



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

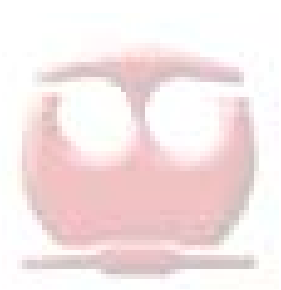
**EXPRESIÓN DE RAF-1 EN TUMORES EPITELIALES SEROSOS
MALIGNOS DE ALTO GRADO EN OVARIO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE QUÍMICA FARMACÉUTICA-BIÓLOGA

P R E S E N T A

ANA MARÍA CABAÑAS LUNA



México D.F.

2007



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: ROSARIO ADELAIDA MUÑOZ CLARES

VOCAL: JOSE ELEAZAR MARTINEZ BARAJAS

SECRETARIO: GUELAGUETZA VAZQUEZ ORTIZ

PRIMER SUPLENTE: IGNACIO CAMACHO ARROYO

SEGUNDO SUPLENTE: LAURA CECILIA BONIFAZ ALONZO

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA: LABORATORIO DE ONCOLOGÍA
GENÓMICA, HOSPITAL DE ONCOLOGÍA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI.
PROYECTO FOFOI- IMSS 2006/1A)/I/030.

ASESOR DEL TEMA: _____

GUELAGUETZAVÁZQUEZ ORTIZ

SUSTENTANTE: _____

ANA MARÍA CABAÑAS LUNA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al IMSS por permitirme participar en el proyecto FOFOI- IMSS 2006/1A)/I/030 y contribuir en el campo de la investigación.

Al Dr. Mauricio Salcedo Vargas, a la Dra. Isabel Alvarado, a la Dra. Minerva Lazos, a la Dra. Patricia Piña, por su apoyo en al adquisición de nuevos conocimientos.

A todos los compañeros del laboratorio de oncología, Sergio, Vanne, Hugo, Karla, Andrés, Manuel... por su apoyo y paciencia.

A mis padres por su apoyo y aliento para llevar a término esta etapa de mi vida. A ti papá porque siempre estaba ahí tu mano y hombro cuando ya no encontraba claridad en mi camino. A ti mamá que siempre recibí un abrazo cuando lo necesite, dándome fortaleza para continuar y que aun continuas alentando...para llevar acabo mis metas. Los quiero mucho...

A Paulo por el apoyo en la búsqueda y obtención de información para este trabajo.

A Carmen, Maru, Alejandro, Ruth y Jesús, mis amigos incondicionales.

Ah... y a cada uno de los profesores de la facultad que ayudaron en cada momento en la adquisición de todo el conocimiento hasta ahora. En especial al Dr. Aníbal Bascuñan por su gran apoyo y comprensión.

A todos mis compañeros de la generación: John, Ezra, Alejandra, Nelly, Lupita, Alicia, Erika....

ÍNDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
I. Ovario	4
<i>I.1 Composición celular</i>	4
<i>I.2 Ovulación</i>	6
II. Cáncer en ovario	7
<i>II.1 Tumorigénesis</i>	7
<i>II.2 Clasificación de tumores en ovario</i>	8
<i>II.3 Epidemiología</i>	10
<i>II.4 Factores etiológicos</i>	10
<i>II.5 Mecanismos propuestos de tumorigénesis en tumor epitelial en ovario</i>	11
<i>II.6 Métodos de diagnóstico</i>	12
III. Proteína Raf	13
<i>III.1 Generalidades</i>	13
<i>III.2 Función de Raf</i>	14
<i>III.3 Importancia biológica de Raf-1 en tumores en ovario</i>	16
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS PARTICULARES	18
MATERIAL Y MÉTODOS	19
<i>Diagrama de flujo</i>	20
<i>Análisis in silico de Raf-1</i>	20

<i>Muestras biológicas</i>	26
<i>Cortes histológicos</i>	26
<i>Tinción Hematoxilina y Eosina</i>	27
<i>Identificación de la lesión</i>	27
<i>Construcción del microarreglo de tejidos (MAT)</i>	28
<i>Inmunohistoquímica</i>	31
<i>Análisis densitométrico de la inmunohistoquímica</i>	32
RESULTADOS	33
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	39
LITERATURA CITADA	40
ANEXO I. Inclusión de tejidos frescos	45
ANEXO II. Preparación de soluciones	47

ABREVIATURAS

CaEO: cáncer epitelial de ovario.

cMYC: oncogen viral V-myc de mielocitomatosis

KRAS: v-Ki-ras2 Kirsten oncogen viral homologo de sarcoma de rata

ERBB2, HER-2/neu: v-erb-b2 oncogen viral de leucemia eritroblastica homologo

PI3K: fosfinositido-3 cinasa

AKT2: cinasa reguladora de apoptosis

BRAF: V-raf oncogen viral de sarcoma murino

IL-1: interleucina-1

IL-6: interleucina-6

EROs: especies reactivas de oxígeno

TJs: uniones fuertes

MUC-1, 2, 3 y 4: mucina-1 a mucina-4

CA125: antígeno de cáncer en ovario (ovarian cancer antigen)

p53: proteína supresora de tumor

TAC: Tomografía Axial Computarizada

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

v-raf: rapidly growing fibrosarcoma

MEK: proteína cinasa activadora de mitógenos

EGF: factor de crecimiento epidermal

MAPKs: proteína cinasa activadora de mitógenos

ERK: cinasa extracelular reguladora de señales

BAD: antagonista de BCL2 involucrada en muerte celular

Bim: mediador de muerte celular por interacción con BCL2

SAGE: Análisis de expresión serial de genes

NCBI: National Center for Biotechnology Information

NCI-CGAP: National Cancer Institute-Cancer Genome Anatomy Project

RESUMEN

El cáncer epitelial de ovario (CaEO) representa la cuarta causa de muerte ginecológica en mujeres a nivel mundial. El primer lugar lo ocupa el cáncer cervicouterino seguido por el cáncer de mama. En México aproximadamente el 90% de los tumores en ovario se origina en el epitelio. Dentro de los factores etiológicos se encuentran historian familiar de cáncer de ovario, mama o colon, nuliparidad y tratamientos para la infertilidad. El cáncer epitelial se clasifica de acuerdo a su morfología en tumores serosos, mucinosos, endometrioides, de células claras y de tipo Brenner. Así también cada uno se subdivide en tumores benignos, borderline y malignos (de bajo y alto grado).

Se han identificado mutaciones en los oncogenes cMYC, KRAS y ERBB2, en la fosfatidil inositol cinasa (PI3K) y AKT2. También existen mutaciones en KRAS y BRAF características de los tumores serosos borderline y los carcinomas serosos de bajo grado, caso contrario para los carcinomas serosos de alto grado donde no se han identificado mutaciones de BRAF y son raras las mutaciones de KRAS en este tipo de tumor.

Mediante análisis *in silico* utilizando la base de datos de expresión génica “GEO Profiles” se identificó un aumento en la expresión del transcrito Raf-1 en el ovario tumoral respecto al ovario normal, permitiendo suponer la posible participación de Raf-1 en la tumorigénesis del ovario. Considerando lo anterior, este trabajo tiene como objetivo determinar la expresión de la proteína Raf-1 en microarreglos de tejido de tumor epitelial seroso en ovario de alto grado y epitelio de ovario normal humano, construidos manualmente empleando la técnica de inmunohistoquímica indirecta. Los resultados indicaron expresión de la proteína Raf-1 en tumores epiteliales serosos a diferencia del epitelio de ovario normal que no mostró expresión, sugiriendo que Raf-1 esta asociado con procesos de tumorigénesis tales como regulación de la invasión y metástasis de las células tumorales.

INTRODUCCIÓN

En años recientes ha surgido un gran interés por entender los aspectos moleculares de la progresión de los tumores en ovario para lo cual se requiere conocer los aspectos fisiológicos del órgano, esta información se presenta en el primer capítulo de este trabajo. Posteriormente en el siguiente capítulo comentaremos los aspectos generales del proceso de tumorigénesis epitelial en ovario, la clasificación de los tumores de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (OMS), la epidemiología a nivel mundial y en México, los factores que predisponen a la mujer a presentar tumores en ovario, los mecanismos propuestos de surgimiento del tumor epitelial en este órgano y las técnicas de detección de la patología.

En el capítulo tercero se dará un bosquejo general de la función, la participación y la importancia de la proteína Raf-1 en ovario tumoral.

Con base en la información disponible se propone que la proteína Raf-1 es importante en el proceso de tumorigénesis, y que en tejidos de ovario normal y tumoral humano *in situ*, su expresión será diferente. Por lo anterior el objetivo del trabajo es determinar la expresión de la proteína Raf-1 en tumores epiteliales serosos y en epitelio de ovario normal pues es probable que su expresión esté involucrado en los cambios moleculares que ocurren en los tumores epiteliales en ovario. También se incluye un apartado de análisis *in silico* donde se muestra el comportamiento del transcrito en diferentes tejidos normales y tumorales, empleando una base de datos pública, con lo cual se intentará dar una perspectiva más amplia a los resultados del presente trabajo.

Así también se presenta un apartado sobre los criterios de inclusión de las muestras, su tratamiento para determinar la morfología del tejido, confirmar del tipo de lesión presente, mediante la ayuda del médico patólogo, la determinación de la expresión de la proteína de interés y los resultados que de ello se deriva.

Finalmente con base en los antecedentes y los resultados obtenidos del trabajo de investigación se darán las respectivas conclusiones y perspectivas del presente trabajo.

I. Ovario

Los órganos reproductores femeninos comprenden los órganos sexuales y las glándulas mamarias. Los órganos sexuales se clasifican en internos y externos. Los órganos sexuales internos están constituidos por ovarios, trompas uterinas, útero y vagina.

Durante el periodo de reproducción, los ovarios pesan aproximadamente entre 2-4 g y miden aproximadamente 4x2.5x1.5 cm. Los ovarios son lisos, redondos u ovalados. (Chen *et. al.*, 2003; Cotran *et. al.*, 2002; Clement, 2002)

Estos tienen dos funciones, una es la maduración y liberación de los oocitos y la segunda es la producción y secreción de hormonas. Los ovarios están recubiertos por una monocapa de células cúbicas denominada mesotelio peritoneal. Esta monocapa de células que forma el epitelio está constituida por células escamosas que pueden adoptar diversas formas, desde células planas, células cuboidales y células cilíndricas. Estas células del mesotelio se caracterizan por presentar queratina 7, 8, 18 y 19, vimentina y mucina. (Geneser, 2001; Auersperg, 2001)

1.1 Composición celular

Un corte transversal del ovario muestra una corteza externa no bien delimitada respecto de una médula central. La médula está compuesta por tejido conectivo laxo y la corteza está formada por estroma, tejido conectivo y es donde se encuentran inmersos los folículos ováricos. Por debajo del mesotelio o epitelio ovárico el tejido conectivo es más fibroso formando una capa delgada llamada túnica albugínea. Los folículos ováricos son denominados folículos primordiales, localizados por debajo de la túnica albugínea. Cada folículo primordial está constituido por un único oocito y una capa de células epiteliales llamadas células foliculares. (Geneser, 2001; Clement, 2002)

Al comienzo de la maduración un folículo primordial pasa a ser un folículo primario en crecimiento. El oocito y las células epiteliales crecen, éstas últimas muestran un citoplasma granuloso formando las denominadas células de la granulosa. Durante el crecimiento del folículo, éste se va localizando hacia la corteza. En éste proceso las células del estroma circundante se ordenan formando una capa de células denominada teca folicular. (ver Figura 1)

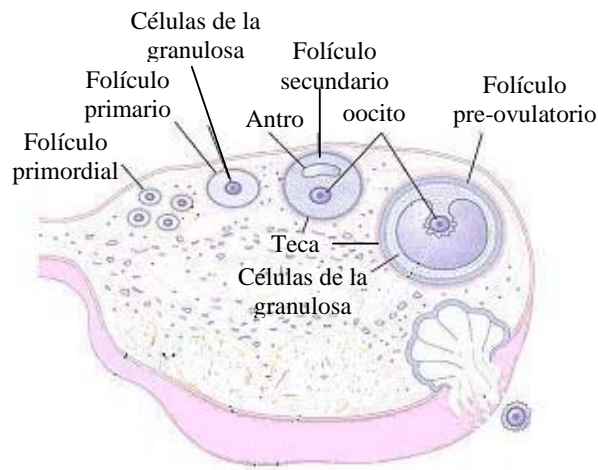


Figura 1. Composición celular del ovario durante el proceso de maduración del folículo y liberación del oocito.

Las células de la teca se diferencian en células de la teca interna y externa. Las células del estroma de la teca interna se diferencian a células epiteliales, mientras que las células de la teca externa continúan siendo de tejido conectivo.

