



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Estandarización del diseño y construcción
de un microarreglo de tejidos de ovario normal y lesiones
benignas (cistadenoma seroso) de ovario.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

María del Carmen Lagunas Cruz

Director de Tesis: Dra. Vázquez Ortiz Guelaguetza
Asesor interno: M. en C. Rangel Corona Rosalva



Noviembre de 2008



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.

Dedicada a:

Mis padres

Maurilia Cruz Miranda
Isidro Lagunas Vásquez

Y hermanos

Isidro
Pedro
Rafael
Maurilio
Juan
Joel
Jacinto

Agradecimientos

De forma muy especial le agradezco a mi madre por 25 años de desvelos, consejos y apoyo incondicional.

A mi padre.

A mis hermanos Joel, Juan y Jacinto por sus consejos, desvelos y apoyo a lo largo de mi vida escolar y personal.

A mis amigas Lupe, Rouse y Lore por haberme aguantado tanto y seguir siendo mis amigas.

A Arturo Valle por su apoyo y paciencia.

A mis compañeras Diana Raquel, Belem, Bere, Liliana, Brenda, Paty, Diana y Karla V.

A mis compañeros Toño, Francisco, Adán, Lalo, Elid, Quique, Rene, Mario, Arturo. Manuel y Sergio.

VIEJA CIUDAD DE HIERRO
Rodrigo Gonzáles.

Vieja ciudad de hierro,
de cemento y de gente sin des
canso
si algún día tu historia tien
e algún remanso
dejarías de ser ciudad.

Con tu cuerpo maltrecho
por los años y culturas que h
an pasado
por la gente que sin ver, has
albergado,
el otoño para ti llegó forzad
o

¡Ya que!

Te han parado el tiempo,
te han quitado la promesa de
ser viento

te han quebrado las entrañas
y el silencio
ha volado como un ave sin ali-
ento
se ha marchado lejos
tu sonrisa clara y en tus azu-
lejos
han morado colores que son añ-
ejos
y ahora ya no brillan más.

Capital de mil formas
de recuerdos que se mueren en-
tre el polvo
de tus carros, de tus fábrica-
s y gentes
que se hacinan y tu muerte no
la sienten.

¿Qué harás con la violencia?
de tus tardes y tus noches en
tus calles
y tus parques y edificios Col-
oniales
convertidos en veloces ejes v

iales.

¡Ya que!

Te han parado el tiempo,
te han quitado la promesa de
ser viento
te han quebrado las entrañas
y el silencio
ha volado como un ave sin ali-
ento
se ha marchado lejos
tu sonrisa clara y en tus azu-
lejos
han morado colores que son añ-
ejos
y ahora ya no brillan más.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Oncología Genómica, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Unidad Médica de Alta Especialidad en Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI- IMSS. Además de contar con el apoyo del Departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de México.

ÍNDICE

Introducción.....	9
Localización anatómica del ovario.....	9
Anatomía funcional del ovario.....	9
Características del epitelio normal de ovario (ENO).	10
Epidemiología del cáncer de ovario.....	12
Etiología y factores asociados al cáncer de ovario.....	13
Clasificación del tumor epitelial de ovario.....	15
Cistadenoma seroso de ovario.....	17
Estudio histológico del cistadenoma seroso de ovario.....	18
Evolución del cistadenoma seroso de ovario.....	18
Aspectos moleculares del cistadenoma seroso de ovario.....	19
Microarreglo.....	21
Microarreglo de tejido.....	22
Diseño de un microarreglo de tejido.....	23
Construcción de un microarreglo de tejido.....	24
Planteamiento del problema.....	26
Hipótesis.....	27
Objetivos.....	28
Objetivo general	
Objetivos específicos	
Métodos.....	29
Material biológico.....	29
Base de datos.....	29
Sección o corte.....	29

Tinción. Técnica hematoxilina-eosina.....	30
Montaje.....	30
Diseño y construcción del microarreglo de tejido.....	31
Resultados.....	33
Elaboración de una base de datos sistematizada que relacione a la muestra con los datos clínicos.	33
Identificación del área de interés en la muestra en estudio (tejido de ovario sin alteraciones histológicas y de cistadenoma serosos de ovario) mediante la técnica de tinción hematoxilina- eosina.....	42
Identificación de las características morfológicas que diferencian un epitelio ovárico sin alteraciones histológicas y un epitelio ovárico con cistadenoma seroso.....	43
Elaboración de un banco de tejidos de ovario.	44
Discusión.....	47
Conclusiones.....	49
Perspectivas.....	50
Bibliografía.....	51

Introducción

Localización anatómica del ovario

Los ovarios se encuentran alojados en la zona intrapélvica, a ambos lados del útero debajo de los orificios de las trompas de Falopio fijos a la superficie posterior del ligamento ancho, por medio de un pliegue peritoneal denominado mesovario (Domarus *et al.*, 1992) (Fig. 1).

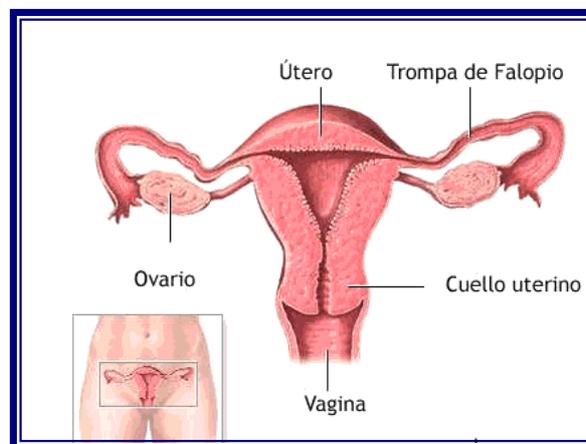


Fig. 1 Esquema que muestra la localización anatómica del ovario. Tomada y modificada de (<http://saludycomunicacion.com/blog/?p=283>)

Anatomía funcional del ovario

Los ovarios son dos cuerpos ovalados cuyas dimensiones, después de la pubertad son 4x3x1cm (Domarus *et al.*, 1992), aunque el tamaño varía a lo largo del ciclo menstrual y en el embarazo (Ganon, 1995); los ovarios pesan, en conjunto, entre de 12 y 15g (Ganon., 1995) (Fig. 2).

Los ovarios son de color rojo grisáceo, su superficie es irregular, debido a la presencia de folículos ováricos en cuyo interior se hallan los ovocitos (Domarus *et al.*, 1992).

Los ovarios tienen una función doble: por un lado, la secreción de hormonas sexuales femeninas (estrógenos) y por el otro se encargan también de proporcionar los gametos viables (óvulos) para su posible fecundación (Domarus *et al.*, 1992).

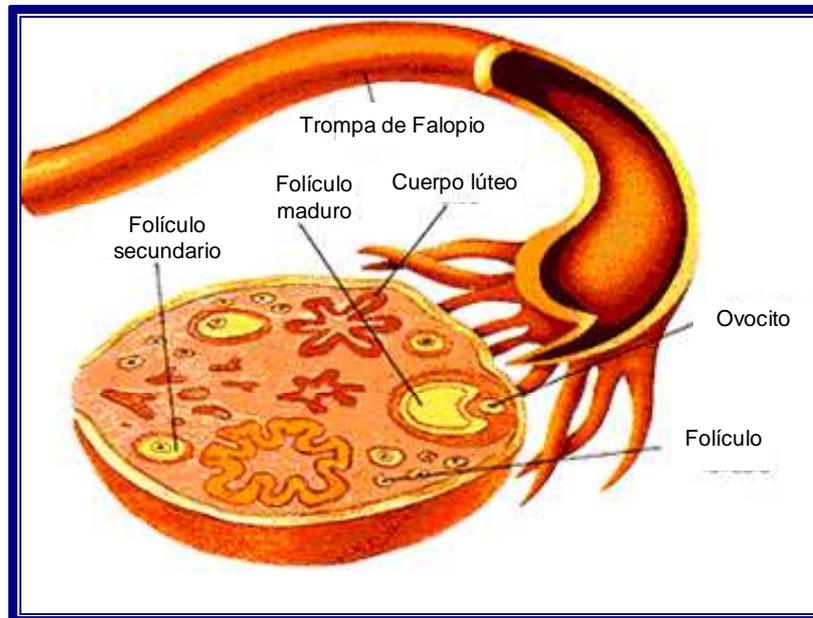


Fig. 2 Sección transversal del ovario. Tomada y modificada de (http://www.natureduca.com/anat_funcreprod_ovulac.php)

El ovario presenta tres regiones perfectamente estructuradas: médula, corteza y epitelio.

La médula proporciona un soporte estructural para los óvulos en desarrollo. La médula contiene con frecuencia agrupaciones de células del estroma, idénticas a las que ocupan la mayor parte de la corteza (Stevens y Lowe, 2006).

Características del epitelio normal de ovario (ENO).

El epitelio rodea la superficie del ovario, es generalmente quiescente con un bajo índice mitótico (Isselbacher *et al.*, 1994)

En las mujeres maduras, el ENO es una monocapa de epitelio escamoso-cuboidal o columnar bajo, pero que con frecuencia se aplana al avanzar la

edad y también cuando el ovario aumenta de tamaño (Stevens y Lowe, 2006) (Fig. 3).

El epitelio ovárico está caracterizado por la presencia de queratinas 7, 8, 18 y 19 que comprenden el complemento típico de queratinas de epitelios simples. El contacto intracelular y la integridad del epitelio se mantienen por desmosomas, algunas integrinas, uniones estrechas y cadherinas. Las cadherinas más frecuentes son la N- cadherina y la E- cadherina, aunque esta última se ha asociado a procesos de diferenciación aberrante en el epitelio. El ENO está aislado del estroma por una membrana basal, por debajo de la cual se encuentra una capa de tejido conjuntivo que da al órgano el color blanquecino y además provee una barrera parcial a la difusión de moléculas entre el estroma y el ENO. EL ENO transporta material de y hacia la cavidad peritoneal y sufre rupturas y reparaciones durante las ovulaciones cíclicas (Antoniou *et al.*, 2003).

La ruptura y reparación del ovario varían durante el ciclo reproductivo y son hormonodependientes. El ENO tiene una capacidad proteolítica que puede contribuir a su remodelación y a la ruptura de la corteza del ovario. Además, puede participar en la restauración de la corteza por la síntesis del epitelio y sus componentes de la matriz extracelular que conforman al tejido conjuntivo (Loman *et al.*, 2001).

El ENO de un ovario no ovulatorio es un mesotelio estacionario con características tanto epiteliales como mesenquimatosas. A diferencia de otros mesotelios, el ENO mantiene la capacidad de alterar su estado de diferenciación hacia fenotipos epiteliales o de estroma ectópicos (aberrantes). El estímulo que provoca la ruptura por ovulación inicia una respuesta regenerativa en las células del ENO. De manera alterna, cuando hay metaplasia, formación benigna de tumores y progresión neoplásica, el ENO adquiere características derivadas del epitelio del ducto Mulleriano como por ejemplo de oviducto, endometrio y endocérvix (Isselbacher *et al.*, 1994) así como progresión neoplásica (Hirsh *et al.*, 2003).

El epitelio ovárico está en continuidad con el peritoneo pélvico a nivel del hilio ovárico (aunque las células difieren estructuralmente de las células mesoteliales del peritoneo) y recibe el nombre de epitelio germinal, denominación que es errónea ya que las células epiteliales no son el origen de los gametos femeninos (Stevens y Lowe, 2006).

