

11217



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL DE GINECO OBSTETRICIA
"LUIS CASTELAZO AYALA"
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

EXPRESIÓN DE LA ACROGRANINA
EN TUMORES DE OVARIO

TESIS DE POSGRADO

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
ESPECIALISTA EN GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA

PRESENTA:

DRA. MIRIAM RAMÍREZ CASTAÑEDA

ASESOR:
DRA. LAURA ELENA DIAZ CUETO
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA
EN MEDICINA REPRODUCTIVA
INVESTIGADOR ASOCIADO



MÉXICO, D. F.

2004

DIVISION DE EDUCACION
E INVESTIGACION MEDICA
HGO. "LUIS CASTELAZO AYALA"
IMSS



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL


Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.


ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

**HOSPITAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA
"LUIS CASTELAZO AYALA"
IMSS**

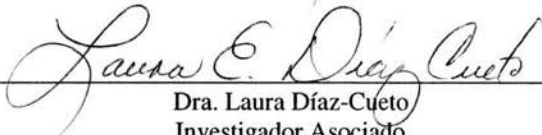
EXPRESIÓN DE LAS ACROGRANINA EN TUMORES DE OVARIO




Dr. Juan Carlos Lacuriello Puente
Director Médico
Hospital de Ginecología y Obstetricia "Luis Castelazo Ayala"



Dr. Gilberto Tena Alavéz
Jefe de la División de Educación Médica e Investigación
Hospital de Ginecología y Obstetricia "Luis Castelazo Ayala"



Dra. Laura Díaz-Cueto
Investigador Asociado
Hospital Ginecología y Obstetricia "Luis Castelazo Ayala"



Dra. Miriam Ramírez Castañeda
Residente Especialidad Ginecología y Obstetricia 4º año
Hospital Ginecología y Obstetricia "Luis Castelazo Ayala"


SE
DIVISIÓN DE EDUCACIÓN MÉDICA E INVESTIGACIÓN
HOSPITAL DE GINECOLOGÍA Y OBSTETRICIA "LUIS CASTELAZO AYALA"
IMSS

AGRADECIMIENTOS

A Dios
Por ser mi roca fuerte

A mi hijo Samuel,
Por ser el tesoro mas grande en mi vida y quien ilumina mi ser
con su sonrisa

A mis padres,
Quienes han estado a mi lado en todo tiempo, brindándome todo
su apoyo y cariño

A mi hermano,
Por ser un ejemplo a seguir

A los Doctores Alejandro Andrade Manzano, Lilia Patricia Barrón
Rodríguez, Isaías Estrada Moscoso, Rosa Luz Fernández Martínez,
Victor Olguín Cruces, Sergio Ruiz Vallarta, Imaní Razavi Sharam
Faziollah del Departamento de Patología.

Al Dr. Moisés Zeferino Toquero del Departamento de Oncología
Ginecológica

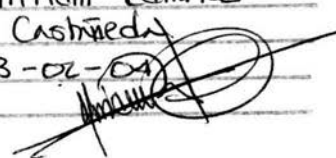
A los Doctores Fabián Arechavaleta Velasco, Clemencia Cancino
Maldonado y Laura Díaz Cueto, así como al biólogo Eeros
Quintero Rodríguez del La Unidad de Investigación Médica en
Medicina Reproductiva.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la
UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el
contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Miriam Ramirez

Cashmed

FECHA: 13-02-09

FIRMA: 

• RESUMEN

EXPRESION DE LA ACROGRANINA EN TUMORES DE OVARIO. Ramírez Castañeda M**, Díaz-Cueto L*. **Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, **Residente de cuarto año. Hospital de Ginecología y Obstetricia No. 4 " Dr. Luis Castelazo Ayala".*

El cáncer de ovario constituye una de las neoplasias ginecológicas más frecuentes en los países industrializados y la mortalidad por esta causa continúa siendo muy elevada a pesar de los avances realizados en la detección oportuna, diagnóstico y tratamiento. En México por su frecuencia es considerado como la cuarta neoplasia entre los tumores ginecológicos y en los EUA es la séptima neoplasia más frecuente y la quinta causa de mortalidad por cáncer en la población femenina. En el Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" del IMSS, el cáncer de ovario corresponde al 15% de todos los cánceres ginecológicos entre las mujeres.

El carcinoma epitelial de ovario es la estirpe histológica más frecuente. La etiología de este tipo de cánceres hasta el momento se desconoce, pero la mayoría de las evidencias sugieren que factores reproductivos y genéticos están jugando un papel importante en el origen de esta patología.

La acrogranina es un nuevo factor de crecimiento que se expresa principalmente en células epiteliales. Estudios previos han demostrado que tienen actividades de regulación sobre el epitelio normal, así como en células epiteliales tumorales de ratón y de humanos, específicamente en líneas celulares de cáncer de mama, de tumores cerebrales y en carcinoma de células epiteliales renales siguiendo importantes vías de señales de transducción.

En el presente trabajo se planteó determinar por un método cuantitativo (PCR de tiempo real) y semicuantitativo (western blot) la expresión de la acrogranina en tumores de ovario benignos y malignos a fin de establecer el grado de expresión en cada uno de ellos. Para esto se analizaron 12 tumores malignos epiteliales de ovario y 18 tumores benignos de ovario que se obtuvieron de pacientes atendidas en el hospital de Gineco-Obstetricia No.4, "Luis Castelazo Ayala" por tratamiento quirúrgico.

Los resultados mostraron que la acrogranina se expresa en los tumores malignos y benignos en igual cantidad y no hubo diferencias significativas entre ambos grupos. Se puede considerar que el tamaño de la muestra fue un factor importante para no encontrar esta diferencia, ya que fue muy pequeña por lo que se podría continuar con el estudio ampliando el tamaño de la muestra. El aumentar el tamaño de la muestra nos permitiría estratificar por estadios o tipos histológicos. Por otro lado, la comparación adecuada debió de ser contra un grupo control formado por tejidos ováricos sin patología, sin embargo esto resulta imposible por la dificultad para conseguir este tejido en estas condiciones. Otra alternativa sería la utilización de técnicas más precisas para la separación solamente del epitelio de las muestras sin incluir estroma, pues un estudio muy reciente ha demostrado que sí existe una relación entre el cáncer de ovario y la acrogranina, ya que se encontró expresión de esta proteína solo en los tumores de ovario invasores y no se observó expresión en los tumores de bajo potencial maligno cuando se aisló RNA solo de tejido epitelial utilizando micro-disección por láser. Cuando se analizó la expresión en forma global del tejido (incluyendo estroma) la acrogranina estuvo presente tanto en los tumores invasores así como en los tumores de bajo potencial maligno.