Cuando el folículo alcanza un tamaño aproximado de 400 μm , a partir de las células de la granulosa se forman zonas con líquido que van creciendo y uniéndose formando un espacio lleno de líquido, conocido como antro folicular. El antro folicular contiene gran concentración de estrógenos, este folículo formado se conoce como folículo secundario.

El folículo secundario continúa su crecimiento con formación de más líquido folicular, previo a la ovulación.

I.2 Ovulación.

El folículo pre-ovulatorio forma un abultamiento en la superficie del ovario. La túnica albugínea, las células de la teca y la capa de células de la granulosa se adelgazan y rompe junto con la ruptura del epitelio liberando el oocito y líquido folicular. (Geneser, 2001; Guyton, 2006)

Las células del epitelio secretan quimi tripsina, elastasa y metaloproteinasas, enzimas que van a facilitar la degradación de epitelio y facilitar la liberación del oocito por ruptura de la túnica albugínea, la capa de células de la teca y la capa de células de la granulosa del folículo pre-ovulatorio. (Wong and Leung, 2007; Clement, 2002)

Así también, el epitelio en el folículo pre-ovulatorio experimenta apoptosis al mismo tiempo en que se lleva a cabo la ovulación. Seguido de la ovulación, la proliferación de las células epiteliales es importante para la reparación y re-construcción del epitelio. Se ha visto que el epitelio circundante al sitio de ruptura epitelial ésta expuesta a citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6) y otros factores tales como especies reactivas de oxígeno (EROs) producidos durante la ruptura del folículo. Las EROs van a incrementar la posibilidad de dañar al DNA. Así la actividad mitógena de las células epiteliales en reparación podría favorecer la sobrevivencia de células epiteliales con acumulación de mutaciones. (Wong and Leung, 2007; Mendoza *et. al.*, 2003; Cardenas and Pedraza, 2005; Fink and Cookson, 2005)

I. Cáncer en ovario.

II.1 Tumorigénesis

Una neoplasia se define como el crecimiento descontrolado de la célula normal. Los tumores epiteliales en ovario se han clasificado de diversas formas, según las células en las que se originan, de acuerdo a sus características macroscópicas y microscópicas.

Las neoplasias benignas en ovario forman masas quísticas que se conocen como cistadenomas. Las neoplasias malignas de origen epitelial, derivadas de cualquiera de las tres capas germinales del embrión se denominan carcinomas. Los carcinomas con crecimiento glandular se conocen como adenocarcinomas; los que proceden de células escamosas procedentes de cualquiera de los epitelios estratificados del organismo se llaman escamosos o epidermoides. (Cotran *et. al.*, 2002; Seidman *et. al.*, 2002)

Existen criterios que nos permiten diferenciar un tumor benigno de un tumor maligno, tales como:

- a) Grado de diferenciación morfológica y funcional. Las neoplasias malignas donde las células están totalmente indiferenciadas se conocen como anaplásicas. La ausencia de diferenciación se caracteriza por núcleos pleomórficos, es decir, variaciones en el tamaño y forma del núcleo. Las células presentan gran cantidad de DNA hipercromático, el tamaño del núcleo es desproporcionado y la relación núcleo:citoplasma es de 1:1. La cromatina suele formar cúmulos y disponerse junto a la membrana nuclear. Las células generalmente presentan gran actividad mitótica.
- b) Velocidad de crecimiento
- c) Invasión local. Los tumores benignos permanecen localizados en su lugar de origen y no presentan capacidad de infiltrar, invadir ni metastatizar a otros tejidos. Están delimitados por una cápsula fibrosa, a diferencia de los tumores malignos en los que hay ruptura de esta cápsula, se observa metástasis e infiltración.

II.2 Clasificación de tumores en ovario

Como se menciono anteriormente, los tumores en ovario se han clasificado de acuerdo a la célula de donde se originan, así se tienen tumores epiteliales, tumores de estroma y tumores de células germinales. Considerando sus características morfológicas los tumores se clasifican en tumor seroso, mucinoso, de células claras y de células de transición o tipo Brenner. Así también de acuerdo a su grado de diferenciación, velocidad de crecimiento e invasión local estos tumores se clasifican en tumor benigno, borderline y maligno, como se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Clasificación general de los tumores en ovario.

ORIGEN	MORFOLOGIA	GRADO DIFERENCIACIÓN, VELOCIDAD CRECIAMIENTO E INVASIÓN LOCAL
Epitelio	<ul style="list-style-type: none"> Serosos Mucinosos Endometroide Células Claras Células de Transición o Tipo Brenner 	<ul style="list-style-type: none"> Benignos Borderline Malignos
Estroma		
Células Germinales		

Los tumores epiteliales están constituidos por áreas quísticas (cistadenomas), áreas quísticas y fibrosas (cistoadenofibromas) y áreas predominantemente fibrosas (adenofibromas). Aunque se denominan tumores epiteliales porque se originan del epitelio, estas células tienen la capacidad de diferenciarse y adoptar la morfología de las células de

los conductos ováricos (tumor seroso), del cuello uterino (tumor mucinoso) y del endometrio (tumor endometroide).

Los tumores serosos son las neoplasias más frecuentes que se caracterizan por presentar células epiteliales altas, cilíndricas y ciliadas que contienen líquido seroso. Los cistadenomas serosos representan el 40% de todos los tumores del ovario. Los tumores benignos y limítrofes predominan entre los 20 y los 50 años de edad. (Cotran *et. al.*, 2002). En el siguiente cuadro se muestra a manera de resumen las características morfológicas que diferencian los tumores serosos benignos, serosos borderline y serosos malignos. (Chen *et. al.*, 2003; Bell, 2005; Seidman *et. al.*, 2002; Crum, 2002)

Cuadro 1. Características de los tumores epiteliales serosos en ovario de acuerdo a su grado de diferenciación.

Grado diferenciación	Tipo Seroso
Benigno	Presenta un quiste, con material rojizo en su interior y proyecciones papilares que generalmente es bilateral y presenta baja proliferación y capacidad invasiva.
Borderline	Presenta proyecciones papilares finas en su interior y exterior, alta proliferación y baja capacidad invasiva. Es bilateral. Su reincidencia se presenta en la cavidad pélvica.
Maligno	Presenta múltiples quistes con áreas sólidas, abundantes proyecciones papilares en la superficie. Es bilateral. Al momento del diagnóstico se encuentra diseminado.

Uno de los aspectos característicos de la carcinogénesis del ovario son los cambios que se presentan a nivel de diferenciación celular. Como se menciono el epitelio ovárico es un epitelio con características de estroma, que al presentarse un proceso maligno adquiere características de las células Mullerianas, es decir, características de las células epiteliales de los oviductos, del endometrio y del cérvix. Durante este proceso se han encontrado

alteraciones moleculares en E-caderina, TJs, antígenos de membrana productos de secreción como MUC-1, 2, 3 y 4 y CA125. (Auersperg, 2001; Drapkin *et. al.*, 2004)

II.3 Epidemiología.

El cáncer en ovario es la primera causa de muerte por neoplasia ginecológica en el mundo occidental y a nivel mundial representa la cuarta causa de muerte por neoplasia. Las estadísticas indican que aproximadamente el 60% de las mujeres que desarrollen cáncer en ovario morirán por la misma enfermedad.

En México, de acuerdo a los datos del Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México (RHNNM) hasta el 2001, el cáncer de ovario es la tercer causa de muerte por neoplasia en mujeres y se incrementa en aproximadamente 2-3% cada año. Sumado a que no existen pruebas específicas para su detección temprana y curso asintomático de la enfermedad, el 75% de las pacientes son diagnosticadas en etapas avanzadas de la enfermedad.

II. 4 Factores etiológicos.

Los factores etiológicos confirmados que predisponen a una mujer a presentar cáncer en ovario se encuentran: historia familiar de cáncer de ovario, mama o colon, nuliparidad y tratamientos para la infertilidad, estos últimos provocan un incremento en el proceso de ovulación con rompimiento y reparación continúa de la superficie epitelial del ovario promoviendo la presencia de alteraciones genéticas (Seidman *et. al.*, 2002; Boulton, 2006; Wong and Auersperg, 2003). Otros factores etiológicos relacionados al cáncer en ovario son la dieta, exposición a residuos industriales, tabaquismo y exposición a asbestos.

II.5 Mecanismos propuestos de tumorigénesis en tumor epitelial en ovario.

Debido a la dificultad para asignar características histopatológicas específicas que faciliten la identificación de los diferentes estadios del tumor en ovario, así como la falta de estudios a nivel molecular Shih y Kurman, 2004, se dieron a la tarea de proponer dos posibles mecanismos de tumorigénesis del ovario.

El primer mecanismo o ruta I considera la presencia de un continuum de lesiones precursoras que incluye cistadenomas, tumores borderline, carcinomas serosos de bajo grado y carcinomas seroso de alto grado. El segundo mecanismo considera que los carcinomas serosos de alto grado se originan de novo a partir del epitelio ovárico.

Los mecanismos propuestos se basan en los escasos resultados obtenidos a nivel molecular. Estos estudios indican que los cistadenomas serosos y los tumores serosos de bajo grado en su mayoría asintomáticos y bajo grado de progresión, presentan frecuentes mutaciones en los genes KRAS (Mok *et. al.*, 1993) y BRAF. A diferencia de los carcinomas serosos de alto grado en donde solo se han encontrado mutaciones en el gen p53, además de la amplificación y sobre-expresión del gen HER-2/neu y del gen AKT1 (Seidman *et. al.*, 2002). Debido a que no existen lesiones precursoras descritas que contengan mutaciones en el gen p53, ellos han sugerido la formación de novo de los tumores serosos de alto grado o bien que el desarrollo de estos últimos no tiene relación alguna con los tumores serosos de bajo grado. (Shih and Kurman, 2004; Singer *et. al.*, 2003).

II.6 Métodos de diagnóstico

El diagnóstico definitivo del cáncer de ovario es básicamente histológico, aunque existen técnicas de apoyo como historia clínica, técnicas de imagen y marcadores tumorales para orientar el diagnóstico y posible origen del tumor.

Dentro de las técnicas de imagen esta la ecografía (ultrasonido), ésta metodología se basa en la identificación de cambios en el tamaño, espesor e irregularidad del contorno del ovario. La ecografía transvaginal es considerada la técnica más efectiva en la obtención de la imagen con un 100% de sensibilidad y 85% de especificidad.

El eco-Doppler color transvaginal se basa en la detección de cambios vasculares presentes en el tejido, considerando que los vasos en el tumor son más abundantes.

La técnica TAC (Tomografía Axial Computarizada) se basa en el escáner abdominopélvico evaluando la extensión del carcinoma, determinando la afectación retroperitoneal pélvica, así como monitoreo de la respuesta a tratamiento.

La RMN (Resonancia Magnética Nuclear) pélvica es una técnica no traumática, de alto costo y por tanto de difícil acceso. Se obtienen imágenes excelentes de todos los órganos pélvicos y contribuye a la caracterización del tumor previo a la cirugía.

En cuanto a los marcadores de presencia de tumor, el marcador ideal es aquel de fácil acceso, cuantificable, producido sólo por el tumor y que sus niveles reflejen el estado de la enfermedad, respuesta a la terapia y permitan diagnóstico precoz. Los marcadores que se conocen en la actualidad son inespecíficos, tal es el ejemplo del marcador de presencia de tumor CA125, el más empleado a nivel mundial, que no es específico ya que se encuentran niveles elevados en cáncer endometrial, gastrointestinal y de mama, así como en procesos benignos como endometriosis, miomas, gestación, embarazo ectópico, durante la fase lútea y en personas sanas. (Martínez and Escribano, 2007; Gogoi *et. al.*, 2006)

I. Proteína Raf

III.1 Generalidades

Ulf Rapp en 1983 reportó la clonación del virus de sarcoma murino y caracterizó al oncogen al cual denominó *v-raf* (*rapidly growing fibrosarcoma*) (Baccarini, 2005). Los genes Raf fueron identificados como una familia de oncogenes retrovirales que poseen actividad de serina/treonina cinasa y son agentes causales de tumores en ratones y pollos. Esta familia está constituida por tres isoformas, A-Raf, B-Raf y C-Raf (Raf-1) (Baccarini, 2005; Mullen *et. al.*, 2006). Las diferentes isoformas se distinguen por su perfil de expresión, regulación y su habilidad para participar en la vía Ras-MEK. Todas las isoformas de Raf presentan un extremo carboxilo terminal conservado. Este sitio puede ser fosforilado por unión con otras proteínas tal como la proteína 14-3-3, promoviendo su actividad. El extremo amino terminal de la proteína al unirse con otras proteínas provoca la inhibición de su actividad como cinasa.