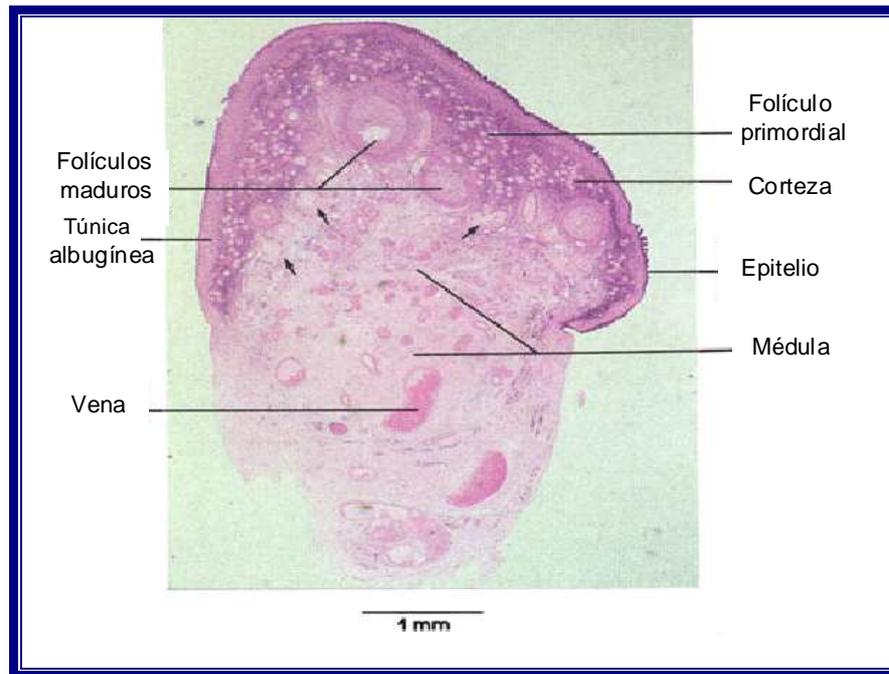


Fig. 3 Vista de conjunto: Corte histológico de ovario. Tomada y modificada de (<http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/imagenes/fem1.jpg&imgrefurl=http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla>).

Las células epiteliales superficiales tienen microvellosidades superficiales prominentes y algunos cilios; las mitocondrias son abundantes y hay pequeñas vesículas de pinocitosis asociadas a la base de algunas microvellosidades (Stevens y Lowe, 2006).

La superficie ovárica suele tener fisuras irregulares, que están recubiertas también por el epitelio superficial. Los cuellos de las fisuras pueden cerrarse, dejando islotes de epitelio superficial dentro de la corteza ovárica. La secreción de líquido por parte de estas células convierte luego a estos islotes en quistes (quistes de inclusión germinal), que son bastante frecuentes (Stevens y Lowe, 2006).

Epidemiología del cáncer de ovario

A nivel mundial en el año 2002 se diagnosticaron 202.499 millones de nuevos casos de cáncer de ovario y 125.000 mujeres perdieron la vida por esta enfermedad (Parkin *et al.*, 1999).

Entre las mujeres estadounidenses, el cáncer de ovario era el séptimo tipo de cáncer más común y la quinta causa principal de muerte por cáncer después de los cánceres de pulmón y bronquios, mama, colorrectal y pancreático (Parkin *et al.*, 1999).

En México el cáncer de ovario ocupa el tercer lugar como causa de mortalidad (4.6%), precedido del cáncer de mamá en segundo lugar (13.3%) y el cáncer de cuello de útero en primer lugar (13.5%) (INEGI, 2005). Cerca del 20 % de los cánceres de ovario son diagnosticados antes de que la malignidad sea propagada a otros tejidos, por lo que la tasa de supervivencia oscila entre 15 y 20% (Romero *et al.*, 2005).

Aunque la mayoría de los casos de cáncer de ovario ocurre en mujeres de 50 años de edad o más, la enfermedad puede presentarse en mujeres más jóvenes (Romero *et al.*, 2005).

Aproximadamente el 90% de los cánceres de ovario son de origen epitelial. Por todo ello, en los últimos 25 años se ha mostrado un gran interés en investigar la epidemiología del cáncer de ovario (Chen *et al.*, 2003).

Etiología y factores asociados al cáncer de ovario

Existen datos que sugieren que para que se de el inicio y progresión de la enfermedad se necesitan múltiples factores (Tabla1). La mayoría de los cánceres de ovario se producen a partir de la transformación maligna del epitelio de superficie del ovario (González y González, 2000).

Al observar que el cáncer de ovario es más prevalente en mujeres nulíparas puso la base para postular la hipótesis de que la ovulación incesante es el agente etiológico inicial en el cáncer de ovario. La hipótesis defiende que la superficie del ovario sufre traumatismos menores en cada ovulación, y que el efecto acumulativo de estas lesiones puede desembocar en una neoplasia (González y González, 2000) (Tabla 1).

El riesgo de presentar cáncer de ovario aumenta si uno o más familiares de primero o segundo grado (madre, hija o hermana) padecen la enfermedad (Fernández *et al.*, 2003), se estima que la probabilidad aumenta entre un 5 y un 10% (González y González, 2000). La edad también es un factor que confiere riesgo de contraer cáncer de ovario, ya que este incrementa su incidencia después de los 35 años de edad con un pico máximo de los 50 a

los 75 años. También se considera que factores como la residencia en países industrializados asociados con existencia de asbesto, nuliparidad, infertilidad y uso de inductores de la ovulación pueden estar vinculados con la presencia de esta enfermedad. (Romero *et al.*, 2005) (Tabla 1).

En cuanto a las bases genéticas del cáncer de ovario; entre los años 1993 y 1995 se identificaron 2 genes de susceptibilidad al cáncer de mama y ovario, el gen BRCA1 (participa en la reparación del ADN y la regulación del ciclo celular, localizado en el cromosoma 17q21) y el gen BRCA2 (localizado en el cromosoma 13q12) (Gallardo *et al.*, 2004), correspondientes a una herencia autosómica dominante de alta penetrancia (Oliva *et al.*, 2004) (Tabla 1).

Las mujeres poseedoras de mutaciones en el gen BRCA1 tienen predisposición al cáncer en un 45 % de las familias ligadas a cáncer de mama, y a un 80 % de las familias con cáncer de mama y ovario (González *et al.*, 2003). La epidemiología del BRCA1 para el cáncer de ovario calcula que la probabilidad de padecerlo es del 30% a los 60 años y del 44% a los 70 años (Margossian y Margossian, 2001).

Las mutaciones heredadas del gen BRCA-2 parecen conferir un riesgo muy bajo de cáncer de ovario, comparado con el riesgo de cáncer de mama según se ha visto en la incidencia de los tumores de las familias relacionadas (González *et al.*, 2003). En estas familias suele existir la asociación de cáncer de ovario con cáncer de mama diagnosticado a una edad joven (Oliva *et al.*, 2004).

Factores protectores	Factores de riesgo	Factores asociados
<ul style="list-style-type: none"> • Multiparidad • Anticonceptivos orales • Histerectomía • Esterilización • Oovorectomía 	<ul style="list-style-type: none"> • Incremento de edad • Historia familiar • Mutaciones del BRCA1 Y BRCA2 	<ul style="list-style-type: none"> • Edad de menarquia y menopausia • Edad de primer parto • Terapéutica hormonal sustitutiva • Infertilidad • Drogas estimulantes de la ovulación • Radiaciones ionizantes • Alteraciones en la capacidad proteolítica

Tabla 1. Principales factores implicados en la aparición de un cáncer de ovario (González y González, 2000; Fernández *et al.*, 2003; Romero *et al.*, 2005; Gallardo *et al.*, 2004).

Por otro lado se han identificado varios factores que parecen disminuir el riesgo de contraer cáncer y son: multiparidad, histerectomía simple, ligadura tubárica y el uso de anticonceptivos orales, entre otros (Fernández *et al.*, 2003) (Tabla 1).

Clasificación del tumor epitelial de ovario

El cáncer de ovario esta compuesto por un grupo heterogéneo de tumores que han derivado del epitelio superficial del ovario o por invaginaciones quísticas (Ganon, 1995).

En el año de 2004 se sugirió un modelo de tumores epiteliales de superficie de ovario los cuales son divididos en dos categorías designadas, tipo I y tipo II. Dentro del tipo I, se encuentra el cistadenoma seroso, el cistadenoma mucinoso, el tumor endometroide, tumor de células claras, y

tumor maligno de Brenner (Ie-Ming y Kurman, 2005) (Tabla 2) correspondientes a diferentes tipos de epitelio en los órganos del tracto reproductor femenino (Ie-Ming y Kurman, 2004); mientras que los de tipo II se encuentran los carcinomas serosos de alto grado y los carcinosarcomas (Ie-Ming y Kurman, 2004).

Los tumores de cada categoría se subdividen en tres grupos: benignos, malignos e intermedios (o limítrofes) (Ie-Ming y Kurman, 2004).

<i>Cistadenoma seroso</i>	Se presentan con más frecuencia que los de tipo mucinoso y como regla general no alcanzan el tamaño de los tumores mucinosos. Es un quiste uni o multilocular, de paredes delgadas y de contenido acuoso, superficie lisa, en raras ocasiones con excrescencias papilares. La mayor parte de su superficie interna es lisa y puede contener un gran número de papilas. Son bilaterales de un 7 a 12%.
<i>Cistadenoma mucinoso</i>	Son los tumores ováricos de mayor tamaño (casos de 45 a 130 Kg.), en ocasiones bilaterales, son masas redondas u ovoides, con cápsula lisa, translúcida, de color gris azulado. El interior está dividido por tabiques o lóculos que contienen líquido mucinoso espeso y viscoso.
<i>Endometroide</i>	Pueden ser únicos o múltiples y con adherencias a la superficie. Contienen un líquido espeso color chocolate. Hay glándulas endometriales y estroma.
<i>Células claras</i>	Está formado por células de citoplasma claro y núcleos que con frecuencia ensanchan la célula hacia el ápice celular (núcleos en tachuela). Por lo general, es de alto grado de malignidad.
<i>Tumores de Brenner</i>	Generalmente son unilaterales, sólidos, fasciculados. Histológicamente está formado por brotes de epitelio de tipo transicional y un estroma fibroso denso, frecuentemente con calcificaciones distróficas. Los núcleos de las células epiteliales con frecuencia son hendidos (en granos de café). Por lo común son benignos, hay variedades malignas y limítrofes.

Tabla 2. Clasificación del tumor epitelial de ovario (Chen et al., 2003)

Cistadenoma seroso de ovario

Los cistadenomas son las neoplasias benignas ováricas con mayor incidencia, son poco frecuentes antes de los 25 años (Ie-Ming y Kurman., 2004), presentan pocas proyecciones papilares y sin áreas sólidas (Ie-Ming y Kurman, 2004).

Según la cubierta epitelial del ovario, los cistadenomas pueden dividirse en serosos y pseudomucinosos. (Henry *et al.*, 2002)

El cistadenoma seroso de ovario ha sido llamado también cistoma seroso o quiste simple del ovario (Islas *et al.*, 2003). Son tumores estromales epiteliales formados por células que se parecen a las que cubren las trompas de Falopio (Méndez, 2007). Su tamaño va desde 2.5cm hasta 25cm, por termino medio mide entre 10 y 15 cm., regularmente tiene pared delgada, muy vascularizada (Islas *et al.*, 2003). El cistadenoma seroso de ovario proviene del epitelio germinativo o superficial del ovario y aunque algunos aparecen de quistes de inclusión por invaginación epitelial, otros se inician en la superficie ovárica (Ie-Ming y Kurman, 2004).

El cistadenoma seroso de ovario por lo general es unilocular, pero puede tener cavidades múltiples las cuales presentan un líquido que varía desde muy claro, seroso, hasta un líquido turbio verdoso o rojo, por hemorragias recientes o antiguas. A veces el líquido tiene cierto carácter mucinoso debido a que el epitelio puede ser productor del moco (Islas *et al.*, 2003).

