHa. La amplificación de los genes HOX en los tejidos ováricos mostraron la expresión diferencial en tejidos malignos de *HOXA10* transcrito 2 (p=0.0427), *HOXA11* (p=0.0427) y *HOXB13* (p=0.0006) mediante PCR punto final. Además, mediante PCR tiempo real se confirmó la sobre-expresión del gen *HOXB13* en muestras de ovario con patología maligna (p<0.05).

Para la estandarización de la reacción de PCR punto final, primero se realizó el diseño de los oligonucleótidos específicos para la amplificación de estos genes y se utilizó la amplificación virtual para cada par de oligonucleótidos, para verificar la presencia de dímeros de iniciadores, la amplificación de bandas inespecíficas y el peso molecular del producto amplificado. La unión de los oligonucleótidos diseñados a otras secuencias fue descartada mediante el uso del programa BLAST.

Los RNA's totales de las líneas celulares y el tejido de placenta, utilizados para estandarizar las reacciones de PCR y como controles positivos de las amplificaciones, se obtuvieron mediante la técnica de Trizol. La integridad de los RNA's totales se corroboró mediante la observación de las bandas más abundantes 28S y 18S de RNA ribosomal en la electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, mientras que la cantidad y calidad de los RNA's se obtuvo mediante espectrofotometría de luz ultravioleta. Se observó la integridad de buena calidad de los RNA's tanto en los obtenidos de los paquetes celulares de SiHa y MCF-7 como del tejido de placenta humana conservado en RNAlater®. La transcripción reversa se realizó a partir de 5 µg de los RNA's totales obtenidos, y se corroboró la eficiencia de la reacción mediante la amplificación de β -actina. Excepcionalmente los RNA's obtenidos en SiHa, MCF-7 y placenta resultaron altamente eficiente ya que para la amplificación de este gen en las líneas celulares y en el tejido de placenta, aún con una dilución 1/10 de los DNAc's se obtuvieron bandas de amplificación prominentes.

La reacción de amplificación para los genes *HOXA7*, *A9* transcrito 1 y 2, *A11*, *B7* y *B13* se estandarizó en la línea celular SiHa, mientras que el gen *HOXA10* transcrito 1 se realizó en la línea celular MCF-7, y el transcrito 2 del gen *HOXA10* en el tejido de placenta de acuerdo en lo descrito previamente por Alami *et al.*, (1999), Chu *et al.*,



(2004) y Sarno *et al.*, (2006) respectivamente. Adicionalmente, se pudo observar que las células SiHa muestran la expresión de *HOXA7* lo que contradice a Alami *et al.* (1999), esto podría deberse a los rearrreglos cromosómicos que sufren las líneas celulares transformadas durante la división celular en los diferentes pasajes a los que están sujetas.

El gen *HOXA10* transcrito 1 fue amplificado en la línea celular MCF-7 según lo referido por Chu *et al.*, en el 2004, de la misma forma el transcrito 2 del gen *HOXA10* también fue amplificado, aunque débilmente, en la línea celular MCF-7, esto no estaba descrito por Chu *et al.*, ya que los oligonucleótidos utilizados en su trabajo sólo amplificaron el transcrito 1. Debido a la expresión débil de *HOXA10* transcrito 2 en la línea celular MCF-7 se decidió buscar su expresión en el tejido de placenta ya que Li *et al.*, en el año 2004 publicaron la secuencia del gen *HOXA10* transcrito 2 derivado del tejido de placenta. En apoyo a esto Sarno *et al.*, (2006) refieren la importancia del gen *HOXA10* en la implantación y el desarrollo de las células de la decidua.

La estandarización de la amplificación de los genes *HOX* y del control endógeno β -actina, en primera instancia se llevó a cabo mediante la amplificación en monoplex, ajustando la temperatura de alineamiento y la concentración del Cloruro de Magnesio en la reacción de PCR. Posteriormente, se realizó la estandarización de la reacción de PCR en dúplex, es decir, simultáneamente la expresión del gen *HOX* y del control endógeno β -actina adecuando en cada caso los parámetros ya mencionados.

Los RNA's totales de las muestras de tejidos ováricos se obtuvieron mediante la misma técnica utilizada para las líneas celulares y el tejido de placenta. De la misma manera, se corroboró la integridad y la pureza de los RNA's. Los tejidos conservados en RNAlater® mostraron una calidad muy similar a la que se obtuvo de los paquetes celulares de SiHa y MCF-7 como del tejido de placenta humana conservado en RNAlater®. La pureza de los RNA's totales estimada mediante una Abs 260/280 varió de 1.13 a 2.4, y la RT-PCR del gen β -actina fue muy similar cualitativamente en todas las muestras. En contraste los tejidos ováricos que fueron preservados y transportados en Trizol no mostraron una adecuada integridad de los RNA's en la electroforesis en gel del agarosa. Estos resultados muestran la mejor preservación de los RNA's totales en los tejidos almacenados en RNAlater® en comparación con trizol.