La familia de proteínas Raf están constituidas por tres regiones conservadas CR1, CR2 y CR3. El dominio CR1 esta formado por dos regiones de unión a Ras (RBD y CRD), el dominio CR2 un dominio rico en serina y treonina que se ha visto está involucrado en la localización y activación de Raf y el dominio CR3 es el dominio catalítico, sujeto a regulación por fosforilación. Por ejemplo la proteína Raf-1, como se muestra en la figura 2, es una proteína formada por 648 aminoácidos con sus dominios CR1, CR2 y CR3. (Chong *et. al.*, 2003; Mercer and Pritchard, 2003)

La proteína Raf-1 tiene cuatro sitios de fosforilación inducibles por Ras, los cuales son: S338, Y341, T491 y S494. Se ha encontrado mutaciones en el sitio S338 provocando una disminución de la activación de Raf inducida por EGF, Ras, entre otros efectores. (Chong *et. al.*, 2003; van Hemert *et. al.*, 2001; Mok *et. al.*, 1993).

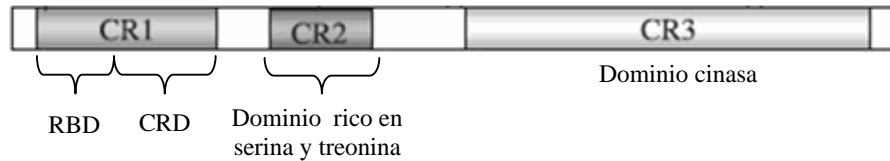


Figura 2. Estructura general de la proteína Raf-1. Proteína de 648 aminoácidos. Esta proteína presenta tres regiones conservadas, CR1 con dos dominios de unión a Ras (RBD y CRD), CR2 dominio rico en serina/treonina y CR3 que es el dominio catalítico.

III.2 Función de Raf

Las diferentes isoformas de la proteína Raf son activadas por las diferentes isoformas de Ras (K, N y H). La isoforma K-Ras presenta mayor afinidad por Raf-1. En particular la isoforma Raf-1 ha sido ampliamente estudiada como la proteína que activa a la ruta Ras/MEK/ERK, obteniendo como respuesta efectos en el crecimiento, diferenciación y transformación celular. (Ehrenreiter *et. al.*, 2005; Schulze *et. al.*, 2001; Zhang *et. al.*, 2002; Ülkü *et. al.*, 2003). La activación de Raf-1 por Ras provoca el reclutamiento de Raf-1 hacia la membrana, donde es activada por otros mecanismos independientes de Ras. La activación de Raf-1 por la proteína 14-3-3 promueve la asociación del complejo Raf-1/14-3-3 con otras proteínas como la proteín-cinasa C; este complejo formado regular la señalización de Ras-Raf-MAPK. Las MAPKs (mitogen-activated protein kinase) están involucradas en la transducción de señales. (vanHemert *et. al.*, 2001; Chong *et. al.*, 2003; Wellbrock *et. al.*, 2004; Hsu *et.al.*, 2004)

La activación constitutiva de la ruta MEK/ERK influencia la progresión del tumor promoviendo o inhibiendo procesos de transcripción. En el citoplasma, ERK puede inactivar proteínas que promueven apoptosis, por ejemplo BAD. Por otro lado la activación de ERK provoca su translocación a núcleo promoviendo la transcripción de genes de ciclinas, de genes de factores involucrados en angiogenesis (VEGF), de invasión (integrinas). Así también disminuye la expresión de genes involucrados en apoptosis y sobrevivencia tal como el gen Bim, miembro de la familia de genes pro-apoptoticos, ver figura 3. (Mercer

and Pritchard, 2003; Panka *et. al.*, 2006; Shah and Catt, 2006; Choi *et. al.*, 2003; O'Neill and Kolch, 2005)

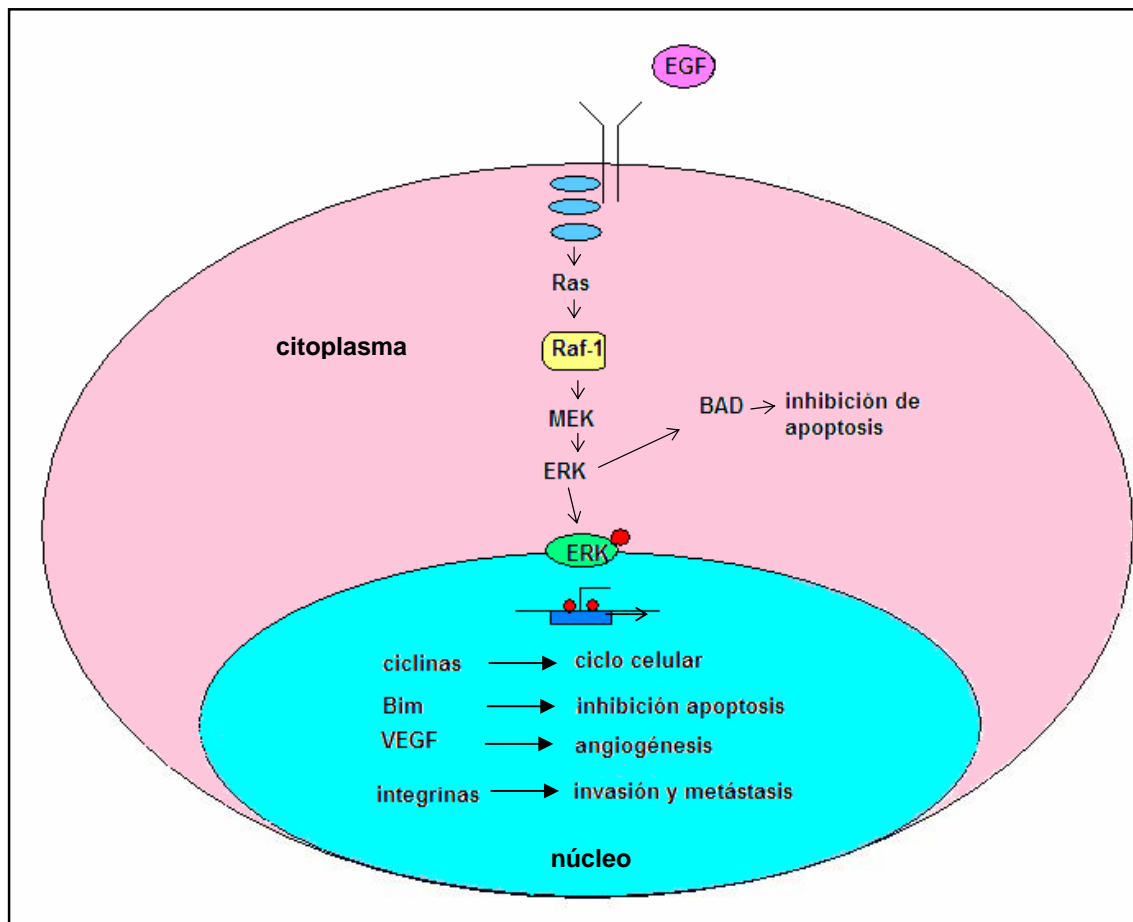


Figura 3. Mecanismo de activación de Raf-1 y procesos involucrados en su activación.

Estudios en ratones knockout para isoformas de Raf reportan la importancia de cada una de las isoformas y sugiere que cada una tiene distintas funciones. Así por ejemplo, alteraciones del gen *Raf-1* y *B-Raf* provocan la muerte durante la gestación o bien retardo en el crecimiento y defectos en el desarrollo en ratones. Modificaciones en el gen *C-Raf* provoca muerte *in útero* originada por hemorragia vascular dada por la apoptosis de las células endoteliales. La eliminación del gen *A-Raf* en ratones provoca generación de crías con defectos intestinales y neurológicos. (Baccarini, 2005; Galabova-Kovacs *et. al.*, 2006)

III.3 Importancia biológica de Raf-1 en tumores en ovario

Se ha reportado que ~1% de las líneas celulares de cáncer en ovario y ~14% del tumor primario en ovario, muestran la presencia de mutaciones en el gen B-Raf. Dichas mutaciones están asociadas con tumores serosos benignos (cistadenomas) y tumores serosos malignos de bajo grado (Singer *et. al.*, 2002; Sieben *et. al.*, 2004; McPhillips *et. al.*, 2006)

McPhillips y colaboradores (2006) han reportado que el incremento en la expresión de Raf-1 esta asociada con una disminución de la sobrevida de las pacientes con cáncer en ovario. También indican un incremento en la expresión de la proteína Raf-1 en tejido de ovario tumoral, incremento en la apoptosis por eliminación de Raf-1 mediante un oligonucleótido antisentido e incremento en la actividad de la proteína en diferentes líneas celulares derivadas de tumores serosos malignos de alto grado en ovario. Por lo anterior se sugieren que la señalización mediada por Raf juega un papel esencial en la progresión del ciclo celular e inhibición de la apoptosis. (Mullen *et. al.*, 2006)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El cáncer de ovario es la tercera causa de muerte en mujeres en nuestro país. La letalidad del carcinoma en ovario parece radicar en la dificultad para detectar la enfermedad en su etapa temprana. Tomando en cuenta la predisposición genética y la escasa información acerca de las alteraciones a nivel molecular en estos tumores, es necesario conocer el comportamiento biológico del tumor para posteriormente subsanar las deficiencias actuales tanto en el diagnóstico como en el seguimiento y comportamiento de este padecimiento. Aunque a la fecha no existe ningún patrón molecular específico para los diferentes estadios y tipos del cáncer en ovario, una de las familias de oncogenes por excelencia, tal como es la familia Ras, parece presentar alteraciones características en cada tipo tumoral, lo que sugiere un efecto sobre la activación de la familia de Raf. Por ejemplo, existe un único reporte en donde se identificaron los niveles de expresión de la proteína Raf-1, encontrando sobre-expresión de dicha proteína en tumores epiteliales serosos respecto al tejido normal. De ahí que la finalidad de este trabajo sea dar seguimiento a este estudio y determinar el comportamiento de dicha proteína en tejidos provenientes de población mexicana, empleando la técnica de inmunohistoquímica y la construcción de microarreglos de tejido, permitiendo evaluar las diferentes muestras bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad.

HIPÓTESIS

Dado que se ha identificado sobre-expresión de la proteína Raf-1 en tejidos conservados en parafina de tumores epiteliales serosos, se espera encontrar diferencias en la expresión de dicha proteína en tumores epiteliales seroso malignos de alto grado respecto al epitelio de ovario normal.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la expresión de la proteína Raf-1 en epitelio de ovario normal y en tumores epiteliales serosos malignos de alto grado para contribuir en la comprensión de los cambios moleculares que pueden estar presentes en este tipo de tumor.

OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Realizar un análisis *in silico* para determinar el comportamiento del transcrito Raf-1 en diferentes tejidos humanos normal y tumoral para dar un esbozo de su conducta *in situ*.
- b) Realizar una búsqueda de material biológico incluido en parafina en los archivos de patología del año 2005 para conocer el número de muestras existentes a analizar.
- c) Realizar cortes histológicos de cada uno de los tejidos y verificar el tipo de lesión en los tejidos completos mediante tinción de hematoxilina y eosina para la posterior construcción de los microarreglos de tejidos correspondientes a ovario normal y tumoral.
- d) Diseñar y construir los microarreglos de tejido para someter los diferentes tejidos presentes en el bloque a las mismas condiciones de trabajo.
- e) Realizar nuevamente cortes histológicos y emplear la técnica de inmunohistoquímica indirecta para determinar la expresión de la proteína Raf-1 en los microarreglos de tejido.
- f) Obtener imágenes de los tejidos a analizar para efectuar un análisis semicuantitativo de la presencia de la proteína a partir de la densidad de coloración observada.