Lo anteriormente mencionado demuestra que el patrón de expresión, así como la cantidad y la actividad de la acrogranina tanto en el epitelio de superficie del ovario normal y del epitelio en cáncer de ovario necesitan futuras investigaciones, por lo que este estudio en tejidos tumorales ovárico humanos así como el estudio en líneas celulares de tumores de ovario continuará para tratar de establecer el papel de la acrogranina en el cáncer de ovario utilizando técnicas más precisas.

INDICE

	Páginas
INTRODUCCIÓN	7-11
Epidemiología del cáncer de ovario.....	7
Clasificación Histológica del cáncer de ovario.....	7
Etapificación del cáncer de ovario.....	7
Factores importantes para el diagnóstico, pronóstico y tratamiento	8
A) Factores Genéticos	
B) Alteración en la expresión de otras proteínas	
C) Acrogranina un nuevo factor de crecimiento y cáncer de ovario	
OBJETIVO	14
HIPÓTESIS	14
MATERIAL Y METODOS	15-18
A) Tipo de estudio	
B) Universo de trabajo	
C) Criterios de Inclusión	
D) Criterios de Exclusión	
E) Consideraciones Éticas	
F) Especificación y Definición de las Variables	
G) Protocolo de Estudio	
H) Sistema de Captación de Datos	
I) Métodos	
J) Análisis Estadístico	
RESULTADOS	19-20
DISCUSIÓN	21-23
BIBLIOGRAFÍA	24-26
ANEXOS	27-29
Tablas y Gráficas	
APENDICES	30

EXPRESIÓN DE LA ACROGRANINA EN LOS TUMORES DE OVARIO

INTRODUCCION

Epidemiología de Cáncer de Ovario

El cáncer de ovario constituye una de las neoplasias ginecológicas más frecuentes en los países industrializados y la mortalidad por esta causa continua siendo muy elevada a pesar de los avances realizados en la detección oportuna, diagnóstico y tratamiento. En los Estados Unidos de Norteamérica, el cáncer de ovario es la séptima neoplasia más frecuente y la quinta causa de mortalidad por cáncer en la población femenina, con aproximadamente 23,000 nuevos casos diagnosticados y aproximadamente 14,000 muertes cada año ^{1,2}.

En México de acuerdo con el Registro histopatológico de las Neoplasias, en el trienio 1993-1995, el cáncer de ovario ocupó la décima posición en la tabla general de frecuencia, con 4119 casos, lo cual constituyó el 2.2% del total de neoplasias. Por su frecuencia, el cáncer de ovario es considerado la cuarta neoplasia entre los tumores ginecológicos y conforma el 3.5% de los cánceres diagnosticados ³.

En el Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" del IMSS, el cáncer de ovario corresponde al 15% de todos los cánceres ginecológicos entre las mujeres, con un promedio de 91 casos por año (Informe anual 2001, Comité de Morbilidad y Mortalidad).

Clasificación Histológica del Cáncer de Ovario

De acuerdo a su origen, las neoplasias del ovario se clasifican histológicamente como se menciona en el Cuadro 1 ^{4,5}. El carcinoma epitelial de ovario es la estirpe histológica más frecuente de estos cánceres, y aproximadamente el 75% de ellos se diagnostican en estadio III con diseminación metastásica intra-abdominal ¹. Los tumores epiteliales malignos del ovario pueden agruparse por tipo histológico como se menciona en el Cuadro 2 ^{4,5}.

Etapificación del Cáncer de Ovario

La etapificación del cáncer de ovario es quirúrgica y se basa en los hallazgos operatorios e histopatológicos de la pieza quirúrgica al momento de la intervención. En el cuadro 3 se menciona la clasificación de los estadios del cáncer de ovario según la FIGO (Federación

Internacional de Ginecología y Obstetricia) ⁶. Probablemente la variable más importante que influye en el pronóstico de todos los casos de cáncer de ovario es el estadio por la extensión de la enfermedad y por lo tanto la supervivencia de las pacientes depende del estadio de la lesión (Cuadro 3), su grado de diferenciación, los hallazgos macroscópicos en la intervención, la cantidad de tumor residual que permanece posterior a la cirugía (citoreducción óptima o subóptima), así como del tratamiento adicional posterior ⁶. Este sistema de etapificación ha hecho posible la comparación de los resultados terapéuticos entre las distintas instituciones tanto a nivel nacional como a nivel mundial.

En cuanto al establecimiento de la sobrevida de los pacientes con cáncer de ovario investigadores clínicos como Akahira y colaboradores ⁷ propusieron que en pacientes con cáncer de ovario el volumen del tumor residual y el tipo histológico deben ser considerados con factores pronósticos de importancia en la sobrevida del paciente. Por otro lado, Esenkop y colaboradores ⁸ agregaron que la extensión de los implantes peritoneales metastásicos también se relacionan con la sobrevida de los pacientes con cáncer en estadio IIIc independientemente del comportamiento tumoral o de los procedimientos requeridos para alcanzar una citoreducción óptima. La sobrevida reportada a 5 años en pacientes con cáncer epitelial de ovario de acuerdo al estadio de la FIGO ⁶, varía según la serie revisada, reportando una sobrevida a 5 años del 90 % para Etapa I, de 0-40 % en Etapa II. Para la Etapa III se reporta una sobrevida de 15-20 % aproximadamente mientras que para Etapas IV la sobrevida es menor al 5% a 5 años ⁹⁻¹².

Factores importantes para el Diagnóstico, Pronóstico y Tratamiento

La etiología de este tipo de cánceres hasta el momento se desconoce en su totalidad, pero la mayoría de las evidencias sugieren que factores reproductivos y genéticos están jugando un papel importante en el origen de esta patología ¹³.

El epitelio de superficie ovárico normal y los carcinomas ováricos secretan y tienen receptores específicos para hormonas y factores de crecimiento, indicando el papel de todos estos factores en la fisiología normal del epitelio de la superficie ovárica y en la transformación y progresión del cáncer de ovario.

A) Factores Genéticos

Dentro de las etiologías del carcinoma ovárico, mutaciones en los genes supresores de tumor BRCA 1 y el BRCA 2 parecen formar las bases etiológicas de la mayoría de los cánceres ováricos familiares. Mutaciones en el gen supresor *p53* así como, mutaciones o amplificaciones o sobre-expresión de los proto-oncogenes tales como *c-myc*, *K-ras* y *Akt*, se han encontrado en los carcinomas ováricos ¹⁴.