El análisis de la expresión de los genes *HOX* en los tejidos ováricos mediante PCR punto final se validó mediante el PCR en duplex con el control endógeno β -actina, ya que permitió descartar aquellas amplificaciones negativas en las cuales el gen β -actina no tuviera una expresión cualitativamente parecida al control positivo (expresión de β -actina en la línea celular SiHa). La amplificación del control interno en la misma reacción de PCR que el gen problema garantiza la integridad de los DNAC's analizados, por lo que cuando no se obtiene la banda de amplificación del gen problema y se observa la banda correspondiente al control interno se pueden descartar problemas técnicos atribuibles a degradación de RNA's o de los DNAC's. Aunado al control interno, por cada reacción de PCR se realiza un control positivo de la reacción de PCR y un testigo negativo, el cual contiene los reactivos para llevar a cabo la amplificación pero sin DNAC's. Los controles de la reacción de PCR nos permiten descartar errores



técnicos durante la realización de la misma, ya sea la falta de uno o más reactivos, o la contaminación cruzada entre muestras y el control positivo (Barrera *et al.*, 1993).

El gen *HOXA7* se encontró expresado en cuatro de las muestras de tejido ovárico con patología maligna (n=6), en dos muestras de tejido con patología benigna (n=6), y en cuatro muestras normales (n=5), es decir no se encontró diferencia significativa de la expresión de este gen entre tejidos, lo cual no corresponde a lo descrito por Naora *et al.*, en el año 2001, donde encuentra la expresión de *HOXA7* en muestras de cáncer de ovario moderadamente diferenciado y en muestras de patología benigna de ovario, no detecta su expresión en células epiteliales ováricas obtenidas por raspado y en la línea celular IOSE. Además, estos mismos autores encontraron anticuerpos en suero para la proteína *HOXA7* en títulos elevados en un 60% de los pacientes con patología maligna de ovario moderadamente diferenciada y patología benigna de ovario, comparado con los títulos encontrados con los pacientes normales. Sorprendentemente, se encontró más variación en las cifras de títulos de anticuerpos obtenidas para los pacientes con patología benigna de ovario con respecto a los pacientes sanos. Sin embargo, estos mismos autores mencionan la presencia mediante inmunohistoquímica de la proteína *HOXA7* en inclusiones epiteliales de los ovarios normales. Por otro lado, si se toma en cuenta que los folículos ováricos expresan *HOXA7* durante sus diferentes estadios (Ota *et al.*, 2006), se podría explicar la amplificación del gen *HOXA7* en muestras normales de ovario analizadas en este trabajo, ya que estos tejidos se obtuvieron del ovario completo. Interesantemente, Naora *et al.*, en el 2001 no indican si las muestras de tejido normal fueron obtenidas de los mismos pacientes de los cuales se obtuvo la muestra de sangre periférica de pacientes sanos. El gen *HOXA7* ha sido relacionado con el grado de diferenciación celular en las células epiteliales ováricas (Naora *et al.*, 2001; Cheng *et al.*, 2005), en contraste con la inhibición de la diferenciación celular de los queratinocitos humanos, descrita por La Celle y Polakowska (2001).

Debido a que *HOXA7* se encontró en 10 de 17 muestras de tejido ovárico analizadas y a la fuerte evidencia de los niveles de expresión de este gen, así como los títulos de anticuerpos, se deberían analizar los niveles de expresión mediante PCR tiempo real.

La expresión de *HOXA9* transcrito 1 se encontró en dos muestras normales, en una muestra de tejido con patología benigna y en dos muestras de tejido ovárico con patología maligna. Así mismo, la expresión de *HOXA9* transcrito 2 se encontró en cuatro muestras de tejido ovárico normales, en cuatro muestras con patología benigna y en cuatro con patología maligna. Ninguno de los dos transcritos de *HOXA9* muestra una diferencia significativa en su expresión entre las muestras con y sin patología maligna de ovario. El análisis de las secuencias reportadas en la librería de genes que se realizó al iniciar el trabajo experimental, sugirió la presencia de un segundo transcrito de *HOXA9*, por lo que se decidió realizar el diseño de oligonucleótidos para su amplificación y determinar su presencia en las muestras de tejido ovárico. El gen *HOXA9* transcrito 2 se encontró en carcinoma de colon y en una línea celular de carcinoma embrional, pero no se ha tomado en cuenta en estudios posteriores. Cheng *et al.*, en el año 2005 describen el desarrollo de cáncer epitelial de ovario en modelos murinos de características histopatológicas muy parecidas a las observadas en cáncer epitelial seroso al transfectar