Macroscópicamente, el tumor seroso típico de ovario contiene uno o pocos quistes de paredes fibrosas de 10 a 15 cm., en promedio de diámetro, que alguna vez llegan incluso a los 40 cm. (Fernández *et al.*, 2003) (Fig. 4). El comportamiento biológico de los tumores serosos depende tanto del grado de diferenciación como de la localización. En cuanto al pronóstico, es más probable que los tumores serosos encapsulados de la superficie del ovario se extiendan a la superficie del peritoneo y el pronóstico está íntimamente relacionado con la imagen histológica del tumor y con su modelo de crecimiento en el peritoneo (Fernández *et al.*, 2003).

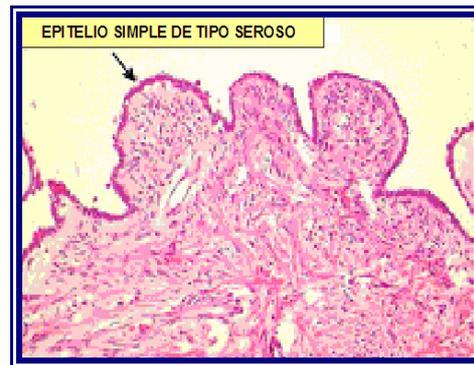


Fig. 4 Fotomicrografía de corte de ovario que muestra un epitelio tipo seroso de ovario. Tomada y modificada de (<http://anatpat.unicamp.br/lamgin16.html>).

Estudio histológico de cistadenoma seroso de ovario

El epitelio limitante del ovario con cistadenoma seroso presenta una pared quística fibrosa que puede ser desde cúbico hasta ligeramente cilíndrico siempre monoestratificado, con núcleos uniformes sin diferencias en volumen, situados más o menos al mismo nivel. Está implantado en una membrana basal bien definida bajo la cual hay fibras colágenas delicadas (Islas *et al.*, 2003).

Al corte del epitelio seroso, las paredes se colapsan liberando el líquido seroso, la cubierta interna presenta un aspecto liso y brillante, en algunos casos puede observarse la presencia de papilas verrugosas aplanadas constituidas por una porción central de tejido conectivo recubierta por una porción de epitelio cuboide parecido al que recubre el resto del quiste (Henry *et al.*, 2002).

Evolución del cistadenoma seroso de ovario

La evolución del cistadenoma seroso de ovario es lenta, benigna y no se disemina, a menos que se hayan desarrollado focos papilares hacia la superficie del ovario. Las excrescencias papilares implantadas en la superficie (hecho muy poco probable), pueden desprenderse e implantarse en la superficie peritoneal, crecer lenta o rápidamente, o permanecer latentes durante muchos años para crecer después bruscamente. Algunos autores han afirmado que los crecimientos papilares secundarios pueden regresar cuando la mayor parte del tumor primario es extirpado (Islas *et al.*, 2003).

En el 75% de los casos observados en cistadenomas serosos se ha observado una transición histológica hacia carcinomas serosos micropapilares no invasivos (MPSCs, por sus siglas en inglés) o hacia carcinomas serosos de bajo grado; de estos el 50% presentan características morfológicas de progresión tumoral (Ie-Ming y Kurman, 2004).

Por otro lado, se sospecha malignidad en los cistadenomas serosos si se llega a observar un elevado proceso de mitosis, la pérdida de polaridad celular y el hiper cromatismo nuclear (Islas *et al.*, 2003).

Los tumores serosos benignos ocurren con mayor frecuencia entre la cuarta y quinta década de vida. En más del 20% de los pacientes, los tumores serosos benignos son bilaterales, ocurriendo simultáneamente en ambos ovarios (Ie-Ming y Kurman, 2004).

El estudio del comportamiento de los cistadenomas puede ayudar a detectar marcadores moleculares involucrados en su aparición; de esta forma sería posible detectarlo de forma temprana evitando así su paso hacia tumor maligno que podría incluso causar la muerte de la paciente. Por esta razón es importante la investigación básica para diseñar métodos moleculares que nos lleven a rápido diagnóstico de lesiones premalignas.

Aspectos moleculares del cistadenoma seroso de ovario

Como se sabe, uno de los mayores retos en el estudio de neoplasias es generar perfiles genéticos con los que permitan establecer la relación entre los cambios moleculares y el comportamiento clínico así como la identificación de marcadores moleculares pronóstico, diagnóstico e incluso de respuesta a terapia (Lastra y Manrique, 2005).

Debido al formidable avance que ha experimentado la genética molecular en los últimos 25 años, se ha permitido descifrar mecanismos fundamentales de la acción de los genes y la codificación de los mismos, tanto para procesos fisiológicos, como para condiciones patológicas; lo que permite entender diversos procesos biológicos que participan en desarrollo celular normal y las alteraciones génicas que dan origen a una célula transformada (Lastra y Manrique, 2005).

Por otro lado, mediante los avances en genética molecular se ha abierto un camino para el desarrollo del poder funcional de la tecnología genómica; semejantes a microarreglos de ADN complementario (ADNc) (Guillen *et al.*, 2003), que hacen posible conocer la expresión génica en una única célula, comparar la expresión génica entre una célula sana y una enferma y también estudiar la expresión génica entre diferentes tejidos. (Romero *et al.*, 2005). Por otra lado, se cuenta con las técnicas de proteómica, mediante las proteínas identificadas en fluidos biológicos se detectan buenos y mejores biomarcadores que ayudan al diagnóstico, clasificación, pronóstico y búsqueda de nuevos blancos (Pimentel *et al.*, 2005).

Una vez encontradas las proteínas y los genes blanco de tumores, se necesita que sean validados; esta validación se puede llevar a cabo mediante hibridación *in situ* utilizando el RNAm o mediante inmunodetección en muestras de tejido clínico (Hidalgo *et al.*, 2003). Estas técnicas *in situ* ayudan a definir el rol de los blancos candidatos moleculares en el tejido, la distribución subcelular y las características clinicopatológicas de los pacientes. Sin embargo, comparado con las grandes tecnologías genómicas usadas en identificación de genes, el análisis de tejidos individuales basado en microscopia es una labor intensiva, cara y tardada (Nocito *et al.*, 2001).

Usando técnicas convencionales, la evaluación de docenas o cientos de marcadores en tejidos puede llevar meses o años, además de ser muy caro. Por otro lado el análisis de múltiples marcadores en secciones consecutivas del tumor puede rápidamente llevar a la pérdida de material ya que las muestras a estudio obtenidas son de tamaño muy limitado. El número de secciones puede ser cortado de un bloque de tumor para realizar análisis *in situ* limitando el número de biomarcadores evaluados de 20 a 30. Por lo antes mencionado es necesaria la búsqueda de nuevas técnicas aplicables a patología molecular (Nocito *et al.*, 2001).

El reciente desarrollo de la técnica de microarreglos de tejido ha experimentado un gran auge al proveernos de una herramienta que permite acelerar estudios *in situ* de especímenes de tejido, para poder explorar la asociación entre cambios moleculares y la información clinicopatológica y asegurar la preservación de la muestra (Hidalgo *et al.*, 2003).

Microarreglo

La palabra microarreglo se deriva del griego *mikro*; pequeño y del inglés *array*; distribución ordenada. La aplicación de los microarreglos se ha acrecentado enormemente en los últimos años y con ello los análisis genéticos en las investigaciones científicas (Guillen *et al.*, 2003).

Existen diferentes tipos de microarreglos según el tipo de material inmovilizado utilizado que abarcan metodologías muy variadas que van desde lo más sencillo hasta lo más sofisticado (Tabla 3) (Lizano, 2004)

Microarreglo de ácidos nucleicos	Esta herramienta de estudio de información genética tiene dos aplicaciones fundamentales; la secuenciación del ADN y el análisis de la expresión génica
Microarreglo de ADNc	<p>El ADNc es una molécula de ADN de cadena sencilla producida en el laboratorio usando ARN mensajero (ARNm) como un molde y transcripción reversa (sintetiza ADN a partir de ARN).</p> <p>Se utilizan pequeñas placas de cristal, en la cual se encuentran fijadas una gran cantidad de fragmentos de ADN (las longitudes de las secuencias son de 500 a 5000 bases), cada uno conteniendo una secuencia de nucleótidos que se utiliza como sonda para un gen específico. De esta manera es posible realizar miles de reacciones de hibridación en paralelo.</p>
Microarreglo de oligonucleótidos	Estos microarreglos tienen una precisión y densidad alta ya que usan oligonucleótidos de cadena sencilla cortos con una longitud de hasta 20 ó 25 nucleótidos.
Microarreglo de proteínas	Las sondas son anticuerpos de captura fijados al portaobjetos de vidrio, anticuerpos de detección fijados a la proteína, y los blancos son muestras de suero o tejido. Estos microarreglos permiten la detección, caracterización y cuantificación de las proteínas así como el estudio de su función y sus interacciones tanto entre diferentes proteínas como con otras moléculas como ADN o lípidos

Tabla 3. Tipos más comunes de microarreglos (Barrero, 2005; Lastra y Manrique, 2005; Lizano, 2004; Pimentel *et al.*, 2005).

Microarreglos de tejido

Un reciente desarrollo tecnológico muy versátil son los microarreglos de tejido (MAT) los cuales constan de un bloque de parafina que agrupa una gran cantidad de tejidos cilíndricos obtenidos de una muestra en estudio previamente fijada e incluida en parafina (Nocito *et al.*, 2001; Islas *et al.*, 2003) (Fig.5).

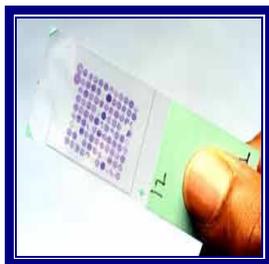


Fig.5. Microarreglo de tejido fijado en laminilla cargada. Tomada y modificada de <http://www.microarraystation.com/tissue-microarray/>

Los MAT facilitan el análisis de alteraciones moleculares de miles de muestras de tejido en estudio; por lo tanto, proporcionan la posibilidad de estudiar nuevos y mejores marcadores a los ya existentes debido a que nos lleva a una rápida visualización de blancos moleculares en miles de tejidos utilizados al mismo tiempo sin la necesidad de estudiar una a una las muestras de tejido repitiendo los ensayos y haciendo extensas validaciones (Nocito *et al.*, 2001; Islas *et al.*, 2003); por otra parte simplifican el diagnóstico diferencial entre muestras en estudio (primario, metástasis, etc.), clasificación de áreas de interés, pronóstico del estadio de la muestra a estudio (malignidad), seguimiento de estadios (alternativa de tratamiento) (Lastra y Manrique, 2005). A su vez, el microarreglo preserva las muestras originales de tejido y disminuye en cuantía su deterioro por el uso frecuente a diferencia de los métodos tradicionales. Esto a su vez nos permite facilitar y acelerar el traslado de la información obtenida a la práctica clínica (Nocito *et al.*, 2001; Islas *et al.*, 2003).

Otras de las ventajas del MAT son la simplicidad de su diseño y que su construcción puede realizarse de forma manual o mediante el uso de un microarreglador (Nocito *et al.*, 2001; Islas *et al.*, 2003).

Diseño de un microarreglo de tejido

Durante el proceso de diseño del MAT se produce la selección del tipo y cantidad de material biológico que se va incluir en el bloque de parafina, esto es, se define la muestra de estudio y su fondo o control. El número de muestras por arreglo puede depender del tamaño del orificio y la densidad deseada para realizar el arreglo ya que a menor tamaño de muestra de estudio el espacio dentro del bloque de parafina permitirá la introducción de mayor cantidad de muestras de estudio. Usando orificios de 0.6 mm. se puede construir arreglos de tejidos con 500 o más muestras, usando orificios de 2 mm. se pueden construir un arreglo de 50 a 100 muestras (Nocito *et al.*, 2001; Islas *et al.*, 2003) (Fig.6).