B) Alteración de otras Proteínas

La sobre-expresión de la proteína *ciclina E*, *Cdk2* con una reducida expresión de la proteína *p27^{kip-1}*, así como también la sobre-expresión del *EGF-receptor*, *erb2*, *ciclina D1* y la proteína *p27^{kip-1}*, se han asociado con un pobre pronóstico en cuanto a la sobrevida en pacientes con cáncer de ovario ¹⁵⁻¹⁷. La activación de la vía de transducción de señal de la fosfatidilinositol 3-kinasa (PI3-kinasa) /Akt ha sido detectada en varias líneas celulares de cáncer de ovario y en ciertos especímenes de cáncer de ovario ¹⁸⁻²⁰. Por otro lado, la adición de EGF y de IL- α a una línea celular ovárica produce la inducción de un fenotipo invasivo ²¹.

En los últimos años Ca-125 se ha considerado como un marcador bioquímico para el cáncer de ovario ²², ya que es una glucoproteína de tipo mucinoso de mas de 200,00 daltons que se encuentra presente en los tejidos del adulto derivados del epitelio celómico, incluyendo las células mesoteliales que recubren la pleura, el pericardio y el peritoneo, así como el componente epitelial de las trompas de Falopio, endometrio y endocérnix. Sin embargo, esta proteína no esta presente en ovarios fetales ni en los adultos, pero si se expresa en mas del 80% de los cánceres de ovario epiteliales, no mucinosos. En el carcinoma epitelial de ovario las concentraciones mayores o menores de Ca-125 se han relacionado con la progresión o regresión de la enfermedad en mas del 90% de las pacientes. Las concentraciones persistentemente elevados de Ca-125 se han asociado con la persistencia de la enfermedad. Prácticamente todas las pacientes con elevación persistente del Ca-125 antes de la cirugía de segunda mirada tienen cáncer residual ²³.

C) Acrogranina un nuevo factor de crecimiento y cáncer de ovario

Varios estudios realizados por Díaz-Cueto y colaboradores²⁴, así como por otros grupos de investigadores han demostrado que esta nueva familia de factores de crecimiento (epitelinas, granulinas) de la cual la Acrogranina es el precursor se expresan preferencialmente en células epiteliales y por lo tanto tienen actividades regulatorias sobre el epitelio normal y en células epiteliales tumorales de roedores y de humanos, siguiendo interesantes vías de señales de transducción²⁵⁻²⁷.

La acrogranina es una glicoproteína con un peso molecular de 67,000 daltons purificada de los testículos de cobayo por Anakawe y Gerton en 1990²⁸. Esta proteína es sintetizada en estadios tempranos de la espermatogénesis y también puede ser procesada en pequeños fragmentos de 62,000, 51,000, 39,000 y 22,000 daltons durante la maduración epididimal. El análisis de la secuencia de aminoácidos de esta proteína demostró que este péptido contiene varios residuos de cisteínas y un motivo que se repite siete veces en toda su secuencia.

La línea celular R es una línea celular de fibroblastos 3T3 originada de embriones de ratón que tienen la mutación para el gen del receptor del factor del crecimiento semejante a la insulina I (IGF-IR). La acrogranina es uno de los principales factores de crecimiento que han sido encontrados en este medio condicionado y que estimula el crecimiento de esta línea celular R, lo cual sugiere que este factor no requiere un IGF-IR funcional para producir su efecto de proliferación celular²⁶. lo cual abre la posibilidad de identificar una nueva vía de señal de transducción mitogénica que probablemente es independiente de *ras*^{25, 26}.

Otros aspectos importantes de la acrogranina en las células MCF-7 (línea celular de cáncer de mama) es que 17 beta-estradiol estimula la transcripción de la acrogranina en forma dosis dependiente y además puede medir la estimulación de crecimiento celular producido por estradiol, y aun más, la acrogranina puede producir proliferación celular en ausencia de estradiol²⁷. Las granulinas también se han observado como mitógenos en las células gliales y se sobre-expresan en ciertos tumores cerebrales y en carcinoma de células renales

epiteliales ^{29,30}. Por lo tanto su patrón de expresión, su distribución en los tejidos y la regulación del crecimiento en estas células sugieren su potencial en la patogénesis y progresión de neoplasias renales y cerebrales primarias. Recientemente se ha demostrado la presencia de acrogranina expresado solamente en el cáncer invasor de ovario y se encuentra ausente en los tumores serosos de bajo potencial maligno ³¹.

Aún con todo esta información, la etiología y los eventos tempranos que se presentan durante la progresión del carcinoma de ovario son entre los más poco entendibles de todos los cánceres humanos malignos. Es por eso que en este trabajo se plantea el estudio de la expresión de la acrogranina en los tumores de ovario en sus estirpes benignas y malignas a fin de establecer el grado de expresión en cada uno de ellos, y proponerlo en un futuro como marcador tumoral, como medio de seguimiento y como blanco para el tratamiento en las pacientes con cáncer de ovario.

Cuadro 1. CLASIFICACION CITOGENÉTICA DE LAS NEOPLASIAS DE OVARIO**I. Neoplasias derivadas del Epitelio Celómico**

- A. Tumor seroso
- B. Tumor mucinoso
- C. Tumor endometroide
- D. Tumor mesonefroide (células claras)
- E. Tumor de Brenner. Carcinoma Indiferenciado
- F. Carcinosarcoma y tumor mesodérmico mixto

II. Neoplasias derivadas de las células germinales

- A. Teratoma
 - 1. Maduro
 - 2. Inmaduro
- B. Disgerminoma
- C. Sarcoma Embrionario
- D. Tumor del seno endodérmico
- E. Coriocarcinoma
- F. Gonadoblastoma

III. Neoplasias derivadas del estroma gonadal especializado

- A. Tumor de células de la granulosa-teca
 - 1. Tumor de la granulosa
 - 2. Tecoma
- B. Tumores de Sertoli-Leyding
 - 1. Arrenoblastoma
 - 2. Tumor de Sertoli
- C. Ginandroblastoma
- D. Tumores de células lipídicas

IV. Neoplasias derivadas del mesénquima inespecífico

- A. Fibroma, hemangioma, leiomioma, lipoma
- B. Linfoma
- C. Sarcoma

V. Neoplasias que metastatizan en el ovario

- A. Tubo gastrointestinal (Krukenberg)
- B. Mama
- C. Endometrio
- D. Linfoma

Cuadro 2. Tumores epiteliales malignos de ovario

Cistoadenocarcinoma seroso	42%
Cistoadenocarcinoma mucinoso	12%
Carcinoma endometroide	15%
Carcinoma indiferenciado	17%
Carcinoma de células claras	6%