MATERIAL Y MÉTODOS

EQUIPOS

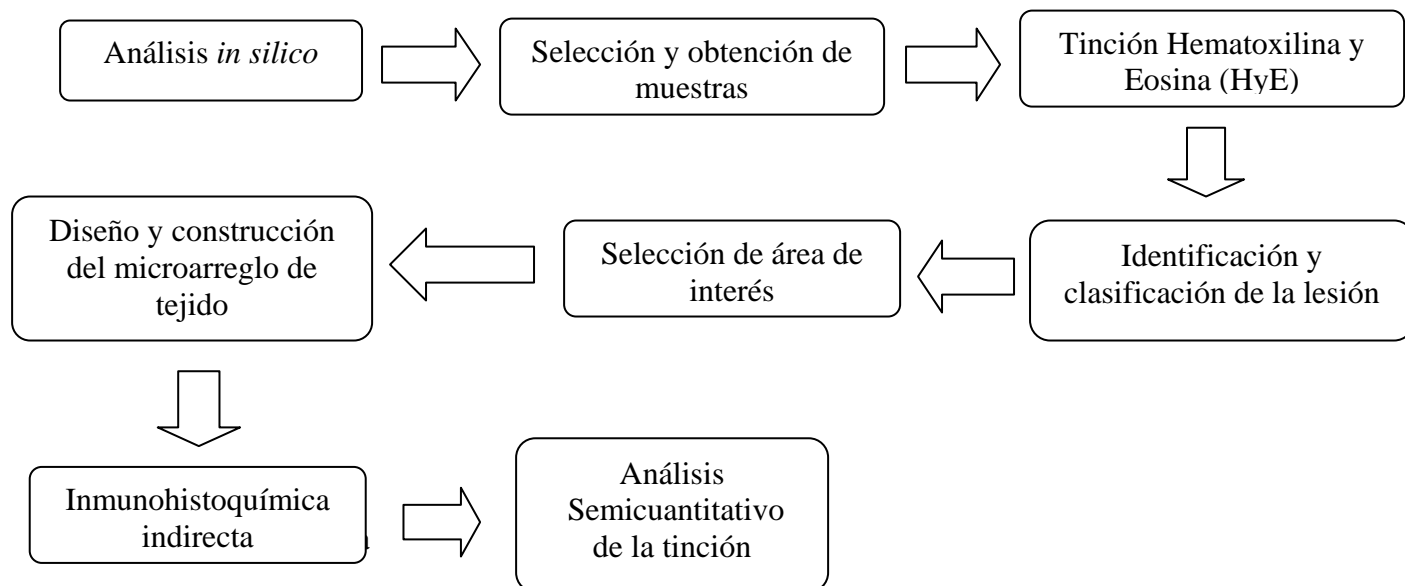
Microtomo LEICA RM 2125	Cubreobjetos
Baño de agua para tejidos	Aguja para biopsia de médula ósea de 3 y 2 mm de diámetro.
Microscopio óptico	Molde para bloques de parafina.
Portaobjetos polarizados	Vasos Coplin de 50 mL

REACTIVOS

Xilol 100%	Anticuerpo secundario marcado con peroxidasa System Detection Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB, BioSB, Santa Barbara, CA, USA).
Etanol 100, 90, 70, 30% (por duplicado)	Kit de diaminobencidina y buffer sustrato
Agua bidestilada	Agua amoniacal ¹
PBS ¹ 1X	Resina
Declere con citratos (DECLERE, CELLMARQUE, Rocklin, CA, CMX632)	Eosina ¹
H ₂ O ₂ /metanol al 10%	Hematoxilina de Harris ¹
Albúmina bovina al 10%	Parafina
Anticuerpo primario anti-Raf-1 (Raf-1 Polyclonal Antibody, BioVision, 3116-100, Mountain View, CA, USA)	Gelatina

¹ La preparación de las soluciones se indica en anexo II

Diagrama de flujo



Análisis *in silico* de Raf-1

El análisis serial de expresión de genes (SAGE) es una herramienta que como su nombre lo indica se emplea para analizar el total de los transcritos de una célula, es decir la expresión de genes conocidos y no conocidos. La tecnología SAGE consiste en el aislamiento del mRNA de una célula, éste mensajero mediante transcripción inversa es convertido a cDNA. El cDNA es sometido a tratamiento con endonucleasas para obtener secuencias de 14-21 nucleótidos (tag); cada una de estas secuencias es capaz de identificar a un gen único en el genoma de la célula. Posteriormente a estos tags se unen mediante la acción de una ligasa; la unión de dos tag es denominado di-tag, como se muestra en la figura 4, y la unión de varios tags se conoce como concatamero. Estos concatameros son clonados en un vector de expresión, expresados formando una biblioteca de expresión. Después estas secuencias son amplificadas empleando la técnica de PCR, así las copias obtenidas de los tags son secuenciadas y analizadas por software específicos. De éste análisis podemos conocer la cantidad de tags por célula y determinar que secuencias corresponden a un gen conocido o a un gen nuevo (Velculescu *et. al.*, 2000).

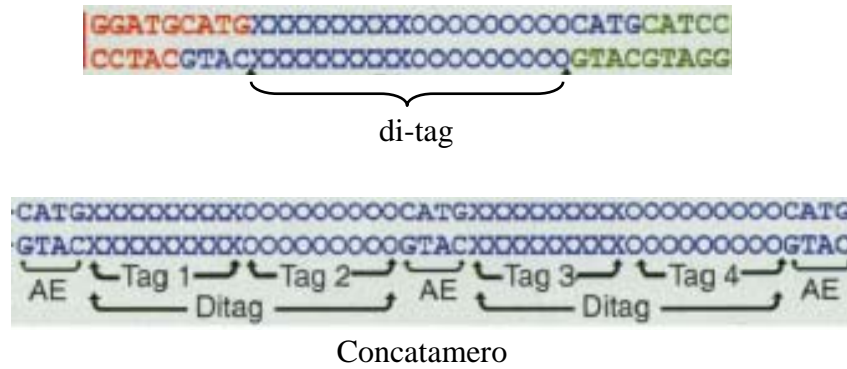


Figura 4. Esta figura muestra la unión de dos tag (di-tag), cada uno de los tag se encuentra marcado con un primer (uno en color rojo y otro en color verde) que representa un sitio de corte que permite identificar cada uno de los tag en el concatamero. El concatamero esta formado por la unión de varios tags.

La información obtenida en la actualidad del análisis de tags de diversos tejidos y líneas celulares se encuentra disponible al público en general en bibliotecas electrónicas tal como “GEO Profiles”. Estas bases de datos sirven para realizar estudios que se denominan *in silico*, es decir aproximaciones virtuales del funcionamiento de la célula en estudio.

Los estudios *in silico* consisten en ingresar a la base de datos del NCBI, seguido de la selección de NCI-CGAP en el menú principal (figura 5).

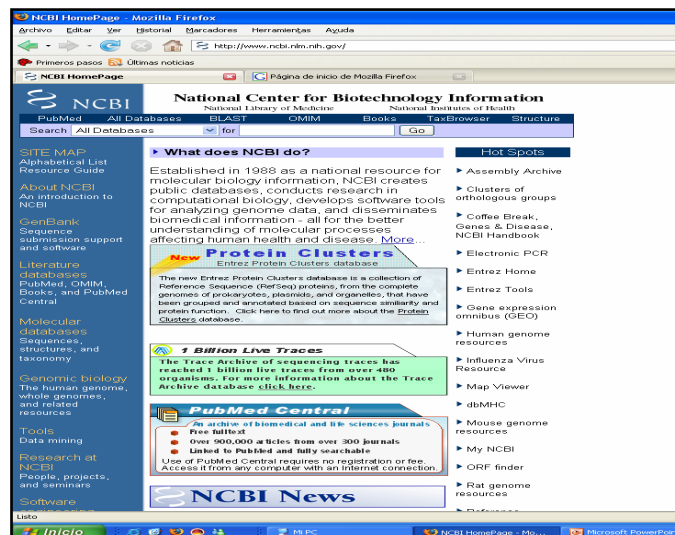


Figura 5. Página de inicio de la base de datos NCBI

En esta ventana de NCI-GAP se eligió Cancer Genome Anatomy Project y a continuación se dio clic en la opción SAGE Genie (figuras 6 y 7), en esta nueva ventana se selección Sage Anatomic Viewer (figura 9) y se despliega una nueva ventan, en la cual se ingresa el nombre del transcrito en la sección Gene Symbol, figura 10. Paso seguido se muestra la venta de Best Tag for Gene (figura 10) donde se visualizan los iconos que permiten ver la secuencia y cantidad de tags encontrados por célula, el número de registro y los resultados de SAGE en diferentes tejidos en humano y en líneas celulares de forma individual o ambos al mismo tiempo. Se eligió esta última opción y finalmente se despliega la imagen de la expresión de los transcritos en tejido normal y en tejido tumoral de acuerdo a una escala de colores. (Figura 11)



Figura 6. Ventana de NCI-GAP y selección de Cancer Genome Anatomy Project.

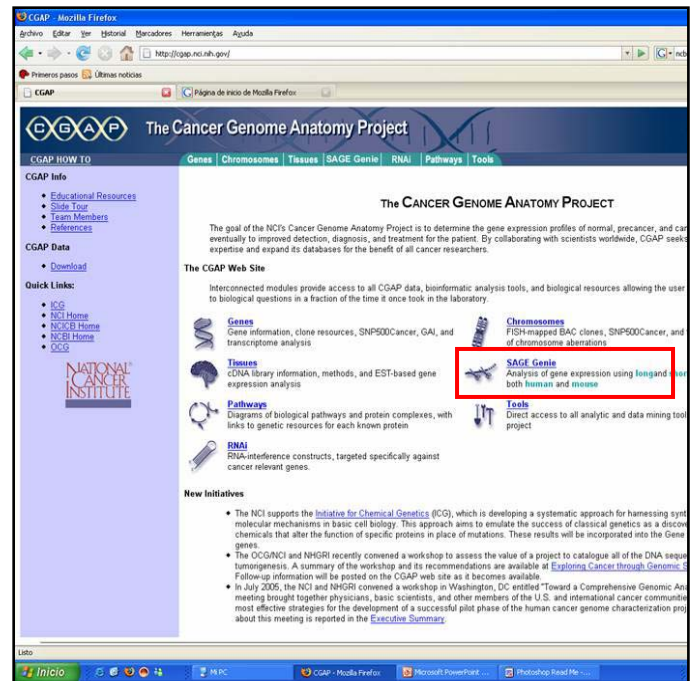


Figura 7. Selección de SAGE Genie, recuadro en rojo.