el DNAc codificante de *HOXA9* transcrito 1 en células de epitelio ovárico murino e inocular peritonealmente estas células transformadas. Los controles normales utilizados en este trabajo son líneas celulares del epitelio superficial del ovario transformadas, y no con el tejido ovárico. No se ha descrito la expresión de *HOXA9* en ninguno de los tipos celulares presente en el ovario, por lo que la presencia de *HOXA9* en muestras de tejido normal de ovario, podría ser explicada por que este gen se exprese en alguna otra estructura ovárica fuera del epitelio.

La amplificación de *HOXA10* transcrito 1 se encontró en la mayor parte de los tejidos analizados. Por el contrario, la expresión diferencial del transcrito 2 del gen *HOXA10* es estadísticamente significativa ($p=0.0427$), detectándose su expresión preferentemente en tejidos con patología maligna. Cheng *et al.*, (2005), con la misma metodología empleada para el gen *HOXA9*, describen el desarrollo de cáncer epitelial de ovario en modelos murinos de características similares a las observadas en cáncer epitelial endometriode. El transcrito detectados por estos autores corresponde únicamente al transcrito 1. Contrariamente, Cheng *et al.*, no encuentra la expresión de este transcrito en epitelio superficial de ovario y tampoco en las líneas celulares transformadas derivadas de epitelio ovárico. Hasta el momento no se había descrito la presencia de *HOXA10* transcrito 2 en cáncer de ovario, ni en el ovario normal. Este transcrito fue reportado en el banco de genes de la NCBI por primera vez en el año 2001 por Xu *et al.*, en el tejido de carcinoma hepatocelular, y posteriormente en el carcinoma epidermoide de glándula salival, en la placenta y en el rabdiomiosarcoma. Como se muestra en la Figura 42 la isoforma del transcrito 2 de este gen presenta el homeodominio, así mismo, en la secuencia nucleotídica se observan diferencias en la región 5'UTR y región codificante comparada con el transcrito 1, que es una isoforma más corta y con diferente región N-terminal que la isoforma resultante del transcrito 1.

La expresión de *HOXA10* transcrito 2 preferencialmente en los tejidos ováricos malignos constituye la primer evidencia *in vivo* con potencial para ser analizado en esta neoplasia.

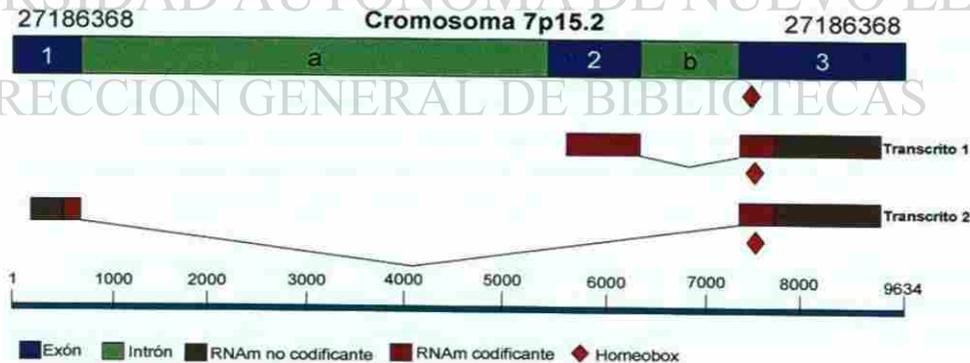


Figura 42. Splicing diferencial de *HOXA10*. El gen *HOXA10* se localiza en el cromosoma 7p15.2, y está constituido de dos exones y dos intrones que son eliminados junto con el exón 1 por splicing para producir el transcrito 1 de 2.64 Kpb y mediante splicing diferencial se produce otro transcrito de 2.23. Realizado a partir de las secuencias GB: NM_004502.3, NM_006896.3, y NC_000007.12.