Cuadro 3. Clasificación por estadios según la nomenclatura de la FIGO ³

Estadio I	Crecimiento limitado a los ovarios
Estadio Ia	Crecimiento limitado a un ovario: no hay ascitis que contenga células malignas; no hay tumor en las Superficies externas; cápsula intacta.
Estadio Ib	Crecimiento limitado a ambos ovarios; no hay ascitis que contenga células malignas; no hay tumor en las superficies externas; cápsula intacta
Estadio Ic	Tumor en estadio Ia o en estadio Ib, pero con tumor en la superficie de uno o ambos ovarios; o con la cápsula rota; o con ascitis que contenga células malignas o con lavados peritoneales positivos.
Estadio II	El crecimiento afecta a uno o ambos ovarios con extensión pélvica
Estadio IIa	Extensión y/o metástasis al útero y/o trompa
Estadio IIb	Extensión a otros tejidos pélvicos
Estadio IIc	Tumor en estadio IIa o IIb pero con afectación de la superficie de uno o ambos ovarios; o con la cápsula(s) rota(s); o con ascitis que contiene células malignas o con lavados peritoneales positivos
Estadio III	Tumor que afecta a uno o ambos ovarios con invasión fuera de la pelvis y/o ganglios positivos retroperitoneales o inguinales, si existen metástasis hepáticas será un estadio III. El tumor está limitado a la pelvis verdadera pero con extensión maligna probada histológicamente al intestino delgado o al epiplón.
Estadio IIIa	Tumor limitado a la pelvis verdadera o con ganglios linfáticos negativos, pero con siembra microscópica en la superficie peritoneal abdominal confirmada histológicamente.
Estadio IIIb	Tumor de uno o ambos ovarios con implantes en la superficie peritoneal abdominal confirmada histológicamente que no superen los 2cm de diámetro; los ganglios linfáticos son negativos
Estadio IIIc	Implantes abdominales mayores de 2cm de diámetro y/o ganglios retroperitoneales o inguinales Positivos
Estadio IV	El carcinoma a uno ambos ovarios con metástasis a distancia. Si existe derrame pleural, la citología debe ser positiva para clasificar un caso en el estadio IV. Las metástasis del parénquima hepático equivalen a estadio IV.

OBJETIVO

Con el fin de conocer si la acrogranina tiene una función en la progresión maligna de los carcinomas ováricos epiteliales, se determinará su expresión o sobre-expresión (por varios métodos moleculares) en especímenes de tejidos ováricos con carcinoma y sin carcinoma.

HIPOTESIS

La acrogranina esta sobre-expresada en los carcinomas ováricos epiteliales humanos al comparase con tumores ováricos benignos.

MATERIAL Y METODOS

A. Tipo De estudio

Se trata de un estudio descriptivo, observacional, prospectivo y comparativo.

B. Universo de Trabajo

Se determinó la expresión de la acrogranina en tejidos de tumores ováricos tanto benignos como malignos, que se obtuvieron de pacientes con el diagnóstico de tumor de ovario, que acudieron al hospital de Gineco-Obstetricia No.4, "Luis Castelazo Ayala" para tratamiento quirúrgico.

C. Criterios de Inclusión

- Pacientes con diagnóstico de tumor de ovario de estirpe benigna o maligna corroborado por histopatología.
- Cualquier edad.
- Ausencia de otras enfermedades o cánceres primarios no relacionados con el carcinoma ovárico.
- Todas las clasificaciones clínicas de la FIGO (Estadio I a IV) fueron incluidas
- Todas las clasificaciones histológicas de la WHO (G1 a G3) fueron incluidas.

D. Criterios de Eliminación

- Pacientes con expedientes incompletos

E. Consideraciones Éticas

A las pacientes cuyas muestras (especímenes ováricos) fueron incluidas dentro del estudio, se les notificó que se llevaría a cabo un estudio adicional en las muestras obtenidas, y que la información de este estudio no beneficiaría ni perjudicaría la evolución natural de la enfermedad.

F. Especificación y Definición de las Variables

1) *Variable dependiente* = La expresión de acrogranina

Definición de expresión o sobreexpresión de la acrogranina. Esta variable fue identificada por varios métodos: El primero de ellos fue el western blot (bandas), el cual nos permitió hacer esta variable cuantitativa. Para decir que existió una sobre-expresión de acrogranina, los especímenes de tejidos con carcinoma ovárico, estas debieron de tener 2 veces más de la expresión del control más alto, para esto varios controles fueron corridos dentro de un mismo experimento. Otro de los métodos más preciso para cuantificar la expresión de acrogranina fue la determinación del RNA mensajero utilizando el método PCR de tiempo real, la concentración obtenida fue comparada con el RNA mensajero de la acrogranina presente en las muestras control (tejidos ováricos sin tumor o tumores benignos).

2) *Variable independiente* = Tipo histológico del cáncer, etapa clínica y grado de diferenciación del tumor, fueron considerados tomando en cuenta las clasificaciones de la FIGO y de la WHO (Cuadros 1, 2 y 3 de la Introducción). La edad de la paciente también fue registrada.

G. Protocolo de Estudio

Diariamente se preguntaba en el Servicio de Oncología del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" sobre el ingreso de pacientes con diagnóstico de tumores de ovario y su fecha de programación para cirugía, recolectándose la información necesaria (ver apéndice 1). El día de la cirugía, las piezas quirúrgicas fueron enviadas al departamento de patología para el diagnóstico trans-operatorio, momento en el cual se separó una pequeña muestra del tejido (0.100g), que se congeló a -70°C y posteriormente fue procesada como se describe a continuación. Todos los procedimientos se llevaron a cabo en la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, del Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 "Luis Castelazo Ayala" del IMSS.

H. Sistema de Captación de Datos

Hoja de recolección de datos (ver apéndice 1). Los datos se vaciaron en hojas de cálculo utilizando el programa de Microsoft Excel 2000.