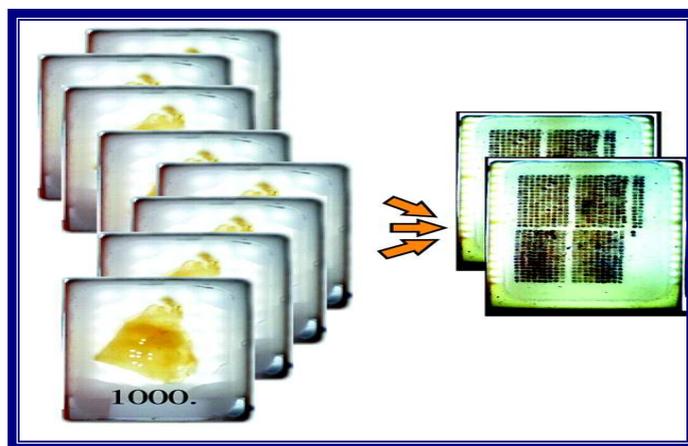


Fig. 6. Perforación y llenado del bloque receptor. Tomado y modificado de (Kallioniemi *et al.*, 2001).

En general las grandes empresas que comercializan los microarreglos son capaces de ofrecer mayores densidades de integración que las que se pueden alcanzar empleando los robots para la fabricación en el laboratorio de un microarreglo personalizado. Esto tiene la ventaja de estudiar un gran número de muestras al mismo tiempo, pero, puede ser una desventaja tener muestras de tejido tan diminutas ya que una mayor área de estudio arroja resultados con mayor validez (Kallioniemi *et al.*, 2001).

Sea cual sea la forma en que se construya el microarreglo de tejido su utilidad es la misma en cada caso, por ejemplo, se pueden llevar a cabo ensayos mediante técnicas inmunohistoquímicas o de hibridación *in situ*, en

sus diferentes variantes como la de revelado enzimático o bien fluorescente. Un único ensayo o reacción de hibridación *in situ* proporciona así información de todos los especímenes de la laminilla a la vez, reproduciéndose de igual manera las condiciones del ensayo para todas las muestras. Las zonas de especial interés en la pieza donante son analizadas y marcadas de forma convencional en tinciones de Hematoxilina-Eosina (H-E) (Kallioniemi *et al.*, 2001) (Fig. 7).

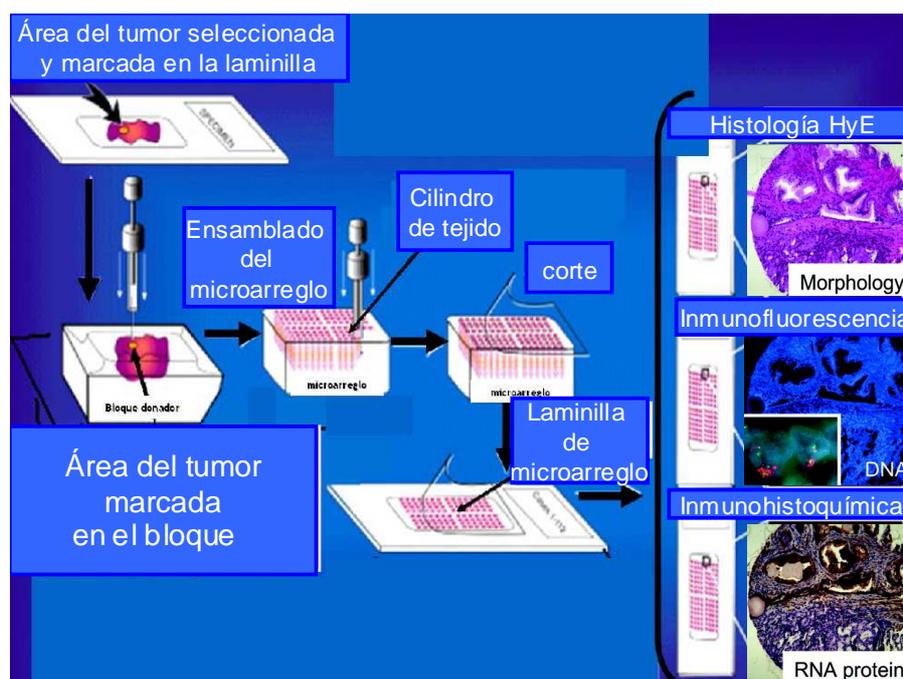


Fig. 7. Diagrama de flujo del proceso de diseño de un microarreglo de tejido. Tomado y modificado de Tissue microarrays basics, 2007.

Construcción de un microarreglo de tejido

Mediante un aparato semiautomatizado llamado microarreglador (Tissue *arrayer*) de cada bloque que presente el tejido de interés pueden ser tomadas muestras de 0,6 ó 1 mm. de diámetro e incluidas a modo de matriz en un nuevo bloque receptor de parafina que fue previamente hecho por el interesado, en este bloque se realizan secciones de 2 a 5 micras para cada laminilla (Hidalgo *et al.*, 2003) (Fig. 8).

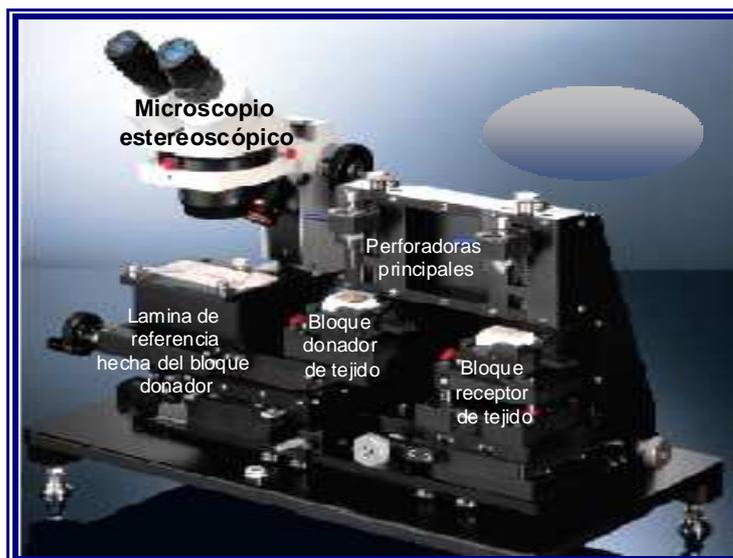


Fig. 8 Microarreglador. Tomada y modificada de Biocompare, 2007

Secciones de varios arreglos de tejidos pueden ser usados simultáneamente para análisis *in situ* hasta de 1000 muestras de tejido tanto para ADN, ARN y concentraciones de proteínas (Guillen *et al.*, 2003).

El uso de microarreglos de tejido proporciona velocidad en el trabajo, permite determinar el tamaño y el número de muestras, además de contar con instrumentos de alta precisión (Hidalgo *et al.*, 2003)

Planteamiento del problema

En México el cáncer de ovario ocupa el tercer lugar como causa de mortalidad, del total de casos que presentan cáncer de ovario, aproximadamente el 90% son de origen epitelial. Por esta razón, en los últimos años se ha mostrado un gran interés en investigar la epidemiología del cáncer de ovario.

Debido al número de genes involucrados en la aparición del cáncer es necesaria la búsqueda e identificación de posibles marcadores moleculares que necesitan la validación masiva de los mismos, para esta validación se crearon herramientas que permiten el análisis de cientos o miles de muestras en una misma ocasión; una de las técnicas utilizadas para esta búsqueda de marcadores moleculares es la elaboración de un microarreglo de tejidos embebidos en parafina el cual permita el uso de análisis *in situ* en varias muestras (tejidos) bajo las mismas condiciones. De ahí el interés de realizar un microarreglo de tejidos como herramienta para permitir un rápido y efectivo análisis de muestras de ovario normal y lesiones benignas (cistadenoma seroso).

Hipótesis

La mortalidad del cáncer de ovario se debe, básicamente, al diagnóstico de la enfermedad en fases avanzadas, siendo la única neoplasia ginecológica de esta importancia en la que el diagnóstico precoz no ha avanzado en los últimos años.

El diseñar y construir un microarreglo de tejido de ovario normal y lesiones benignas (cistadenoma seroso) de ovario, permitirá el análisis masivo de muestras en estudio, para eventualmente determinar la presencia de genes sobreexpresados en este tipo de tejido, lo cual facilitará y acelerará el traslado de la información obtenida hacia la práctica clínica.

Objetivos

A. Objetivo general

- Realizar el diseño y construcción manual de 6 microarreglos de tejido de ovario normal y 6 microarreglos de cistadenoma serosos de ovario.

B. Objetivos particulares

- Elaborar una base de datos sistematizada que relacione a la muestra con los datos clínicos.
- Identificar el área de interés en la muestra en estudio (tejido de ovario sin alteraciones histológicas y de cistadenoma serosos de ovario) mediante la técnica de tinción hematoxilina- eosina
- Identificar las características morfológicas que diferencian un epitelio ovárico sin alteraciones histológicas y un epitelio ovárico con cistadenoma seroso.
- Elaborar un banco de tejidos de ovario.

Métodos

Material biológico

Del departamento de Anatomía Patológica del Hospital General de México se obtuvieron 50 biopsias históricas de cistadenoma seroso de ovario y 44 biopsias de epitelio normal de ovario (control negativo); dichas biopsias se obtuvieron ya incluidas en parafina.

Base de datos

Se realizó una búsqueda de datos en libros de Quirúrgica y Biopsias, con autorización de la biblioteca del Hospital General de México, esta información se utilizó para formular una base de datos correspondiente a cada paciente a estudiar. Para la base de datos se tomó en cuenta lo siguiente: número de biopsia para la localización del bloque; la edad del paciente y el diagnóstico clínico. Esta información es de utilidad para tener un parámetro que indique los posibles factores asociados al problema en estudio.

Sección o corte

A partir de los bloques de parafina se procedió a cortar una muestra de tejido por cada uno obteniendo un total de 94 laminillas. Los cortes histológicos se realizaron de cinco micras con un micrótopo rotativo (marca Leica, RM2125), después fueron colocados en baño de flotación que contiene agua corriente y gelatina bacteriológica a temperatura de 48° C para ser extendidos. Los cortes histológicos se adhirieron a un portaobjetos, asignándoles su número de folio con un lápiz diamante sobre un extremo de la laminilla.

Las laminillas fueron colocadas en unas canastillas y posteriormente se introdujeron al horno (marca Surgical & Electrical, LK30) a temperatura de

70° C para desparafinar los tejidos. Terminado este proceso, se pasaron a dos recipientes que contenían xilol (marca Merck) permaneciendo 5 minutos en cada uno. Posteriormente los tejidos se deshidrataron a diferentes concentraciones de alcoholes (100°, 96°, 70°, 30°, marca HYL A) de forma descendente permaneciendo 5 minutos en cada baño hasta llegar a agua destilada.

Tinción. Técnica hematoxilina-eosina

Las laminillas fueron sumergidas en hematoxilina de Harris (al 70 %, en alcohol; marca HYL A) durante 30 segundos, el exceso de colorante se retiró con agua destilada frenando la acción del diferenciador; para obtener el vire de color se utilizó agua amoniacal.

Una vez observado el vire en la coloración, la laminilla se sumergió en Eosina (Sigma) durante un minuto, posteriormente se procedió a la deshidratación del tejido en baños de alcohol ascendentes comenzando con una concentración de 30°, 70°, 96°, 100° por 5 minutos cada uno. Finalmente el tejido se aclaró en dos baños de xilol de 5 minutos cada uno.

Montaje

Ya deshidratado el tejido se fijó de modo permanente con permount (resina sintética, marca Termo Electron) el cual no solo sirvió para unir el tejido al cubreobjetos; esta resina lo que hace es entrar a la célula, evitando que se introduzcan moléculas de agua con lo que se mantiene la arquitectura de la célula y del tejido. De esta forma se almacenó sin el riesgo de que el tejido se descomponga, se rompa o se deshaga.