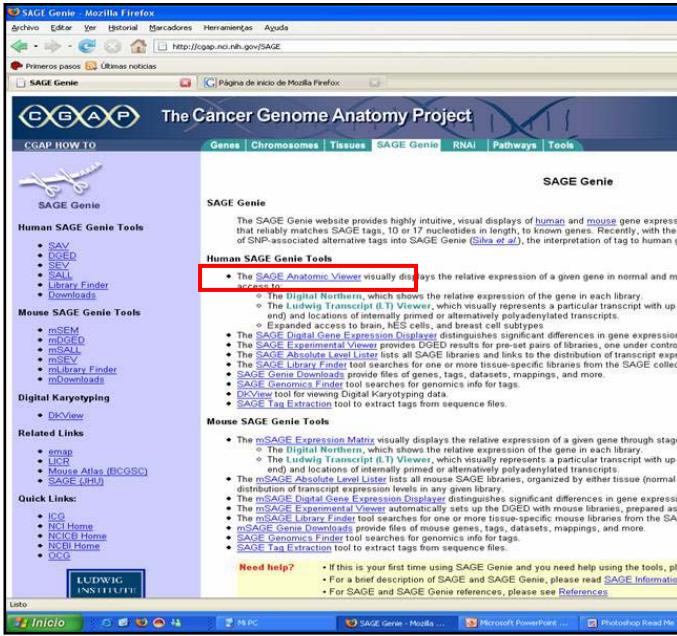


Figura 8. Selección de Sage Anatomic Viewer

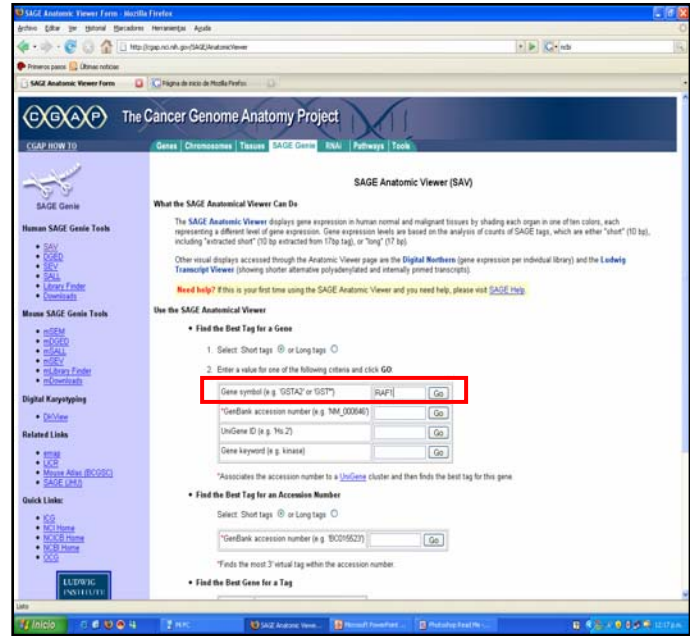


Figura 9. Ingreso del nombre del transcrito en el recuadro Gene Symbol,

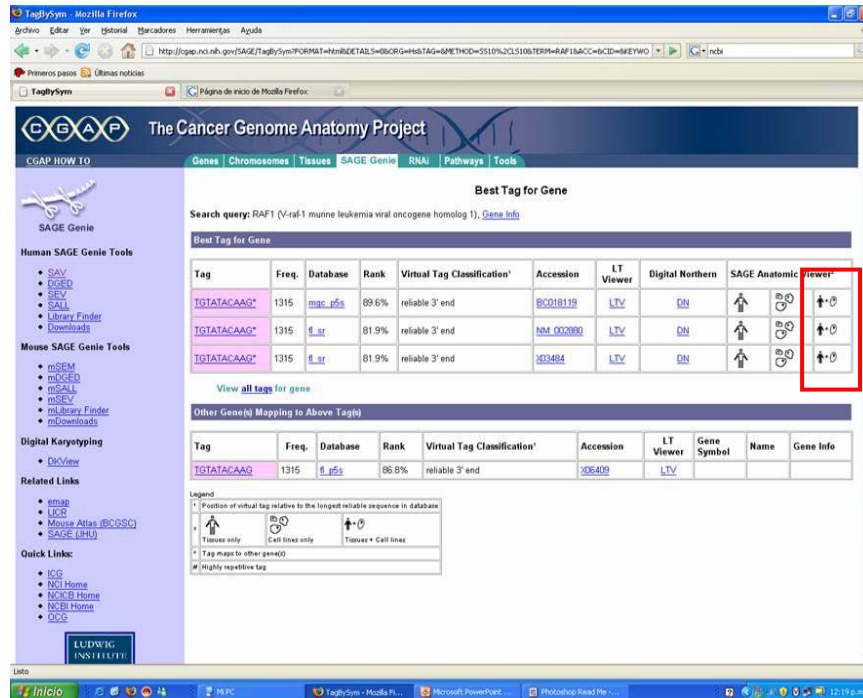
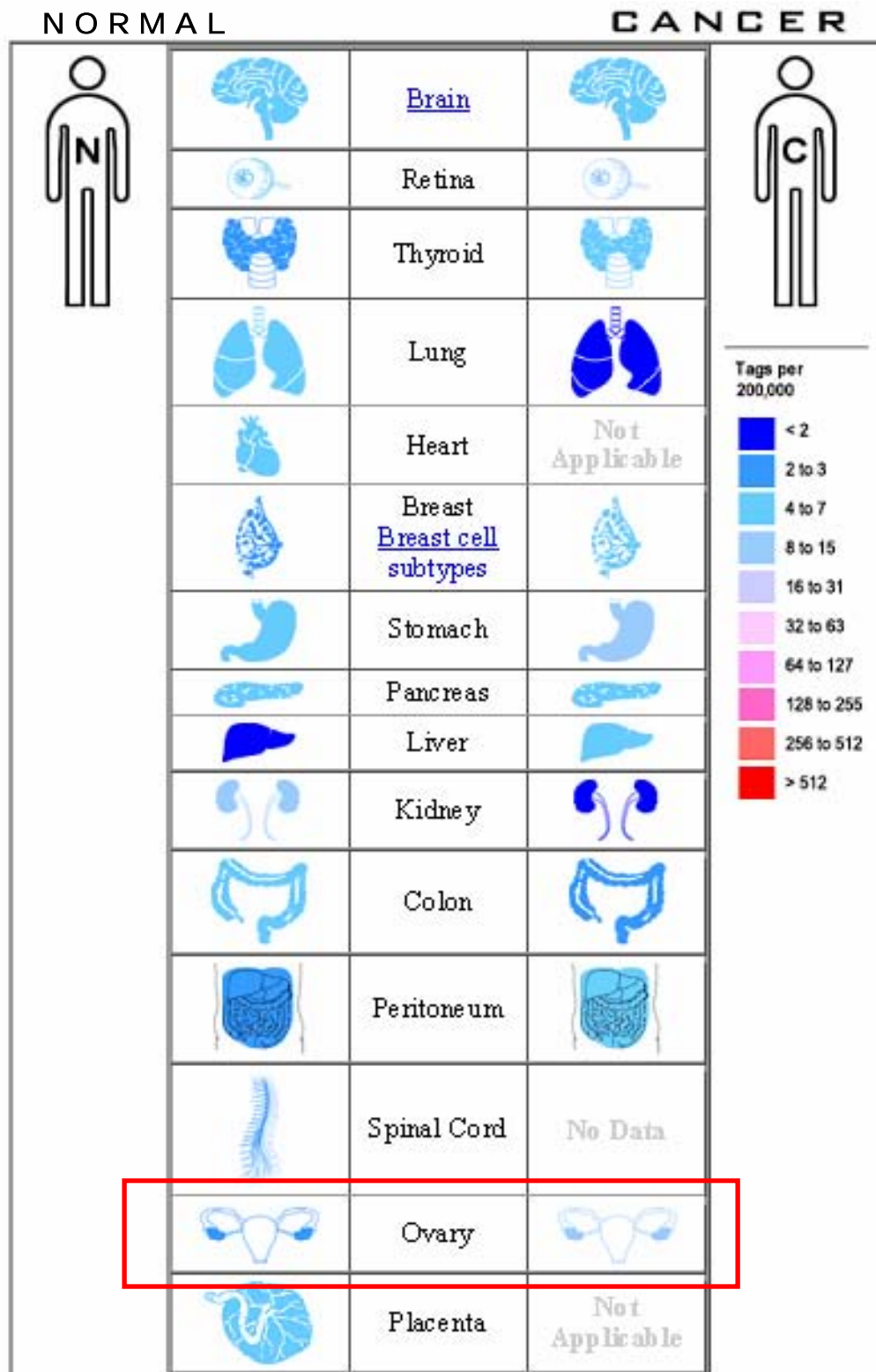


Figura 10. Vista de Best Tag for Gene, selección del icono que muestra un cuerpo humano más una célula, indicado por el recuadro.

Empleando esta base de datos se realizó un análisis del transcrito Raf-1, arrojando la imagen de la figura 11, que muestra en su lado derecho diferentes tejidos “normales” y del lado izquierdo los tejidos tumorales y una escala de colores correspondiente al número de transcritos encontrados por célula. Así por ejemplo en pulmón normal, de acuerdo a la escala de colores, hay de 4-7 transcritos y en tumores en pulmón se tienen menos de dos. En el caso de ovario normal se observa que hay de 2-3 transcritos a diferencia del tejido tumoral que muestra un ligero incremento de 4-7 transcritos, lo que hace suponer que encontraremos un incremento en la expresión de la proteína Raf-1 en tejido *in situ*.



Raf-1

Figura 11. Análisis de expresión diferencial del transcrito Raf-1 de bibliotecas de cDNA de tejido epitelial de ovario normal y tumoral, provenientes de la base de datos de SAGE (<http://cgap.nci.nih.gov/SAGE>).

Muestras biológicas

Del Archivo del Servicio de Patología de la Unidad Médica de Alta Especialidad en Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI-IMSS, y del Servicio de Anatomopatología del Hospital General de México, SS. Se colectaron 10 biopsias de ovarios normales y 10 tumores epiteliales serosos malignos de alto grado embebidos en parafina², correspondiente al año 2005, bajo los siguientes criterios de inclusión:

Para tejido de ovario normal

- a) Ovarios histológicamente normales.
- b) Ausencia de quistes.
- c) Que las mujeres no hayan estado bajo tratamiento hormonal.

Para tejido tumoral

- a) Que el tumor sea primario.
- b) Que la paciente no haya estado bajo tratamiento hormonal.
- c) Que la paciente no haya estado bajo tratamiento de quimioterapia y/o radioterapia.

Cortes histológicos

Se realizaron cortes histológicos de ~5 µm de grosor de cada uno de los bloques. El corte del tejido se colocó sobre un portaobjeto, se adicionó una gota de etanol al 70% para facilitar su extendido. Posteriormente el tejido se transfirió a un baño de agua a ~45°C, a la que se adicionó un poco de gelatina para permitir el extendido del tejido mediante calor y promover la adherencia del tejido a la superficie del portaobjetos, en donde finalmente se conservó el tejido para su tinción con hematoxilina y eosina. Se dejó secar.

² La técnica de inclusión de los tejidos frescos se indica en el anexo I.

Tinción Hematoxilina y Eosina

Se colocaron los portaobjetos con tejido a 60°C por 30 min. Al término de este tiempo se procedió a desparafinar con xilol al 100%, hidratar el tejido mediante una secuencia de soluciones de etanol que van del 100% al 30% como se indica a continuación:

Reactivo	tiempo (min)
xilol 100%	15
xilol 100%	15
etanol 100%	10
etanol 100%	10
etanol 96 %	5
etanol 96 %	5
etanol 70%	5
etanol 30%	5

Paso seguido se trasladaron los portaobjetos a una solución de PBS 1X, posteriormente se tiñeron los núcleos de las células con hematoxilina de Harris por 2-3 min y se lavaron con agua desionizada. Se colocaron los portaobjetos en agua amoniacal seguido de un lavado con agua desionizada. Posteriormente se tiñó el citoplasma celular con eosina por 2-3 min. Finalmente se procedió a deshidratar los tejidos empleando la secuencia de soluciones de etanol y xilol antes mencionadas y se fijaron con resina.

Identificación de la lesión

Se observó el tejido al microscopio (40X) y mediante la ayuda del Médico Patólogo se identificó el tipo de lesión presente en cada tejido y se seleccionó el que área que presentara el epitelio de ovario normal y la lesión tumoral (ver figura 12), según sea el caso. De ésta área indicada en la laminilla se extrapola al bloque que contiene el tejido completo con el fin de extraer una porción de tejido para la construcción del microarreglo de tejido, como se indica más abajo.

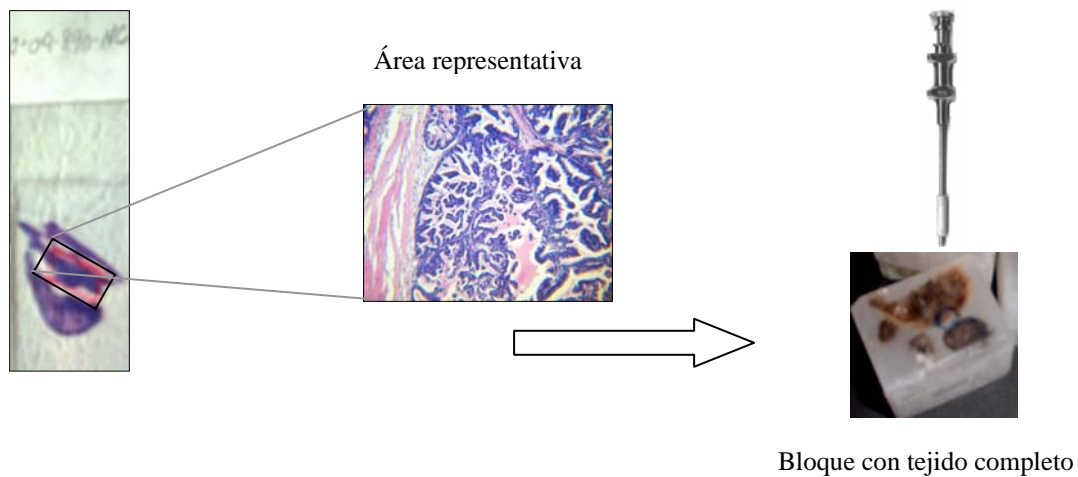


Figura 12. Tinción hematoxilina-eosina y selección del área de interés, indicada por el recuadro.

Construcción del microarreglo de tejidos

Los microarreglos de tejido (MATs) es una tecnología de permite analizar cientos de tejidos diferentes al mismo tiempo, utilizando diversas metodologías, para identificar los niveles de DNA, RNA o proteínas. Un MAT puede definirse como un acomodo ordenado de tejidos diferentes dentro de un bloque de parafina.

En este trabajo se construyeron dos MATs, uno correspondiente al epitelio de ovario normal y el otro al tumor seroso de ovario. La metodología utilizada para el diseño y la construcción de ambos, fue la misma y se indica a continuación.

La construcción de un micro arreglo consiste de dos etapas: 1) la construcción de una matriz en blanco conteniendo el número de pozos correspondiente al número de muestras a analizar y 2) colocar en los pozos una porción de la lesión representativa de cada uno de los tejido a investigar formando el MAT.

La construcción de la matriz en blanco requiere de un bloque de parafina, que no contenga ningún tejido incluido u horadación. Empleando una aguja de biopsia para médula ósea calibre

16G (3mm de diámetro) se realizaron manualmente una serie de “pozos” (horadaciones) acomodados de forma matricial, en este trabajo la matriz en blanco se constituyó de un total de 25 pozos.