I. Métodos

- **1) Técnica de Western Blot.** El inmunoblot se realizó como ha sido descrito previamente por Díaz-Cueto y cols (24). En resumen, aproximadamente 0.05 g de tejido ovárico fue homogenizado y lizado en 2.5 ml de buffer de lisis (1% NP-40, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 20 mM Tri-HCl, pH 7.5, 5mM EDTA, 1 mM Na₃VO₄, 10 μM Na₂MnO₄, 1mM PMSF, 10 μg/ml leupeptine, 1%aprotinina). El lizado fue centrifugado a 100,000 g por 1 h a 4°C y el sobrenadante se guardó a -80°C hasta su análisis. El total de proteínas en el sobrenadante fue cuantificado por medio del método de BCA (Pierce Biotechnology). El extracto equivalente a 10 μg del total de proteínas fue separado por electroforesis-SDS-poliacrilamida en un gel al 10% , el cual posteriormente fue transferido a una membrana de PVDF. La membrana fue posteriormente bloqueada con una solución amortiguadora salina-Tris (TBS) conteniendo 5% de leche y 0.1% de detergente tween-20 (TBS-tween). Una vez bloqueada la membrana, ésta fue probada con un anticuerpo policlonal que reconoce la acrogranina (Proporcionado por el Dr. George Gerton, Universidad de Pennsylvania) a una dilución de 1:2000 en TBS-tween por toda la noche y a una temperatura de 4°C. Después de que la membrana fue lavada por tres veces con TBS-tween y cada una con duración de 15 min, se añadió el segundo anticuerpo (horseradish-peroxidasa-conjugada anti-conejo IgG) por 1h a temperatura ambiente. La proteína fue detectada por medio del sistema de quimiluminiscencia (Amersham). Los controles fueron tejidos ováricos sin carcinoma.

- **2) Cuantificación del RNAm de Acrogranina por medio del método de tiempo Real.**

Aislamiento de RNA. Aproximadamente 50 mg de tejido ovárico fue homogenizado en 1 ml de Trizol (Life Technologies) siguiendo las indicaciones de la compañía manufacturera para la obtención de RNA. Una vez aislado el RNA, éste fue cuantificado y 1 μg fue utilizado para la realización del RT-PCR (Reverse Transcription-PCR) . Con el cDNA obtenido se procedió a la realización del PCR de tiempo real.

PCR de Tiempo real. Previo diseño de los primeros para la amplificación de la acrogranina y de la enzima (GAPDH) que se uso como control se procedió a la realización del PCR de tiempo real. La amplificación y la detección de la

fluorescencia fueron llevadas a cabo usando el detector de secuencias ABI Prism 7000. las características del ciclo fueron: una desnaturalización inicial a 95°C por 3 min, seguida por 45 ciclos de 95°C for 10 s, 58°C por 45 s , y 72°C por 10s, y las lecturas de la flurescencia fueron tomadas durante los pasos a 58°C.

J. Análisis Estadístico

Se utilizó como estadística descriptiva solo el promedio para graficar la expresión del RNAm de la acrogranina en los tumores malignos y benignos. Para analizar las diferencias entre las concentraciones del RNAm de acrogranina entre tumores malignos y benignos se utilizo la prueba de U-Mann-Whitney. El nivel de significancia se estableció en $p < 0.05$. El programa estadístico utilizado fue Stat 32.

RESULTADOS

1. Características de los tumores ováricos analizados

En total se analizaron 11 tumores malignos epiteliales de ovario y 18 tumores benignos de ovario, de los cuales 10 fueron cistoadenomas (56%) y 8 fueron teratomas (44%) (Tabla 1), estos tumores benignos fueron considerados como controles de los tumores malignos, ya que fue difícil coleccionar muestras de ovarios sin patologías. De los tumores malignos 4 casos (36%) correspondieron a cistoadenocarcinoma serosos, otros 4 casos (36%) correspondieron a cistoadenocarcinomas mixtos y solo se encontró un caso (9%) de carcinoma endometroide y de carcinoma de células claras. Solamente un caso (9%) se reportó como de difícil estirpe, llama la atención que no se encontraron cistoadenocarcinomas mucinosos puros (Tabla 1). Las muestras de estos tumores fueron coleccionadas de pacientes que acudieron al Hospital de Gineco-Obstetricia # 4 "Luis Castelazo" para su tratamiento y manejo quirúrgico.

2.-Expresión de Acrogranina en los diferentes tumores ováricos

En las figuras 1, 2 y 3 se encuentran los patrones representativos de la expresión de acrogranina en los lisados de cada uno de los tejidos tumorales de ovario. Como se mencionó en la metodología cada una de las muestras obtenidas fue procesada para obtener un extracto de proteínas, del cual 10 µg de proteínas totales fueron corridos en un gel de poliacrilamida y posteriormente transferido a una membrana PVDF, identificando a la acrogranina por medio de la adición de un primer anticuerpo en contra de esta misma proteína y posteriormente una segundo anticuerpo marcado con peroxidasa. Posteriormente la utilización de un sustrato específico nos permitió la identificación de la acrogranina correspondiente a cada una de la bandas observadas en las membranas de las figuras 1-3. Como se puede apreciar en estas figuras (1-3) la acrogranina esta presente en cada una de las muestras tumorales benignas y malignas estudiadas así como en el ovario normal humano que fue usado como control. La principal banda fue detectada a un peso de 67,000 *Mr* y una segunda banda de menor peso molecular la cual se encontró por arriba de 45,000 *Mr*.

Por esta técnica semicuantitativa no fue posible establecer diferencias significativas en la expresión de acrogranina en las muestras tumorales de ovario tanto malignas como benignas, sin embargo nos permitió identificar que la acrogranina esta presente tanto en el tejido ovárico sin patología, así como en los tejidos tumorales ováricos benignos y malignos.

3. Expresión del RNAm de la Acrogranina en los diferentes tumores ováricos.

Como se mencionó previamente en la metodología la determinación de la expresión del RNAm de la acrogranina fue realizada por medio del método de PCR de tiempo real. Para esto, primeramente cada una de las muestras tumorales ováricas benignas y malignas fueron procesadas para obtener el RNA total. Una vez obtenido este RNA se procedió a la realización de RT-PCR (Transcripción-Reversa-PCR) para obtener el cDNA (DNA complementario) el cual sería utilizado para la realización del PCR de tiempo real.

Los resultados obtenidos se encuentran graficados en la figura 4 y se encuentran expresados como número de copias de acrogranina /100 copias de GAPDH. En esta gráfica podemos observar que existe una gran variabilidad en la expresión del gen de la acrograina tanto en las muestras tumorales ováricas malignas como benignas. Por lo tanto no se encontraron diferencias significativas en la expresión de la acrogranina en los diferentes tumores malignos y benignos estudiados hasta el momento.

DISCUSION

Estudios previos³²⁻³⁶ han demostrado que una nueva familia de factores de crecimiento a la cual pertenece la acrogranina se expresan principalmente en células epiteliales y por lo tanto muestran actividades de regulación sobre las células del epitelio normal así como en células epiteliales tumorales de roedores y de humanos.