La expresión diferencial del gen *HOXA11* en los tejidos ováricos es estadísticamente significativa ($p=0.0427$), su amplificación se obtuvo en tres muestras normales, en dos tejidos con patología benigna y en todas las muestras de tejido ovárico con patología maligna, es decir, presenta una tendencia de expresión en los tejidos ováricos con patología maligna. Los estudios de este gen descritos a la fecha en cáncer de ovario se realizaron en cultivo celular mediante la transfección estable de la secuencia codificante de *HOXA11* en la línea celular transformada derivada de epitelio de ovario (MOSE) y posteriormente inoculada peritonealmente en modelos murinos (Cheng *et al.*, 2005). Los resultados mostraron el desarrollo de tumores sólidos con características histopatológicas similares a las encontradas en tumores mucinosos. Previamente, en este estudio no se encontró la expresión de este gen en las líneas celulares MOSE a las cuales se les transfeció la secuencia codificante de *HOXA11*. La presencia de este gen no se ha descrito en ninguna otra estructura del ovario. *HOXA11* se ha encontrado expresado en tejido de melanoma humano, y no así en nevus, lo que sugiere la participación en el desarrollo o en la biología del melanoma, aunque no se ha determinado claramente su papel (Wong *et al.*, 2004). Contrariamente Whitcom *et al.*, en 2003 encuentran que la metilación del promotor del gen *HOXA11* es de pobre pronóstico para carcinoma endometrial, debido al papel que desempeña *HOXA11* en mantener la naturaleza de plasticidad del endometrio, es posible que los cambios epigenéticos en *HOXA11* alteren su expresión y puedan contribuir al desarrollo de malignidad endometrial. Interesantemente, no se ha propuesto un mecanismo mediante el cual la metilación de este gen se lleve a cabo.

La presencia del transcrito de *HOXA11* en todas las muestras de tejido analizados constituye la primera evidencia de la expresión de *HOXA11* en tejidos *in vivo* en cáncer de ovario. Estos resultados permiten postular a *HOXA11* como gen con potencial para el desarrollo de esta neoplasia que debe de ser verificado mediante PCR tiempo real y analizado en un mayor número de muestras, así como la probable vía de señalización en la que interviene.

Por otro lado, en las muestras analizadas de tejido ovárico sin patología maligna la co-expresión de los genes *HOXA10* transcrito 2 y *HOXA11* se observa en 4 de las 11 muestras analizadas. Sin embargo en las muestras de tejido maligno de ovario se pudo detectar la co-expresión de estos dos genes en las 6 muestras analizadas. Por lo que se podría posteriormente seguir analizando la significancia tanto clínica como molecular de la presencia de estos genes en los tejidos ováricos con patología maligna.

El gen *HOXB7* se encontró en la mayoría de las muestras de tejido ovárico analizadas, tanto en tejidos con y sin patología maligna de ovario. Contrariamente, Naora *et al.*, en el año 2001, encontraron una baja expresión de *HOXB7* en células epiteliales ováricas, y en líneas celulares derivadas del epitelio ovárico transformadas, en contraste, con el aumento en la expresión de este gen en muestras de tejido ovárico maligno moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados. Además Naora *et al.*, (2001) encontraron la presencia de altos niveles de anticuerpos antiHOXB7 en solamente el 30% de los pacientes con cáncer de ovario, y ningún título elevado en los pacientes normales. Por otro, lado Cheng *et al.*, (2005) mediante la co-transfección del



gen *HOXB7* y de *HOXA9*, *HOXA10* o *HOXA11*, en líneas derivadas del epitelio de ovario transformadas e inoculadas intraperitonealmente en modelos murinos, encuentran el desarrollo de la neoplasia ovárica pobremente diferenciada, sin afectar el subtipo histopatológico determinado por los genes *HOXA9*, *HOXA10* y *HOXA11* (seroso, endometriode y mucinoso respectivamente). Recientemente, Yamashita *et al.*, 2006 encuentran a *HOXB7* altamente expresado (>300 veces) en 5 líneas celulares de cáncer de ovario en comparación a células epiteliales ováricas obtenidas por raspado mediante la técnica de PCR tiempo real. Estos resultados pueden explicarse debido a que la técnica utilizada en el trabajo de Naora *et al.*, para amplificar la expresión de *HOXB7* fue RT-PCR punto final por lo que no se pueden detectar los niveles de expresión, solamente la ausencia y presencia de los genes analizados (Reinhold *et al.*, 2001). Debido a lo anterior, los niveles de expresión de *HOXB7* en las muestras ováricas analizadas deberían ser verificados mediante PCR tiempo real para determinar el probable papel de *HOXB7* en esta neoplasia.

La expresión diferencial del gen *HOXB13* en muestras de tejido ovárico muestra una clara tendencia a la amplificación en tejidos con patología maligna, en comparación con aquellos sin patología maligna ($p=0.0006$). Con la excepción que este gen se expresa en solamente una muestra de tejido con patología benigna de ovario. Debido a la clara tendencia de expresión de este gen mediante la técnica de PCR punto final, se decidió corroborar los resultados obtenidos mediante PCR tiempo real.