La segunda etapa en la construcción del microarreglo de tejidos, consistió en tomar una porción del tejido completo correspondiente al área representativa de la lesión de cada uno de los tejidos, usando una aguja para biopsia de médula ósea calibre 14G con un diámetro de 2 mm (Hidalgo *et. al.*, 2003; Kallioniemi *et. al.*, 2001). Esta porción de tejido se transfirió a uno de los pozos del bloque en blanco (matriz en blanco) anotando su ubicación. Este proceso se repitió con cada uno de los tejidos completos, ver figura 13. Finalmente cada uno de los MATs se conformó de un total de 20 tejidos correspondientes a las 10 muestras de ovario normal y 10 muestras de tumores seroso malignos de alto grado con su respectivo duplicado. La figura 14 esquematiza el diseño y acomodo estratégico final, de cada uno de los tejidos en el MAT. Así por ejemplo, la muestra B05-13244A se localiza en las coordenadas A1 y A3, la muestra B05-18855D en las coordenadas B1 y B3 y así sucesivamente hasta la muestra 10.

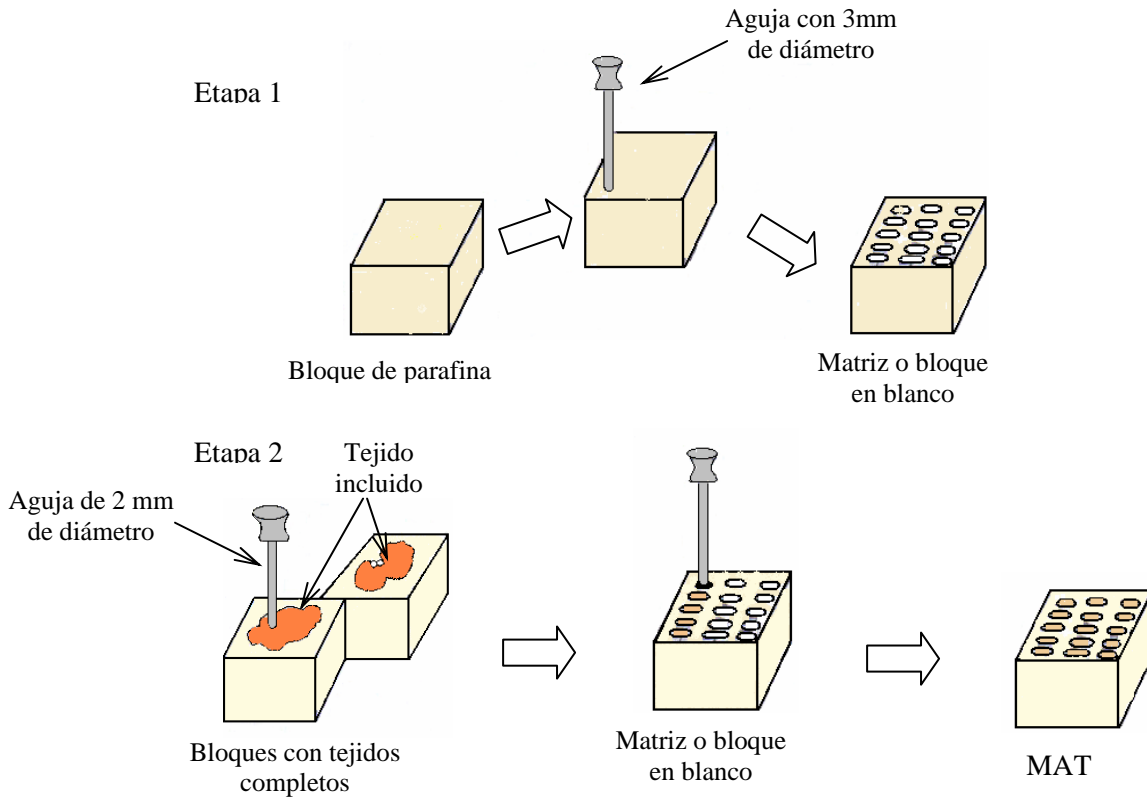


Figura 13. Esquema general de la construcción manual del micro-arreglo de tejido. De cada uno de los bloques conteniendo el tejido completo se extrajo una porción del tejido mediante el uso de una aguja para biopsia de médula ósea con un diámetro de 2mm. La porción de tejido extraído se transfirió (inyectó) al bloque de parafina en blanco.

Coordenadas en el MAT	Tejido normal	Tejido tumoral
A1, A3	B05-13244A	TO-5595-01-8
B1, B3	B05-18855D	0-03-4227-11
C1, C3	B05-12346T	TO-99-6749-2
D1, D3	B05-17914E	0-04-890-6
E1, E3	B05-14132E	TO-5595-01-9
A2, A4	B05-13209E	0-03-5812
B2, B4	B05-19062B	000-1452-8
C2, C4	B05-13328A	0-04-890-10
D2, D4	B05-17538C	005884-2
E2, E4	B05-13125U	0-03-930-5

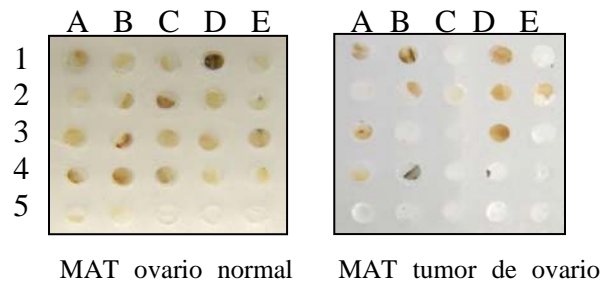


Figura 14. Esquema del diseño del MAT y lista de cada uno de los tejidos con su ubicación en el arreglo

Inmunohistoquímica

Una vez que los MATs fueron contruidos en su totalidad, se procedió a realizar cortes histológicos de ~5 µm de grosor, montando el tejido en portaobjetos polarizados para a continuación realizar la identificación de la proteína Raf-1 mediante inmunohistoquímica indirecta.

Los portaobjetos con los cortes de los MATs se incubaron a 60°C por 30 min. Al término del tiempo de procedió a hidratar los MATs mediante la siguiente secuencia de soluciones:

Reactivo	tiempo (min)
xilol 100%	15
xilol 100%	15
etanol 100%	10
etanol 100%	10
etanol 96 %	5
etanol 96 %	5
etanol 70%	5
etanol 30%	5
PBS 1X	Conservar

Al termino de la hidratación, los MATs se trasfirieron a una solución de citratos a 90°C (DECLERE, CELLMARQUE, Rocklin, CA, CMX632) por 30 min, para degradar fibras del tejido que no permiten el acceso completo al antígeno presente en el tejido. Inmediatamente se procedió a lavar con PBS 1X para eliminar la solución anterior. Acto seguido, los tejidos se incubaron por 30 min con H₂O₂ /MeOH al 10% a temperatura ambiente, para eliminar la peroxidasa endógena. Se realizaron lavados con PBS al 1X. A continuación, se adicionó albúmina bovina al 10% incubando por 30 min. Al término de este tiempo, se elimino el exceso de albúmina y se adicionó el anticuerpo específico para Raf-1 a una concentración de 0.01 µg/mL (Raf-1 Polyclonal Antibody, BioVision, 3116-100, Mountain View, CA, USA). Se dejó

incubar por una noche a 4°C. Al día siguiente, se lavo dos veces con PBS 1X. Se eliminaron los restos de PBS e incubo por 30-45 min a temperatura ambiente con el segundo anticuerpo marcado con peroxidasa, dilución 1:1, en agua estéril (System Detection Mouse/Rabbit PolyDetector HRP/DAB, BioSB, Santa Barbara, CA, USA). Posteriormente, se lavo nuevamente dos veces con PBS 1X. Finalmente se identificó la proteína Raf-1 mediante una reacción enzimática empleando el kit DAB1000 Chromogen System, BIOCARE, Concord CA. Se preparo la diaminobencidina, transfiriendo 50µL de ésta a un tubo eppendorf de 2.0 mL y se llevo a un volumen de 1.0 mL con buffer sustrato que contiene el sustrato de la enzima, por lo anterior es importante preparar y emplear la solución el día de su preparación.

La reacción de oxidación de la diaminobencidina se visualizo al microscopio, con el objetivo 10X, como la aparición de un precipitado color café en el citoplasma de las células. El MAT se sometió a una tinción de contraste con hematoxilina por 2-3 min después de lo cual se procedió a deshidratar y fijar.

Análisis densitométrico

Para el análisis semi-cuantitativo de las IHQ se capturaron tres imágenes de diferentes campos de cada tejido a 40X y mediante el empleo del programa *Imagen Pro-Plus 4.1*, se mide la densidad de color en un área de 28.53µm, indicada manualmente. El programa muestra automáticamente un cuadro de datos con la sumatoria de la densidad de coloración permitiéndonos observar de manera semicuantitativa el comportamiento de la expresión de la proteína en los tejidos.

Análisis estadístico

La diferencia de expresión de la proteína en los diferentes tejidos se analizo por una prueba de t student.

Resultados

Morfología celular

Las células epiteliales de ovario normal de todas las muestras mostraron una monocapa de células epiteliales bien definida (indicada con flechas), como se ve en la figura 15, recuadros A y B, con una relación núcleo:citoplasma mayor, a diferencia de las células de tejido tumoral donde podemos observar pérdida de la arquitectura del epitelio (ver figura 15, recuadros C y D), hay células y núcleos pleomórficos con actividad mitótica, la relación núcleo:citoplasma es menor.

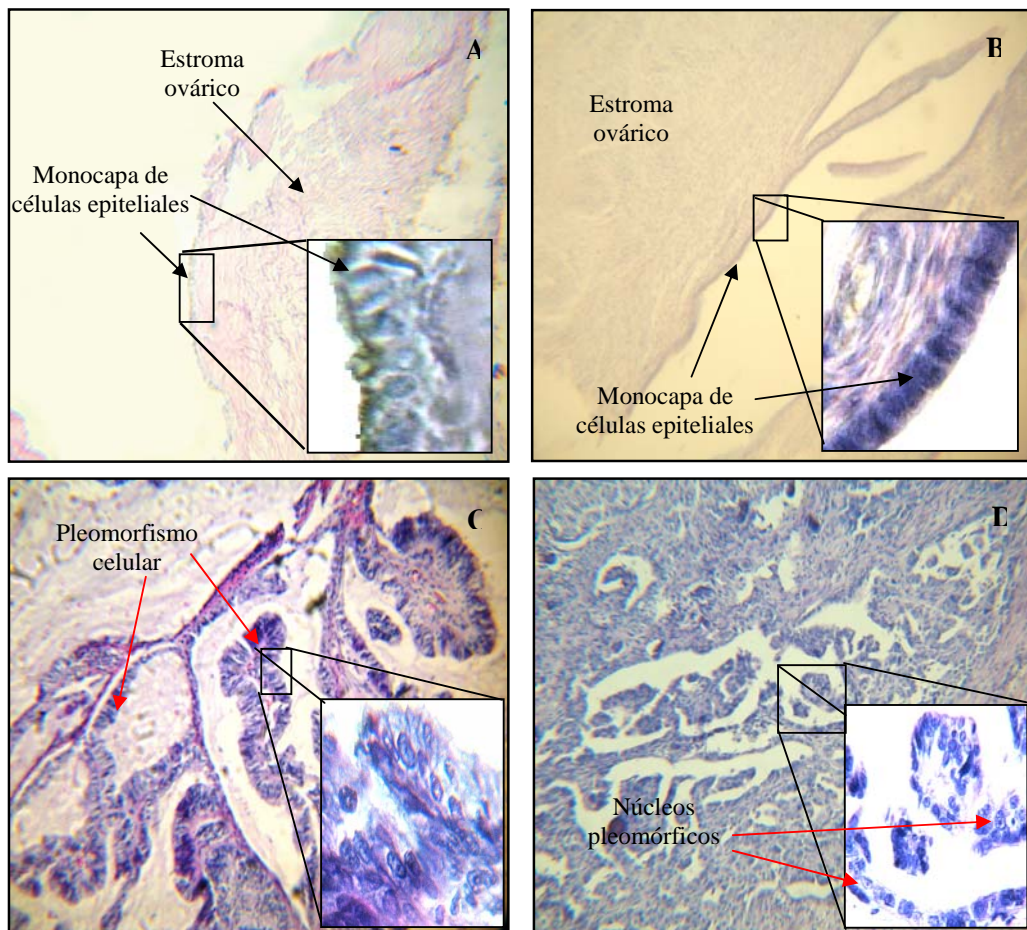


Figura 15. Morfología de células epiteliales en ovario normal y en tumor epitelial seroso maligno de alto grado en ovario. Recuadro A y B: epitelio de ovario normal, indicado con flechas, y estroma ovárico. Recuadros C y D: tumor epitelial seroso maligno de alto grado, células y núcleos pleomórficos con actividad mitótica.