La expresión de la acrogranina en el ovario y en el ovocito así como en embriones de ratón previo a la implantación ya ha sido demostrada previamente,^{24,37} sin embargo hasta el momento se desconocen las funciones que la acrogranina tiene en el ovario. En el blastocisto la acrogranina parece tener una función importante, ya que es sintetizada y secretada por el mismo y la adición de acrogranina al medio de cultivo de embriones de ocho células estimula la incidencia en la formación del blastocistos, reduce el tiempo en el inicio de la cavitación, estimula la expansión del blastocele e incrementa el número de células del trofotodermo. Por otro lado, el bloqueo de la función de la acrogranina por medio de la adición de un anticuerpo específico en contra de esta proteína en el cultivo de embriones de 8 células detiene el desarrollo del embrión y por lo tanto la formación del blastocisto. Estos resultados demuestran que la acrogranina tiene una función importante en el desarrollo embrionario previo a la implantación. Además, el hecho de que los embriones respondan a la acrogranina indica que estos poseen la maquinaria necesaria para unir el factor y activar una vía de señal de transducción intracelular.²⁴

Otro estudios han demostrado que el gen de la acrogranina esta expresada en tumores humanos y líneas celulares cancerígenas, como en los glioblastomas (tumores cerebrales) que expresan el gen de la acrogranina, así como la proteína, y esta proteína tiene un efecto regulatorio sobre el crecimientos de astrocitos primarios de rata y de líneas celulares de glioblastomas humanos.²⁹ Se ha sugerido que el patrón de expresión de la acrogranina, la distribución en los tejidos y su asociación con la regulación del crecimiento de los glioblastomas sugiere un role de esta proteína en la patogénesis y/o progresión maligna de esta neoplasia cerebral primaria. La acrogranina también se expresa en células cancerígenas de tumores de mama humanos (MCF-7 y las MDA-MB-468). Las células MCF-7 son

receptor a estrógenos positivas y las MDA-MB-468 son células con receptor a estrógenos negativas. El tratamiento de estas últimas células con un anticuerpo en contra de acrogranina resulta en una inhibición de la proliferación celular, en una forma dosis-dependiente, sugiriendo que acrogranina actúa como un factor regulador del crecimiento en forma autocrina.³⁸ La acrogranina también ha sido detectada en células renales cancerígenas, así como en dos líneas celulares derivadas de leiomiomas (SK-UT-1 y SK-LMS-1).³⁹

El epitelio de superficie del ovario normal así como el de los carcinomas ováricos secretan y presentan receptores específicos para hormonas y factores de crecimiento, sugiriendo que estos factores pudieran tener una función en la transformación y progresión del cáncer de ovario.⁴⁰ Dado que la acrogranina se expresa en el ovario y actúa como un regulador autocrino y paracrino del crecimiento epitelial²⁴, en este estudio nosotros nos propusimos determinar si la acrogranina se encuentra sobre-expresada en el carcinoma epitelial de ovario. Sin embargo hasta el momento no hemos podido demostrar esta relación en las muestras analizadas. Del hecho de no encontrar diferencias significativas en cuanto a la expresión de la acrogranina en las muestras de tumores de ovario malignos y benignos estudiadas podríamos considerar que el tamaño de la muestra fue un factor importante para no encontrar esta diferencia, ya que fue muy pequeña (11 tumores malignos y 18 tumores benignos). por lo que se podría continuar con el estudio ampliando el tamaño de la muestra. El aumentar el tamaño de la muestra nos permitiría estratificar por estadios o tipos histológicos. Por otro lado, la comparación adecuada debió de ser contra un grupo control formado por tejidos ováricos sin patología, sin embargo esto resulta imposible por la dificultad para conseguirlos, y de conseguirse la mayoría provendrían de mujeres en edad menopausica, lo cual también pudiera dar un sesgo al estudio, por no conocer cual es la expresión de la acrogranina en el ovario a través de la etapa reproductiva y menopausica. O alternativa sería la utilización de técnicas más precisas (microscopio de láser) para la separación solamente del epitelio de las muestras sin incluir estroma, pues un estudio muy reciente⁴¹ que utilizó esta técnica ha demostrado que sí existe una relación entre el cáncer de ovario y la acrogranina, ya que se encontró expresión de esta proteína solo en los tumores de ovario invasores y no se observó expresión en los tumores de bajo potencial

maligno cuando se aisló RNA solo de tejido epitelial utilizando micro-disección por láser, cuando se analizó la expresión en forma global del tejido (incluyendo estroma) la acrogranina estuvo presente tanto en los tumores invasores así como en los tumores de bajo potencial maligno.⁴¹

Lo anteriormente mencionado demuestra que el patrón de expresión, así como la cantidad y la actividad de la acrogranina tanto en el epitelio de superficie del ovario normal y del epitelio en cáncer de ovario necesitan futuras investigaciones, por lo que este estudio en tejidos tumorales ovárico humanos así como el estudio en líneas celulares de tumores de ovario continuará para tratar de establecer el papel de la acrogranina en el cáncer de ovario utilizando técnicas más precisas.

