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 RNA*later*®. 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 rearreglos 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 RNA*later*® 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 RNA*later*®. 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 RNA*later*® 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, asi 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 la 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 endometrioide. 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.

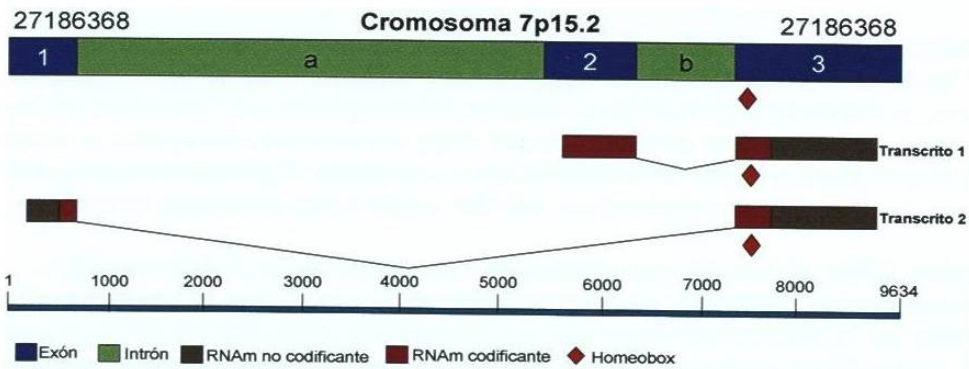

Figura 42. ***Splicing diferencial de HOXA10.*** El gen *HOXA10* se localiza en el cromosoma 7p15.2, y está constituido de dos exones y dos intrones que son eliminados junto con el exón 1 por splicing para producir el transcrito 1 de 2.64 Kpb y mediante splicing diferencial se produce otro transcrito 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 transfectó 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 asi 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 acabo.

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 patologia 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 puedo 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, endometrioide 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 anormalidades 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 mas apoyadas acerca de la etiología del cáncer epitelial de ovario es el constante proceso de inflamación y cicatrización que se lleva acabo 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 lineas 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.

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 proteina 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. Elservier, 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. Elservier, 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., Rappl G., Schittek 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.