Expresión de Raf-1

Se empleó como control negativo un corte de cada uno de los microarreglos; éstos se trabajaron como se indica en la técnica inmunohistoquímica sólo que no se adicionó el anticuerpo primario, es decir el anticuerpo anti Raf-1. Como control positivo se usó tejido de cérvix, debido a que se sabe que este tejido expresa Raf-1 en el citoplasma de las células del epitelio.

En cuanto a los resultados para las diferentes muestras evaluadas, las células del epitelio de ovario normal no presentaron reacción positiva que indique la presencia de la proteína Raf-1, sólo se presentó ligera reacción positiva en estroma ovárico. Sólo una muestra de tejido de ovario normal mostró reacción positiva en el epitelio para Raf-1 en el citoplasma celular, precipitado en color café, que puede verse en el recuadro D de la figura 16.

En el caso de los tejidos tumorales, seis de las muestras evaluadas presentaron reacción positiva para Raf-1, es decir mostraron gran expresión de la proteína Raf-1 en el citoplasma celular, color café, que se muestra en los recuadros E y F de la figura 16.

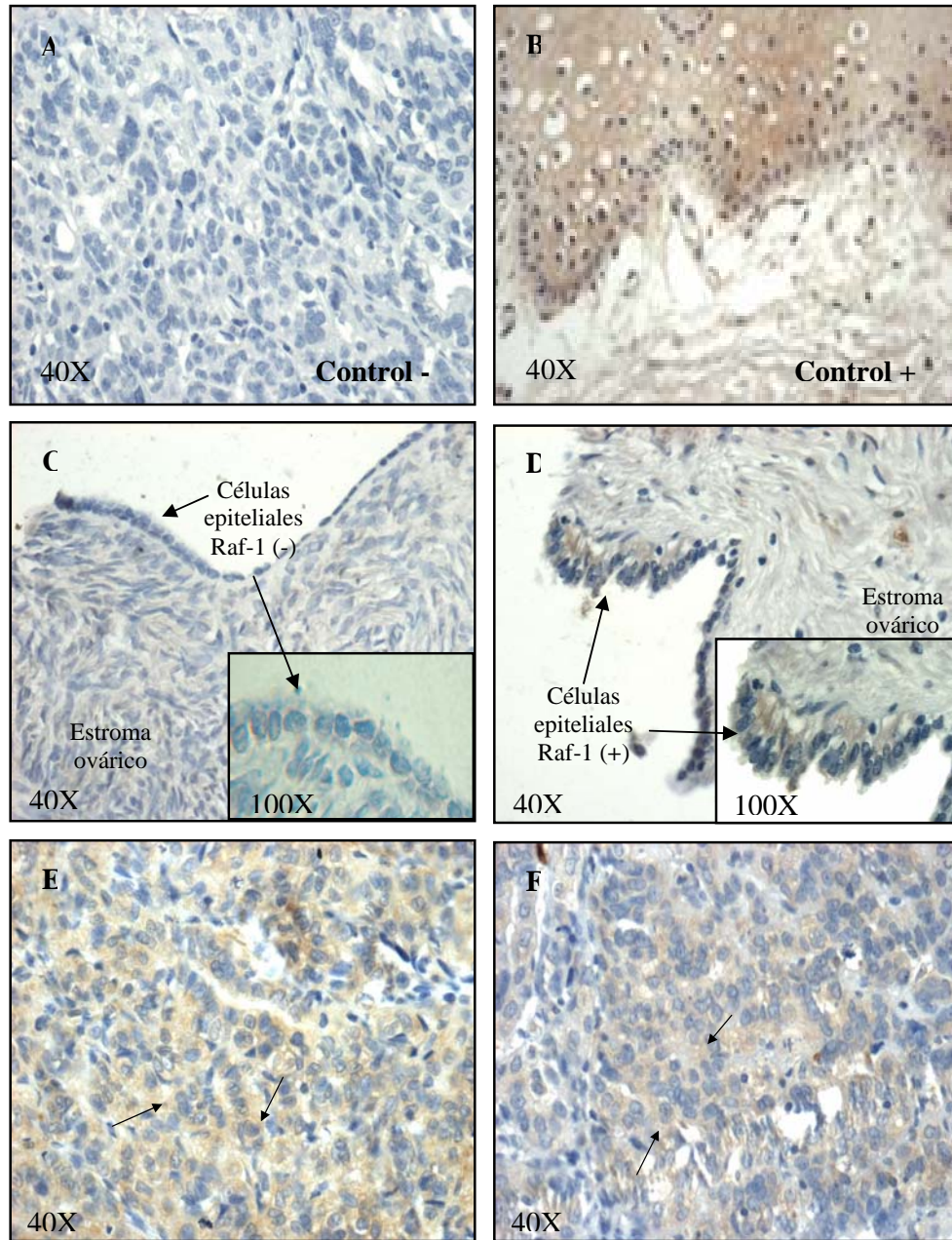


Figura 16. Expresión de la proteína Raf-1 en epitelio de ovario normal y tumor epitelial seroso maligno de alto grado. Imágenes a 40X. Recuadro A: control negativo, tumor epitelial seroso en ovario. Recuadro B: control positivo, cervix. Recuadro C: Ovario normal. No se observa precipitado color café en células del epitelio que indique la presencia de la proteína Raf-1. Recuadro D: Ovario normal. Algunas células del epitelio muestran reacción positiva en el citoplasma celular, color café. Recuadros E y F: tumor epitelial seroso maligno de alto grado. Las células manifiestan reacción positiva para Raf-1 en su citoplasma, coloración café.

En el siguiente cuadro se muestra el valor de la densidad de coloración obtenido para cada uno de los tejidos evaluados así como el promedio de la densidad; el resultado del análisis estadístico, del cual indica diferencias en la expresión de la proteína Raf-1 en los epitelio normal y en tumor epitelial seroso de ovario. Así también podemos observar de manera gráfica (figura 12) el comportamiento de la expresión de Raf-1 en los diferentes tejidos.

Cuadro 2. Valores de densidad de color de cada muestra evaluada.

Valor de densidad de color		% de expresión de Raf-1	t student
Ovario normal	Tumor epitelial	<p>El 90% de los tejidos de ovario normal mostraron reacción negativa para Raf-1.</p> <p>El 60% de las células tumorales presentaron reacción positiva para Raf-1.</p>	<p>$T_{exp} = 2.72$</p> <p>$T_{tab} = 1.83$</p> <p>La H_1 se acepta</p>
1,7437706	1,578994		
0	2,481808		
0	2,185594		
0	1,849415		
0	3,244756		
0	1,977035		
0	0		
0	0		
0	0		
0	0		
Promedio = 0,17437706	Promedio = 1,3317602		

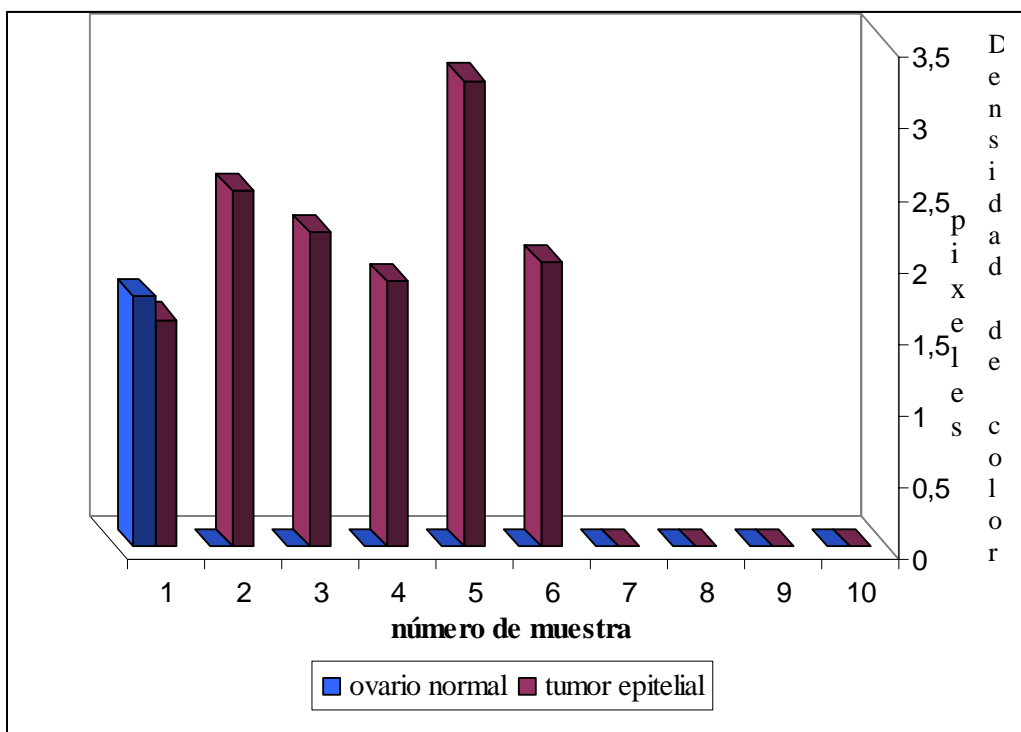


Figura 12. Gráfico que muestra la expresión de la proteína Raf-1 en células del epitelio de ovario normal y tumor epitelial serosos de alto grado. En el eje de las X se indica el número de muestra analizada y en el eje de las Y la media de la densidad de la tinción.

DISCUSIÓN

De las observaciones morfológicas puede verse que se presenta gran cambio en cuanto a arquitectura, forma y tamaño celular entre las células normales y tumorales lo cual sugiere que la sola identificación de dichos cambios morfológicos en el tejido puede dar un diagnóstico y posible pronóstico de la enfermedad. Así por ejemplo un examen morfológico que indique pérdida de la arquitectura del epitelio y células con núcleos de gran tamaño y con gran actividad mitótica respecto a una célula “normal” será indicativo de presencia de una patología en determinada etapa, y es básicamente la forma de diagnóstico actual de dicha enfermedad en las pacientes.

Por otro lado, con el fin de identificar diferencias en la expresión de la proteína Raf-1 en tumores epiteliales serosos de alto grado y en epitelio de ovario normal se construyeron los MATs correspondientes y se determinó la expresión mediante la técnica IHQ indirecta. Los resultados mostraron expresión de la proteína Raf-1 en el citoplasma de las células tumorales (coloración café), en 6 de 10 (60%) de las muestras a diferencia de las células del epitelio de ovario normal que en su mayoría no mostraron (9:10, 90%) expresión de la proteína Raf-1 (figura 12), sólo se observó ligera expresión en el estroma.

En cuanto al análisis *in silico* previamente realizado, éste indicó expresión del transcrito de Raf-1 tanto en ovario normal como tumoral, resultados que difieren con los obtenidos del análisis en tejido *in situ*, donde no se encontró expresión de la proteína en tejido normal pero sí en tejido tumoral. La diferencia en los resultados se debe básicamente a la sensibilidad, especificidad de las metodologías y sobre todo el tipo de biomolécula analizada, es decir, el análisis *in silico* es una metodología más sensible ya que cuantifica la mínima cantidad de transcritos (mRNA) de Raf-1 presentes en una célula. A diferencia de la técnica inmunohistoquímica que detecta proteínas además de

que es menos sensible ya que requiere que la proteína se encuentre a una concentración que permita ser detectada con el anticuerpo específico.

Por último los resultados fueron contrastantes al único trabajo reportado por un grupo de investigadores (McPhillips *et. al.* 2006), quienes encontraron sobreexpresión de la proteína Raf-1 en tumores epiteliales serosos respecto al epitelio de ovario normal. Esta discrepancia en los resultados se sugiere se deba a que posiblemente en las muestras de ovario “normal” empleadas el epitelio no se encontraba adyacente a quistes que pudieran influir en la activación de rutas importantes como la vía Ras-Raf-MEK, vía en la cual la activación de Raf-1 provoca eventos como angiogenesis, proliferación, migración y apoptosis, logrando así detectar a la proteína Raf-1 en los tejidos de ovario normal. Además habría que considerar los criterios de inclusión de las muestras empleadas en el trabajo publicado.

Finalmente de acuerdo al mecanismo propuesto de activación de Raf-1 y los eventos que se derivan de ello, los hallazgos en la expresión de la proteína en los tejidos tumorales a diferencia de ovario normal sugieren su participación en procesos de tumorigénesis como proliferación, angiogénesis, migración e inhibición de apoptosis.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados muestran que la proteína Raf-1 se expresa en tumores epiteliales serosos de alto grado a diferencia de epitelio de ovario normal donde no hay expresión, lo cual podría sugerir que Raf-1 participa en procesos de tumorigénesis, como invasión y metástasis de las células tumorales y ser un posible marcador de presencia de tumor. Sin embargo estos datos no son concluyentes debido al número de muestras analizadas en este trabajo, por lo que se sugiere un incremento en el número de muestras así como la determinación de la expresión de la proteína Raf-1 en diferentes lesiones epiteliales benignas del tumor en ovario y así contribuir en la comprensión del origen del tumor epitelial de alto grado.