Diseño y construcción del microarreglo de tejidos

Para iniciar el diseño de los 12 microarreglos de tejido se realizó la base de datos ordenando los tejidos por antigüedad.

A continuación se diseñan los nuevos bloques de parafina (marca Kendall), hechos con un molde especial para altas y bajas temperaturas; estos bloques fueron horadados con un cilindro, el número de horadaciones fue correspondientes al número de muestras a incrustar, en forma de matriz de puntos equiespaciados, a manera de coordenadas, en el eje de las X del microarreglo de tejido se colocó el número de la columna; en el eje de las Y se colocó una letra que representa cada una de las filas del microarreglo. En la parte inferior del bloque de parafina se colocó la clave o el nombre del tejido que se está colocando en el microarreglo, de esta forma se facilitó la localización de cada muestra dentro del microarreglo de tejido así como diferenciar un microarreglo de otro, tanto entre tejidos como entre replicas (Fig. 10).

Posteriormente, de las biopsias de ovario embebidas en parafina se obtuvieron las áreas de interés (epitelio sin alteraciones, epitelio con cistadenoma seroso) mediante el uso de un cilindro. En forma ordenada por filas se introdujeron cada uno de los cilindros de tejido en su respectiva horadación del nuevo bloque (Fig. 10).

Cada nuevo bloque tiene la capacidad de recibir 25 tejidos, por lo que 2 bloques sumaron las 50 muestras de ovario con cistadenoma seroso y 2 bloques sumaron las 44 muestras de tejido de ovario normal. De cada bloque se hicieron 2 más para tener replicados biológicos de cada una de las muestras.

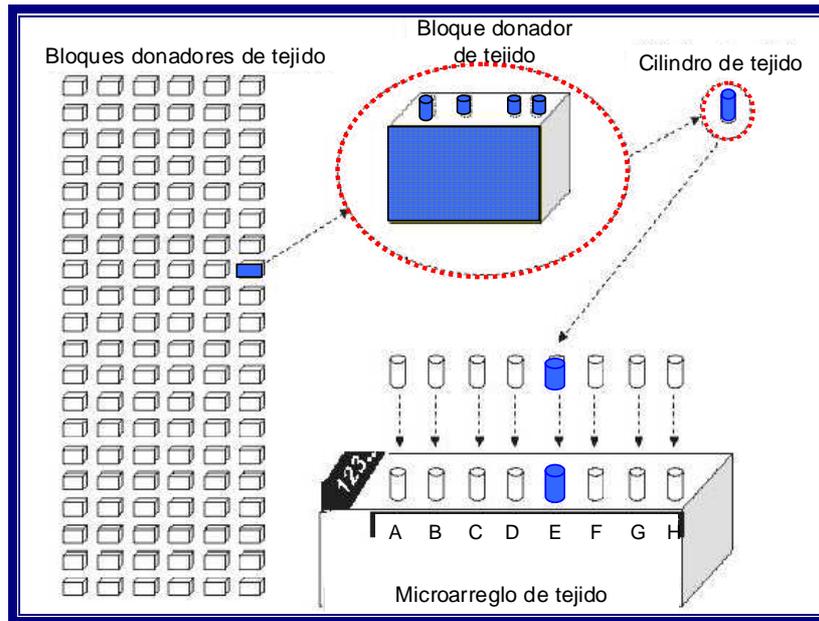


Fig. 10 Acomodo de tejido en forma de matriz. Tomado y modificado de (www.gen-es.org)

Resultados

➤ **Elaboración de una base de datos sistematizada que relacione a la muestra con los datos clínicos.**

En México el cáncer de ovario a tomado aproximadamente 1, 684 víctimas en los últimos años, el 90% de estos casos tuvo origen epitelial de los cuales el 20% es de tipo seroso (Romero *et al.*, 2005); por esto se ha tomando en cuenta la necesidad de tener una base de datos de mujeres mexicanas que presentaron cistadenoma seroso, como uno de los posibles precursores del cáncer de ovario. Eventualmente estos datos serán de utilidad para encontrar factores que estén fuertemente ligados a la aparición de esta enfermedad.

A demás se realizó la búsqueda de ovario sin alteraciones histológicas como control negativo al momento de empezar investigaciones usando los microarreglos construidos.

Basándome en la información recabada en la biblioteca de Patología del Hospital General, se realizó una base de datos que agrupa datos clínicos como: el número de biopsia, la edad de la paciente, el diagnóstico, número de expediente y las coordenadas que permitan localizar cierto tejido dentro del microarreglo. En primera instancia esta base de datos sirvió para la localización del bloque en el banco de tejidos de Patología (Tabla 4 Y 5).

Tabla 4. Base de datos. Biopsias históricas de cistadenoma seroso de ovario.

AÑO	BIOPSIA	EDAD	DIAGNOSTICO	EXPEDIENTE	COORDENADAS	OBSERVACIONES
B-99-	308-C	15	CISTADENOMA SEROSO	464608	A-1	LADO NO ESPECIFICADO
	909-C	40	CISTADENOMA SEROSO	100969	A-2	OVARIO IZQUIERDO
B-01-	14535-B	40	CISTADENOMA SEROSO	766078	A-3	OVARIO IZQUIERDO
	15557	S/EDAD	CISTADENOMA SEROSO	789190	A-4	OVARIO DERECHO
	3989-A	32	CISTADENOMA SEROSO	738850	A-5	OVARIO DERECHO
	11875-B	29	CISTADENOMA SEROSO *	771548	B-1	OVARIO DERECHO
	11681-F	39	CISTADENOMA SEROSO *	740231	B-2	OVARIO DERECHO
	21644	53	CISTADENOMA SEROSO	138901	B-3	OVARIO DERECHO
	21232	30	CISTADENOMA SEROSO	15874	B-4	OVARIO IZQUIERDO
	1540	35	CISTADENOMA SEROSO	01-1540	B-5	OVARIO IZQUIERDO
	21965-A	S/EDAD	CISTADENOMA SEROSO	S/E	C-1	OVARIO DERECHO
	15172	S/EDAD	CISTADENOMA SEROSO	603348	C-2	OVARIO DERECHO
	380	S/EDAD	CISTADENOMA SEROSO	S/E	C-3	LADO NO ESPECIFICADO
	1866-A	S/EDAD	CISTADENOMA SEROSO	689290-00	C-4	LADO NO ESPECIFICADO
	11724-B	45	CISTADENOMA SEROSO *	363492198	C-5	OVARIO IZQUIERDO
	13092	42	CISTADENOMA SEROSO	734686	D-1	OVARIO IZQUIERDO
	11259-B	32	CISTADENOMA SEROSO	S/E	D-2	LADO NO ESPECIFICADO
	11436-A	26	CISTADENOMA SEROSO	EXTERNO	D-3	LADO NO ESPECIFICADO
	3220-D	33	CISTADENOMA SEROSO	709405	D-4	OVARIO IZQUIERDO
	3604-A	41	CISTADENOMA SEROSO	5975	D-5	OVARIO IZQUIERDO

	19430-E	S/EDAD	CISTADENOMA Seroso	795753	E-1	OVARIO DERECHO
	15481-A	42	CISTADENOMA Seroso	793113	E-2	OVARIO DERECHO
	16879-E	49	CISTADENOMA Seroso	550878	E-3	OVARIO DERECHO
	15820	22	CISTADENOMA Seroso	787326	E-4	OVARIO DERECHO
	2425-E	45	CISTADENOMA Seroso	112	E-5	OVARIO DERECHO
	11259-B	32	CISTADENOMA Seroso	S/E	A-1	LADO NO ESPECIFICADO
B-04-	17170-B	17	CISTADENOMA Seroso	1157534	A-2	LADO NO ESPECIFICADO
	7159-B	54	CISTADENOMA Seroso	41026	A-3	OVARIO DERECHO
	450-A	31	CISTADENOMA Seroso	1063024	A-4	OVARIO DERECHO
	7598-A	23	CISTADENOMA Seroso	1120244	A-5	LADO NO ESPECIFICADO
	9890-I	43	CISTADENOMA Seroso	41122	B-1	OVARIO DERECHO
	9886-A	28	CISTADENOMA Seroso	468225	B-2	OVARIO DERECHO
	174-D	43	CISTADENOMA Seroso	03--4263	B-3	LADO NO ESPECIFICADO
	1326	38	CISTADENOMA Seroso	157965	B-4	OVARIO DERECHO
	12731	S/EDAD	CISTADENOMA Seroso	1087024	B-5	LADO NO ESPECIFICADO
	6568-F	36	CISTADENOMA Seroso	04-1139	C-1	LADO NO ESPECIFICADO
	9603-D	45	CISTADENOMA Seroso	04/1368	C-2	OVARIO DERECHO
	12710-B	31	CISTADENOMA Seroso	90804	C-3	LADO NO ESPECIFICADO
	6569-B	48	CISTADENOMA Seroso	1119205	C-4	LADO NO ESPECIFICADO
	11436-A	S/EDAD	CISTADENOMA Seroso	S/E	C-5	LADO NO ESPECIFICADO
	11690-B	18	CISTADENOMA Seroso	1125012	D-1	LADO NO ESPECIFICADO
	7828	30	CISTADENOMA Seroso	41041	D-2	LADO NO ESPECIFICADO
	071-A	S/EDAD	CISTADENOMA Seroso	S/E	D-3	LADO NO ESPECIFICADO
	14434-A	27	CISTADENOMA	S/E	D-4	OVARIO DERECHO

		SEROSO			
9978-C	39	CISTADENOMA Seroso	04/609	D-5	OVARIO DERECHO
19430-E	27	CISTADENOMA Seroso	931601	E-1	LADO NO ESPECIFICADO
17134-F	43	CISTADENOMA Seroso	42881	E-2	AMBOS OVARIOS
4982-A	45	CISTADENOMA Seroso	1076155	E-3	OVARIO DERECHO
4611-A	38	CISTADENOMA Seroso	976969	E-4	LADO NO ESPECIFICADO
B- 05-	4712-A 30	CISTADENOMA Seroso	1329250	E-5	OVARIO DERECHO

Nota. * Papilar.

Tabla 5. Base de datos. Biopsias históricas de ovario sin alteraciones histológicas.