BIBLOGRAFIA

1. Salom E, Almeida Z, Mirhasheimi R. Management of recurrent ovarian cancer: evidence-based decisions. *Curr Opin Oncol.* 2002;14:519-527
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S and Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA. Cancer. J. Clin.* 2000;50:7-33
3. Instituto Nacional de Cancerología: Manual de Oncología. McGraw-Hill Interamericana. 1ª Edición, 1999
4. International Federation of Gynecology and Obstetrics.-Changes in definitions of clinical staging for carcinoma of the cervix and ovary: *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:263-4
5. Hoskins W, Pérez CA, Young RC. Principles and Practice of Gynecologic Oncology. Lippincott Williams & Wilkins. 3rd Edition 2000
6. Shingleton HM, Fowler WC, Jordan JA, Lawrence WD. Clasificación de estadificaciones de uso actual. En *Oncología Ginecológica*. p 561-579. McGraw-Hill Interamericana. Primera edición en español 1998
7. Akahira J, Yoshikawa H, et al. Prognostic Factors of Epithelial Ovarian Cancer: A multicenter Retrospective Study. *Ginecol Oncol.* 2001;81:398-403.
8. Eisenkop S, Spirtos N. Procedures Required to Accomplish Complete Cytoreduction of Ovarian Cancer: Is There a Correlation with "Biological Aggressiveness" and Survival?. *Gynecol Oncol.* 2001; 82:435-441
9. Menczer J. Reflections on the FIGO surgical staging of invasive epithelial ovarian cancer (review). *Eur J Gynaecol Oncol.* 2003;24(3-4):215-22.
10. Ph Major A, Kiscic J, Tropé CG: Controversies in surgical management of advanced ovarian cancer (Stage III-IV) *Eur Gynecol Oncol.* 2000;21(5):449-59.
11. DiSaia Philip. *Oncología Ginecológica Clínica*. Editorial Harcourt Brace. Quinta Edición, 1999.
12. Pedrero A. Citoreducción Primaria en Cáncer de Ovario EIII Tesis 2003. Servicio de Ginecología Oncológica del hospital "Luis Castelazo Ayala", IMSS.
13. Holschneider CH, and Berek JS. Ovarian cancer: epidemiology, biology, and prognostic factors. *Semin Surg Oncol.* 2000;19:3-10
14. Aunoble B, Sanches R, Didier E and Bignon YJ. Major oncogenes and tumor suppressor genes involved in epithelial ovarian cancer (review). *Int J Oncol.* 2000;16:567-576
15. Sui Li, Dong Y, Ohno M, Sugimoto K, Tai Y, Hando T and Tokuda M. Implication of malignancy and prognosis of p27^{kip1}, Cyclin E, and Cdk2 expression in epithelial ovarian tumors. *Gynecol Oncol.* 2001;83:56-63
16. Berchuck A, Kamel A, Whitaker R, Kerns B, Olt G, Kinney R, Soper JT, Dodge R, Clarke-Pearson, DL, Marks P, McKenzie S, Yin S and Bast RC. Overexpression of HER-2/neu is associated with poor survival in advanced ovarian cancer. *Cancer Res.* 1990;50:4087-4091
17. Rosenberg E, Demopoulos RI, Zeleniuch-Jacquotte A, Yee H, Sorich J, Speyer JL, Newcomb EW. Expression of cell cycle regulators p57(KIP2), cyclin D1, and cyclin E in epithelial ovarian tumors and survival. *Hum Pathol.* 2001;32:808-813
18. Bellacosa A, de Feo D, Godwin AK, Bell DW, Cheng JQ, Altomare DA, Wan M, Dubeau L, Scambia G and Masciullo V. Molecular alterations of the AKT2 oncogene in ovarian and breast carcinomas. *Int J Cancer.* 1995;64:280-285
19. Shayesteh L, Lu Y, Kuo WL, Baldocchi R, Godfrey T, Collins C, Pinkel D, Powell B, Mills GB and Gray JW. PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. *Nat Genet.* 1999;21:99-102
20. Yuan ZQ, Sun M, Feldman RI, Wang G, Ma X, Jiang C, Coppola D, Nicosia SV and Cheng JQ. Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of

- phosphoinositide-3-OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. *Oncogene*. 2000;19:2324-2330
21. Chen Z, Fadiel A, Feng Y, Ohtani K, Rutherford T, Naftolin F. Ovarian epithelial carcinoma tyrosine phosphorylation, cell proliferation, and ezrin translocation are stimulated by interleukin 1a and epidermal growth factor. *Cancer*. 2001;92:3068-3075
 22. Bast RC Jr. Status of tumor markers in ovarian cancer screening. *J Clin Oncol*. 2003;21(10 Suppl):200-5.
 23. Saygili, S.Guclu. Can serum Ca-125 levels predict the optimal primary cytoreduction in patients with advanced ovarian carcinoma?. *Gynecol Oncol* 2002;86:57-61
 24. Díaz-Cuteo L, Stein P, Jacobs A, Schultz RM, Gerton GL. Modulation of mouse preimplantation embryo development by acrogranin (epithelin/granulin precursor). *Dev Biol*. 2000;217:406-418
 25. Zanocco-Marani T, Bateman A, Romano G, Valentinis B, He ZH and Baserga R. Biological activities and signaling pathways of the granulin/epithelin precursor. *Cancer Res*. 1999;59:5331-5340
 26. Xu SQ, Tang D, Chamberlain S, Pronk G et al. The Granulin/epithelin precursor abrogates the requirement for the insulin-like growth factor I receptor for growth in vitro. *J Biol Chem* 1998;273:20078-20083
 27. Runging Lu, Ginette Serrero. Inhibition of PC cell derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the human breast carcinoma cell line MDA-MB-468. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(8):3993-3998.
 28. Anakwe OO, Gerton GL. Acrosome biogenesis begins during meiosis: Evidence from the synthesis and distribution of an acrosomal glycoprotein, acrogranin, during guinea pig spermatogenesis. *Biol Reprod*. 1990;42: 317-328
 29. Liao, R.L:Lallone, R.S.Seitz. Identification of a Human Glioma-associated Growth Factor Gene, granulin, using differential Immuno-absorption. *Cancer Res*. 2000;60:1353-1360
 30. Donald CD, Laddu A, Chandham P, Lim SD, Cohen C, Amin M, Gerton GL, Marshall FF, and Petros JA. Expression of progranulin and the epithelin/granulin precursor acrogranin correlates with neoplastic state in renal epithelium. *Anticancer Res*. 2001;21:3739-3742
 31. Jones-Brown M, Spooner M, and Kohn EC. The granulin-epithelin precursor: a putative new growth factor for ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2003;88(1 Pt 2):S136-9
 32. Shoyab M, McDonald VL, Byles C, Todaro GJ, Plowman GD. Epithelins 1 and 2: Isolation and characterization of two cysteine-rich growth-modulating proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:7912-7916
 33. Plowman GD, Green JM, Neubauer MG, Buckley SD, McDonald VL, Todaro GJ, Shoyab M. The epithelin precursor encodes two proteins with opposing activities on epithelial cell growth. *J Biol Chem*. 1992;267:13073-13078
 34. Zhou J, Gao G, Crabb JW, Serrero G. Purification of an autocrine growth factor homologous with mouse epithelin precursor from a highly tumorigenic cell line. *J Biol Chem*. 1993;268:10863-10869
 35. Halper J, and Moses HL. Epithelial tissue-derived growth factor-like polypeptides. *Cancer Res*. 1983;43:1972-1979.
 36. Brown CA and Halper J. Mitogenic effect of transforming growth factor type e on epithelial and fibroblastic cells. Comparison with other growth factors. *Exp Cell Res*. 1990;190:233-242
 37. Suzuki, M., Matsumura, M., Hirabayashi, K., Ogawara, M., Takahashi, M., and Nishihara, M. Oocyte-specific expression of granulin precursor (acrogranin) in rat ovary. *J Reprod Devel*. 2000;46:271-277.
 38. Lu R and SerreroG. Inhibition of PC cell-derived growth factor (PCDGF, epithelin/granulin precursor) expression by antisense PCDGF cDNA transfection inhibits tumorigenicity of the