Para la estandarización de la reacción de PCR tiempo real, se utilizaron los oligonucleótidos con sondas Taqman MMG® de Applied Biosystem para los genes β -actina y *HOXB13*. Se realizó una curva de calibración estándar para cada uno de estos genes utilizando a la línea celular SiHa, para determinar la eficiencia de la reacción de PCR con oligonucleótidos diseñados y así establecer el umbral de detección para la fluorescencia. Posteriormente, los DNAc's obtenidos previamente de los RNA's de las muestras de tejidos ováricos, fueron utilizados para el análisis de la expresión relativa de *HOXB13* mediante PCR tiempo real. Los valores de C_T 's obtenidos para el gen *HOXB13* fueron normalizados por el gen β -actina, y por la eficiencia de la reacción de PCR, y se comparó contra los valores obtenidos de la muestra de ovario normal confirmada mediante histopatología por el Dr. Raúl Garza. Los resultados obtenidos con PCR tiempo real corroboran a los encontrados con PCR punto final, se observó una mayor expresión relativa de *HOXB13* (desde 76 hasta 4985 veces) en muestras de patología maligna de ovario comparada con las muestras normales y con patología benigna, diferencia estadísticamente significativa ($p<0.05$). Interesantemente, en donde se observó una mayor desviación estándar, es decir variación entre los valores, fue en las muestras con patología benigna de ovario. Esto podría deberse a que las muestras fueron obtenidas de una población heterogénea. Los resultados obtenidos concuerdan con lo descrito por Yamashita *et al.*, en el 2006, quienes encontraron mediante PCR tiempo real la sobre-expresión de éste gen en más de 300 veces (sin especificar los valores exactos) en líneas celulares en comparación con células de epitelio normal de ovario. El gen *HOXB13* se encuentra relacionado o involucrado en el proceso de cicatrización, aunque el mecanismo no se encuentra bien estudiado, se ha encontrado que la sobre-expresión de *hoxb13* produce varias anomalías fenotípicas en tejido epidérmico bien



diferenciado en modelos murinos adultos, mientras que en modelos murino fetales se ha encontrado que *hoxb13* tiene funciones proapoptóticas y antiproliferativas durante el desarrollo de la médula espinal caudal y de las vértebras de la cola (Mack *et al.*, 2005). Una de las hipótesis más apoyadas acerca de la etiología del cáncer epitelial de ovario es el constante proceso de inflamación y cicatrización que se lleva a cabo en el epitelio ovárico durante la ovulación, esta hipótesis radica en la observación de que el uso de anticonceptivos orales y el embarazo son factores protectores de estas neoplasias (Cramer y Welch 1983, Siskind *et al.*, 2000). Aunado, a que este gen se encuentra sobre-expresado en carcinoma endometrial, y se sobre-expresa al haber exposición a estrógenos en líneas celulares de cáncer de endometrio, respondiendo de manera dependiente a tiempo y dosis (Zhao *et al.*, 2005). Por otro lado, el aumento en la expresión de *HOXB13* en cáncer de mama (Cantile *et al.*, 2003, Ma *et al.*, 2004 y Webb *et al.*, 2007) nos permite postular que este gen podría estar involucrado en el desarrollo de neoplasias malignas ováricas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



9. CONCLUSIONES

El trabajo llevado a cabo en esta tesis nos lleva a concluir lo siguiente:

- Los resultados muestran la mejor preservación de los RNA's totales en los tejidos almacenados en RNA^{later}® en comparación con Trizol.
- Se establecieron las condiciones para la amplificación dúplex de los genes *HOXA7*, *A9* transcritos 1 y 2, *A11*, *B7* y *B13* con el control endógeno β -*actina* en los DNAc's obtenidos de las células SiHa.
- Se logró la amplificación de *HOXA10* transcrito 1 y se detectó débilmente la presencia de *HOXA10* transcrito 2 en la línea celular MCF-7, no descrito anteriormente.
- Se corroboró la presencia y se logró estandarizar las condiciones para la amplificación del transcrito 2 de *HOXA10* en tejido de placenta.
- Se encontró la expresión diferencial de los genes *HOXA10* transcrito 2, *A11* y *B13* en neoplasias malignas de ovario con respecto a histopatología benigna de ovario con una diferencia estadísticamente significativa en la expresión cualitativa ($p < 0.05$).
- Se confirmó la sobreexpresión de *HOXB13* mediante la cuantificación relativa por PCR tiempo real ($p < 0.05$) en las muestras con patología maligna en comparación con las muestras con histopatología benigna.
- No se detectó una diferencia estadísticamente significativa en la expresión entre los tejidos ováricos con y sin patología maligna de los genes *HOXA7*, *A9* transcritos 1 y 2, *A10* transcritos 1 y *HOXB7*.