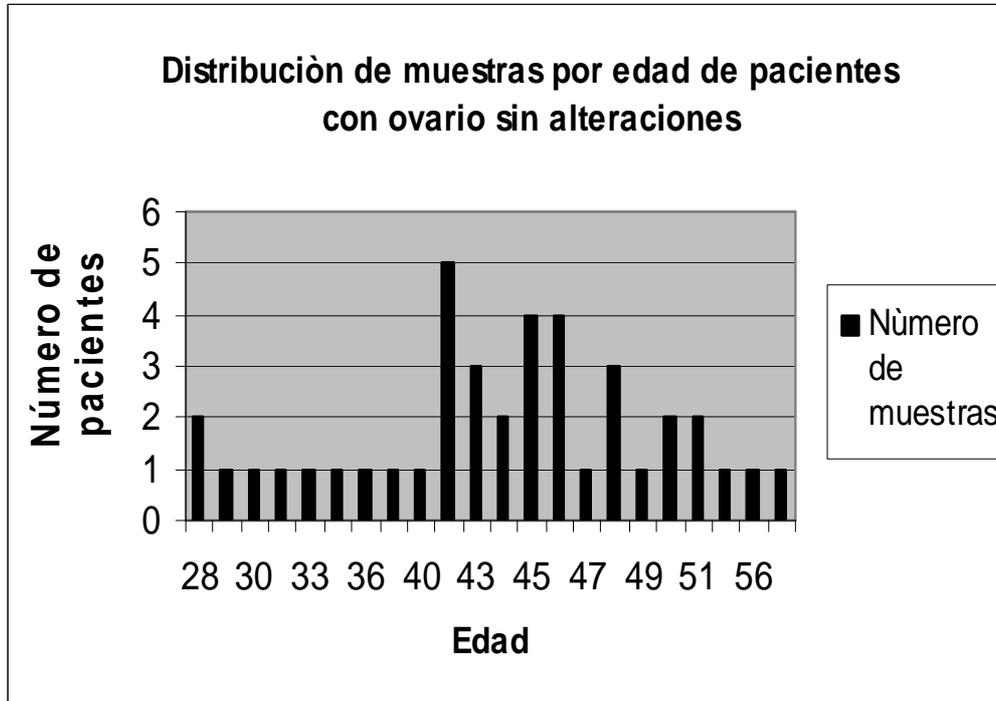
AÑO	BIOPSIA	EDAD	DIAGNOSTICO	EXPEDIENTE	COORDENADAS	OBSERVACIONES
B-90-	446 H	60	OVARIO SIN ALTERACIONES	1274762	A1	OVARIO IZQUIERDO
	1842E	45	OVARIO SIN ALTERACIONES	96851	B1	OVARIO IZQUIERDO
	1182F	45	OVARIO SIN ALTERACIONES	1295632	C1	AMBOS OVARIOS
	602 C	51	OVARIO SIN ALTERACIONES	1286647	D1	OVARIO DERECHO
	13134E	48	OVARIO SIN ALTERACIONES	S/E	E1	AMBOS OVARIOS
	12922N	42	OVARIO SIN ALTERACIONES	84--211	A2	OVARIO IZQUIERDO
	974A	34	OVARIO SIN ALTERACIONES	1299378	E1	OVARIO DERECHO
	1774H	46	OVARIO SIN ALTERACIONES	90273	E2	OVARIO DERECHO
	602D	51	OVARIO SIN ALTERACIONES	1286647	D2	OVARIO IZQUIERDO
B-00-	5996F	42	OVARIO SIN ALTERACIONES	00--537	E2	OVARIO IZQUIERDO
B-01-	8057E	30	OVARIO SIN ALTERACIONES	S/E	A3	OVARIO IZQUIERDO
	8058E	43	OVARIO SIN ALTERACIONES	S/E	B3	OVARIO IZQUIERDO
	6150Y	33	OVARIO SIN ALTERACIONES	1333	C3	OVARIO IZQUIERDO
	5299 I	46	OVARIO SIN ALTERACIONES	S/E	D3	OVARIO IZQUIERDO
	6797V	56	OVARIO SIN ALTERACIONES	724017/a	E3	OVARIO IZQUIERDO
	6151G	S/EDAD	OVARIO SIN ALTERACIONES	S/E	A4	OVARIO IZQUIERDO
	11361E	45	OVARIO SIN ALTERACIONES	472832	B4	OVARIO DERECHO
	5981D	32	OVARIO SIN ALTERACIONES	S/E	C4	OVARIO DERECHO
	11227E	49	OVARIO SIN ALTERACIONES	5749	D4	OVARIO DERECHO

B-04-	16985C	44	OVARIO SIN ALTERACIONES	1128341	E4	OVARIO DERECHO
	16913G	48	OVARIO SIN ALTERACIONES	2718	A5	OVARIO DERECHO
	9083F	50	OVARIO SIN ALTERACIONES	1103171	B5	OVARIO IZQUIERDO
	9114A	42	OVARIO SIN ALTERACIONES	1121343	C5	OVARIO IZQUIERDO
	10516N	54	OVARIO SIN ALTERACIONES	41055	D5	OVARIO IZQUIERDO
	9449F	40	OVARIO SIN ALTERACIONES	41160	E5	OVARIO IZQUIERDO
	10317F	43	OVARIO SIN ALTERACIONES	51516	A1	OVARIO DERECHO
	10046A	28	OVARIO SIN ALTERACIONES	31265	B1	OVARIO IZQUIERDO
	5113S	42	OVARIO SIN ALTERACIONES	04--502	C1	OVARIO IZQUIERDO
	8887A	36	OVARIO SIN ALTERACIONES	1116799	D1	AMBOS OVARIOS
	4983E	38	OVARIO SIN ALTERACIONES	973584	E1	OVARIO IZQUIERDO
	5147E	46	OVARIO SIN ALTERACIONES		A2	OVARIO IZQUIERDO
	10046B	28	OVARIO SIN ALTERACIONES		B2	OVARIO DERECHO
	4093D	44	OVARIO SIN ALTERACIONES	34685	C2	OVARIO DERECHO
	14680J	50	OVARIO SIN ALTERACIONES	1559/04	D2	AMBOS OVARIOS
	5147F	46	OVARIO SIN ALTERACIONES	982440	E2	OVARIO DERECHO
	13226E	48	OVARIO SIN ALTERACIONES	930891	A3	OVARIO IZQUIERDO
B-05-	1276D	S/EDAD	OVARIO SIN ALTERACIONES	342786	B3	OVARIO IZQUIERDO
VACIO	VACIO	VACIO	VACIO	VACIO	C3	VACIO
B-90-	1897 J	45	OVARIO SIN ALTERACIONES	90--304	D3	OVARIO IZQUIERDO
B-01-	8060E	47	OVARIO SIN ALTERACIONES	S/E	E3	OVARIO IZQUIERDO
B-01-	11875B	29	OVARIO SIN ALTERACIONES	771548	A5**	LADO NO ESPECIFICADO
B-04-	071A	S/EDAD	OVARIO SIN ALTERACIONES	S/E	B5**	LADO NO ESPECIFICADO
B-04-	17134	43	OVARIO SIN ALTERACIONES	42881	C5**	LADO NO ESPECIFICADO

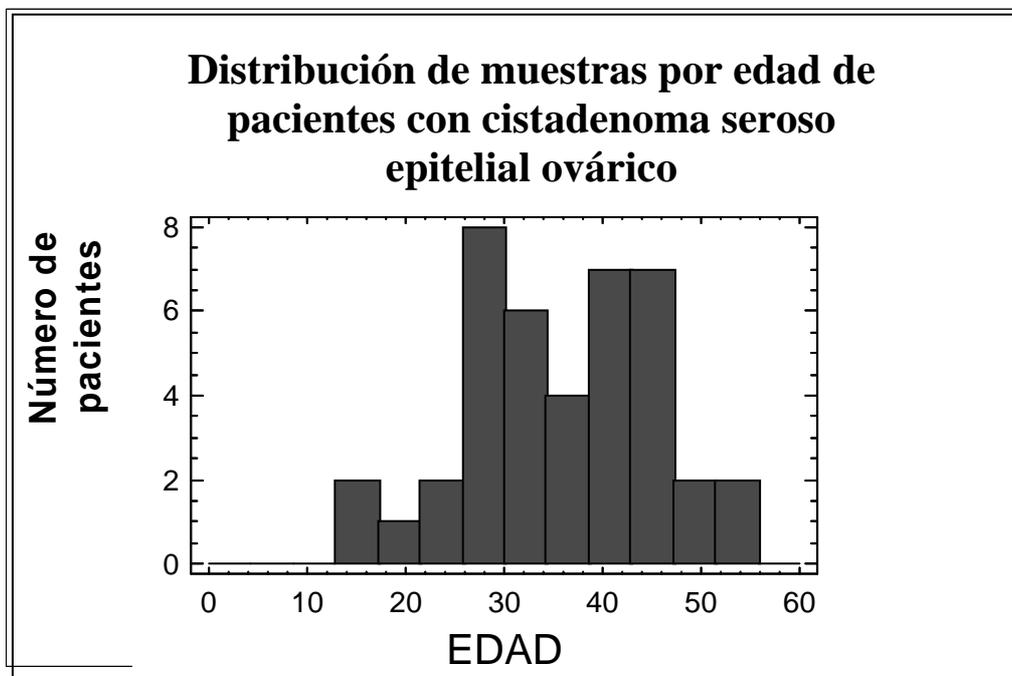
B-01-	13092	42	OVARIO SIN ALTERACIONES	734686	D5**	LADO NO ESPECIFICADO
B-04-	7598	S/EDAD	OVARIO SIN ALTERACIONES	1120244	E5**	LADO NO ESPECIFICADO

Nota. ** Epitelio sin alteraciones tomado de bloque que presenta cistadenoma seroso de ovario.

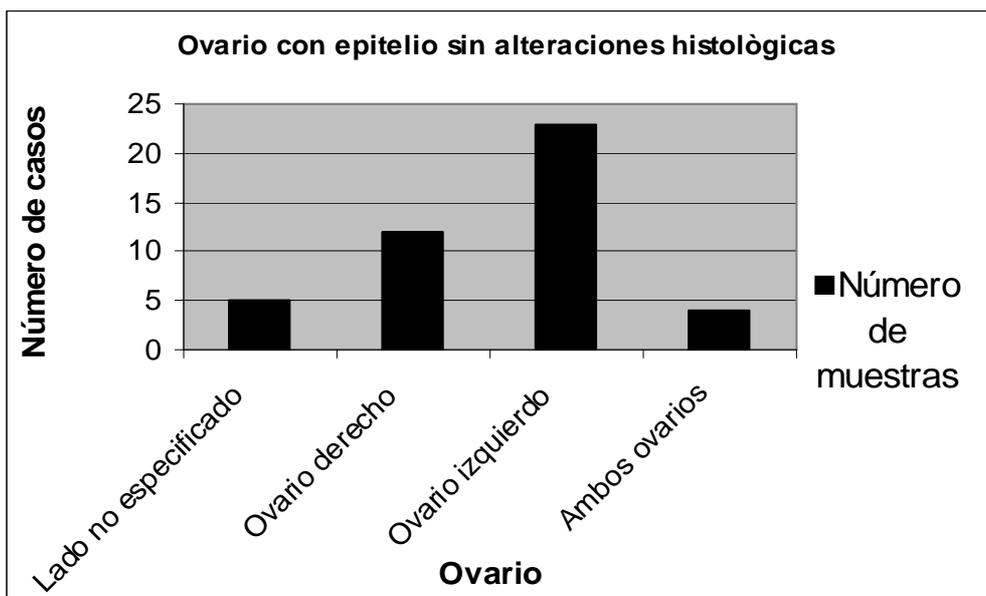
Posteriormente, con la base de datos terminada se realizaron gráficas que representan los datos obtenidos para compararlos con los consultados en la bibliografía (Grafica 1).



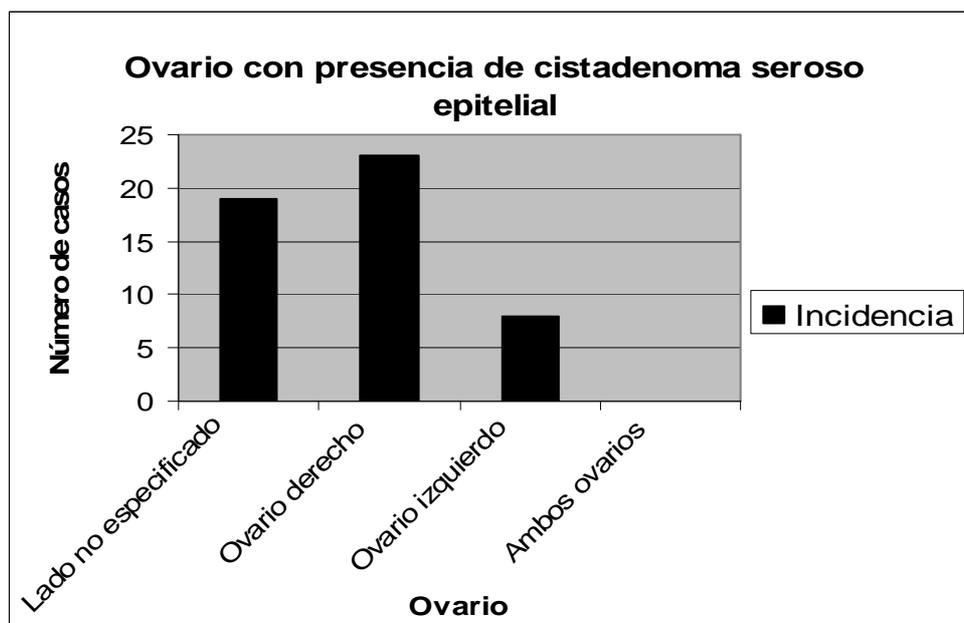
(A)



(B)



(C)



(D)

Grafica 1. Grafica de columnas obtenida a partir de la base de datos. A) en promedio se observa que el cistadenoma seroso se presenta con mayor frecuencia a la edad de 34 años. B) en esta grafica se muestra que la mayoría de los datos se encuentra en un rango de 28.3 a 42 años

con una $p = 0.000000$, totalmente significativa C) el ovario de lado derecho presenta mayor número de casos con cistadenoma seroso. D) el ovario de lado izquierdo parece tener mayor resistencia a la aparición de esta enfermedad.