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Auersperg N, Wong AS, Choi KC, Kang SK, Leung PC. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology and pathology. *Endocr Rev* 2001, 22(2):255-88.
- Baccarini M. Second nature: biological functions of the Raf-1 “kinase”. *FEBS Lett* 2005, 579(15):3271-3277.
- Bell DA. Origins and molecular pathology of ovarian cancer. *Modern Pathol* 2005, 18:S19-S32.
- Boulton SJ. Cellular functions of the BRCA tumor-suppressor proteins. *Biochem Soc Trans* 2006, 34(5):633-645.
- Cardenas RN and Pedraza CJ. Especies reactivas de oxígeno y sistemas antioxidantes: aspectos básicos. *Educación Química* 2005, 17(2):164-173.
- Chen VW, Ruiz B, Killeen JL, Cote TR, Wu XC, Correa CN. Pathology and clasification of ovarian tumors. *Cancer* 2003, 97(10):2631-2642.
- Choi K-C, Auersperg N and Leung PCK. Mitogen-actived protein kinase in normal and (pre)neoplastic ovarian surface epithelium. *Reprod Biol Endocrinol* 2003, 1(71):1-8.
- Chong H, Vikis HG and Guan KL. Mechanisms of regulating the Raf kinase family. *Cell Signal* 2003, 15(5):463-469.
- Clement PB. “Anatomy and histology of the ovary” *In: Blaustein’s Pathology of the female genital tract.* 5a. ed., USA, Springer-Verlag, 2002. 649-673.
- Cotran RS, Kumar V and Collins T. *Patología estructural y funcional.* 6a. ed., Colombia, McGraw-Hill, 2002. 277-348.
- Crum, CP. “Aparato genital femenino” *In: Patología estructural y funcional.* 6ª. ed., Colombia, McGraw-Hill, 2002. 1110-1124.

- Drapkin R, Crum CP and Hecht JL. Expression of candidate tumor markers in ovarian carcinoma and benign ovary: evidence for a link between epithelial phenotype and neoplasia. *Hum Pathol* 2004, 35(8):1014-1021.
- Ehrenreiter K, Piazzolla D, Velamoor V, Sobczak I, Small JV, Takeda J, Leung T and Baccarini M. Raf-1 regulates Rho signaling and cell migration. *J Cell Biol* 2005, 168(4):955-964.
- Fink SL and Cookson BT. Apoptosis, pyroptosis and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 2005, 73(4):1907-1916.
- Galabova-Kovacs G, Kolbus A, Matzen D, Meissl K, Piazzolla D, Rubiolo C, Steinitz K, Baccarini M. ERK and beyond: insights from B-Raf and Raf-1 conditional knockouts. *Cell Cycle* 2006, 5(14):1514-1518.
- Geneser F. Histología. 3^a. ed., Argentina, Panamericana, 2001. 105-128, 536-562.
- Gogoi R, Srinivasan S and Fishman DA. Progress in biomarker discovery for diagnostic testing in epithelial ovarian cancer. *Expert Rev Mol Diagn* 2006, 6(4):627-637.
- Guyton, AC Textbook of medical physiology. 11^a. ed., China, ELSEVIER SAUNDERS, 2006. 1011-1130.
- Hidalgo A, Piña P, Guerrero G, Lazos M and Salcedo M. A simple method for the construction of small format tissue arrays. *J Clin Pathol* 2003, 56(12):144-146.
- Hsu C-Y, Bristow R, Cha MS, Wang BG, Ho C-L, Kurman RJ, Wang T-L and Shih I-M. Characterization of active mitogen-activated protein kinase in ovarian serous carcinomas. *Clin Cancer Res* 2004, 10(19):6432-6436.
- Kallioniemi O-P, Wagner U, Kononen J and Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* 2001, 10(7):657-662.

Martínez SJ and Escribano T JJ. “Patología orgánica del ovario”.

<http://ccp.ucr.ac.cr/bvp/pdf/manual/saludreproductiva/11%20Salud%20reproductiva%20e.pdf>. 35

pp. (10 julio 2007)

McPhillips F, Mullen P, MacLeod KG, Sewell JM, Monia BP, Cameron DA, Smyth JF and Langdon SP. Raf-1 is the predominant Raf isoform that mediates growth factor stimulated growth in ovarian cancer cells. *Carcinogenesis* 2006, 27(4): 729-739.

Mendoza-Rodríguez CA, Monroy-Mendoza G, Zarazúa CM, García-Guzmán M, García A and Cerbón M. Cómo se mueren las células: mecanismos moleculares e importancia biológica. *Educación química* 2003, 14(4):202-206.

Mercer KE and Pritchard CA. Raf proteins and cancer: B-Raf is identified as a mutational target. *Biochim Biophys Acta* 2003, 1653(1):25-40.

Mok S C-H, Bell DA, Knapp RC, Fishbaugh PM, Welch WR, Muto MG, Berkowitz RS and Tsao S-W. Mutation of K-ras Protooncogene in Human Ovarian Epithelial Tumors of Borderline Malignancy. *Cancer Res* 1993, 53(7): 1489-1492.

Mueller P, McPhillips F, Monia BP, Smyth JF and Langdon SP. Comparison of strategies targeting Raf-1 mRNA in ovarian cancer. *Int J Cancer* 2006, 18(6):1565-1571.

O’Nelli E and Kolch W. Raf-1 controls apoptosis by suppressing MST2/hippo. *Cell Cycle* 2005, 4(3):365-367.

Panka DJ, Atkins MB and Mier JW. Targeting the mitogen-activated protein kinase pathway in the treatment of malignant melanoma. *Clin Cancer Res* 2006, 12(7):2371s-2375s.

Schulze A, Lehmann K, Jefferies HBJ, McMahon M and Downward J. Analysis of the transcriptional program induced by Raf in epithelial cells. *Genes & Dev* 2001, 15:981-994.

- Seidman JD, Russell P and Kurman RJ. "Surface epithelial tumors of the ovary" *In:* Blaustein's Pathology of the female genital tract. 5a. ed., USA, Springer-Verlag, 2002. 791-843.
- Shah BH and Catt KJ. Protein phosphatase 5 as a negative key regulator of Raf-1 activation. *TRENDS Endocrinol Metabol* 2006, 17(10):382-384.
- Shih I-M and Kurman RJ. Ovarian tumorigenesis: a proposed model based on morphological and molecular genetic analysis. *Am J Pathol* 2004, 164(5):1511-1518.
- Sieben N LG, Macropoulos P, Roemen G MJM, Kolkman-Uljee S M, Fleuren G J, Houmadi R, Diss T, Warren B, Al Adnani M, de Goeij A PM and Krausz T. In ovarian neoplasms, BRAF but not KRAS mutations are restricted to low-grade serous tumours. *J Pathol* 2004, 202(3):336-340.
- Singer G, Kurman RJ, Chang H-W, Cho S KR and Shih I-M. Diverse tumorigenic pathways in ovarian serous carcinoma. *Am J Pathol* 2002, 160(4):1223-1228.
- Singer G, Oldt III R, Cohen Y, Wang BG, Sidransky D, Kurman RJ and Shih I-M. Mutations in BRAF and KRAS characterize the development of low-grade ovarian serous carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95(6):484-486.
- Ülkü AS, Schäfer R and Der CJ. Essential role of Raf in Ras transformation and deregulation of matrix metalloproteinase expression in ovarian epithelial cells. *Mol Cancer Res* 2003, 1(14):1077-1088.
- vanHemert MJ, de Steensma HY and van Heusden GPH. 14-3-3 proteins: key regulator of cell divisions, signalling and apoptosis. *BioEssays* 2001, 23(10):936-946.
- Velculescu VE, Vogelstein B and Kinzler KW. Analysis of uncharted transcriptomes with SAGE. *Trends Genet* 2000, 16(10):423-425.

Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004, 5(11):875-85.

Wong AST and Auersperg N. Ovarian surface epithelium: family history and early events in ovarian cancer. *Reprod Biol Endocrinol* 2003, 1(70):1-8.

Wong AST and Leung PCK. Role of endocrine and growth factor on the ovarian surface epithelium. *J Obstet Gynaecol Res* 2007, 33(1):3-16.

Zhang L, Bewick M and Lafrenie RM. EGFR and ErbB2 differentially regulate Raf-1 translocation and activation. *Lab Invest* 2002, 82:71-78.

Anexo I: Inclusión de tejidos frescos

Las muestras de tejido fresco se colocan en solución de etanol 70%/formol 2%. Se dejan incubando toda una noche en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente se elimina dicha solución y se transfiere el tejido a las siguientes disoluciones incubando el tiempo indicado.

Disoluciones	Condiciones		
	Tiempo (h)	Temperatura (°C)	
Etanol 70%	1	TA	Agitación
Etanol 96%	1	TA	Agitación
Etanol 100%	1	TA	Agitación
Etanol /xilol (1:1)	1	TA	Agitación
Xilol	1	TA	Agitación
Xilol	1	TA	Agitación
Parafina	1	60	Agitación
Parafina	1	60	Agitación

Finalmente al termino de la segunda incubación con parafina el tejido se trasfiere a un recipiente, el tejido colocado con cierta orientación de la lesión, esta etapa la realiza el especialista (ver figura 13). Se adiciona de inmediato la parafina caliente evitando formar burbujas. Se deja enfriar.

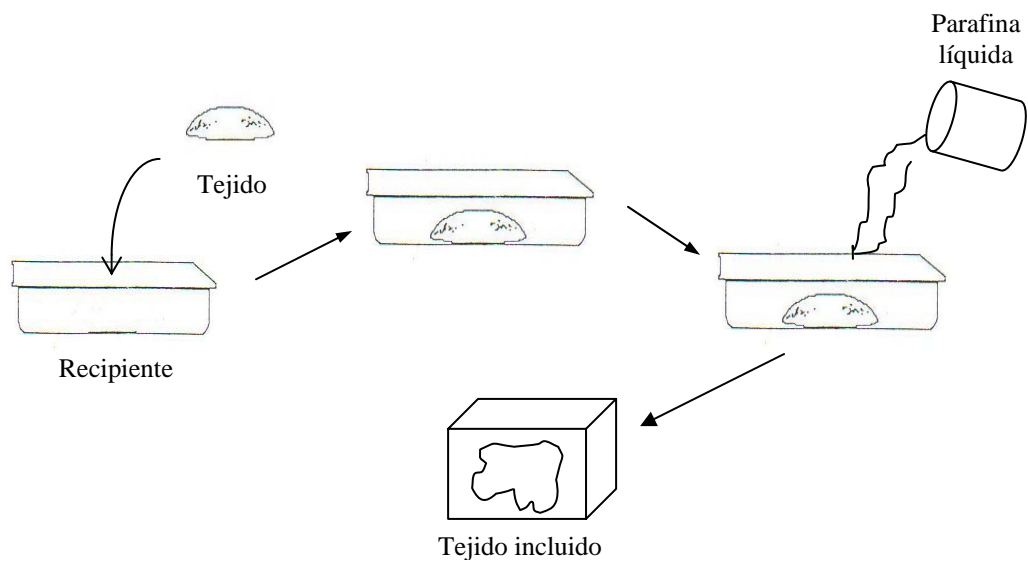


Figura 13. Proceso de inclusión de tejido en parafina

Anexo II: Preparación de soluciones

PBS (solución buffer de fosfatos)

1.48 g NaH_2PO_4
0.43 g Na_2HPO_4
7.2 g NaCl
1000 mL de agua destilada
pH 7.0-7.6

Agua amoniaca

Transferir de 2-4 mL de hidróxido de amonio al 28% en 800mL a 1000 mL.

Solución de eosina (stock)

Disolver 1g de eosina Y en 20 mL de agua destilada. Adicionar 80 mL de etanol al 95%.

Solución de trabajo. A una parte de la solución stock adicionar tres partes de etanol al 80% y 0.5 mL de ácido acético glacial.

Solución de hematoxilina de Harris

1.0 g de hematoxilina
50.0 mL etanol al 100%
100.0 g sulfato doble de alúmina y potasa
2.5g óxido mercúrico

Disolver el sulfato doble de alúmina y potasa en agua destilada con ayuda de calor y agitación.

Por otro lado disolver la hematoxilina en el volumen de etanol, agitando vigorosamente. Mezclar las disoluciones anteriores y calentar. Dejar hervir 1 min. Retirar del calentamiento y adicionar poco a poco el óxido mercúrico. Nuevamente colocar al fuego hasta que la solución presente una coloración púrpura. Finalmente colocar en hielo y adicionar 20 mL de ácido acético glacial para intensificar la tinción nuclear. Filtrar la solución antes de usar.