- human breast carcinoma cell line MDA-MB-468. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97:3993-3998
39. Daniels R, He Z, Carmichael P, Halper J, and Bateman A. Cellular localization of gene expression for progranulin. *J Histochem Cytochem*. 2000;48:999-1009
 40. Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, and Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr Rev*. 2001;22:255-88.
 41. Brown M, Michener CH, Blanchette J, Kuznetsov V, Raffeld M, Serrero G, Emmert-Buck M, Petricoin E, Krizman D, Liotta L and Kohn E. The granulin-epithelin precursor/PC-cell-derived growth factor is a growth factor for epithelial ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9:44-51

ANEXOS

TABLA 1. TUMORES DE OVARIO ANALIZADOS

<i>TUMORES DE OVARIO</i>	<i>N/%</i>
<u>MALIGNOS</u>	11
Cistoadenocarcinoma Seroso	4/36 %
Cistoadenocarcinoma Mixto	4/36 %
Carcinoma Endometroide	1/9 %
Carcinoma de Células Claras	1/9 %
Carcinoma de Difícil Estirpe	1/9 %
Cistoadenocarcinoma Mucinoso	0
<u>BENIGNOS</u>	18
Cistoadenomas	10/56 %
Teratomas	8/44 %
<i>TOTAL</i>	29

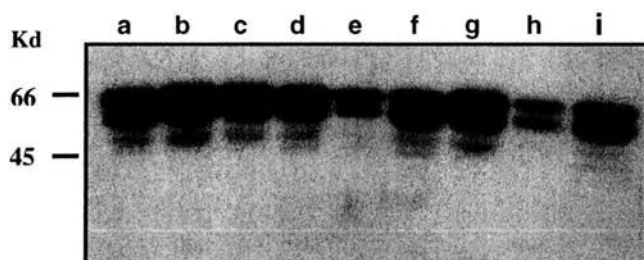


FIGURA 1.-Detección de Acrogranina por medio de inmunoblot en extractos proteicos provenientes de tumores ováricos benignos. La acrogranina fue detectada a 67,000 Mr y una segunda banda fue observada con un peso mayor de 45,000 Mr. a) ovario normal, b), c), f), g), h), i) Cistoadenomas y d), e) teratomas.

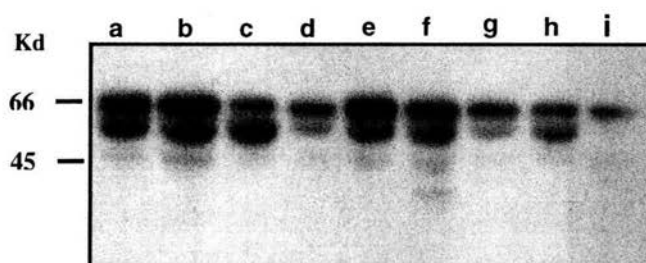


FIGURA 2.-Detección de Acrogranina por medio de inmunoblot en extractos proteicos provenientes de tumores ováricos malignos y benignos. La acrogranina fue detectada a 67,000 Mr y una segunda banda fue observada con un peso mayor de 45,000 Mr. a) ovario normal, b), c), f), i) Tumores malignos, d), e), g), h) Cistoadenomas.

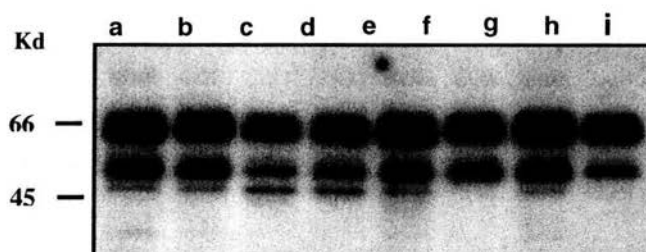


FIGURA 3.-Detección de Acrogranina por medio de inmunoblot en extractos proteicos provenientes de tumores ováricos malignos y benignos. La acrogranina fue detectada a 67,000 Mr y una segunda banda fue observada con un peso mayor de 45,000 Mr. a), b), c), d), e), f), g) Tumores malignos y h) Cistoadenoma.

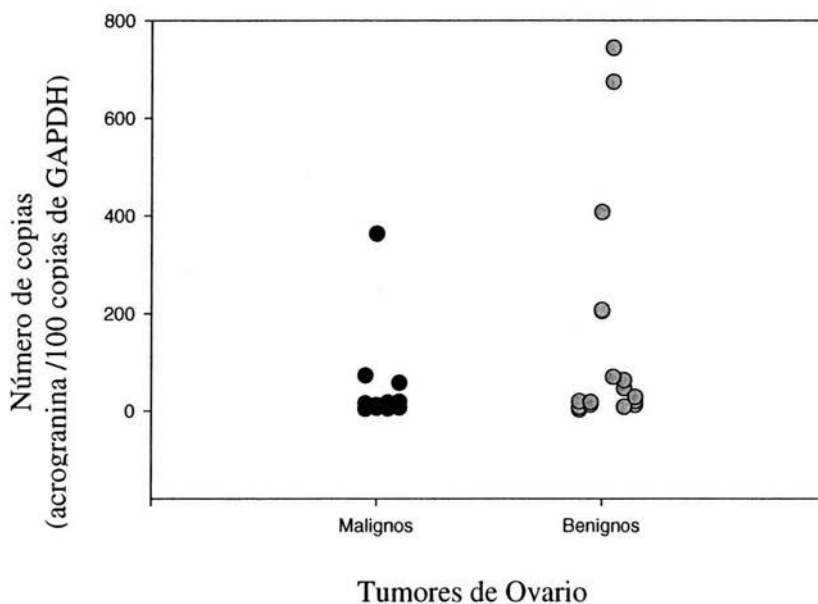


FIGURA 4. Expresión del gen de la acrogranina determinado por medio de PCR de tiempo real y expresado en número de copias (acrogranina/100 copias de GAPDH). Podemos observar que el gen de la acrogranina se expresa tanto en los tumores malignos como benignos y en ambos grupos presenta una gran variabilidad.

Apéndice 1**HOJA DE RECOLECCION DE DATOS****PROYECTO: EXPRESIÓN DE LA ACROGRANINA EN TUMORES DE OVARIO****Paciente No.** _____**Edad** _____ **Expediente No.** _____**Dirección**
_____**Teléfonos**
_____**Fecha de diagnostico y estadificación**
_____**Fecha de cirugía y diagnostico histopatológico**
_____**Tratamientos Adicionales**

Nombre de quien llenó los datos