Con la base de datos terminada, se obtuvieron los tejidos del archivo de patología.

De los cortes histológicos se obtuvieron 94 laminillas en total:

- 50 laminillas pertenecientes a tejido de ovario con presencia de cistadenoma seroso epitelial y
- 44 laminillas con tejido de ovario sin alteraciones epiteliales.

➤ **Identificación del área de interés en la muestra en estudio (tejido de ovario normal y de cistadenoma serosos de ovario) mediante la técnica de tinción hematoxilina- eosina**

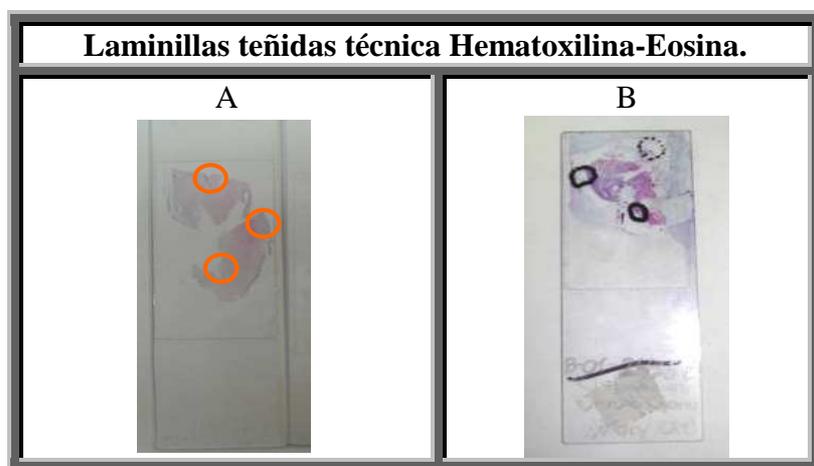


Fig. 11. Técnica de tinción hematoxilina- eosina (H-Y). A) laminilla con un corte de ovario sin alteraciones histológicas. B) laminilla con un corte de ovario con cistadenoma seroso. El núcleo celular se observa de color azulado (hematoxilina), la medula, la corteza y la membrana basal se observan de color rosado (eosina).

- **Identificar las características morfológicas que diferencia un ovario normal y un ovario que presenta cistadenoma seroso.**

Como se mencionó en la metodología, estos cortes fueron sometidos a la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina para poder diferenciar los epitelios morfológicamente (Fig. 12).

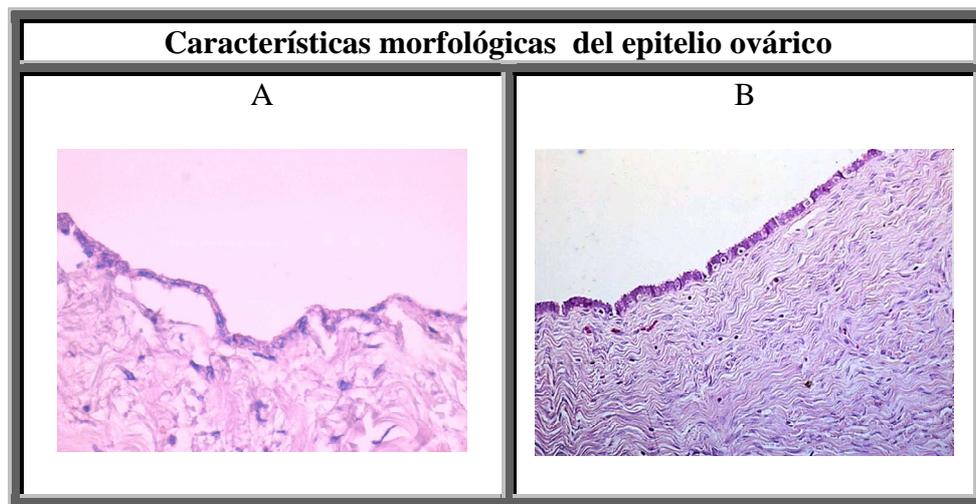


Figura 12. Cortes vistos al microscopio a un aumento de 10x. A) Tejido epitelial si alteraciones histológicas; núcleo bien definido y célula cúbica. B) Tejido epitelial seroso; núcleo ligeramente más grande y célula cilíndrica.

➤ **Elaboración de un banco de tejidos de ovario.**

Con los tejidos necesarios se diseñaron y construyeron en total 12 microarreglos de ovario con 25 muestras de tejido cada uno; 6 microarreglos pertenecientes a ovario con presencia de cistadenoma seroso epitelial y 6 microarreglos de ovario sin alteraciones histológicas epiteliales (Fig. 13A).

Para confirmar que los microarreglos presentan epitelio sin alteraciones y epitelio seroso respectivamente, se le realizó un corte a cada microarreglo y se sometió a tinción hematoxilina-eosina (Fig. 13B).

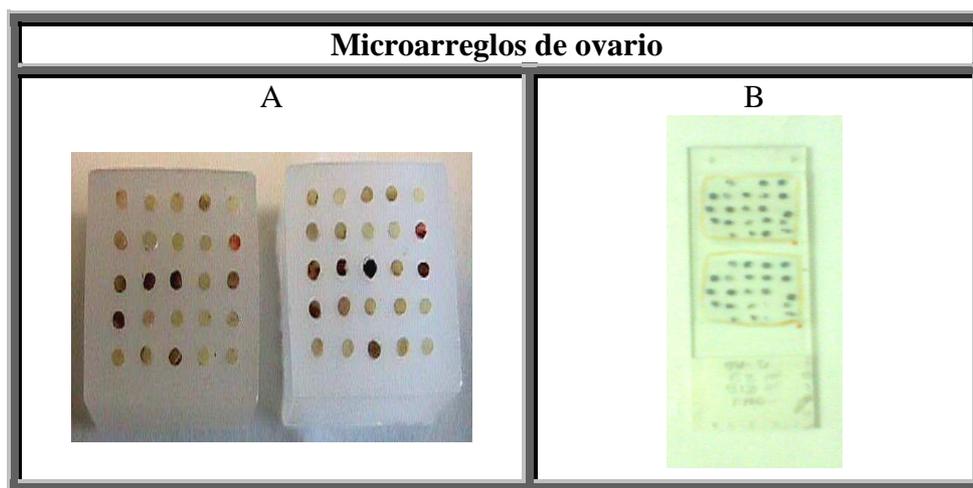


Figura 13. A) Dos de los microarreglos contruidos a partir de muestras de ovario de pacientes mexicanas.

B) corte de un microarreglo de tejido de ovario; teñido y montado en la laminilla.

Al observar el corte del microarreglo de biopsias de ovario con cistadenoma seroso al microscopio se observaron regiones como el núcleo,

la membrana basal, el epitelio ovárico y en ocasiones lisis de las células epiteliales (Fig. 14).

Cistadenomas serosos epiteliales de ovario

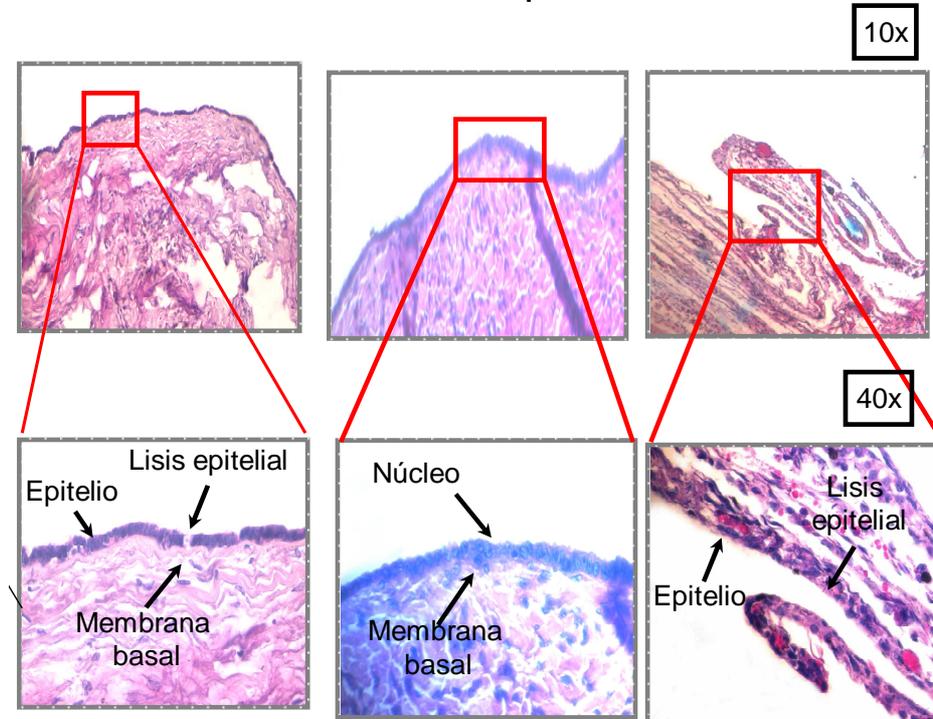


Figura 14. Epitelio ovárico visto a aumentos de 10x y 40x

- ➔ Núcleo
- ➔ Epitelio con cistadenoma seroso
- ➔ Membrana basal
- ➔ Lisis celular

Al observar el corte del microarreglo de biopsias de ovario sin alteraciones epiteliales al microscopio se observaron regiones como el núcleo, la membrana basal y el epitelio ovárico (Fig.15).

Epitelio de ovario sin alteraciones histológicas

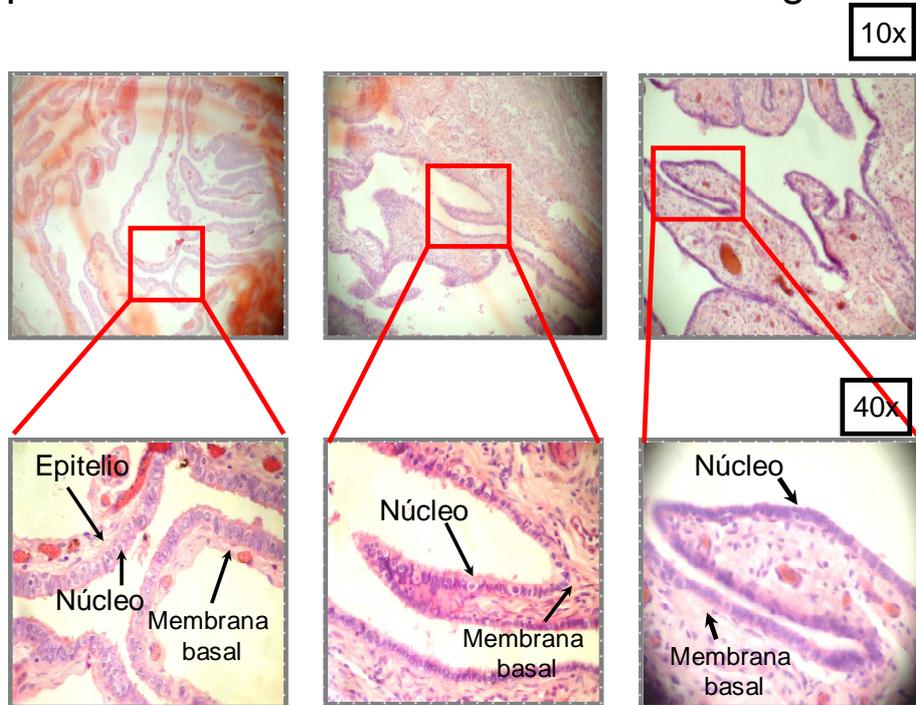


Fig. 15. Epitelio ovárico visto a diferentes aumentos 10x y 40x

- Núcleo
- Epitelio sin alteraciones histológicas
- Membrana basal

Discusión

Diseño y construcción de microarreglos

El diseño y la construcción de los 12 microarreglos de tejido de ovario se fundamentó en el trabajo de Nocito, 2001, siguiendo un patrón de coordenadas X (números), Y (letras). Para ordenar estos tejidos dentro del microarreglo se optó por acomodarlos de acuerdo a su antigüedad, iniciado con el año 1990 en cuanto a tejidos sin alteraciones y 1999 en tejidos con presencia de cistadenoma seroso de ovario.