- Este trabajo constituye el primer reporte de la expresión diferencial *in vivo* de los genes *HOXB13*, *HOXA10* transcrito 2 y *HOXA11* en tejidos de ovario con y sin patología benigna de ovario.

El análisis de la expresión génica en cáncer de ovario es importante debido a la falta de marcadores específicos y sensibles para su diagnóstico oportuno, y por lo tanto para su tratamiento y evolución satisfactoria. Los resultados obtenidos en esta tesis, abren un panorama de la expresión de los genes *HOX in vivo* en cáncer de ovario. Así mismo, se requiere analizar la expresión relativa de *HOXA10* transcrito 2, *HOXA11* y *HOXB7* con PCR tiempo real en las muestras de tejido ovárico normal, con patología benigna y maligna, para su posterior correlación con la evolución clínica del paciente. Adicionalmente, para examinar la posibilidad de utilizar a la proteína *HOXB13* como un biomarcador molecular en el diagnóstico de muestras de cáncer de ovario, se propone la siguiente estrategia:

- 1.- Corroborar la presencia de la proteína de *HOXB13* en los tejidos ováricos con patología maligna mediante Western Blot.
- 2.- Analizar la presencia topográfica mediante inmunohistoquímica de la proteína de *HOXB13* en los tejidos ováricos con patología maligna y compararlos con patología benigna y ovario normal.
- 3.- Analizar la correlación de la expresión de *HOXB13* con el subtipo histopatológico, la respuesta a tratamiento y la evolución del mismo mediante un análisis prospectivo.
- 4.- Evaluar la presencia de anticuerpos contra la proteína de *HOXB13* en suero de los pacientes con patología maligna, en comparación con pacientes sanos y con patología benigna de ovario.



LITERATURA CITADA

Afonina E., Neumann M., Pavlakis G. N. (1997). Preferential binding of poly(A)-binding protein 1 to an inhibitory RNA element in the human immunodeficiency virus type 1 gag mRNA. *J Biol Chem* 272(4):2307-2311.

Alami Y., Castronovo V., Belotti D., Flagiello D., Clausse N. (1999). HOXC5 and HOXC8 expression are selectively turned on in human cervical cancer cells compared to normal keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 257(3):738-745.

Barrera S.H.A., Ortiz, L.R., Rojas, M.A., Reséndez, P.D. 1993. Reacción en cadena de la polimerasa: Una nueva época dorada en la biología molecular. *Ciencia y Desarrollo, (Conacyt)* 18 (108): 50-60.

Block K., Kardana A., Igarashi P., Taylor H. S. (2000). In utero diethylstilbestrol (DES) exposure alters Hox gene expression in the developing mullerian system. *Faseb J* 14(9):1101-1108.

Cantile M., Pettinato G., Procino A., Feliciello I., Cindolo L., Cillo C. (2003). In vivo expression of the whole HOX gene network in human breast cancer. *Eur J Cancer* 39(2):257-264.

Cantile M., Pettinato G., Procino A., Feliciello I., Cindolo L., Cillo C. (2003). In vivo expression of the whole HOX gene network in human breast cancer. *Eur J Cancer* 39(2):257-264.

Cannistra S. A. (2004). Cancer of the ovary. *N Engl J Med* 351(24):2519-2529.

Carlson M. B. (2005). *Embriología Humana y del Desarrollo*. Elsevier, pp. 393-427.

Cermik D., Selam B., Taylor H. S. (2003). Regulation of HOXA-10 expression by testosterone in vitro and in the endometrium of patients with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 88(1):238-243.

Cheng W., Liu J., Yoshida H., Rosen D., Naora H. (2005). Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nat Med* 11(5):531-537.

Chu M. C., Selam F. B., Taylor H. S. (2004). HOXA10 regulates p53 expression and matrigel invasion in human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 3(6):568-572.



Cramer D. W., Hutchison G. B., Welch W. R., Scully R. E., Ryan K. J. (1983). Determinants of ovarian cancer risk. I. Reproductive experiences and family history. *J Natl Cancer Inst* 71(4):711-716.

Cramer D. W., Welch W. R. (1983). Determinants of ovarian cancer risk. II. Inferences regarding pathogenesis. *J Natl Cancer Inst* 71(4):717-721.

Drife J., Magowan B. (2005). *Ginecología y Obstetricia. Clínicas*. 1ª Edición. Editorial El Sevier. España.

Gerard G.F., D'Alessio J.M., Kotewicz M.L., Noon M.C. (1986) Influence on stability in *Escherichia coli* of the carboxy-terminal structure of cloned Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase. *DNA*. 5(4): 271-9.

Goodman F. R., Majewski F., Collins A. L., Scambler P. J. (2002). A 117-kb microdeletion removing HOXD9-HOXD13 and EVX2 causes synpolydactyly. *Am J Hum Genet* 70(2):547-555.

Grier D. G., Thompson A., Kwasniewska A., McGonigle G. J., Halliday H. L., Lappin T. R. (2005). The pathophysiology of HOX genes and their role in cancer. *J Pathol* 205(2):154-171.

Heid C. A., Stevens J., Livak K. J., Williams P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Res* 6(10):986-994.

Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88(16):7276-7280.

Huntriss J., Hinkins M., Picton H. M. (2006). cDNA cloning and expression of the human NOBOX gene in oocytes and ovarian follicles. *Mol Hum Reprod* 12(5):283-289.

Huntriss J., Hinkins M., Picton H. M. (2006). cDNA cloning and expression of the human NOBOX gene in oocytes and ovarian follicles. *Mol Hum Reprod* 12(5):283-289.

Kumar V., Abbas A.K., Fausto N. (2005). *Patología Estructural y Funcional de Robins y Cotran*. Elsevier, pp. 1063-1121.

Kutyavin I. V., Lukhtanov E. A., Gamper H. B., Meyer R. B. (1997). Oligonucleotides with conjugated dihydropyrroloindole tripeptides: base composition and backbone effects on hybridization. *Nucleic Acids Res* 25(18):3718-3723.



La Celle P. T., Polakowska R. R. (2001). Human homeobox HOXA7 regulates keratinocyte transglutaminase type 1 and inhibits differentiation. *J Biol Chem* 276(35):32844-32853.

Lee L. G., Connell C. R., Bloch W. (1993). Allelic discrimination by nick-translation PCR with fluorogenic probes. *Nucleic Acids Res* 21(16):3761-3766.

Livak K. J., Flood S. J., Marmaro J., Giusti W., Deetz K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4(6):357-362.

Ma X. J., Wang Z., Ryan P. D., Isakoff S. J., Barmettler A., Fuller A., Muir B., Mohapatra G., Salunga R., Tuggle J. T., Tran Y., Tran D., Tassin A., Amon P., Wang W., Wang W., Enright E., Stecker K., Estepa-Sabal E., Smith B., Younger J., Balis U., Michaelson J., Bhan A., Habin K., Baer T. M., Brugge J., Haber D. A., Erlander M. G., Sgroi D. C. (2004). A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell* 5(6):607-616.

Milikowsky, C. Berman, I. (2001). *Atlas de Histopatología*. Marban Libros, pp 390-399.

Mohar A., Frias-Mendivil M., Suchil-Banal L., Mora-Macias T., de la garza G.J. (1997). Epidemiología descriptiva del cáncer en el Instituto Nacional de Cancerología de México. *Salud Pública de México*, 39(4):253-258.

Moore L. K. (1997). *Anatomía con orientación clínica*. 3ª Edición. Editorial Médica Panamericana. España.

Moore L.K., Persaud T.V.N. (1995). *Embriología clínica*. 5ª Edición. Nueva Editorial Interamericana Mc Graw-Hill. México.

Mun G.M.E., Gaxiola R.R., Balderas P.L.M.A., Barragán R.A., Salas G.E., González O.A. (2003). Perfil epidemiológico del cáncer en el hospital de ginecoobstetricia del centro Médico Nacional de Occidente. *Ginecología y Obstetricia de México*, 71:626-632.

Naora H. (2005). Developmental patterning in the wrong context: the paradox of epithelial ovarian cancers. *Cell Cycle* 4(8):1033-1035.

Nolan T., Hands R. E., Bustin S. A. (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nat Protoc* 1(3):1559-1582.



Nolan T., Hands R. E., Bustin S. A. (2006). "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR." *Nat Protoc* 1(3):1559-1582.

Ota T., Choi K. B., Gilks C. B., Leung P. C., Auersperg N. 2006. Cell type- and stage-specific changes in HOXA7 protein expression in human ovarian folliculogenesis: possible role of GDF-9. *Differentiation* 74(1):1-10.

Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29(9):e45.