Se consideraron 25 muestras incluidas por microarreglo de dimensiones de 0.5 mm siguiendo las observaciones de Islas *et al* 2003, donde dice que un área mayor de tamaño nos arroja resultados con mayor significancia y validez.

Una vez teniendo el microarreglo de tejido, es de gran utilidad para aplicar técnicas *in situ* que nos ayuden buscar e identificar gran número de genes blanco en cantidades considerables como lo menciona Lastra *et al*, 2005, por lo que a cada uno de los 6 microarreglos originales se le realizó un duplicado para poder seguir trabajando con los mismos tejidos en varias investigaciones.

Base de datos

La base de datos realizada concuerda con lo citado por Romero *et al* año 2005 en cuanto al promedio de edad con mayor número casos de tumores de ovario, se mencionan la edad de 35 años; el promedio de edades de las 50 biopsias de mujeres mexicanas incluidas en el microarreglo promediaron una edad de 34.38 años como pico máximo de incidencia de cistadenoma seroso de ovario.

Si se analizan los datos obtenidos de forma independiente también coincide con Romero *et al* año 2005 en el punto donde menciona que aproximadamente a los 50 años se comienza a elevar el número de casos de tumores ováricos. En la base de datos de pacientes mexicanas obtenida en este trabajo indica que el mayor número de incidencias se presenta alrededor de los 45 años de edad.

Por otro lado notamos que el cistadenoma seroso en el epitelio ovárico suele presentarse con mayor frecuencia en el ovario de lado derecho.

Identificación del área epitelial en la muestra en estudio.

El área en estudio se identificó mediante la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina (H-Y), ésta técnica facilita la distinción morfológica de la célula.

Debido a que la hematoxilina es basófila tiñe los ácidos nucleicos de la célula por lo que es fácil observar los núcleos celulares del ovario, los cuales se tiñen de una coloración azulada; al utilizar en conjunto la tinción con eosina, se crea un contraste que facilita observar las diferencias morfológicas entre las estructuras del tejido. La eosina al ser ácidofila no es asimilada por los ácidos nucleicos por lo que permite distinguir otras estructuras como por ejemplo, la membrana basal.

Identificación de las características morfológicas entre un ovario sin alteraciones histológicas y uno que presenta cistadenoma seroso.

Tomando en cuenta lo observado por Stevens y Lowe en el 2006 se pudieron identificar las diferencias morfológicas en nuestras muestras de ovario; en el caso del ovario sin alteraciones se observaron áreas como: la membrana basal, el epitelio en forma cuboidal, núcleos homogéneos y localizados al mismo nivel.

En el caso de los ovarios con cistadenoma seroso se observaron áreas como: la membrana basal, el epitelio de forma cilíndrica, núcleos un poco alargados y en ocasiones se pudieron distinguir las fisuras epiteliales y las invaginaciones quísticas.

Banco de tejidos

Con la construcción de los 12 microarreglos se inicia el banco de tejidos de ovario de mujeres mexicanas, cuya utilidad abre paso a nuevas investigaciones a nivel masivo, permitiendo resultados únicos y exclusivos de nuestro país.

Conclusión

- Se realizó el diseño y construcción de 6 microarreglos de tejido de ovario normal y 6 microarreglos de cistadenoma serosos de ovario.
- Se elaboró una base de datos sistematizada que relaciona a la muestra con los datos clínicos.
- Se utilizó la técnica de tinción Hematoxilina-eosina para identificar el área de interés de las muestras en estudio.
- Se identificaron las características morfológicas que diferencian un ovario normal de un ovario que presenta cistadenoma seroso.
- Se elaboró un banco de tejidos de ovario de pacientes mexicanas.

Una forma de lograr avances y encontrar respuestas a mayor escala en cuanto a la prevención y tratamiento del cáncer de ovario se encuentra en la construcción de los microarreglos de tejido ya que al miniaturizar las muestras se puede trabajar con un mayor número de ellas, sin necesidad de invertir mucho tiempo, se evita desperdiciar muestra y se tiene la misma validez que trabajando con la muestra en estudio en su totalidad.

Perspectivas

El cáncer de ovario sigue siendo un peligroso enemigo potencial de la salud y de la vida de cualquier mujer. Lamentablemente muchos casos de cáncer de ovario se diagnostican tardíamente y los tratamientos en las etapas avanzadas curan a muy pocas pacientes. A pesar de que el cáncer de ovario ha cobrado un gran número de víctimas en nuestro país, no se le ha puesto la suficiente atención en la investigación de esta enfermedad tan ampliamente como se esperaría. Por esta razón los microarreglos construidos serán utilizados para la búsqueda de blancos moleculares que permitan llegar a un diagnóstico clínico precoz evitando en lo posible la aparición de esta enfermedad.

Bibliografía

- Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al.(2003) Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American Journal Human Genetic*, **72**(5), 1117–1130.
- Chen V. W., Ruiz B., Killen J. L., Coté T. R., Wu X. C., Correa C. N. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*. **15**; 97(10 Suppl):2631-2642.
- Domarus AV, Valentí PF, Rozman C. (1992) Medicina Interna. Duodécima edición. Ediciones Doyma, pp. 1992;2121
- Fernández V, Acuña F, Recuay P, Arce K, García N, Marco M. (2003) Cistoadenoma seroso gigante *Gynecological and. Obstetric*,; **49** (1) : 63-66
- Gallardo M, Faúndez PJ, Cruz A, Rodríguez M, Álvarez ZM, Carvallo SQP. (2004) Determinación de una mutación en el gen BRCA-1 en una familia que presenta cáncer de mama hereditario *Revista Médica de Chile*. 132: 203-210
- Ganon W.F., (1995) Fisiología médica editorial El manual moderno, México; pp. 1521.
- Gonzales BJ., Gonzales MJ. (2000) Ginecología Oncológica. Segunda edición. Editorial Masson. Barcelona. pp. 331-335
- Gonzáles MJ, Gonzáles BJ, Gonzáles BE. (2003)Ginecología. Octava edición. Editorial Masson. Barcelona. pp. 592
- Guillén I., Torres E., Fernández J. R.(2003) Tecnología, análisis y aplicaciones de los Bio-arreglos *Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Subdirección de Investigaciones Biomédicas*. 20:77-84

- Henry NF., Rock J., Oppenheimer E., Egozcue CJ. (2002) Sistema reproductor. Editorial Masson. pp. 197-198
- Hidalgo A, Piña P, Guerrero G, Lazos M, Salcedo M. (2003) A simple method for the construction of small format tissue arrays. *Journal Clinical Pathology*. 56:144-146
- Hirsh-Yechezkel G, Chetrit A, Lubin F, Friedman E, Peretz T, Gershoni R, et al. (2003) Population attributes affecting the prevalence of BRCA mutation carriers in epithelial ovarian cancer cases in Israel. *Gynecology and Oncology*, **89**(3), 494–498.
- <http://saludycomunicacion.com/blog/?p=283>
Consultado el 10 de abril de 2007
- http://www.natureduca.com/anat_funcreprod_ovulac.php
Consultado el 13 de abril de 2007
- <http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/imagenes/fem1.jpg&imgrefurl=http://www.anatomohistologia.uns.edu.ar/plantilla>.
Consultado el 13 de abril de 2007
- <http://anatpat.unicamp.br/lamgin16.html>
Consultada el 23 de abril de 2007
- www.gen-es.org
Consultada el 23 de abril de 2007
- <http://www.microarraystation.com/tissue-microarray/>
Consultada el 29 de abril de 2007
- http://tmaj.pathology.jhmi.edu/doc/manual/TMA_Basics.html
Consultado el 29 de abril de 2007
- Ie-Ming Shih, Kurman R. J. Molecular Pathogenesis of Ovarian Borderline Tumors: New Insights and Old Challenges (2005) *Human Cancer Biology*; 7279 **11**(20)7.
- Ie-Ming Shih, Kurman R. J. Ovarian tumorigenesis. A proposed model based on morphological and molecular genetic analysis (2004) *American journal of pathology*; **164**(5):1511-8.

- INEGI (2005). Estadísticas vitales, base de datos. Consultado en <http://inegi.gob.mx>
- Islas D. LP. , Cardiel MLE, Ortiz A M del R, Chávez GCI (2003). Cistoadenoma gigante de ovario en una recién nacida. *Revista Mexicana de Pediatría*. Pp. 70
- Isselbacher KJ, Braunwald E, Wilson JD, Martin JB, Fauci AS, Kasper DL. (1994) Principios de medicina interna. 13ª edición. Vol. II. Ediciones Interamericana Mc Graw Hill. 2137
- Kallioniemi OP., Wanger U., Kononen J., Sauter G. (2001) Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human molecular genetics*. **10**(7):657-662
- Lastra GL; Manrique AC, (2005) Microarreglos: herramienta para el conocimiento de las enfermedades *revista colombiana de reumatología*. Colombia. 263-267.
- Lizano L. F. (2004) Fundamentos moleculares en medicina. Editorial Manual moderno. Pp. 321-279
- Loman N, Johannsson O, Kristoffersson U, Olsson H, Borg A. Family history of breast and ovarian cancers and BRCA1 and BRCA2 mutations in a population-based series of early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001, **93**(16), 1215–1223
- Margossian AL y Margossian M. (2001) Patrones Genéticos de predisposición en Cáncer de mama. *Sociedad Argentina de Mastología*. **20** (67); 25.
- Méndez HMC. (2007) Regulación del desarrollo del epitelio superficial del ovario por factores de crecimiento y hormonas”. [consulta:24 de abril de 2007] Disponible en: [www.facmed.unam.mx/deptos/embrio/LinInv.html#epitelio superficial](http://www.facmed.unam.mx/deptos/embrio/LinInv.html#epitelio%20superficial)
- Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. (2001) Tissue microarrays (TMAs) for throughput molecular pathology research, *Journal of Cancer*. 94, 1-5

- Parkin DM, Pisani P., Ferlay J (1999) Global cancer statics. *Cancer Journal Clinic*; 49:78-79
- Pimentel PE., Ortiz MAR., Breña M. (2005) Tópicos de genética. Editorial Sifa. pp. 270
- Oliva VR., Ballesta F., Orida J., Claria J., (2004) Genética médica. Tercera edición. Editorial Barcelona. Pp. 219-222
- Romero GG, Naves SJ, Horma LA, Aspe LCJ, Molina RR, Ponce PAL. (2005) Factores asociados al cáncer de ovario *Ginecología y Obstetricia*. 73:611-7
- Stevens A, Lowe JS. (2006) Histología Humana. Tercera edición. Editorial Elsevier Mosby. Madrid. Pp. 356-357.