Reinhold U., Berkin C., Bosserhoff A. K., Deutschmann A., Garbe C., Glaser R., Hein R., Krahn G., Peter R. U., Rapp G., Schitteck B., Seiter S., Ugurel S., Volkenandt M., Tilgen W. (2001). Interlaboratory evaluation of a new reverse transcriptase polymerase chain reaction-based enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of circulating melanoma cells: a multicenter study of the Dermatologic Cooperative Oncology Group. *J Clin Oncol* 19(6):1723-1727.

Rozen S., Skaletsky H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol* 132:365-386.

Rychlik W., Rhoads R.E. (1989) A computer program for choosing optimal oligonucleotides for filter hybridization, sequencing and *in vitro* amplification of DNA. *Nucleic Acid Res.* 17(21): 8543-51.

Sambrook J., Russel D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 7.7, 8.21, y 11.38.

Sarno J. L., Kliman H. J., Taylor H. S. (2005). HOXA10, Pbx2, and Meis1 protein expression in the human endometrium: formation of multimeric complexes on HOXA10 target genes. *J Clin Endocrinol Metab* 90(1):522-528.

Scott R.J., Di Saia J.P., Hammond B.C., Spellacy N.W. (2000). *Tratado de Obstetricia y Ginecología de Danforth*. Septima edición. Mc Graw Hill Interamericana, pp 905-949.

Simms D., Cizdziel P.E., Chomczynski P. (1993) TRIzol™ A new reagent for optimal single-step isolation of RNA. *Focus*®. 15(4):99-102.

Siskind V., Green A., Bain C., Purdie D. (2000). Beyond ovulation: oral contraceptives and epithelial ovarian cancer. *Epidemiology* 11(2):106-110.

Stevens A., Lowe S. J. (2006). *Histología humana*. 3ª Edición. Editorial El Sevier Mosby. España.



Taylor H. S. (2000a). The role of HOX genes in human implantation. *Hum Reprod Update* 6(1):75-79.

Taylor H. S. (2000b). The role of HOX genes in the development and function of the female reproductive tract. *Semin Reprod Med* 18(1):81-89.

Taylor H. S., Vanden Heuvel G. B., Igarashi P. (1997). A conserved Hox axis in the mouse and human female reproductive system: late establishment and persistent adult expression of the Hoxa cluster genes. *Biol Reprod* 57(6):1338-1345.

Villaescusa J. C., Verrotti A. C., Ferretti E., Farookhi R., Blasi F. (2004). Expression of Hox cofactor genes during mouse ovarian follicular development and oocyte maturation. *Gene* 330:1-7.

Wittwer C. T., Herrmann M. G., Moss A. A., Rasmussen R. P. (1997). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22(1):130-131, 134-138.

Webb-Vargas Y. G. (2007). Expresión Diferencial de Genes HOX en Cáncer de Mama: HOXA1, A5, D3 y B13 como Candidatos a Biomarcadores Moleculares. Tesis de Licenciatura. F.C.B. U. A. N. L.

Xu X. R., Huang J., Xu Z. G., Qian B. Z., Zhu Z. D., Yan Q., Cai T., Zhang X., Xiao H. S., Qu J., Liu F., Huang Q. H., Cheng Z. H., Li N. G., Du J. J., Hu W., Shen K. T., Lu G., Fu G., Zhong M., Xu S. H., Gu W. Y., Huang W., Zhao X. T., Hu G. X., Gu J. R., Chen Z., Han Z. G. (2001). Insight into hepatocellular carcinogenesis at transcriptome level by comparing gene expression profiles of hepatocellular carcinoma with those of corresponding noncancerous liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(26):15089-15094.

Yamashita T., Tazawa S., Yawei Z., Katayama H., Kato Y., Nishiwaki K., Yokohama Y., Ishikawa M. (2006). Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *Int J Oncol* 28(4):931-938.

Zhang Z., Bast R. C., Jr., Yu Y., Li J., Sokoll L. J., Rai A. J., Rosenzweig J. M., Cameron B., Wang Y. Y., Meng X. Y., Berchuck A., Van Haaften-Day C., Hacker N. F., de Bruijn H. W., van der Zee A. G., Jacobs I. J., Fung E. T., Chan D. W. (2004). Three biomarkers identified from serum proteomic analysis for the detection of early stage ovarian cancer. *Cancer Res* 64(16):5882-5890.

Zhao Y., Yamashita T., Ishikawa M. 2005. Regulation of tumor invasion by HOXB13 gene overexpressed in human endometrial cancer. *Oncol Rep* 13(4):721-726.

